

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet



Jadranka M. Miletić Vukajlović

**Ispitivanje zavisnosti lipidnog sastava
plazme i parametara lipidne peroksidacije
od stadijuma i dužine trajanja Parkinsonove
bolesti i primene terapije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade
Faculty of Pharmacy



Jadranka M. Miletić Vukajlović

**ANALYSIS OF PLASMA LIPID
COMPOSITION AND LIPID
PEROXIDATION PARAMETERS
ACCORDING TO STAGE AND
DURATION OF PARKINSON'S DISEASE
AND APPLIED THERAPY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

Prof. dr Aleksandra Stefanović

vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Dunja Drakulić

naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Članovi komisije:

Prof. dr Marina Svetel

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Dr Snežana Pejić

viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Prof. dr Tihomir Ilić

redovni profesor, Univerzitet odbrane, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Velike stvari u životu mogu se ostvariti samo uz nesebičnu pomoć i podršku ljudi koji nas okružuju. Izrada ove doktorske disertacije predstavljala je za mene dug put, pun uspona i padova, prepun izazova, nadanja, velikim uložnim radom i trudom... Život je nebrojano puta stavljao velike izazove koje sam iznela zahvaljujući nemerljivom bogatstvu koje posedujem - velikim prijateljima, kojima ću pokušati na ovim stranicama da iskažem zahvalnost koju osećam.

Mojim dragim fakultetskim mentorkama, prof. dr Aleksandri Stefanović i bivšoj mentorki prof. dr Marini Stojanov iskazujem veliku zahvalnost što su mi svojim dobronamernim savetima pomogle da napredujem u svakom pogledu kroz vreme koje smo provele zajedno tokom izrade ove doktorske disertacije.

Mojoj Institutskoj mentorki, dr Dunji Drakulić dugujem neizmernu zahvalnost za sve godine zajedničkog rada, za sve reči podrške i ohrabrenja da istrajem u svom radu, nesebično utrošenom vremenu kako bih se usavršavala kako na profesionalnom, tako i na ličnom polju.

Dr Snežani Pejić se iskreno zahvaljujem što je bila „mentor iz senke“ tokom celokupne izrade ove doktorske disertacije, što je uvek bila tu da pomogne, posavetuje i pruži podršku. Pored koje sam naučila da je svaki problem rešiv i da život uvek nagradi dobre ljude.

Mojim dragim mentorkama se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći koju su mi pružale tokom izrade ove doktorske disertacije, hvala im što sam pored njih odrasla i sazrela, spremna da dalje koračam u neke nove životne izazove znajući da će one uvek biti tu za mene, kao i ja za njih.

Prof. dr Marini Svetel i prof. dr Tihomiru Iliću se iskreno zahvaljujem na velikoj pomoći oko prikupljanja uzoraka, što su jednom biohemičaru „otvorili vrata“ svojih ordinacija i upoznali me sa kliničkom praksom doprinoseći i proširujući time moje znanje, kao i na nesebičnoj i prijateljskoj pomoći, podršci i savetima tokom svih faza rada.

Svim članovima komisije se zahvaljujem i na korisnim sugestijama i savetima prilikom pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svom osoblju Klinike za neurologiju KCS, kao i odeljenju Funkcionalne neurologije i Laboratoriji za toksikologiju, VMA na pruženoj pomoći.

Dragim kolegama i kolegamicama (sadašnjim i bivšim) iz laboratorije za fizičku hemiju i molekularnu biologiju se zahvaljujem na velikoj kolegijalnosti, prijateljstvu i pomoći koju su mi pružili tokom svih godina rada u Institutu za nuklearne nauke “Vinča”.

Mojoj velikoj prijateljici dr Jovani Pantović dugujem zahvalnost za sve sate koje je provela pomagajući i bodreći, čak i onda kada je ponestajalo snage, volje i energije.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici, sestrama, porodici i prijateljima čija ljubav i razumevanje su mi dali snagu da ovako veliki posao dovedem do kraja. Dugujem im neizmernu zahvalnost na toplim rečima ohrabrenja i podrške, strpljenju, veri da mogu sve.

†Prof dr Ismetu Hodžiću koji me je uveo u svet nauke, čoveku koji je verovao... Nadam se da bi bio ponosan.

Mojoj nesebičnoj podršci, pokretaču, neiscrpnom izvoru energije i ljubavi, neizmernoj podršci, osobi koja je od mene stvorila čoveka - mojoj majci Mariji.

Mom voljenom suprugu Bošku, životnom saputniku koji je moj pokretač pored koga rastem i postajem bolja, jača, snažnija, uz čiju bezgraničnu ljubav, bezrezervnu podršku i snagu nebo više nije granica.

Stoga vama, voljeni moji je posvećena ova doktorska disertacija.

Ispitivanje zavisnosti lipidnog sastava plazme i parametara lipidne peroksidacije od stadijuma i dužine trajanja Parkinsonove bolesti i primene terapije

IZVOD

Parkinsonova bolest (PB) je hronična neurodegenerativna bolest koja nastaje usled poremećaja multiplih neurotransmitera, između kojih prednjači nedostatak dopamina u delu mozga u kome se nalaze centri za izvođenje voljnih pokreta. Iako je PB predmet mnogobrojnih dugogodišnjih istraživanja, tačna etiopatologija je nepoznata. Pretpostavlja se da je pored različitih faktora, jedan od ključnih uzročnika njenog nastanka i progresije prekomerna produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta i narušen kapacitet njihovog uklanjanja koje mogu pokrenuti kaskadu promena i izazivati oštećenja biomolekula, poput proteina i lipida.

Cilj ovog istraživanja bio je da se identifikuju potencijalni biomarkeri za evaluaciju stanja pacijenata obolelih od PB praćenjem promena parametara oksidativnog stresa (OS) (prooksidativni-antioksidativni balans (PAB), produkti oksidovane modifikacije proteina (AOPP), 4-hidroksinonenal (HNE), malondialdehid (MDA)), odnosa intenziteta pikova fosfatidilholina (PC) i lizofosfatidilholina (LPC), kao i parametara antioksidativne (AO) zaštite (superoksid dizmutaza (SOD), katalaze (CAT) i glutationa (GSH)) u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika (pola, starosti, Hoehn i Yahr (H&Y) stadijuma i dužine trajanja bolesti). Takođe, proučavan je i efekat terapije na ispitivane parametre. Studija je obuhvatila ispitanike, kontrole i pacijente sa PB utvrđenom prema dijagnostičkom kriterijumu *UK PB Society Brain Bank Research criteria*. Promene parametara OS i AO zaštite kod 111 ispitanika (20 kontrola i 91 pacijenta) su praćenje pomoću spektrofotometrijskih metoda i imunoblot tehnikom, dok je lipidni profil kod 35 ispitanika (10 kontrola i 25 pacijenata) određivan MALDI TOF (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time Of Flight*) masenom spektrometrijom što ujedno predstavlja prvo ispitivanje PC/LPC inteziteta kod pacijenata sa PB.

Analiza ispitivanih parametara ukazuje na povećan nivo svih OS parametara, kao i poremećenu AO zaštitu i narušen lipidni profil pacijenata sa PB, ali i na njihovu vezu sa kliničko-patološkim karakteristikama. Sa druge strane, uticaj doze i tipa terapije nije uočen ni na jednom od ispitivanih parametara.

Dobijeni rezultati sugerišu da se ispitivani parametri OS i AO zaštite mogu koristiti kao potencijalni markeri u evaluaciji stanja pacijenata obolelih od PB, dok uočene promene PC/LPC intenziteta pikova mogu poslužiti kao jedan od prvih koraka u karakterizaciji lipidnog profila pacijenata sa PB kao pokazatelji strukturnih lipidnih rekonfiguracija.

KLJUČNE REČI:

Parkinsonova bolest, parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, odnos intenziteta pikova fosfatidilholina i lizofosfatidilholina, kliničko-patološke karakteristike, levodopa

NAUČNA OBLAST:

Medicina, Neurologija, Biohemija

UŽA NAUČNA OBLAST:

Biohemija

UDK broj: 616.858:[577.115:546.21(043.3)

Analysis of plasma lipid composition and lipid peroxidation parameters according to stage and duration of Parkinson's disease and applied therapy

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease associated with alteration of multiple neurotransmitters, including dopamine deficiency, in the brain region responsible for voluntary movement. Although PD has been subject of many studies over the years, the underlying etiopathology still remains unknown. PD onset and progression might be a consequence of the overproduction of reactive oxygen and nitrogen species and impaired capacity for their removal that could initiate a cascade of events and induce damage of biomolecules, including proteins and lipids.

The aim of current study was to identify potential biomarkers for the evaluation of patients with PD by monitoring changes of oxidative stress (OS) parameters (pro-oxidant-antioxidant balance (PAB), advanced oxidized protein products (AOPP), 4-hydroxynonenal (HNE), malondialdehyde (MDA)), phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPC) peak intensity ratios, along with antioxidant (AO) defence parameters (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione (GSH)) and their relation to clinical and pathological characteristics (such as gender, age at examination, duration of the disease, and Hoehn and Yahr (H&Y) score). Furthermore, the effect of therapy (dose and type) on the examined parameters was also studied. The study included controls and patients with PD determined by the diagnostic criteria of the UK PB Society Brain Bank Research criteria. Changes in parameters of OS and AO defence in 111 subjects (20 controls and 91 patients) were monitored using spectrophotometric methods and immunoblot technique, while the lipid profile in 35 subjects (10 controls and 25 patients) was determined by MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time Of Flight) mass spectrometry which represents the first attempt to investigate PC/LPC intensity ratio in plasma of PD patients.

The obtained results revealed the increased levels of investigated OS parameters along with an altered AO defence response and impaired lipid profile of PD patients and their relationship with clinic-pathological characteristics. Moreover, dose and type of therapy had no influence on any investigated parameter.

According to presented results, investigated parameters of OS and AO defence might be used to evaluate the condition of PD patients, while the observed changes of PC/LPC intensity might serve as one of the first steps in characterizing the lipid profile of PD patients being a mark of structural lipid reconfigurations.

KEYWORDS:

Parkinson's disease, parameters of oxidative stress and antioxidative defence, phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine intensity ratio, clinico-pathological features, levodopa

SCIENTIFIC FIELD:

Medicine, Neurology, Biochemistry

SCIENTIFIC SUBFIELD:

Biochemistry

UDK number: 616.858:[577.115:546.21(043.3)]

Skraćenice

*GSSG – diglutatiil anjon radikal
*NO₂⁻ – azot-dioksid radikal
*O₂⁻ – superoksid anjon radikal
*OH – hidroksil radikal
*RS – tiil radikal
¹O₂ – singlet kiseonika
8-OHdG – 8-hidroksideoksiguanozin
AB – Alchajmerova bolest
AO – antioksidativno
AOPP – produkti oksidovane modifikacije proteina
ATP – adenzin trifosfat
C – ugljenik
CAT – katalaza
CHCA – eng. *α-cyano-hydroxy-cinamic acid*
CNS – centralni nervni sistem
COMT – katehol-O-metiltransferaza
CRP – C-reaktivni protein
CST – cerebroskinalna tečnost
CuZn – bakar cink
DA – dopamin
dH₂O – destilovana voda
DHB – 2,5-dihidroksibenzoinske kiseline
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
eNOS – endotelna azot oksid sintaza
ESI – elektrosprej jonizacija
ESR – elektron spin rezonanca
FAST - fragment analiza i strukturni TOF
GLM – generalni linearni model
GR – glutation-reduktaza
GS – glutatiil radikal
GSH – glutation
GSH-Px – glutation peroksidaza
GSSG – oksidovani glutation

H&Y – Hoehn i Yahr
H₂O – voda
H₂O₂ – vodonik peroksid
Hb – hemoglobin
HB – Huntingtonova bolešt
HDL – lipoproteinske čestice velike gustine
HNE – 4-hidroksinonenal
HNO₂ – nitritna kiselina
HOCl – hipohlorna kiselina
HRO₂[•] – hidroperoksil radikal
HSA – humani serum albumin
KMB – krvno moždana barijera
LDL- lipoproteinske čestice male gustine
L-dopa – levo dopa
LED – L-dopa ekvivalent doze
LID – levodopa indukovana diskinezija
LN – Levijevi neuriti
LO[•] – alkoksil radikal
LOH – lipidni aldehid
LOOH – lipidni peroksid
LPL – lizofosfolipid
LPO – lipidna peroksidacija
LT – Levijeva telašca
M²⁺ – redukovani metal
M³⁺ – oksidovani metal
MALDI – masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa
MAO-A – monoaminoksidaza A
MAO-B – monoaminoksidaza B
MDA – malondialdehid
Mn – mangan
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
N₂O₃ – dinitrogen trioksid
N₂O₄ – dinitrogen tetrahlorid

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH – nikotinamid adenin fosfat dinukleotid
NF- κ B – Nuklearni Faktor-kapa B
NMDA – N-metil-D-aspartat
NO⁻ – nitrozonijum anjon
NO⁺ – nitrozonijum katjon
NO[•] – azot-monoksid radikal
NO₂Cl – nitril hlorid
OD – optička gustina
ONOO⁻ – peroksi nitrit
OS – oksidativni stres
PAA – poliakrilamid
PAB – prooksidativni-antioksidativni balans
PARP – poli (ADP-ribozna) polimeraza
PB – Parkinsonova boleost
PC – fosfatidilholin
PI – fosfatidiletanolamin
PKC – protein kinaze C
PL – fosfolipidi
PNMK – polinezasićene masne kiseline
PSD – eng. *post-source decay*
PVDF – polivinilidendifluorid
R[•] – alkil radikal
RAV – reaktivne ayotne vrste
REM – eng. *rapid-eye movement*
RKV – reaktivne kiseoniočne vrste
RO[•] – alkoksil radikal
RO₂[•] – peroksil radikal
ROOH – organski peroksidi
ROONO – alkil peroksinitrit
RT – sobna temperatura (eng. *room temperature*)
SD – standardna devijacija
SNpc – lat. *substantia nigra pars compacta*
SOD – superoksid dizmutaza

TAC – ukupni AO kapacitet

TBK – tiobarbituranska kiselina

TCEP – tris (2-karboksietil) fosfin

TOF – vreme preleta

UH – ukupni holesterol

Sadržaj

1. Uvod.....	20
1.1 Parkinsonizam i Parkinsonova bolest	21
1.2 Patofiziologija Parkinsonove bolesti	22
1.3 Klinička slika Parkinsonove bolesti.....	24
1.4 Simptomi.....	25
1.4.1 Motorni simptomi.....	25
1.4.1.1 Tremor u miru	25
1.4.1.2 Bradikinezija	26
1.4.1.3 Rigiditet.....	27
1.4.1.4 Posturalna nestabilnost.....	28
1.4.2 Nemotorni simptomi.....	28
1.5 Tok Parkinsonove bolesti.....	29
1.6 Dijagnostikovanje Parkinsonove bolesti.....	30
1.7 Faktori rizika i mehanizmi nastanka	31
1.8 Oksidativni stres	32
1.8.1 Oštećenja biomolekula pod uticajem slobodnih radikala.....	33
1.8.1.1 Oksidacija proteina.....	33
1.8.1.2 Modifikacija DNK.....	33
1.8.1.3 Lipidna peroksidacija	33
1.8.1.3.1 4-hidroksinonenal.....	37
1.8.1.3.2 Malondialdehid.....	38
1.9 Antioksidativna zaštita.....	39
1.9.1 Superoksid dizmutaza.....	40
1.9.2 Katalaza	41
1.9.3 Glutation	42
1.10 Uloga komponenti oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u patogenezi Parkinsonove bolesti	43
1.11 Uloga lipida u pojavi i progresiji neurodegenerativnih bolesti.....	44
1.12 Terapija za Parkinsonovu bolest	45

2	Ciljevi	48
3	Materijali i metode	50
3.1	Materijali.....	51
3.2	Metode	51
3.2.1	Ispitanici	51
3.2.2	Uzorkovanje krvi i priprema uzoraka.....	53
3.2.3	Priprema uzoraka za određivanje lipidnog profila	54
3.2.4	Priprema uzoraka iz pune krvi za analizu parametara AO zaštite i merenje koncentracije hemoglobina	54
3.3	Određivanje parametara oksidativnog stresa	54
3.3.1	Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB).....	54
3.3.2	Detektovanje produkata oksidativne modifikacije proteina (AOPP)	56
3.3.3	Određivanje koncentracije hidroksinonenala	56
3.3.4	Određivanje koncentracije tiobarbiturne kiseline reagujućih supstanci (TBARS)	57
3.4	Određivanje lipidnog profila/statusa masenom spektrometrijom zasnovanom na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa.....	57
3.5	Metode za određivanje ispitivanih parametara antioksidativne zaštite	59
3.5.1	Merenje aktivnosti superoksidaze (SOD).....	59
3.5.2	Merenje aktivnosti katalaze (CAT)	60
3.5.3	Merenje koncentracije glutationa (GSH).....	60
3.6	Određivanje koncentracije proteina	61
3.7	Elektroforeza proteina i kvantifikacija proteina Western blot metodom.....	62
3.7.1	Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	62
3.7.2	„Western blot“ analiza.....	63
3.8	Određivanje ukupne dnevne L-dopa ekvivalentne doze (LED) kod pacijenata obolelih od PB	64
3.9	Statistička obrada podataka.....	65
4	Rezultati	66

4.1	Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na kontrole.....	68
4.1.1	Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od PB u odnosu na kontrole	68
4.1.2	Lipidni profil plazme kontrolne grupe i pacijenata sa PB.....	70
4.1.3	Promena ispitivanih parametara antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od PB u odnosu na kontrole	73
4.2	Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti ...	75
4.2.1	Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika.....	75
4.2.2	Promena ispitivanih parametara antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika.....	82
4.2.3	Promena PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika.....	88
4.3	Uticaj terapije na promene ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti	90
4.4	GLM analiza	98
4.5	Promena ekspresije ispitivanih enzima antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na kontrole	101
5	Diskusija.....	103
6	Zaključci.....	117
7	Literatura.....	120
8	Prilozi.....	142

Uvod

1.1 Parkinsonizam i Parkinsonova bolest

Parkinsonizam je klinički sindrom koji se odlikuje promenama na nigrostrijatnim dopaminergičkim neuronima. Nastaje usled poremećaja u pražnjenju dopaminergičkih sinapsi, smanjenja osetljivosti receptora dopamina (DA) u strijatumu, promena koje se dešavaju na strukturnom nivou (kao što su različiti tumori, hidrocefalus) ili usled procesa degeneracije dopaminergičkih projekcija ili samog strijatuma. U kliničkom smislu, primarno prepoznata kao oboljenje poremećaja pokreta, parkinsonizam se uobičajeno manifestuje kombinacijom simptoma: tremor pri mirovanju, rigiditet (ukočenost), bradikinezija (usporenost pokreta), poremećaj refleksa ravnoteže (posturalnih), semifleksioni stav tela i srazmerno ređe motorne blokade pri kretanju (tzv. *freezing*). Prisustvo najmanje dva od navedenih simptoma je neophodno za dijagnostikovanje ovog sindroma [1].

Parkinsonizam se na osnovu etiologije same bolesti deli na: primarnu ili idiopatsku Parkinsonovu bolest (PB)¹, sekundarni ili stečeni (simptomatski, koji nastaje usled dejstva poznatog faktora), nasledni (hereditarni), atipični parkinsoni sindromi („parkinsonizam plus” sindromi u kojima se pored parkinsonizma identifikuju i drugi neurološki poremećaji kojih nema u PB poput ranih autonomnih poremećaja, cerebelarnih i piramidnih znakova, poremećaja pokretljivosti bulbusa, rane demencije, amiotrofije i dr.), i parkinsonizam u okviru heredo-degenerativnih bolesti kao deo složenije kliničke slike.

Posle Alchajmerove bolesti (AB), PB je drugo po učestalosti neurodegenerativno oboljenje, koje pogađa u proseku 1% svetske populacije starije od 55 godina [3]. Tačna etiologija PB nije u potpunosti razjašnjena i nepoznat je uzrok otpočinjanja odumiranja dopaminergičkih neurona. Iako do sada nisu definisani glavni faktori rizika za dobijanje idiopatske PB, starenje predstavlja najbitniji i najkonkretniji faktor rizika [4]. Iako se PB javlja sporadično u većini slučajeva, postoje dokazi o uticaju genetske predispozicije i spoljašnjih faktora poput izloženosti toksičnim i infektivnim supstancama [4,5].

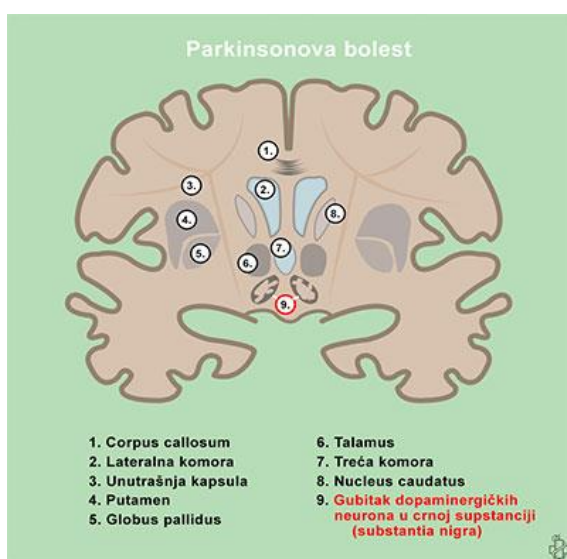
Najčešće se javlja kao bolest starije populacije, mada se PB može javiti i u svim životnim dobima. Na osnovu skorašnjih meta-analiza, ukupna učestalost PB je 315 na

¹ Bolest je dobila ime po lekaru Džejmusu Parkinsonu (James Parkinson), koji je prvi put pisao o simptomima bolesti u svojoj knjizi „Rasprava o drhtavoj paralizi” 1817 godine [2].

100 000 ljudi, s tim što se sa godinama (u starosnoj grupi 60-69 godina) broj obolelih povećava na 428, dok u starosnoj grupi 80 godina i više, učestalost doseže 1903 [6]. Prevalencija bolesti kod muškaraca (65,5 na 100 000 ljudi po godini) je veća u odnosu na žene (36,5 na 100 000 ljudi po godini). Prosečna stopa smrtnosti pacijenata obolelih od PB u Republici Srbiji jedna od najviših u Evropi, čak 3,43 obolelih [5–7].

1.2 Patofiziologija Parkinsonove bolesti

Kod obolelih od PB neurodegeneracija zahvata različite regione mozga i počinje decenijama pre ispoljavanja prvih kliničkih manifestacija bolesti.



Slika 1. Gubitak dopaminergičkih neurona u crnoj supstanciji. Slika preuzeta sa: www.zonamedicine.com

Progresivno propadanje dopaminergičkih ćelija kompaktnog dela crne supstancije (lat. *substantia nigra pars compacta*, SNpc), jedne od bazalnih ganglija mozga (Slika 1) sa posledičnom lezijom nigrostrijatnih projekcija i poremećajem nivoa DA (Slika 2) uz pojavu proteinskih unutarćelijskih depozita nazvanih Levijeva tela (LT) su odgovorni za najznačajnije manifestacije bolesti [8].

Gubitak funkcije neurona, okolne nervne ćelije uspevaju da nadomeste sve do momenta kada biva narušeno 50% nigrostrijatnog dopaminergičkog sistema, sa posledičnim manjkom DA od 70%. Tada se uočavaju prvi znaci PB i motorne manifestacije bolesti koje se kod pacijenata ispoljavaju najčešće na udu i/ili udovima jedne strane tela [9].

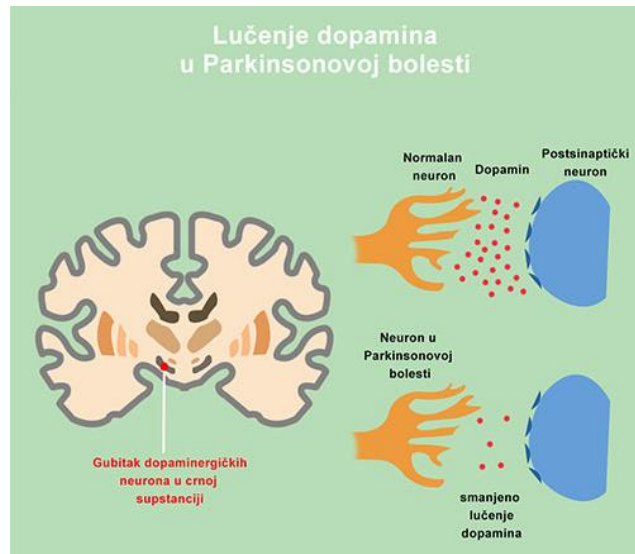
Uloga i značaj DA u patofiziologiji PB poznata je još od 60-tih godina prošlog veka [10,11]. DA se sintetise u neuronima centralnog nervnog sistema (CNS), dok se u ćelijama srži nadbubrežne žlezde sintetise njegov mali deo iz prekursora odgovarajućih aminokiselina (L-fenilalanina, L-tirozina i L-dopamina (L-dopa)). Nakon sinteze, DA se skladišti u

vezikulama, prenosi se do presinaptičke membrane i egzocitozom se oslobađa iz vezikula u sinaptičku pukotinu. Vezuje se za dopaminske receptore na dendritima susednog neurona, ali se može vezati i za receptore na presinaptičkoj membrani odnosno na ćeliji u kojoj je sintetisan. Pored uloge prekursora sinteze noradrenalina, DA može se ponašati i kao neurotransmiter [12].

Dopamin je danas predmet proučavanja velikog broja studija jer je pokazano da u strijatumu pacijenata sa PB postoji značajan manjak DA [13], koji se može kompenzovati primenom specifičnih terapija kojima se stimulišu presinaptički neuroni da povećaju njegovu sintezu i smanje njegovo preuzimanje, dok se na postsinaptičkoj membrani uvećava broj dopaminergičkih receptora [14–16].

Pored smanjenja nivoa DA na pojavu PB utiče i nagomilavanje proteina α -sinukleina koji formira LT [17]. Prisustvo α -sinukleina se vezuje za normalno funkcionisanje sinapse i procese koji su značajni za procese neurodegeneracije. Do sada nije razjašnjena fiziološka funkcija ovog proteina. Takođe, nije jasno da li njegova agregacija predstavlja [18–20]: pokušaj organizma da se odbrani od stanja u kome se nalazi, primarni uzrok nastajanja PB, fiziološku karakteristiku procesa starenja ili mehanizam odbrane protiv neidentifikovanog patogena.

Hipoteza vezana za progresiju širenja patoloških promena uzrokovanih akumulacijom α -sinukleina predložena je od strane Braak-a i saradnika [18], prema



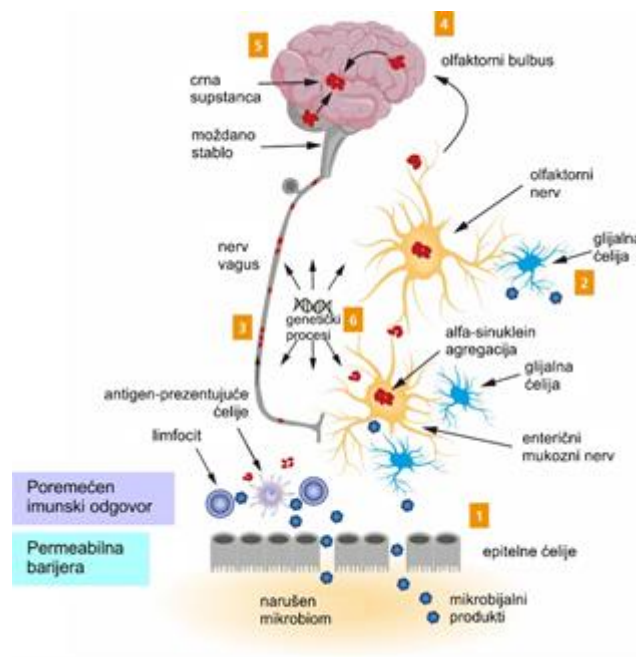
Slika 2. Smanjeno lučenje dopamina
Slika preuzeta sa: www.zonamedicine.com.

kojima su inicijalna mesta pojavljivanja LT u moždanom stablu, i to je prevashodno jedro vagusa i olfaktorni nerv [21], usled čega dolazi do ispoljavanja inicijalnih nemotornih simptoma bolesti. Napredovanje bolesti je okarakterisano povećanim nakupljanjem LT u drugim moždanim strukturama, a kada je zahvaćen i SNpc ispoljavaju se prvi motorni simptomi bolesti, po kojima je i prepoznatljiva.

1.3 Klinička slika Parkinsonove bolesti

Klinička slika ovog složenog neurodegenerativnog oboljenja se razvija postepeno i asimetrično, i praćena je prisustvom motornih i nemotornih simptoma čije se ispoljavanje razlikuje kako između pacijenata, tako i tokom samog toka bolesti [22]. Naime, asimetrično ispoljavanje motornih simptoma je karakteristično za početak PB i usko je povezano sa gubitkom DA koji reguliše motorni region u strijatumu. U početku bolesti obolelom je potrebno više vremena za izvršavanje nekih svakodnevnih, rutinskih preciznih radnji/pokreta poput zakopčavanja dugmadi i vezivanja pertli, koje mogu biti praćene i otežanim ustajanjem i okretanjem u krevetu. Kod nekih pacijenata uočeno je i progresivno smanjenje veličine i čitljivosti slova tokom pisanja (mikrografija), dok su neki pokreti poremećeni, smanjeni ili izostaju, kao, na primer mahanje rukom tokom hodanja i gestikulacija u toku razgovora. Lice obolelog je obično hipomimično kao maska, a govor tih, monoton i nerazumljiv usled poremećaja artikulacije.

Veliki broj studija opisao je specifične procese koji se javljaju u premotornoj fazi u ćelijama obolelih od PB [23,24], čiju dužinu trajanja opisuje Braak-ova hipoteza [18]. Naime, neidentifikovani patogen (virus ili bakterija) u crevima bi mogao da bude odgovoran za pojavu PB i izaziva odgovor koji rezultira Levijevom patologijom (LB i Levijevi neuriti (LN)) koja počinje u predilekcionim mestima i širi se prema specifičnom obrascu, preko olfaktornog trakta i vagalnih nerava, prema i unutar CNS-a (Slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz šest faza prema Braak-ovoj hipotezi. Tokom faze 1 i 2, mikrobi napadaju neurone moždanog stabla, specifično olfaktorne i/ili enteričke neurone u kojima se pokreće agregacija α -sinukleina. Fazu 3 i 4 karakteriše pojava motornih simptoma usled nagomilavanja α -sinukleina u drugim delovima CNS-a poput SNpc, amigdala i nekolicini jedara, kao i anteromedijalni temporalni mezo- i alokorteks. U poslednjim stadijumima (5 i 6), bolest se širi pri čemu neokorteks biva zahvaćen, pogađajući prevashodno senzorna i motorička područja mozga. Preuzeto iz [25] i modifikovano.

1.4 Simptomi

1.4.1 Motorni simptomi

Osnovne karakteristike PB su poremećaji motornih funkcija, što se ogleda pojavom tremora, bradikinezije i rigiditeta, a tek u kasnijoj fazi bolesti i pojava posturalne nestabilnosti. Većina kliničkih studija ukazuje da tremor, rigidnost i akinezija (potpuni prestanak jednostavnih brzih repetitivnih pokreta), iako poseduju mnoge sličnosti, imaju značajno različite karakteristike. Naime, smanjenje količine DA smatra se značajno važnim u akineziji, dok tremor i rigiditet mogu biti regulisani periferno i aktivacijom drugih centralnih neuronskih sistema. Pretpostavlja se da drugi neurotransmiterski sistemi umesto/pored dopaminergičkih (npr. holinergički, serotoninergički, i dr) ili druga neuronska kola umesto/pored bazalnih ganglija (npr. mali mozak, crveno jedro) mogu imati bitnu ulogu u ispoljavanju simptoma PB [26].

1.4.1.1 Tremor u miru

Najlakše uočljiv simptom PB je tremor, koji često predstavlja početnu i najdominantniju motornu karakteristiku, premda je moguće i da je odsutan ili prisutan u blažem obliku.

Tremor se uopšteno deli na nekoliko kategorija [27]: akcioni (kinetički), posturalni i tremor u mirovanju/statički tremor, s tim da se njihovo ispoljavanje i karakter mogu menjati tokom bolesti. Tremor koji je specifičan za PB je distalni tremor u mirovanju frekvencije 4-6 Hz. U antigravitacionom položaju može se videti tzv. posturalni tremor, dok se termin akcioni tremor primenjuje za okolnosti u kojima se tremor javlja isključivo prilikom pokreta dela tela, npr. pri usmeravanju kažiprsta ka nosu pacijenta [28–30]. Akcioni tremor je povezan sa tremorom u mirovanju kod PB, i pojavljuje se na strani tela gde je tremor u mirovanju predominantan [31]. Suzbijanje tremora u mirovanju tokom pokreta je jedan od najvažnijih dijagnostičkih karakteristika [32].

Tremor u mirovanju, najizraženiji simptom PB, najčešće počinje asimetrično, pri čemu su gornji ekstremiteti obično više pogođeni nego donji. Sa napredovanjem bolesti, osim gornjih ekstremiteta, tremor u mirovanju može se proširiti kako na donje ekstremitete tako i može zahvati usne, vilicu i jezik, a izuzetno retko se javlja tremor i vrata/glave. Interesantno je da tremor u mirovanju može nestati sa nekom aktivnošću ili tokom spavanja.

Za razliku od rigiditeta i akinezije, ne postoji korelacija između težine tremora i količine dopaminergičkog deficita u strijatumu ili progresije bolesti [33], i neretko tremor nije zadovoljavajuće kontrolisan primenjenom antiparkinsonom terapijom [34–36].

1.4.1.2 Bradikinezija

Bradikinezija se javlja kod svih obolelih i predstavlja usporenost i osiromašenost voljnih pokreta. Može se javiti izolovano ili s tremorom na zahvaćenoj strani tela, s progresivnim smanjenjem brzine i amplitude (hipokinezija) jednostavnih repetitivnih pokreta do potpunog prestanka istih (akinezija). Na početku bolesti najčešće se javlja usporenost pri obavljanju dnevnih aktivnosti, sporo, otežano kretanje i smanjena brzina reakcije. To može uključivati poteškoće sa zadacima koji zahtevaju finu motornu kontrolu (npr. zakopčavanje, upotreba pribora za jelo), kao i gubitak spontanih pokreta i gestikulacije, naglašeno lučenje pljuvačke (uobičajeno zbog otežanog gutanja), umanjeње (ređe izostanak) ekspresije mimične muskulature lica, proređeno treptanje i redukcija prirodnih, udruženih pokreta rukama prilikom hoda.

Uzimajući u obzir da je bradikinezija simptom PB koji je najlakše prepoznati, može postati očigledan pre bilo kog formalnog neurološkog pregleda [37]. Iako patofiziologija bradikinezije nije dobro opisana, smatra se da najbolje oslikava stepen smanjenja DA kod ovih pacijenata [38]. Ova pretpostavka je podržana praćenjem smanjenja neuronske gustine u SNpc kod starijih pacijenata sa parkinsonizmom [39].

Elektromiografska analiza je pokazala da pacijenti sa bradikinezijom nisu u stanju da aktiviraju odgovarajuće mišiće i izvode brze balističke pokrete, prema obrascu aktivacije mišića koji je zabeležen kod zdravih osoba [40,41]. Takođe je analiza pozitronskom emisionom tomografijom pokazala povezanost bradikinezije kod pacijenata sa PB i povećanja aktivnosti strijatuma i mediodorzalnog talamusa. Nemogućnost izvođenja željenih pokreta je ukazala na promenjenu metaboličku aktivnost u delovima mozga odgovornim za izvođenje voljnih motornih pokreta [42].

1.4.1.3 Rigiditet

Rigiditet je prisutan u više od 90% pacijenata sa PB i predstavlja povišen tonus mišića, s približno jednakim zahvatanjem kako agonističkih, tako i antagonističkih mišića [9,35]. Relaksacija ovih mišića se dešava u veoma ograničenom obimu, čime se smanjuje obim pokreta udova, doprinosi opštoj nelagodnosti, pa čak i bolu. Rigiditet najčešće prati bradikineziju i tremor na strani tela koju bolest inicijalno zahvata. Bolno rame predstavlja jednu od posebno čestih inicijalnih manifestacija PB, pri čemu se neretko ovaj simptom bolesti pogrešno dovodi u vezu sa humeroskapularnim periartritisom, ili ređe sa reumatoidnim artritisom, vodeći ka odlaganju postavljanja tačne dijagnoze. Kod pacijenata sa PB, kao i ostali klinički znaci bolesti, rigiditet može biti jednostran (određeno vreme) i odražava se u formi ukočenosti i krutosti udova, trupa i vrata. Može se ispoljiti proksimalno (stopala i šake) i distalno (ruke, ramena, nadlaktice, noge), ali i aksijalno (vrat) i biti uzrok karakterističnog položaja bolesnika [43]. Tonus se može pojačavati pokretanjem suprotnih ekstremiteta, što ukazuje da dolazi do promena u suprotnoj hemisferi mozga i narušavanja kontrole motornih impulsa [41,44].

U eksperimentima u kojima je vršena stimulacija bazalnih ganglija i motornog dela talamusa, ustanovljeno je da motorne petlje imaju značajnu ulogu u pojavi rigiditeta [9].

1.4.1.4 Posturalna nestabilnost

Posturalna nestabilnost nastaje usled gubitka posturalnih refleksa i predstavlja generalno osobinu kasnije faze PB koja se ogleda otežanim održavanjem ravnoteže pri hodu i/ili stajanju. Međutim, ponekad i u ranijim stadijumima bolesti pacijenti imaju narušenu ravnotežu što se označava kao kompenzovana posturalna nestabilnost.

Gubitak posturalnih refleksa kod obolelih od PB odlikuje se karakterističnim položajem tela. Naime, osoba je nagnuta ka napred i kada stoji i kada hoda, donji ekstremiteti su savijeni u kolenima, gornji u laktovima i postavljeni uz telo, a dok hoda pacijent ih ne pomera spontano tako da ne prate ritam hoda. Često postoji specifična devijacija šake sa ekstenzijom u interfalangealnim, a fleksijom u metakarpofalangealnim zglobovima. Trup pacijenata dok sede je često nagnut u stranu ili unazad, pa im je potrebna pomoć drugog lica da bi održali sedeći položaj. Takođe, obolele karakteriše i nestabilnost i zanošenje pri ustajanju sa stolice, hodu ili okretanju, i s tendencijom pada u stranu (lat. *lateropulsio*), unapred (lat. *anteropulsio*) ili ređe unazad (lat. *retropulsio*) spontano ili na najmanji doprinos sa strane [37,45].

Posturalna nestabilnost predstavlja jedan od najtežih simptoma u uznapredovalom stadijumu bolesti, jer je povezan sa učestalim padovima, i gubitkom samostalnosti. Istraživanja ukazuju da je gubitak holinergičkih neurona direktno povezan sa stepenom nestabilnosti kod pacijenata obolelih od PB [46].

1.4.2 Nemotorni simptomi

Nemotorni simptomi su česti u PB, ali su i u isto vreme „zanemareni” u odnosu na motorne. Mogu se podeliti u nekoliko kategorija: neuropsihijatrijski (depresija, apatija, anksioznost), autonomni (problemi sa mokrenjem, znojenje, impotencija), gastrointestinalni (konstipacija, mučnina, nemogućnost gutanja pljuvačke), senzorni (bol, vizuelna disfunkcija), poremećaji spavanja (sindrom „nemirnih nogu”, poremećaj ponašanja u REM fazi spavanja (*eng. - rapid-eye movement*)) i drugi [47,48].

Navedeni simptomi se mogu javiti već u početnoj fazi bolesti, a pojedini kao što su depresija, konstipacija, olfaktivna disfunkcija, REM poremećaj spavanja, mogu se javiti i znatno pre motornih simptoma [47]. Na primer, olfaktivna disfunkcija je jedna od čestih ranih nemotornih simptoma koja može prethoditi razvoju PB i do 4 godine, a prisutna je i kod 90% obolelih. Manifestuje se oslabljenom detekcijom i identifikacijom

mirisa i kao takva može biti značajan pokazatelj bolesti pre manifestacije motornih simptoma [48,49]. Neki od pomenutih simptoma, kao što je konstipacija, javljaju se čak i do 10 godina pre ispoljavanja motornih simptoma, a prisutna je kod 60-80% pacijenata [50]. Početak pojave bola je povezan sa motornim simptomima, može se čak javiti nekoliko godina pre ispoljavanja same bolesti ili pak nakom uspostavljanja dijagnoze [51].

1.5 Tok Parkinsonove bolesti

Određivanje podtipova PB je važno za razumevanje mehanizma bolesti i razvoj odgovarajućih strategija lečenja [52]. Podela na četiri osnovne grupe je izvršena na osnovu kliničke slike pacijenata i ispoljavanja motornih znakova [53–55]:

1. Pacijenti oboleli u mlađoj životnoj dobi, kod kojih se javlja spora progresija bolesti, manjak kognitivnih oštećenja i veći potencijal za razvijanje motornih fluktuacija, najverovatnije kao posledica dužine trajanja terapije L-dopom,
2. Pacijenti kod kojih je dominantni simptom bolesti tremor karakteriše sporije napredovanje i komplikacije tokom terapije L-dopom zbog slabijeg odgovora pacijenata,
3. Pacijenti kod kojih tremor nije dominantni simptom bolesti ispoljavaju slabiji odgovor na terapiju L-dopom ali sporije napredovanje i komplikacije tokom terapije,
4. Pacijenti sa brzom progresijom bolesti i bez kognitivnih oštećenja.

Kako je PB sporo progresivna bolest, pacijentima se od momenta uspostavljanja dijagnoze pogoršavaju simptomi, kako motorni tako i nemotorni. Sa tim u vezi, bolest napreduje vremenom kroz određene stadijume. Brojne skale se koriste za procenu stepena motornih oštećenja i invaliditeta kod pacijenata, međutim većina ovih skala nije u potpunosti pouzdana niti validna. Skala koja se najčeće koristi za poređenje grupa pacijenata i za obezbeđivanje grube procene progresije bolesti je Hoehn i Yahr (H&Y) [56] skala, koja je u rasponu je od stadijuma 0 do 5 (Tabela 1) [37,57,58].

Tabela 1. Hoen i Yahr-ova (H&Y) skala za procenu težine PB.

Stadijum 0	Nema znakova bolesti
Stadijum 1	Bolest zahvata jednu stranu tela
Stadijum 1.5	Jednostrana i aksijalna zahvaćenost
Stadijum 2	Obostrana zahvaćenost bez poremećaja ravnoteže
Stadijum 2.5	Blaga obostrana zahvaćenost sa održavanjem ravnoteže pri naglom narušavanju početnog položaja
Stadijum 3	Blaga do umerena obostrana zahvaćenost, posturalna nestabilnost, fizička nezavisnost
Stadijum 4	Teška onesposobljenost uz mogućnost samostalnog stajanja i hodanja
Stadijum 5	Zavisnost od trećeg lica, vezanost za kolica ili postelju

Ova skala se koristi da se opiše progresija PB i od kada je usvojena, njena primena je zadržana sve do danas uz minimalnu izmenu. Naime, PB započinje asimetrično zahvatajući jednu stranu tela (H&Y 1). Sa napredovanjem bolesti dolazi do poremećaja držanja tela, aksijalna zahvaćenost (H&Y 1.5), potom se motorni simptomi ispoljavaju i na drugoj strani tela (H&Y 2), dok su u kasnijem stadijumu bolesti (H&Y 2.5) zahvaćeni i refleksi ravnoteže, koji dovode do posturalne nestabilnosti (H&Y 3). Progresijom bolesti simptomi postaju sve izraženiji i pacijenti u preposlednjoj fazi (H&Y 4) postaju teško fizički pokretni, dok je njihov život vezan za kolica i postelju u poslednjoj fazi bolesti (H&Y 5). Ispoljavanje motornih simptoma najčešće je praćeno i pojavom nemotornih.

1.6 Dijagnostikovanje Parkinsonove bolesti

Do danas nije usvojen nijedan specifičan test za dijagnozu PB [59]. Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničkih kriterijuma i kombinaciji kliničke slike, anamneze, i pregleda, a zasniva se na povezivanju neuroloških simptoma i znakova, brzine progresije bolesti, postojanja (ili odsustva) atipičnih simptoma i znakova, kao i terapijskog odgovora na primenu specifičnih lekova. Za uspostavljanje definitivne dijagnoze neophodna je patohistološka potvrda odnosno *post-mortem* detekcija karakterističnih promena u različitim regionima mozga [60,61].

Dijagnostički kriterijumi *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Research criteria, UK, London* [62] koriste se za postavljanje dijagnoze PB. U cilju postavljanja dijagnoze PB neophodno je prisustvo bradikinezije i rigora i/ili tremora u mirovanju. Međutim, pored navedenih potvrdnih simptoma, neophodno je imati u vidu i kriterijume koji ne smeju da postoje, poput traume mozga, tumora mozga, intoksikacija koje se dovode u vezu sa parkinsonizmom, demencije, izostanka reakcije na visoke doze L-dope

i dr. Upotrebom radioloških metoda, kao što su CT skener i magnetna rezonanca, nije moguće sa sigurnošću dijagnostikovati PB, ali ove metode mogu poslužiti za isključivanje ostalih bolesti.

Takođe, postoje kriterijumi koji podržavaju dijagnozu PB i neophodno je prisustvo najmanje tri od sledećih kriterijuma: unilateralni početak, tremor u miru, spora progresija, odličan odgovor na L-dopu, razvoj diskinezija izazvanih L-dopom, trajanje bolesti duže od 10 godina, oslabljeno čulo mirisa (hipoosmija), vizuelne halucinacije [62,63].

Treba istaći da je bolest teško dijagnostikovati u ranoj fazi kada klinička slika nije kompletno razvijena, kao i u atipičnim slučajevima kada se znaci i simptomi preklapaju sa drugim „parkinsonizam plus” sindromima. Prisustvo dva od četiri glavna simptoma (bradikinezija, rigiditet, tremor i posturalna nestabilnost), kao i adekvatna reakcija na antiparkinson terapiju se smatra, od strane kliničkih stručnjaka, dovoljnim i potrebnim uslovom za uspostavljanje dijagnoze. Ukoliko se ne ispunjavaju navedene karakteristike, onda postoji mogućnost da to nije idiopatska PB već neki drugi oblik parkinsonizama [27].

1.7 Faktori rizika i mehanizmi nastanka

Iako uzroci nastanka nisu poznati, pretpostavlja se da se PB javlja kao posledica međusobnog delovanja genetskih faktora i uticaja spoljašnje sredine poput toksičnih agenasa odnosno raznih supstanci i drugih materija iz svakodnevnog okruženja uključujući pesticide i toksine koji izazivaju oksidativna oštećenja i narušavanje funkcije mitohondrija [64,65].

Genetski faktori su odgovorni za 5-10% slučajeva obolelih od PB [66]. Javlja se znatno ranije uz ispoljavanje distonije, progresija bolesti je znatno sporija i ovi pacijenti bolje reaguju na primenjenu terapiju [67]. Pored toga što postoje razlike između genetskih i sporadičnih oblika PB, oni ipak imaju sličnosti u ispoljavanju motornih osobina, na osnovu čega se može zaključiti o njihovim zajedničkim patogenetskim mehanizmima. Do sada je pronađeno više od 30 hromozomskih regiona i šest gena (SNCA, LRRK2, PRKN, DJ1, PINK1 i ATP13A2) koji u određenoj meri doprinose naslednom obliku PB [67–69]. Funkcija ovih gena ogleda se u kodiranju proteina za enzime koji imaju ulogu u mnogobrojnim procesima u organizmu. Narušena metabolička funkcija kao posledicu

ima izmenjenu funkciju mitohondija, blokiranje pražnjenja vezikula, povećanje koncentracije gvožđa u ćeliji i dr. [70]. Osim toga, istraživanja ukazuju i da PB nastaje istovremenim delovanjem spoljašnjih faktora na ekspresiju specifičnih gena [71].

Nastanak PB dugo se povezivao sa uticajima faktora sredine [72]. Jednom meta-analizom pokazano je da osobe izložene pesticidima imaju gotovo dvostruko veći rizik za nastanak PB [73], međutim jos uvek ni jedan pesticid nije označen kao uzročnik PB.

Sa druge strane, mnogobrojna istraživanja ukazuju na teške metale (gvožđe, bakar, cink, olovo, aluminijum i mangan) kao uzročnike pojave i progresije bolesti [74]. Smatra se da njihovo taloženje u neuronima bazalnih ganglija izaziva oštećenja, međutim njihova uloga nije u potpunosti definisana, jer u delovima mozga koji su najviše oštećeni kod pacijenata koji boluju od PB nekada ima i do tri puta više gvožđa u odnosu na zdrave ispitanike [75].

Literatura ističe da neuroinflamacija i oksidativni stres (OS) mogu doprineti patogenezi ove neurodegenerativne bolesti i mogu pokrenuti kaskadu događaja koja dovodi do oštećenja lipida, proteina i dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), ćelijske disfunkcije i, na kraju, ćelijske smrti. Naime, na ćelijskom nivou, početak i napredovanje PB se pored narušavanja metabolizma kateholamina i AO sistema, povećanog taloženja gvožđa u SNpc i nivoa citokina i hemokina, može povezati i sa prekomernim stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) odnosno reaktivnih azotnih vrsta (RAV) [76,77].

1.8 Oksidativni stres

Oksidativni stres se definiše kao prekomerno nastajanje i/ili nedovoljno uklanjanje slobodnih radikala (RKV/RAV)² i njihovih produkata usled narušavanja AO kapaciteta. Kao posledica, oštećuju se proteini, DNK, lipidi, i drugi biomolekuli što dovodi do patoloških promena u organizmu [79].

² Slobodni radikali se u zavisnosti od aktivnog centra dele na: RKV u koje spadaju slobodni radikali kao što su superoksid anjon radikal (O_2^-), hidrosil radikal (OH), hidroperoksil radikal (HO_2^\cdot), peroksil radikal (RO_2^\cdot), alkoksil radikal (RO^\cdot) i alkil radikal (R) kao i neradikalni metaboliti kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina (HOCl) i organski peroksidi (ROOH), singlet kiseonika ($^1\text{O}_2$). Što se tiče RAV, u njih spadaju azotmonoksidni radikal (NO^\cdot) i azotdioksidni radikal (NO_2^\cdot) slobodni radikali, kao i neradikalni metaboliti u koje se ubrajaju nitritna kiselina (HNO_2), nitrozonijum katjon (NO^+), nitrozonijum anjon (NO^-), dinitrogen tetrahlid (N_2O_4), dinitrogen trioksid (N_2O_3), peroksininitrit (ONOO^\cdot), alkilperoksininitrit (ROONO), nitril hlid (NO_2Cl), dok u radikale čiji je aktivni centar sumpor spadaju tiil radikal (RS), glutatiil radikal (GS) i diglutatiil anjon radikal (GSSG) [78].

1.8.1 Oštećenja biomolekula pod uticajem slobodnih radikala

1.8.1.1 Oksidacija proteina

Reaktivne vrste mogu izazvati oksidativnu modifikaciju aminokiselina koje ulaze u sastav proteina, čime se menja njihova primarna struktura. Aminokiselinski ostaci proteina razlikuju se po stepenu osetljivosti na slobodne radikale, pri čemu su cistein i metionin najosetljiviji [80], dok se nove funkcionalne grupe (npr. hidroksilne i karbonilne grupe) najčešće javljaju kao posledica oksidacije proteina [81]. Oksidovane forme proteina se akumuliraju tokom starenja, OS, i pri nekim patološkim stanjima organizma.

Oksidacija proteina može biti dvojaka – slobodni radikali mogu delovati direktno na protein ili indirektno kao posledica oksidacije drugih molekula (lipida ili ugljenih hidrata) [82–84]. Sekundarna proteinska oštećenja koja se javljaju kao posledica OS uključuju: (1) dodavanje produkata glikozilacije i/ili lipidne peroksidacije (LPO), (2) oksidaciju aminokiselinskih bočnih lanaca, i (3) oksidaciju polipeptidnog lanca gde kao posledica dolazi do fragmentisanja proteina [85].

1.8.1.2 Modifikacija DNK

RKV/RAV mogu reagovati sa svim komponentama DNK, i na taj način dovesti do različitih genetskih oštećenja. Oksidativna modifikacija DNK je najizraženija u prisustvu metala koji ima promenljivu valencu i tada kao produkt oksidativne reakcije nastaje OH[•]. Nastali radikal reaguje sa purinskom bazom guanin i formira se 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) koji predstavlja indikator oksidativnog oštećenja DNK [80,86].

1.8.1.3 Lipidna peroksidacija

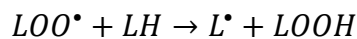
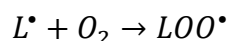
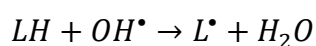
Lipidna peroksidacija (LPO) je proces oksidativnog oštećenja lipida u ćelijama i nastaje kao posledica uticaja slobodnih radikala na polinezasićene masne kiseline - PNMK (eng. - *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) (Tabela 2), koje ulaze u sastav između ostalih i fosfolipida (PL) odnosno glicerofosfolipida.

Tabela 2. Najčešće masne kiseline na koje mogu delovati slobodni radikali

Klasično ime	Skraćeno ime ^a
Palmitoińska kiselina	16:0
Stearinska kiselina	18:0
Oleinska kiselina	18:1
Linoleinska kiselina	18:2
α - Linoleinska kiselina	18:3
Arahidonska kiselina	20:4

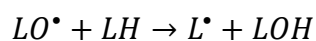
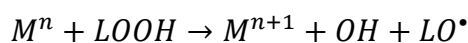
^aBroj ugljenihovih atoma u lancu: broj dvostrukih veza

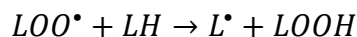
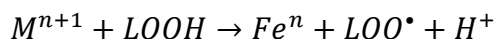
Oštećenje membrana može dovesti ne samo do narušavanja funcionisanja ćelije (poremećaj propustljivosti membrane i inaktivacija membranskih proteina) već i do ugrožavanja njenog opstanka. Oslobođanje hidrolitičkih enzima prilikom narušavanja integriteta lizozomskih membrana može dovesti do vitalnih ćelijskih poremećaja što može rezultirati smrću ćelije [81]. LPO prolazi kroz tri faze (Slika 4): faza inicijacije, faza propagacije i faza terminacije. U fazi inicijacije, oksidansi vezuju vodonik iz α - metil grupe (metil grupe najbližoj dvostrukoj vezi) pri čemu nastaje lipidni radikal (L^{\bullet}). Kako bi se novonastalo hemijsko jedinjenje stabilisalo, dolazi do pomeranja nesparenog elektrona duž PNMK-e što dovodi do premeštanja dvostrukih veza i formiranje diena. U propagacionoj fazi, reakcija molekuskog kiseonika i lipidnog radikala dovodi do formiranja perosil radikala (LOO^{\bullet}) koji oduzima atom vodonika sa svog ugljovodonočnog lanca ili sa drugih lipidnih molekula stvarajući nove lipidne radikale i lipidne perokside ($LOOH$) [87–89].



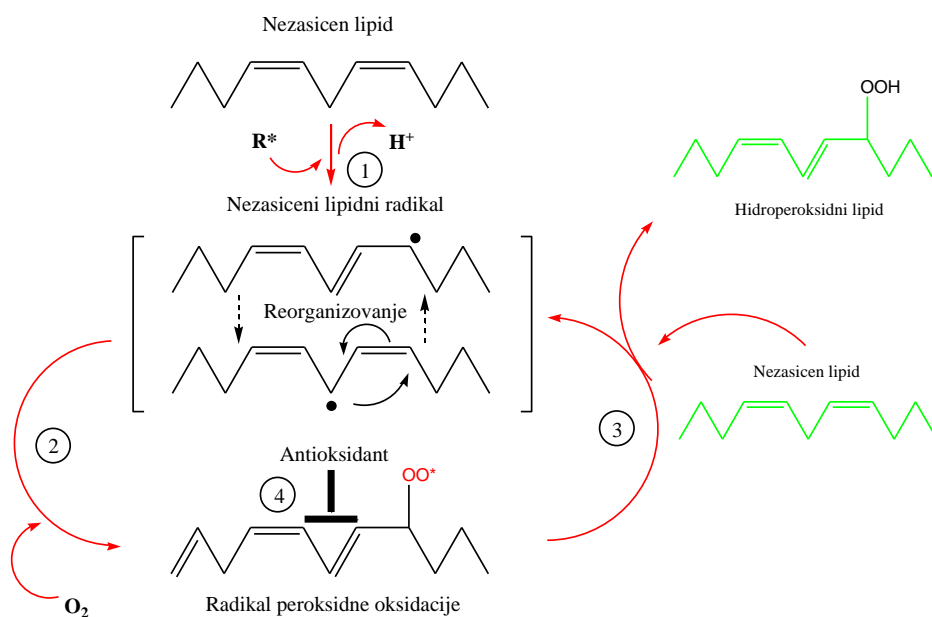
$LOOH$ može da reaguje kako sa redukovanim, tako i sa oksidovanim metalima. U reakciji sa redukovanim metalima (M^{2+}) kao proizvod nastaje lipidni alkoksil radikal (LO^{\bullet}) koji pri reakciji sa drugim lipidima uzrokuju formiranje L^{\bullet} i lipidnog aldehida (LOH), dok u interakciji sa oksidovanim metalima (M^{3+}) dolazi do formiranja LOO^{\bullet} .

Svi novoformirani lipidni radikali generišu nove lančane reakcije.





U poslednjoj fazi, fazi terminacije, lančane reakcije se mogu zaustaviti interakcijom dva slobodna radikala pri čemu dolazi do formiranja neradikalskog proizvoda, antioksidansi kao npr. vitamin E donira atom vodonika LOO^\bullet vrstama i formira odgovarajući vitamin E radikal koji potom reaguje sa drugim LOO^\bullet formirajući neradikalni produkt ili delovanjem AO sistema zaštite.



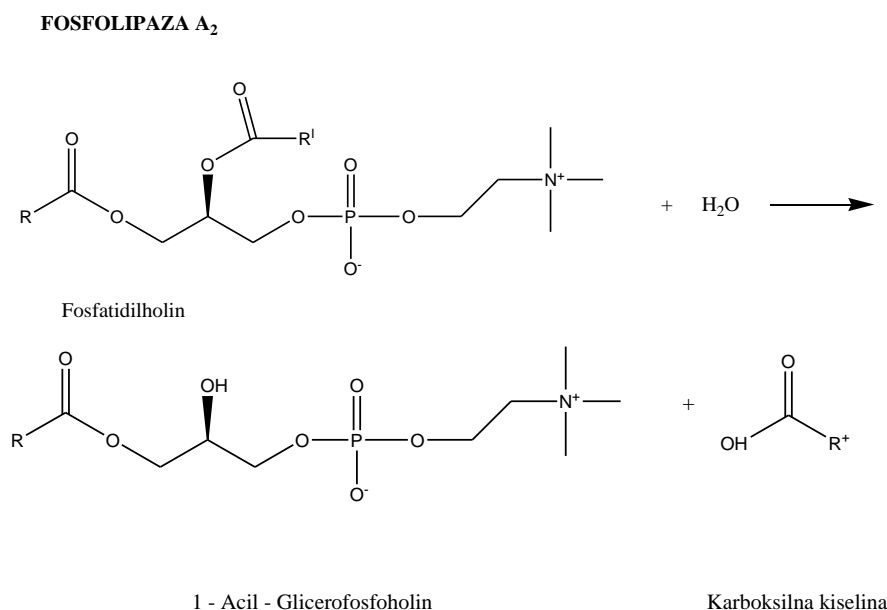
Slika 4. Tri faze LPO u četiri koraka: korak 1- faza inicijacije, koraci – 2 i 3 - faza propagacije, i terminalna faza korak 4. Slika preuzeta iz [90] i modifikovana.

Ćelija na različite načine reaguje shodno stepenu toksičnog stanja. Ukoliko se ćelija nalazi u subtoksičnim uslovima (fiziološko ili nisko lipid peroksidaciono stanje), ćelija stimulacijom komponenti AO odgovara na stres, dok u toksičnim uslovima (srednji ili visoki nivo LPO) ćelija indukuje apoptozu ili nekrozu iz razloga što toliki nivo stresa prevazilazi reparacioni kapacitet. Oba procesa dovode do oštećenja ćelije što može uzrokovati ili olakšati razvijanje različitih patoloških stanja i ubrzati starenje [91–94].

Primarni produkti LPO su lipidni hidroperoksidi, koji mogu ispoljavati i neke biološke funkcije, poput funkcije sekundarnih glasnika u unutarćelijskom prenosu signala, regulisanju genske ekspresije, aktivaciji transkripcionih faktora i faktora rasta [95–98].

Shodno koncentraciji produkata LPO mogu se izazvati različiti ćelijski odgovori. Visoke koncentracije mogu dovesti od akutnih toksičnih posledica, kao i do sprečavanja ćelijske proliferacije [99], dok niske mogu dovesti do stimulacije aktivnosti određenih enzima ili transkripcione regulacije AO gena [95].

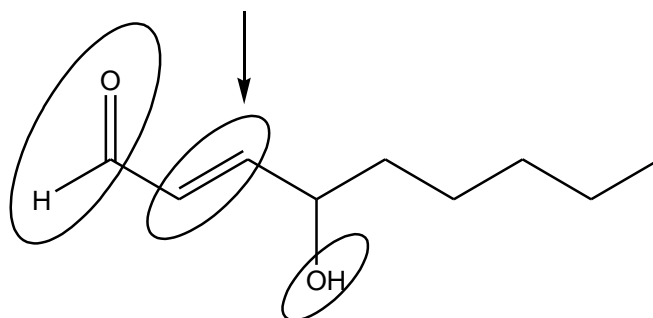
Produkti LPO su izuzetno nestabilni i mogu biti transformisani u peroksil i alkoksil radikal. Alkoksil radikali su specijalno skloni reakcijama u kojima dolazi do formiranja kratko lančanih produkata, od kojih su najznačajniji 4-hidroksinonenal (HNE) i malondialdehid (MDA) [100]. HNE, lipidni aldehid koji nastaje tokom peroksidacije nezasićenog lipidnog acil ostatka esterifikovanog fosfolipida [102,107,108], je toksičan i inhibira rast ćelija, modifikuje metabolizam lipoproteina i podstiče razvoj mnogih oboljenja [103]. MDA može da reaguje sa nukleinskim kiselinama i slobodnim amino-grupama proteina, i da dodatno ošteti ćelije. Uklanjanje toksičnih lipidnih peroksida iz membrana smatra se da ima važnu ulogu u detoksifikaciji oštećenih PNMK. Enzimi koji učestvuju u ovom procesu pripadaju familiji fosfolipaza tipa A₂ (PLA₂). Familiju ovih enzima čine kalcijum-stimulisana i kalcijum nezavisna forma koje katalizuju hidrolizu estarske veze između masne kiseline na *sn*-2 poziciji fosfolipidnog molekula (Slika 5), poziciju gde se većina PNMK nalaze, pri čemu se formiraju slobodne masne kiseline i lizofosfolipidi (LFL/LPL) [104].



Slika 5. Reakcija kataliza estarske veze fosfolipidnog molekula enzimom PLA₂

1.8.1.3.1 4-hidroksinonenal

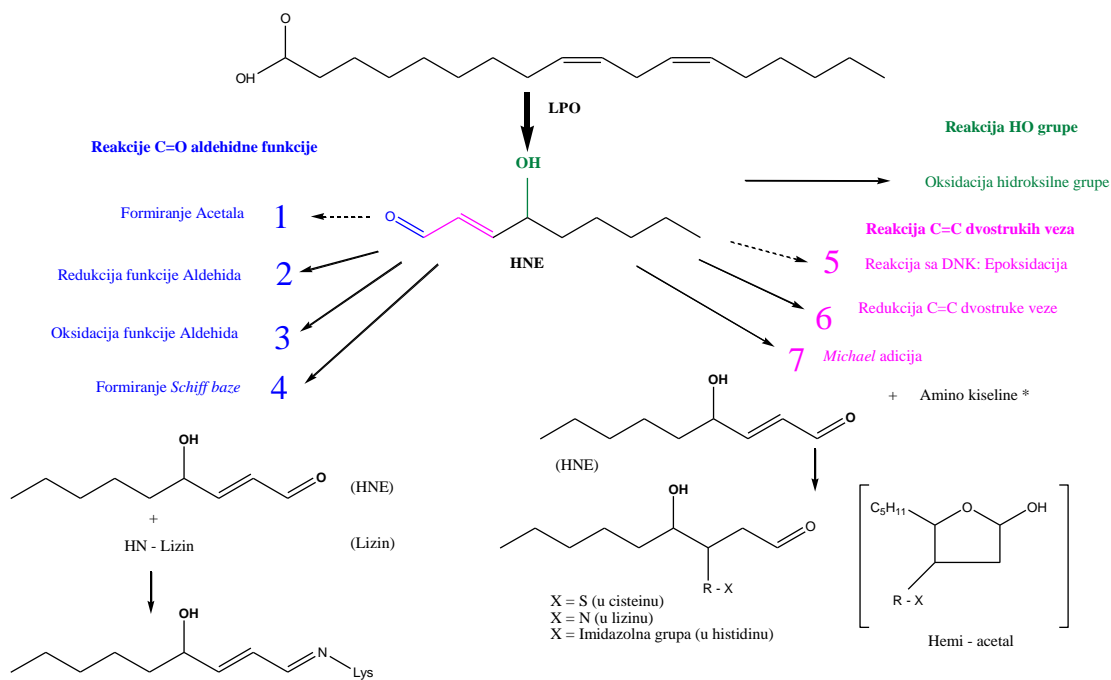
HNE je lipofilni, α , β - nezasićeni hidroksialkenal koji se smatra najtoksičnijim aldehidom zbog prisustva svoje tri funkcionalne grupe: aldehidne (karbonil grupe na C1), dvostruke veze između C2 i C3 i sekundarne alkoholne (hidrokil) grupe na C4 poziciji (Slika 6). Ugljenik C1 je redoks, a zajedno sa C3 je i nukleofilni centar.



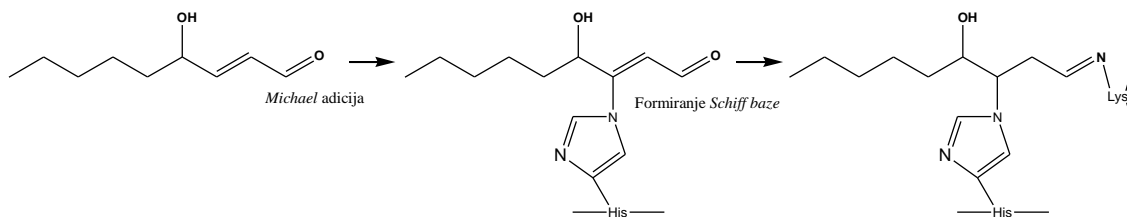
Slika 6. Hemijska struktura HNE. Na slici su zaokružene reaktivne grupe molekula; strelicom je obeleženo mesto nukleofilnog „napada“. Slika preuzeta [103] i modificirana.

Ove reaktivne funkcionalne grupe omogućavaju da ovaj elektrofilni molekul reaguje sa nukleofilnim tiol i amino grupama pri čemu dolazi do Mihaelove adicije i stvaranja Šifovih baza. Kinetika formiranja Šifovih baza je suštinski spora i reverzibilna, tako da je stvaranje Mihaelovih adukata dominantno. HNE može, stoga, da reaguje sa velikim brojem makromolekula kao što su proteini (najviše sa onima koji sadrže histidinske, cisteinske i lizinske bočne ostatke) [105,106], lipidi (koji sadrže amino grupu) i sa nukleinskim kiselinama (najviše sa guanozinom) (Slika 7).

Koncentracija HNE u humanim uzorcima krvi i seruma je procenjena na 0,05 – 0,15 mM [102], dok se u patološkim uslovima koncentracija može ekstremno povećati na vrednost čak i preko 100 mM [107]. U zavisnosti od unutarćelijske koncentracije, fiziološka uloga HNE se menja. Pri niskim koncentracijama ($< 5 \mu\text{M}$), uloga HNE je delotvorna, dovodi do opstanka ćelije i njene proliferacije [108,109]. Genotoksični efekat HNE se javlja pri nešto višim koncentracijama (20-100 μM), što za posledicu ima promenu sestrinskih hromatida, formiranje mikronukleusa, DNK fragmentaciju [110,111], ometanje diferencijacije i pokretanje ćelijske smrti [112,113]. Kada koncentracija pređe 100 μM , HNE i njemu slični aldehidi pored toga što uzrokuju letalnu



SLUCAJ REAKCIJE SA PROTEINIMA



Slika 7. Reaktivnost HNE molekula. Potencijalne reakcije HNE na vodoničnim, ugljeničnim i dvostrukim vezama. 4 -HNE je biotransformisan, ali takođe može reagovati sa proteinima preko Mihaelove adicije i formiranjem Šifovih baza i DNK epoksidacijom. Lys - lizin, His – histidine. Slika preuzeta [114] i modifikovana.

toksičnost, dovode do inhibicije glikolitičkih enzima, mitohondrijalne respiracije, i proteinske sinteze [115].

Kako se velike količine lipidnih aldehida akumuliraju pod patološkim uslovima, i s obzirom da utiču na metabolizam pri relativno niskim koncentracijama stoga se smatra da se ovi aldehidi ponašaju kao „toksični sekundarni glasnici”.

1.8.1.3.2 Malondialdehid

MDA je krajnji produkt razgradnje arahidonske kiseline i PNMK-a, a nastaje u različitim enzimskim i neenzimskim reakcijama. MDA, nastao delovanjem enzima, je znatno hemijski stabilniji i membranski permeabilniji u odnosu na HNE [101]. Do sada

je pokazano da MDA ima mnogobrojne uloge i ponaša se kao signalni molekul [116,117]. Sa druge strane, MDA nastao neenzimskim procesima je manje istražen uprkos njegovoj potencijalnoj tarapeutskoj vrednosti. Pretpostavlja se da MDA na ovaj način nastaje u stresnim situacijama i ima visoku moć delovanja sa razne biomolekule, kao što su proteini ili DNK, pri čemu dolazi do formiranja adukata i biomolekulskih oštećenja [118,119]. Povećana produkcija MDA je povezana sa različitim patološkim stanjima poput neurodegenerativnih obolenja, tumora i dr. [120–123].

MDA adukti su biološki izrazito značajni zato što učestvuju u sekundarnim reakcijama tako što generišu intramolekularno ili intermolekularno protein/DNK povezivanje koje može izazvati značajne promene u biohemijskim svojstvima biomolekula i dovesti do njihove akumulacije tokom starenja i hroničnih oboljenja [124–126].

1.9 Antioksidativna zaštita

Antioksidativni molekuli koji čine AO zaštitu organizma deluju na različitim nivoima.

Prema Ighodaro & Akinloye [127] antioksidansi su, na osnovu sistema zaštite u koji se uključuju, podeljeni na:

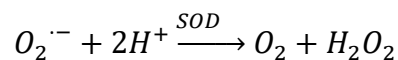
- antioksidanse prve linije zaštite, koji imaju ulogu da onemoguće ili spreče formiranje slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta u ćeliji. U njih spadaju tri ključna enzima: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) koji dismutuju $\cdot O_2^-$, razgrađuju H_2O_2 i hidroperokside do „bezopasnih“ molekula. U ovu klasu takođe spadaju i metal jon vezujući protein, kao što su transferin i ceruloplazmin koji vezuju gvožđe ili bakar i posledično onemogućavaju formiranje slobodnih radikala,
- antioksidansi druge linije zaštite su „sakupljači“ s obzirom da pretežno uklanjaju oksidanse. Oni uklanjaju aktivne radikale u cilju sprečavanja pokretanja lančanih reakcija i zaustavljanja reakcija propagacije tako što donirajući elektron slobodnim radikalima i sami postaju slobodni radikali, pri čemu je njihov štetni efekat daleko manji. Ovako formirani „novi radikali“, delovanjem drugih antioksidanasa iz ove grupe, se lakše neutrališu i njihov štetni efekat se u

potpunosti uklanja. Veliki broj antioksidanasa kako hidrofилnih tako i lipofilnih čini drugu liniju zaštite, kao što su: askorbinska kiselina, mokraćna kiselina, GSH, alfa tokoferol (Vitamin E), ubikvinol i dr.,

- antioksidansi treće linije zaštite su *de novo* enzimi koji popravljaju štetu na biomolekulima koja je nastala delovanjem slobodnih radikala i repariraju oštećenja na ćelijskim membranama. Njihova uloga je višestruka, oni prepoznaju, razgrađuju i uklanjaju oksidovane ili oštećene proteine, DNK ili lipide, kako bi sprečili njihovu akumulaciju koja može biti tkivno toksična. U njih spadaju između ostalih i DNK enzimski reparacioni sistemi (polimeraze, glikozilaze i nukleaze), kao i proteolitički enzimi (proteinaze, proteaze i peptidaze) koji su lokalizovani kako u citosolu tako i u mitohondriji ćelija sisara,
- antioksidansi četvrte linije zaštite su poslednja linija odbrane koja predstavlja adaptaciju u kojoj signali za produkciju i reakcije slobodnih radikala pokreću stvaranje i prenos specifičnih antioksidanasa do mesta delovanja [128]. Signali koji nastaju od formiranih radikala pokreću formiranje i transport adekvatnog AO do mesta delovanja.

1.9.1 Superoksid dizmutaza

Superoksid dizmutaza (EC 1.15.1.1) kao najvažniji AO enzim predstavlja prvu liniju odbrane od RKV/RAV i ostalih reaktivnih vrsta. Kao najjači antioksidans u ćelijama ima važnu ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja [127,129] time što katalizuje dizmutaciju visoko reaktivnog superoksid anjona do molekularnog O₂ i manje reaktivnog vodonik peroksida (H₂O₂)³.



Za aktivnost SOD-a neophodno je prisustvo metala kao kofaktora. Na osnovu specifičnih uloga, aktivatora, deaktivatora i mesta delovanja [130,131], kao i u zavisnosti od tipa metalnog jona, razlikuju se tri forme enzima [132,133]:

- Citosolna bakar/cink SOD (**Cu/ZnSOD; SOD1**), čiji su kofaktori cink (Zn) i bakar (Cu). SOD1 ima najvažniju ulogu u odbrani od RKV i ispoljava do 80% ukupne

³ Iako slabo reaktivan, H₂O₂ u prisustvu jona gvožđa može da bude supstrat za formiranje izuzetno reaktivnog hidroksil jona.

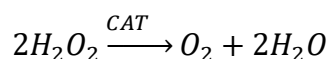
aktivnosti svih oblika SOD. Prisutna je u svim ćelijama organizma, a najzastupljenija je u jetri, eritrocitima, mozgu i neuronima, dok se vanćelijska (EC) SOD (koja takođe sadrži Cu/Zn kao kofaktor, a ima različitu aminokiselinsku sekvencu od SOD1) nalazi u telesnim tečnostima: plazmi, limfi i CST [134]. Zbog mesta delovanja EC SOD ima važnu ulogu u „presretanju“ $O_2^{\cdot-}$ koji je oslobođen od strane fagocita i drugih ćelija [132]. Takođe, drugi faktori mogu imati uticaj na aktivnost ovog enzima, a njegova koncentracija je direktno proporcionalna životnom dobu [135],

- Mitohondrijalna mangan SOD (**MnSOD; SOD2**) prisutna je kod prokariota i u mitohondrijama i peroksizomima eukariota u dve moguće izoforme - homodimera ili homotetramera sa jednim atomom Mn^{3+}/Mn^{2+} kao kofaktorom po subjednici. Aktivnost SOD2 je promenjiva i sa povećanjem OS se značajno povećava, što nije slučaj sa drugim izoformama SOD. Smatra se glavnim enzimom koji uklanja $O_2^{\cdot-}$ i time obezbeđuje AO zaštitu ćelije od LPO [136,137],

- Vanćelijska superoksid dizmutaza (**EC SOD; SOD3**) za čiju je aktivnost neohodano gvožđe, pronađena je isključivo kod sisara i pretežno se nalazi u intersticijalnom matriksu tkiva i glikokaliksi, gde je vezana za heparin sulfat proteoglikane, dok se u telesnim tečnostima nalazi u manjoj meri [138]. Predstavlja glikoprotein sa velikim afinitetom vezivanja za heparin. U svom katalitičkom centru sadrži jone Cu i Zn i smatra se da je divergirala u ranoj fazi evolucije od SOD1 [139]. Ekspresija ovog enzima je ograničena na specifični tip ćelija i tkiva, a njegova aktivnost može prevazići aktivnost SOD1 i SOD2, s tim što opada sa godinama [140,141]. Njegova osnovna uloga je da spreči deaktivaciju NO i time vazokonstrikciju i inflamaciju.

1.9.2 Katalaza

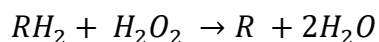
Katalaza (EC 1.11.1.6) je enzim koji koristi gvožđe ili mangan kao kofaktore i čija je osnovna uloga razlaganje neradikalnog H_2O_2 do vode i molekularnog kiseonika što za posledicu ima „dovršavanje“ procesa detoksifikacije koju je započela SOD.



Ovim procesom, CAT onemogućava difuziju H_2O_2 u druge ćelije [142].

Osim katalazne reakcije, ovaj enzim katalizuje i peroksidaznu reakciju, time što dovodi do oksidacije H-donora uz potrošnju jednog molekula H_2O_2 . CAT vrši

peroksidaznu reakciju i redukuje H₂O₂ koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina i sl.).



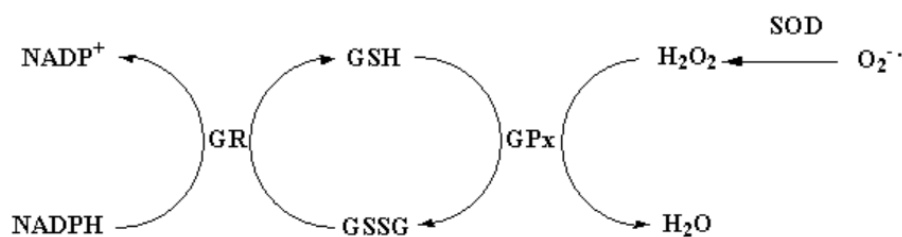
Od brzine nastajanja H₂O₂, kao i od koncentracije donora vodonika zavisi koju reakciju će CAT katalizovati [143]. Bez obzira na koncentraciju H₂O₂, CAT ne može biti zasićena supstratom, već sa porastom koncentracije istog proporcionalno raste i enzimaska aktivnost katalaze [81].

Unutar eukariotskih ćelija je u najvećoj meri lokalizovana u peroksizomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijama [144].

1.9.3 Glutation

Glutation (GSH) je mali molekul, tripeptid i predstavlja najprisutniji neenzimski antioksidans u ćeliji. Pored neosporne antioksidativne uloge kao kofaktor određenih enzima, na direktan način eliminiše lipidne i slobodne radikalske vrste (OH[•], O₂^{•-}, ONOO⁻), hidroperokside, ali i omogućava regeneraciju neenzimskih AO vrsta kao i reparaciju ćelija izazvanu oksidativnim oštećenjima.

GSH predstavlja najzastupljeniji ćelijski tiol koga na svojim aktivnim mestima karakteriše prisustvo sulfhidrilnih ostataka (-SH) [145]. Redukujuća i oksidovana forma glutaciona (GSH odnosno GSSG) deluju zajedno sa drugim redoks-aktivnim jedinjenjima (npr. NAD(P)H) kako bi regulisali i održali ćelijski redoks status [146]. Kada se ćelija nalazi u normalnom redoks stanju, skoro celokupan GSH se nalazi u redukovanom obliku, dok oksidovani oblik čini svega 1% [147]. Uključen je u redukciju disulfidnih i drugih molekula, kao i u konjugaciji jedinjenja i na taj način štiti ćeliju od dejstva slobodnih radikala. Sa povećanjem OS, dolazi do brzog smanjenja koncentracije GSH, dok se koncentracija GSSG povećava. Kako bi se uspostavilo normalno funkcionisanje metabolizma neophodno je da se nivo GSH nadoknadi što se dešava na dva načina, ili *de novo* sintezom ili redukcijom nastalog GSSG (Slika 8).



Slika 8. Glutationski ciklus.

Iako je GSH neophodan činilac AO, sam ne može da spreči citotoksično delovanje reaktivnih vrsta već je sastavni deo odgovora GSH-zavisnih enzima koji učestvuju u prvoj i drugoj liniji odbrane [148]. Upravo, rezultati studija pokazuju da narušena GSH homeostaza i inaktivacija GSH-zavisnih enzima, doprinose inicijaciji i progresiji neurodegenerativnih bolesti uključujući PB [149,150].

1.10 Uloga komponenti oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u patogenezi Parkinsonove bolesti

Mozak je posebno osetljiv na štetno delovanje RKV/RAV zbog visoke metaboličke aktivnosti i relativnog sniženog redukujućeg kapaciteta za ćelijsku regeneraciju u poređenju sa drugim organima. U slučaju određenih neurodegenerativnih bolesti kao što su PB, AB i amiotrofička lateralna skleroza (ALS) specifični regioni mozga podležu selektivnoj neurodegeneraciji. Napad RKV/RAV na glijalne ćelije i neurone za posledicu ima oštećenje [151] i smrt neurona [152]. Takođe, oksiradikali povećavaju oštećenja DNK [153].

U osnovi teorije OS kod pacijenata sa PB je DA metabolizam [154]. DA se oksiduje monoamin oksidazom A i B (MAO-A i MAO-B) do neurotoksičnog aldehida. Takođe, DA može podleći procesu autooksidacije čime nastaju reaktivni kinoni koji dovode do progresije oksidativnog oštećenja molekula. Preteran višak kinona je toksičan za mitohondrije i daje ključan doprinos mitohondrijalnoj disfunkciji koja pogoršava OS u dopaminergičkim neuronima [155]. Narušena povratna sprega i povećan citosolni sadržaj DA, koji su posledica terapije L-dopom, mogu povećati nivo OS i oštećenja SNpc neurona [156].

Kod pacijenata sa PB potvrđen je povišen nivo produkata LPO. U neuronima je detektovano povećanje HNE i HNE - protein produkata [157–159]. Povećano prisustvo

HNE kod ispitivanih pacijenata potvrđeno je u LT [160], dopaminergičkim ćelijama SNpc, cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) [161,162], kao i u plazmi pacijenata [163]. Ovo ukazuje da LPO može biti uzročno povezana sa PB. Takođe, ovi toksični produkti, nastali tokom oksidativnih promena, znatno doprinose progresiji bolesti [164]. U prilog ovoj hipotezi idu i određena ispitivanja na eksperimentalnim životinjama, u kojima je pokazano da je HNE važan posrednik OS koji ubrzava unos DA nakon vezivanja za –SH grupe DA transportera. Takođe, osim HNE, mnogobrojna ispitivanja pokazala su da je i nivo MDA značajno veći u plazmi [165], kao i u SNpc [166] kod pacijenata obolelih od PB u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod PB pacijenata karakteristična je redukcija GSH u SNpc, uključujući i dopaminergičke neurone u ovoj moždanoj regiji. U skladu sa tim, pri *post-mortem* analizama na uzorcima moždanog tkiva, uočeno je izrazito smanjenje antioksidansa GSH [167,168], povećana proteinska i DNK oksidacija i/ili nitracija, povećan nivo jona gvožđa i povećana aktivnost SOD2 [169].

1.11 Uloga lipida u pojavi i progresiji neurodegenerativnih bolesti

Lipidi imaju važnu ulogu u normalnom/fiziološkom funkcionisanju, time što se ponašaju kao strukturne komponente, energetske depoi i signalni molekuli. Literaturni podaci ukazuju da promenjen metabolizam lipida može doprineti pojavi i progresiji različitih bolesti, uključujući gojaznost, dijabetes, arterosklerozu, kancer, neurološka i neurodegenerativna oboljenja [170–173]. Tako na primer, uočene su promene metabolizma dokosaheksainske kiseline (DHA), esencijalne PNMK, kod pacijenta sa PB, AB, i drugim neurodegenerativnim bolestima [174–176], dok izmenjena signalna transdukcija posredovana diacilglicerolom (DAG) može se povezati sa modifikacijama dugotrajne potencijacije, rastom dentrita, sazrevanjem trnja što za posledicu može imati narušavanje pažnje i memorije [177–179]. Nedostatak apolipoproteina E kod miševa sa arterosklerozno-indukovanom dislipidemijom može se povezati sa narušavanjem metabolizma različitih sfingolipida i glicerofosfolipida [180]. Osim toga, i promene u sastavu glicerofosfolipida poput fosfatidilholina (PC), lizofosfatidilholina (LPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerola (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinozitola (PI), fosfatidne kiseline (PA), kardiolipina (CL), i drugih, primećene

su u različitim bolestima. Te promene dovode do narušavanja fluidnosti i propustljivosti membrane i zajedno sa akumulacijom produkata LPO mogu biti odgovorne za neurodegeneraciju koja se javlja u neurološkim oboljenjima [181]. Upravo, Mulder i saradnici (2003) [172] detektovali su značajno smanjenje LPC koje indukuje smanjenje LPC/PC u CST pacijenata koji boluju od AB, dok su Fucks i saradnici (2005) [182], takođe, uočili smanjenje LPC koje uzrokuje povećanje PC/LPC u plazmi i zaključili, da upravo, praćenje odnosa PC/LPC u plazmi može biti značajan indikator reumatodnog artritisa. Kod parkin-mutiranih fibroblasta u poređenju sa normalnim fibroblastom pronađeni su viši nivoi LPC 16:0⁴ i LPC 18:1⁵ [183], dok je zabeležen negativan efekat LPC-a na dopaminergički sistem [171,184]. U plazmi i frontalnom korteksu pacijenata sa PB uočen je smanjeni nivo ukupnog PC, PC 34:2 i 46:2, PC 34:5, 36:5, i 38:5 [185,186]. Smanjeni nivo PC detektovan ne samo u SNpc kod muškaraca kojima je dijagnostifikovana PB [187], već i u moždanom tkivu eksperimentalnih životinja - miša i zlatne ribice [188]. Osim toga, uočena je povezanost dislipidemije sa rizikom za razvoj PB [189]. Naime, smanjen rizik od nastanka PB dovodi se u vezu kako sa visokim nivoom holesterola u lipoproteinskim česticama niske gustine (LDL-C) tako i ukupnog holesterola (UH) [190–192], dok se pozitivna korelacija uočava između holesterola u lipoproteinskim česticama visoke gustine (HDL-C) i dužine trajanja PB [193].

Stoga, lipidi, poput masnih kiselina, glicerolipida, glicerofosfolipida, sfingolipida, sterola lipida, prenol lipida, saharolipida i poliketida, mogu poslužiti kao potencijalni biomarkeri neurodegenerativnih bolesti.

1.12 Terapija za Parkinsonovu bolest

Osnovnim lekom u tretmanu PB smatra se metabolički prekursor DA, L-dopa koji u prvom redu deluje na motorne simptome bolesti. Mnogim studijama potvrđeno je da L-dopa poboljšava kvalitet života pacijenata i produžuje životni vek (u poređenju sa pacijentima koji nisu uzimali lek), te se i danas smatra zlatnim standardom lečenja [194]. U vezi sa mogućnosti da već rana primena L-dope dovodi do izvesnog neuroprotektivnog dejstva, konačni stav ni danas nije jasno definisan [195,196].

⁴ 1-palmitoil-lizofosfatidil holin

⁵ 1-oleoil-2-hidroksi-sn-glicero-3-fosfoholin

Treba istaći da iako PB nastaje zbog gubitka dopaminergičkih neurona u strijatumu, direktno korišćenje DA u lečenju bolesti nije moguće, budući da ne prolazi krvno-moždanu barijeru (KMB). Upravo, iz pomenutog razloga, koristi se L-dopa, koja putem aktivnog transporta prolazi KMB i koja se nadalje uz pomoć enzima dopa-dekarboksilaze u dopaminergičkim neuronima SNpc transformiše u DA [197]. Iako prolazi KMB, manje od 5 % ovog medikamenta ulazi u dopaminergičke neurone, dok se preostali deo u organizmu transformiše u DA čiji metabolizam za posledicu ima pojavu neželjih dejstva (mučnina, povraćanje) [56]. Zbog neželjenih dejstava u terapiju su uvedeni i inhibitori dekarboksilaze, koji imaju funkciju da blokiraju dopa dekarboksilazu van mozga, omogućavajući da što više L-dope dospe do mozga, čime se povećava njena iskoristivost sa 1 % na oko 10 % [198]. Klinička kombinacija L-dope i dopa dekarboksilaznog inhibitora (u ranijoj ili kasnijoj fazi bolesti), inhibitora MAO-B ili katehol-O-metiltransferazni (COMT) inhibitora⁶, sa dopaminskim agonistima, odlažu početak motornih komplikacija indukovanih L-dopom [199–201]. U praksi dopaminergički agonisti imaju važnu ulogu u terapiji PB s obzirom da direktno deluju na DA receptore i imaju duži poluživot u plazmi nego L-dopa. Monoterapija je moguća sa agonistima DA i primenjuje se u ranijim fazama bolesti i kod mlađih pacijenata (obolelih pre 40-te godine života). Klinička praksa je pokazala da kombinacija terapije sa agonistima DA značajno smanjuje dozu L-dope ili redukuje diskineziju [202].

L-dopa ne utiče na nemotorne simptome bolesti [203], niti zaustavlja progresiju degeneracije neurona u SNpc. Iz pomenutih razloga, L-dopa svoj najveći efekat pokazuje u prve dve godine od početka korišćenja, dok komplikacije nastaju nakon prosečno pet godina od uvođenja terapije. Sa daljom progresijom PB (5-10 godina), efikasnost terapije opada, dolazi do razvoja motornih fluktuacija (eng. „*wearing-off*” and „*on-off*” fenomena) i diskinezija, kao najizražajnijih neželjenih dejstva, i iz tog razloga pacijenti nemaju više stabilan i predvidiv klinički odgovor [204]. Stoga, kako bi se održao inicijalni pozitivan terapeutski odgovor neophodno je odmereno i pošteno povećavati dozu i učestalost primene L-dope [205]. Pojedini istraživači i nadalje zauzimaju stav da je L-dopa toksična za neurone [196], dok je u praksi pokazano da je bolje početi što kasnije sa njenim korišćenjem, kada je stepen bolesti značajno uznapredovao i kada se simptomi PB

⁶ Uključivanjem COMT inhibitora iskoristivost L-dope je od oko 30 %.

ne mogu više uspešno kontrolisati [206]. I pored mnogobrojnih nedoumica oko korišćenja, L-dopa trenutno predstavlja najefikasniji lek za tretiranje bradikinezije i rigiditeta kod osoba obolelih od PB [197].

Pored L-dope u tretmanu se koriste i lekovi koji se mogu klasifikovati u dve grupe: oni čije dejstvo ima efekat na dopaminergički sistem i oni čiji efekat se ispoljava na ćelijama bazalnih ganglija. Druga grupa ima slabiji efekat, utiče na ganglijske ćelije motornog sistema i predstavljaju klasu antiholinergičkih lekova i antagonista N-Methyl-D-Aspartat NMDA - tipa glutamatnih receptora.

Uvođenje adekvatne terapije koja će pacijentima omogućiti što kvalitetniji život i funkcionisanje je postalo veliki izazov. Pribegava se alternativnim strategijama kombinovanja lekova koji se koriste u terapiji PB, od uvođenja monoterapije sa DA ili MAO-B inhibitora ili terapije kombinovanja DA, MAO-B inhibitora, ili COMT inhibitora sa manjom dozom L-dope. Da bi se omogućilo poređenje različitih vrsta medikamenata, moguće je izračunavanje L-dopa ekvivalentne doze tzv. LED. Vrednost LED, koja se dobija sabiranjem doza svakog pojedinačnog antiparkinsonog leka, obezbeđuje koristan parametar praćenja ukupnog dnevnog unosa antiparkinsonih lekova pacijenta [207].

Ciljevi

Imajući u vidu oskudnost podataka o specifičnim i senzitivnim indikatorima PB, **osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je da se identifikuju promene parametara OS i AO zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika, kao potencijalnih markera koji se mogu koristiti u evaluaciji stanja pacijenata sa PB. Osim toga, proučavan je i efekat korišćene terapije (doza i tip) na njihov nivo, odnosno aktivnost.**

U skladu sa navedenim ciljem izučavane su:

1. promene parametara OS i AO zaštite pacijenata obolelih od PB u poređenju sa zdravim ispitanicima, kao i njihova korelacija sa kliničko-patološkim karakteristikama (pol, starost, dužina trajanja bolesti, H&Y stadijum) kod pacijenata obolelih od PB,
2. lipidni profil i odnos intenziteta pikova PC i LPC u plazmi pacijenata obolelih od PB u poređenju sa zdravim ispitanicima, kao i njihova korelacija sa kliničko-patološkim karakteristikama (pol, starost, dužina trajanja bolesti, H&Y stadijum) kod pacijenata obolelih od PB,
3. uticaj doze i tipa terapije na ispitivane parametre OS i AO zaštite, i PC/LPC intenzitet pikova kod pacijenata obolelih od PB,
4. modifikacije ekspresije proteina krvne plazme PB pacijenata u odnosu na kontrole koje mogu nastati usled OS, odnosno pod uticajem poremećenog pro- i anti-oksidativnog balansa, povećanog nivoa AOPP, HNE i drugih reaktivnih aldehida kao posledica bolesti.

Materijali i metode

3.1 Materijali

Hemikalije korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji su bile p.a. stepena čistoće.

Od firme SERVA, Heidelberg, Nemačka, su nabavljene sledeće hemikalije: Tris baza, glicin, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), DMSO (dimetilsulfoksid), hloramin T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum), Drapkinov reagens, kalijum jodid, vodonik peroksid, natrijum hidroksid, kao i mokraćna, hlorovodonična i glacijalna (sirćetna) kiselina.

Od firme Sigma Aldrich, SAD, nabavljeni su: albumin iz goveđeg seruma (BSA), natrijum dodecil sulfat (SDS), 2,5-dihidroksibenzoinska kiselina (DHB), Tween-20, b-merkaptotanol, etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (EDTA), etilen glicerol tetrasirćetna kiselina (EGTA), akrilamid, Folin & Ciocalteus Phenol reagens.

Hloroform i metanol su proizvodi firme LGC Promochem GmbH, Nemačka.

Antitela korišćena u imunoblot analizi su: poliklonska anti-katalaza proizvod firme Abcam, SAD, poliklonski anti- β -aktin i antikožje IgG proizvodi firme Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD, dok su poliklonska anti-Cu/ZnSOD i antizečije IgG proizvodi firme Stressgen, Kanada. Polivinilidendifluorid (PVDF) membrana i 20 x koncentrovani supstrat za hemiluminiscenciju (eng. enhanced chemiluminescence, ECL) su proizvodi firme Millipore Cooperation Biotechnology, SAD, a korišćen molekularski marker Cruz MarkerTM Molecular Weight Standards je nabavljen od firme Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD.

Za ispitivanje nivoa GSH u krvi korišćen je kit BIOXYTECH® GSH-420TM (OXIS International, Inc., SAD), dok je kit za merenje koncentracije HNE proizvod firme MyBio-Source, SAD, a od Cayman Chemical Company, SAD nabavljen je kit za merenje aktivnosti enzima SOD.

3.2 Metode

3.2.1 Ispitanici

Radi ostvarivanja zadatih ciljeva ove doktorske disertacije, u eksperimentima su korišćeni uzorci krvi dobijeni od ukupno 111 ispitanika, od toga 20 zdravih koji su predstavljali kontrolnu grupu, a ostalih 91 su bili pacijenti kojima su neurolozi, sa

posebnim iskustvom u dijagnostici oboljenja poremećaja pokreta na osnovu standardnih dijagnostičkih kriterijuma (*UK Parkinson disease Society Brain Bank Criteria*) potvrdili dijagnozu idiopatske PB.

Kriterijumi za uključivanje zdravih ispitanika podrazumevali su:

- starost što približnju starosti pacijenata,
- odsustvo neuroloških i/ili psihijatrijskih oboljenja,
- odsustvo hroničnih oboljenja i pripadajuće medikamentozne terapije.

Kriterijumi za isključivanje zdravih ispitanika bili su:

- klinički značajne laboratorijske vrednosti koje odstupaju od referentnih ili preporučenih vrednosti i/ili hronična oboljenja,
- medicinska istorija malignih oboljenja, autonomnih, gastrointestinalnih, kardiovaskularnih, hepatičkih, renalnih, hematoloških, endokrinih, neuroloških, imunoloških, pulmoloških ili drugih medicinskih poremećaja,
- trudnoća ili dojenje.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata podrazumevali su:

- starost ispitanika iznad 30 godina života,
- dijagnoza idiopatske PB (na osnovu *UK Parkinson disease Society Brain Bank Criteria*),

Kriterijumi za isključivanje pacijenata bili su:

- klinički značajne laboratorijske vrednosti koje odstupaju od referentnih ili preporučenih vrednosti i/ili klinički značajna hronična oboljenja,
- poremećaj koji može interferirati sa adsorbcijom, distribucijom, metabolizmom ili ekskrecijom antiparkinsone medikacije,
- medicinska istorija malignih oboljenja, autonomnih, gastrointestinalnih, kardiovaskularnih, hepatičkih, renalnih, hematoloških, endokrinih, neuroloških, imunoloških, pulmoloških ili drugih medicinskih poremećaja,
- trudnoća i dojenje.

Studija je sprovedena uz pisanu saglasnost svakog ispitanika i odobrenje Etičkih komiteta Kliničkog centra Republike Srbije (broj protokola: 105/12) i Vojnomedicinske akademije (broj protokola: 18-05/16). Od svakog ispitanika je uzeta kompletna medicinska istorija. Svi pacijenti koji su učestvovali u studiji su pacijenti koji su ambulantno i/ili bolnički lečeni u Klinici za neurologiju, Kliničkog centra Republike Srbije i na Odeljenju funkcionalne neurologije, Vojnomedicinske akademije. Bolest pacijenata je dijagnostikovana od strane neurologa specijalizovanih za poremećaje pokreta, dok su pacijenti bili podeljeni u više grupa na osnovu: pola, godina starosti, dužine trajanja bolesti i stadijuma bolesti (H&Y skala) (Tabela 1). Takođe, pacijenti su dodatno podeljeni i na one koji nisu primili terapiju (*de novo*) i one koji su na antiparkinsonoj terapiji (apt).

3.2.2 Uzorkovanje krvi i priprema uzoraka

Kod svih ispitanika krv je uzorkovana u jutarnjim časovima, nakon perioda gladovanja u trajanju od 10 h tokom noći. Krv je uzorkovana u dva seta polipropilenskih epruveta/tuba sa antikoagulansom EDTA K₂ (Vacutainer BD Diagnostics, Plymouth, UK).

Prvi set uzoraka je korišćen za praćenje pomena parametara OS kod svih 111 ispitanika (20 kontrola i 91 pacijenta sa PB), dok je kod 10 zdravih ispitanika i 25 pacijenata sa PB određivan lipidni profil i PC/LPC intenzitet pikova⁷. Za oba tipa analiza, krv je u roku od 30 min nakon uzorkovanja centrifugirana na 1500 g, 10 min, 4°C (Eppendorf centrifuga 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Nemačka), izdvojena plazma je zatim podeljena u alikvotne od 100 µl i čuvana na -80°C do upotrebe, osim uzoraka za merenja koja su vršena odmah.

Drugi set uzoraka (n = 111) je u cilju pripreme lizata ćelija iz pune krvi, za analizu parametara AO zaštite nakon uzorkovanja zamrznut na -80°C i čuvan do upotrebe.

⁷Manji broj uzoraka, ali reprezentativnih, je korišćen za ispitivanje lipidnog profila i odnosa PC i LPC intenziteta iz tehničkih razloga s obzirom da su analize odrađene u Institutu za medicinsku fiziku i biofiziku, Odseka za medicine, Univerziteta u Lajpcigu, Lajcig, Nemačka. Dobijeni rezultati su prikazani kao relevantni za celokupnu ispitivanu populaciju i kao takvi su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.2.3 Priprema uzoraka za određivanje lipidnog profila

Ukupni lipidni ekstrakt plazme je pripremljen po Folch [208] metodi sa manjim modifikacijama [209,210] koristeći sistem rastvarača hloroform/metanol/voda. Uzorak plazme (50 µl) je homogenizovan u ultrazvučnom kupatilu na 40°C, 10 min sa 3 ml rastvarača hloroform/metanol (2:1, v/v). Nakon toga, dodavana je dejonizovana voda (600 µl) i celokupna smesa je centrifugirana 3 min, 3000 rpm na sobnoj temperaturi (RT). Nakon odvajanja organskog i vodenog sloja, organski sloj je uparen blagom strujom azota. Svi uzorci su analizirani u duplikatu.

3.2.4 Priprema uzoraka iz pune krvi za analizu parametara AO zaštite i merenje koncentracije hemoglobina

Celokupan proces liziranja krvnih ćelija rađen je na hladnom. Nakon postepenog odleđivanja i dobrog vorteksovanja, u uzorke je dodavana destilovana voda (dH₂O) u odnosu 1:3. Uzorci su potom vorteksovani 1 min, centrifugirani na 10000 g, 15 min, 4°C (Eppendorf centrifuga 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Nemačka), alikvotirani i zamrznuti na -80°C do merenja enzimске aktivnosti.

Nakon pripreme lizata, izmerena je koncentracija hemoglobina (Hb), dodavanjem 2,5 ml Drapkinovog reagensa u 10 µl lizata eritrocita. Smeša je potom vorteksovana i ostavljena 20 min na RT i izmerena je apsorbancija na 546 nm (UV Line 9400, SI Analytics GmbH, Nemačka). Kao slepa proba se koristio Drapkinov reagens.

3.3 Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.3.1 Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

Koncentracija PAB u uzorcima plazme ispitanika određivana je korišćenjem metode Hamidi-Alamdaria i saradnika [211] uz određene modifikacije⁸.

Za pravljenje standardne krive su korišćeni rastvori H₂O₂ i mokraćne kiseline u različitim odnosima. Kapacitet prisutnih antioksidanasa je kalibrisan prema mokraćnoj kiselini i

⁸ Modifikacija metode se odnosi na prilagođavanje zapremine uzorka, standardnih rastvora, slepe probe i reagenasa standardnim zapreminama bazena mikrotiter ploče i povećanjem količine enzima peroksidaze u radnom rastvoru. Time je omogućeno dobijanje linearne zavisnosti između koncentracije i apsorbancije prilikom izrade kalibracione krive.

izražavan u $\mu\text{mol/l}$, a kapacitet prooksidanasa je kalibrisan prema H_2O_2 i izražavan u $\mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2$.

Korišćeni su sledeći reagensi:

TMB I rastvor: 60 mg TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) + 10 ml dimetilsulfoksida (DMSO).

TMB katjon: 1 ml TMB I + 50 ml acetatnog pufera (0,05 M, pH 4,5) + 175 μl sveže pripremljenog hloramina T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum) (100 mmol/l). Rastvor je dobro promešan i inkubiran 1 h na 37 °C, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije u 50 ml TMB katjona dodavano je 25 U enzima peroksidaze.

TMB II rastvor: 200 μl TMB/DMSO je rastvoreno u 10 ml acetatnog pufera (0,05 M, pH 5,6). Ovako pripremljen rastvor korišćen je odmah ili maksimalno u roku od 2 dana, pri čemu je čuvan na temperaturi od 4°C.

Radni rastvor: 1 ml TMB katjona je dodan u 10 ml TMB rastvora II i 6 min mešan na RT i na tamnom mestu. Pripremljen radni rastvor je korišćen odmah.

Postupak: U bunariće mikrotitar ploče dodavani su standardni rastvori, slepa proba (dH_2O) i ispitivani uzorci (po 10 μl). Zatim je višekanalnom automatskom pipetom dodavano 180 μl radnog rastvora, te je mikrotitar ploča inkubirana na tamnom mestu 12 min na 37°C. Reakcija je bila zaustavljena sa 40 μl 2 mol/l hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu.

Metoda je spektrofotometrijska, a apsorbanca je merena na 450 nm (LKB Vertriebs GmbH, DV 990 BV4-6, Austrija). Na osnovu izmerenih apsorbanacija koje se dobijaju u standardnim rastvorima konstruisana je kalibraciona kriva iz koje su očitavane koncentracije uzoraka.

Vrednosti PAB-a su izražavani u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima pomnožen sa 6.

3.3.2 Detektovanje produkata oksidativne modifikacije proteina (AOPP)

Modifikovana metoda koju su postavili Witko-Sarsat i saradnici [212]⁹ korišćena je za određivanje koncentracije AOPP kao markera oksidativnog stresa na automatskom analizatoru Ilab 300+ (Diamond Diagnostic INC, SAD) na 340 nm.

Određivanje AOPP se zasniva na metodi završne tačke sa slepom probom reagensa. U uzorak plazme, odnosno standarda (60 µl) dodaje se 300 µl reagensa R1 i posle inkubacije od 1 min očitava se prva apsorbanca uzorka. Nakon toga, reakcionoj smeši dodaje se reagens R2 i posle inkubacije od 3 min, ponovo se meri apsorbanca na talasnoj dužini 340 nm.

Korišćeni reagensi:

R1: glacijalna kiselina izmešana sa fosfatnim puferom u odnosu 1:8;

R2: kalijum jodid rastvoren, takođe, u fosfatnom puferu.

Koncentracija AOPP je izražena preko ekvivalenta hloramina T koji je upotrebljen za izradu standardne prave u rasponu koncentracija od 10 do 100 µmol/l, pri čemu njegova apsorbanca linearno raste sa porastom koncentracije.

3.3.3 Određivanje koncentracije hidroksinonenala

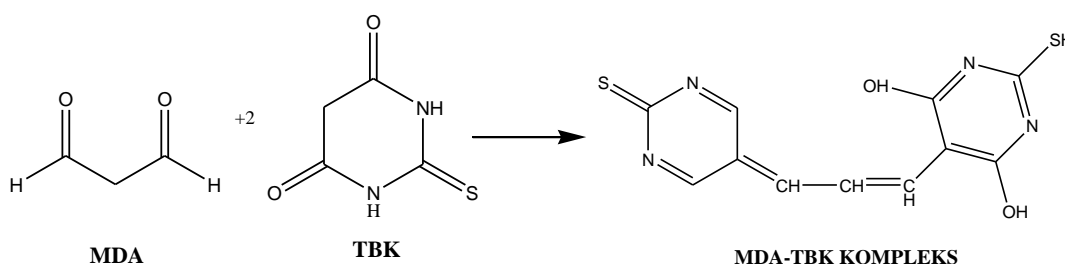
Koncentracija HNE ispitivana je specifičnim enzimskim imunoesejem za kvantitativno određivanje u humanim uzorcima. Standardi/kontrolni/nepoznati uzroci plazme (50 µl) su nanošeni na mikrotitar ploču čiji su bunarići obloženi specifičnim HNE antitelom i inkubirani 2 h na 37°C. Nakon uklanjanja tečnosti, dodavano je konjugovano biotin antitelo specifično za HNE, ploča je potom inkubirana 1 h na 37°C, ispirana i dodavano je 50 µl HRP-avidina (avidin konjugat peroksidaze). Ploča je ponovo inkubirana 1 h na 37°C i ispirana, pa je dodavan hromogeni supstrat TMB (tetrametilbenzidin) koji dovodi do razvijanja boje i čiji je intenzitet proporcionalan količini vezanog HNE u početnom koraku eseja. Reakcija je zaustavljena stop reagensom, nakon čega je očitavana apsorbanca na 450 nm. Koncentracija HNE je određena spektrofotometrijski na ELISA čitaču (LKB Vertriebs GmbH, DV 990 BV4-6, Austrija)

⁹Optimizacija metode se ogleda u mogućnosti analize uzoraka na automatskom analizatoru

upoređivanjem optičke gustine (eng. *optical density*, OD) uzoraka sa standardnom krivom. Koncentracija HNE je data u mg/ml.

3.3.4 Određivanje koncentracije tiobarbiturne kiseline reagujućih supstanci (TBARS)

Nivo MDA i ostalih reagujućih supstanci sa tiobarbiturnom kiselinom (TBK) meren je specifičnim esejem [87] koji se zasniva na obrazovanju crveno-obojenog kompleksa MDA-TBK. Princip ove metode se zasniva na sledećoj reakciji (Slika 9):



Slika 9. Proces formiranja MDA-TBK kompleksa.

Postupak: U 0,3 ml plazme dodato je 0,6 ml TBK reagensa. Dobijena smeša je promešana, zagrevana na 100°C u vodenom kupatilu, 5 min. Nakon hlađenja i centrifugiranja na 10000 g, 10 min, 4°C (Eppendorf centrifuga 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Nemačka), apsorbanca supernatanta očitavana je na 535 nm (LKB Vertriebs GmbH, DV 990 BV4-6, Austrija). Za izračunavanje koncentracije TBARS korišćena je standardna kriva konstruisana na osnovu apsorbaneci koje su dobijene upotrebom radnih rastvora koncentracije od 1-10 µmol/l, napravljenih od osnovnog standarda MDA koncentracije 1 mmol/l.

3.4 Određivanje lipidnog profila/statusa masenom spektrometrijom zasnovanom na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa

U ovoj eksperimentalnoj postavci, od interesa je bilo detektovanje potencijalnih promena odnosa intenziteta PC i LPC, kao glavnih konstituenata membrane i esencijanih signalnih molekula, kod pacijenta sa PB u odnosu na kontrole, s obzirom da su promene uočene u drugim neurodegenerativnim bolestima. Takođe, proučavana je i njihova povezanosti sa kliničko-patološkim karakteristikama. Treba istaći da je pristup

izračunavanja odnosa intenziteta informativan, a da za njegovu primenu nije potrebno korišćenje internog standarda, dok je priprema uzoraka i snimanje spektara relativno jednostavno i ekonomski isplativije u poređenju sa drugim metodama. Takođe, dodatna prednost je u tome što nije potrebno prethodno poznavanje očekivanih koncentracija lipida pre ovog tipa merenja [213].

MALDI-TOF (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time Of Flight*) masena spektrometrija je rutinska metoda za detekciju i analizu molekula prisutnih u uzorcima u malim koncentracijama. U odnosu na druge spektrometrijske metode pogodnost korišćenja ove metode ogleda se u tome što nije potrebna modifikacija uzorka, mogu se obraditi uzorci biološkog porekla koji imaju povišenu koncentraciju neorganskih soli, dok se rezultati dobijaju brzo (spektri se mogu dobiti za nekoliko sekundi).

Postupak: upareni uzorci pripremljeni za određivanje lipidnog profila su tretirani matricom za MALDI-TOF analizu. Rastvor matrice sastojao se od 0,5 M 2,5-dihidroksibenzoiniske kiseline (DHB)¹⁰ u metanolu [213,215–217] u koncentraciji 10 mg/ml. Na sahatnom staklu su pomešane iste zapremine uzorka i DHB matrice i takav homogeni rastvor (1 µl) je nanešen u bunare čelične MALDI pločice, u duplikatu. Da bi se postigla što veća homogenost uzorka, uzorci su sušeni pod strujom toplog vazduha, nakon čega je pristupljeno MALDI-TOF analizi.

Svi spektri snimljeni su u pozitivnom modu na Bruker Autoflex Speed masenom spektrometru (Bruker, Nemačka), azotnim laserom na 355 nm. Spektri su dobijeni u reflektornom modu, dok su uslovi „zakasnele ekstrakcije” (eng. *delayed extraction*) korišćeni kako bi se poboljšao kvalitet spektara. Kalibracija je rađena korišćenjem lipidne smeše poznatog sastava. Svaki spektar u proseku je snimljen sa 500 udaraca laserom, koji je nasumično pomeran po uzorku (koristeći „nasumični hod”) da bi se izbegla/kompenzovala nehomogenost analit matriks ko-kristala.

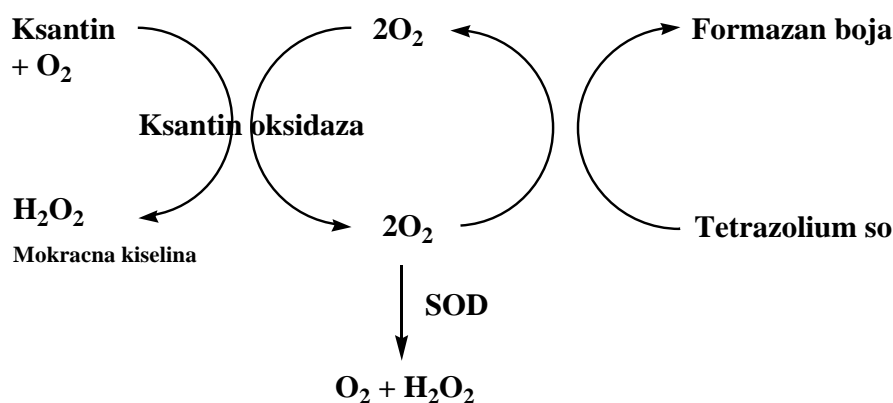
¹⁰ DHB je korišćena kao jedna od najboljih i najupotrebljivijih matrica za snimanje spektara malih molekula u pozitivnom jon modu [214]. U poređenju sa matricama dobijenim od cinaminske kiseline (poput eng. *α-cyano-hydroxy-cinamic acid (CHCA)*), ona daje znatno manji pozadinski šum što je posebno važno kada se snimaju lipidi relativno malih molekulskih masa. Još jedna prednost DHB je ta što se gotovo sva jedinjenja mogu detektovati, dok druge matrice, kao što je 9-amino akridin, ne mogu detektovati neutralna jedinjenja, kao što su triacil gliceroli.

Za prevazilaženje problema različitih adukata (H^+ i Na^+), koji nastaju u prisustvu DHB matrice, intenziteti oba adukta su uzeta u obzir i odgovarajući odnosi su izračunati. PSD (eng. *post-source decay*) eksperimenti su, takođe, rađeni da bi se dobijeni pikovi dodatno potvrdili. Prekursor jona od interesa je izolovan korišćenjem vremenskog jonskog selektora (eng. *timed ion selector*).

3.5 Metode za određivanje ispitivanih parametara antioksidativne zaštite

3.5.1 Merenje aktivnosti superoksidaze (SOD)

Ukupna SOD aktivnost merena je specifičnim esejem (Slika 10) koji se zasniva na reakciji O_2^- i tetrazolijum soli koji se generiše ksantin oksidazom. Jedna jedinica SOD je definisana kao količina enzima potrebna da pokaže 50% dizmutacije superoksid radikala.



Slika 10. Shematski prikaz SOD esejja.

Esej je izveden u mikrotiter ploči sa 96 bunarića u koje je nanoseno po 10 μ l standarda sa konačnom SOD aktivnosti od 0 do 0,05 U/ml odnosno uzoraka. U sve bunariće dodavano je po 200 μ l radikalskog detektora odnosno rastvora tetrazolijum soli. Reakcija je bila započeta dodavanjem 20 μ l pufera za uzorke (50 mM TRIS-HCl, pH 8.0). Nakon inkubacije od 30 min uz blago mešanje, izmerena je apsorbancna na 450 nm ELISA čitaču (Wallac 1420 Victor², Perkin Elmer Inc., SAD).

3.5.2 Merenje aktivnosti katalaze (CAT)

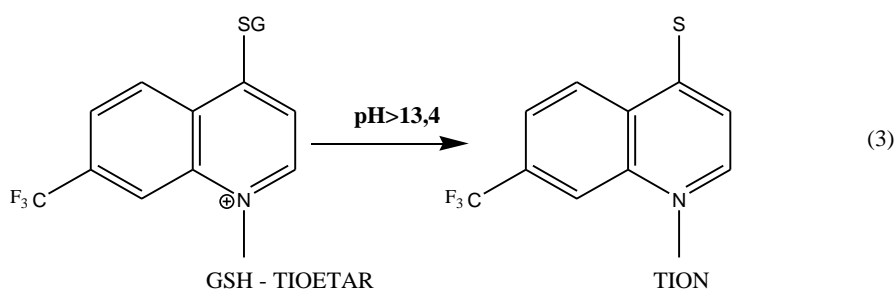
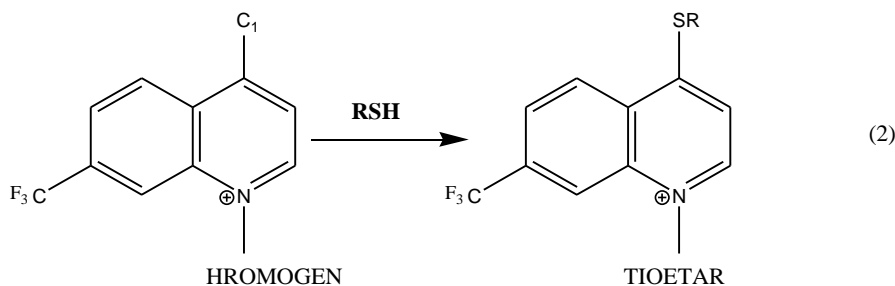
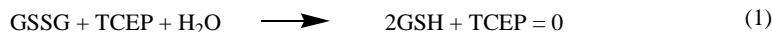
Aktivnost katalaze u ispitivanim uzorcima je određivana po metodi Beutlera [218].

Postupak: Reakciona smeša je pripremljena od 50 μl Tris-HCl pufera (1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0), 900 μl substrata (10 mM H_2O_2), 30 μl dH_2O i 20 μl uzorka. Razlaganje H_2O_2 je praćeno spektrofotometrijski (UV Line 9400, SI Analytics GmbH, Nemačka) na 230 nm, na svakih 30 sek tokom 3 min na 37°C. Jedna jedinica CAT aktivnosti je definisana kao količina enzima koja razgradi 1 μmol H_2O_2 u min pri predhodno optimizovanim uslovima eseja. Milimolarni ekstincioni koeficijent H_2O_2 iznosi 0,071 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.3 Merenje koncentracije glutationa (GSH)

Koncentracija GSH je određivana u tri kolorimetrijska reakciona koraka (Slika 11):

1. Korak 1: redukovanje svih oksidovanih glutationa (GSSG) u uzorku do redukovanog stanja pomoću tris (2-karboksietil) fosfin (*eng. Tris (2-carboxyethyl) phosphine, TCEP*) (jednačina 1),
2. Korak 2: formiranje tioetra u prisustvu hromogena (4-hloro-1-metil-7-trifluorometilkinolinium metilsulfat, *eng. 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethylquinolinium methylsulfate*) koji reaguje sa tiolima u uzorku (jednačina 2),
3. Korak 3: formiranje hromofornog tiona (*eng. chromophoric thione*) kao rezultata β -eliminacije koja je specifična za GSH-tioetre kada se doda baza (NaOH) i pH reakcione smeše raste preko 13 (jednačina 3).



Slika 11. Shematski prikaz tri kolorimetrijska reakciona koraka.

U eksperimentalne tubice (Eppendorf, Nemačka) dodavana je jednaka zapremina uzoraka, pufera (kalijum-fosfat, pH 7,8) i redukujućeg agensa (TCEP) i smeša je dobro vorteksovana. Potom je dodavan hromogen i nakon vorteksovanja, u poslednjem koraku u reakcionu smešu je dodat indikator boje (NaOH u H₂O). Smeša je inkubirana u mraku na RT 30 min, i apsorbancija je izmerena na 420 nm (UV Line 9400, SI Analytics GmbH, Nemačka).

3.6 Određivanje koncentracije proteina

Zbog poređenja dobijenih rezultata sve aktivnosti, odnosno ekspresije oba ispitivana enzima AO zaštite obračunate su u odnosu na količinu proteina u punoj krvi, koja je određivana po modifikovanoj¹¹ Lowry-jevoj metodi [219], korišćenjem albumina iz goveđeg seruma (BSA) u opsegu koncentracija 0,2-10 mg/ml kao standarda.

¹¹ Modifikacija metode podrazumevala je dodavanje natrijum-dodecil-sulfata (SDS) u bazni reagens i povećanje količine Na-K-tartaratnog reagensa. Prednost korišćenja ove metode zasniva se na tome što se koncentracija proteina može odrediti bez unapred urađene solubilizacije i ekstrakcije lipida, a dodavanjem SDS sprečava se taloženje denaturisanih proteina unutar kivete za merenje i na taj način se može izmeriti veći broj uzoraka u kratkom roku.

Postupak: u seriju epruveta dodavano je po 10 μ l uzorka/slepe probe (dH₂O)/rastvora BSA, 890 μ l dH₂O i 100 μ l 1 M NaOH. Nakon mućkanja i inkubacije od 10 min na RT, u smešu je dodavano 3 ml reagensa C, nakon čega je sledilo vorteksovanje i inkubacija od 20 min na RT a potom dodavanje 0,3 ml reagensa D, vorteksovanje i inkubacija od 45 min na RT.

Korišćeni reagensi:

Reagens A: 2 % Na₂CO₃ + 0,4 % NaOH + 0,16 % Na-K-tartarat + 1 % SDS;

Reagens B: 4 % CuSO₄ x 5 H₂O;

Reagens C: Reagens A: Reagens B (100:1), pravi se neposredno pre upotrebe;

Reagens D: Folin & Ciocalteus Phenol reagens se razblažuje sa dH₂O u zapreminskom odnosu 1:1.

OD uzorka/slepe probe (dH₂O)/rastvora BSA izmerena je spektrofotometrijski na 750 nm (S-30 Boeco, Nemačka). Na osnovu dobijenih vrednosti standarda konstruisana je prava i određivana je koncentracija proteina u uzorcima.

3.7 Elektroforeza proteina i kvantifikacija proteina Western blot metodom

Imunoblot („Western blot”) analizom ispitivana je ekspresija specifičnih molekula na nivou proteina u krvi zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB.

3.7.1 Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Pomoću pufera za izolaciju, koncentracije proteina u uzorcima su svedene na 2.5 mg/ml i pred samu upotrebu alikvoti su pomešani sa puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE (2 x Sample Buffer) i β -merkaptetanolom u zapreminskom odnosu 1:9 [220]. Posle inkubacije smeše na 100°C, 5 min, uzorci su ohlađeni i po 16 μ l pripremljenih uzoraka (~ 40 μ g) nanošeno je u bunariće predhodno pripremljenog 10 % poliakrilamidnog (PAA) denaturišućeg gela. Kao molekularni marker korišćen je Cruz Marker™ Molecular Weight Standards, koji se sastoji od 9 proteina različitih molekularnih masa (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa).

Na osnovu molekularne mase, proteini su razdvajani na PAA gelu elektroforezom u sistemu Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) u puferu koji je sadržao

0,25 M TRIS bazu, 0,192 M glicin i 0,1 % SDS. Elektroforeza je pri konstantnom naponu od 100 V trajala oko 90 min na RT. Nakon završetka razdvajanja proteina elektroforezom gelovi su korišćeni za Western blot analizu.

3.7.2 „Western blot“ analiza

Nakon završene elektroforeze, gelovi su potapani u pufer za transfer (20 % metanol, 0,025 M TRIS HCl, 0,192 M glicin, pH 8,3) i aktivirana je polivinilidendifluorid (PVDF) membrana. Postupak aktivacije PVDF membrane je podrazumevao njeno potapanje u 100 % metanol 15 sek, ispiranje u dH₂O (2 min) i potapanje u transfer pufer 5 min.

Nakon toga, formiran je „sendvič“ koji se sastojao: od jednog papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), PAA gela, PVDF membrane i jednog papira Whatman (svi natopljeni puferom za transfer). Prenos proteina sa gela na PVDF membranu odrađen je u sistemu za transfer (Trans-Blott Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) tokom 60 min, pri konstantnom naponu od 100 V, na 4°C.

Nakon završenog transfera, kako bi se utvrdila njegova efikasnost, membrane su bojene 1 % rastvorom Ponceau S u 5 % sirćetnoj kiselini. Nakon uklanjanja viška boje vodom, membrane su inkubirane 1–2 h u puferu za blokiranje, 5 % BSA rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), na RT uz blago mućkanje. Membrane su potom isečene prema markeru na određenim molekulskim masama i inkubirane preko noći sa odgovarajućim primarnim antitelima na CAT (razblaženje 1:5000), Cu/ZnSOD (razblaženje 1:7500) i β-aktin (razblaženje 1:1000). Nakon završene inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 3 x 10 min TBST puferom na RT uz blago mućkanje i inkubirane 1,5 h uz mućkanje sa odgovarajućim sekundarnim antizečijim ili antikozijskim antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženje 1:5000). Membrane su nakon toga ispirane i inkubirane 5 min sa supstratom za hemiluminiscenciju (ECL), nakon čega su osušene, pokrivene tankom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filma. Rendgen film (Fuji, Japan) postavljen je na pokrivenu membranu pri čemu je dužina ekspozicije varirala (1–5 min). Intenzitet signala na filmu odgovarao je količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Imunohemiluminescentni signal koji potiče poreklom od ciljnog proteina kvantifikovan je denzitometrijski u programu za analizu slike ImageJ.

3.8 Određivanje ukupne dnevne L-dopa ekvivalentne doze (LED) kod pacijenata obolelih od PB

S obzirom da svaki pacijent individualno reaguje na primenjenu terapiju, vrsta terapije, i njeno doziranje razlikuju se od pacijenta do pacijenta. Kako bi bilo moguće uporediti primenjene terapije, a imajući u vidu da svaki pojedinačni pacijent prima različitu kombinaciju lekova, bilo je neophodno uvesti jedinstveni parametar (LED) za čije izračunavanje korišćeni su konverzioni faktori. Vrednosti konverzionih faktora preuzete su iz rada Tomlisona i saradnika [207] i prikazani u Tabeli 3.

Ukupni dnevni LED pacijenata izračunava se sumiranjem vrednosti dobijenih množenjem dnevnih doza medikamenata i odgovarajućih konverzionih faktora, za svaki pojedinačni medikament.

Tabela 3. LED-ovi za antiparkinson medikamente

Klasa medikamenata	Medikament	Ukupan LED (mg/100 mg L-dopa)
L-dopa	L-dopa	100
	Kontrolisano otpuštajuća L-dopa	133
COMT inhibitori	Entacapone	LD x 0,33
	Pramipexole	100
DA agonisti	Ropinirole	5
	Bromocriptine	10
	Selegiline	10
MAO-B inhibitori	Rasagiline	1
	Amantadine	100

Kako bi se izračunao ukupan LED za COMT inhibitore, ukupna količina L-dopa je izračunata i zatim pomnožena sa odgovarajućim konverzionim faktorom. Za Stalevo, L-dopa i COMT inhibitor je razdvojen i izračunat odvojeno.

3.9 Statistička obrada podataka

Sve vrednosti obrađene su metodama deskriptivne statistike. Testiranje normaliteta distribucije podataka rađeno je *Shapiro–Wilks* testom. Zbog utvrđenih odstupanja od normalne distribucije analiziranih varijabli, za statističku analizu su korišćeni neparametrijski testovi. Za testiranje razlika ispitivanih parametara između dve grupe ispitanika korišćen je *Mann Whitney* test koji je alternativa Student-ovog i testa za uzorke koji ne prate normalnu raspodelu. *Kruskal–Wallis* test je korišćen za testiranje razlika između grupa pri ispitivanju parametara OS i AO zaštite, PC/LPC intenziteta pikova, kao i za testiranje efekta primenjenog tipa terapije i njegove doze. Odnos između kategoričkih varijabli utvrđivan je *Chi-square* (χ^2) testom.

Za utvrđivanje korelacije između parametara OS – AO zaštite, kao i korelacije između kliničko-patoloških karakteristika i parametara AO zaštite odnosno oksidativnih varijabli, korišćena je *Spearman* neparametrijska korelaciona analiza.

Generalni linearni model (GLM) je korišćen za testiranje linearne zavisnosti između ispitivanih parametara i kliničko-patoloških karakteristika. Kao preduslov tačnosti modela, vrednosti merenja za zavisne varijable prethodno su *log* transformisane.

Podaci dobijeni MALDI-TOF masenom spektrometrijom obrađeni su pomoću programa „Flex Analysis” verzija 2.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Nemačka). Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa određivane su *Mann Whitney*, *Kruskal–Wallis* i *Games Howell post hoc* testom.

Kvantifikacija rezultata dobijenih imunoblot analizom je izvršena denzitometrijskom analizom signala u programu ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Svi eksperimenti su ponovljeni dva puta, svaki put sa novom grupom zdravih ispitanika i pacijenata sa PB. Izmerene vrednosti OD signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražene u arbitrarnim jedinicama (count). Sve vrednosti su izražene u odnosu na β -aktin sa istog blota, a rezultati su potom predstavljeni kao procenat od kontrole.

Vrednost $p < 0,05$ je korišćena kao statistički značajna.

Statistička analiza je rađena korišćenjem programa Graph-Pad Prism6 (San Diego, CA, SAD) i SPSS 18.0. za Windows (SPSS Inc., SAD).

Rezultati

U ispitivanju je učestvovalo 20 zdravih ispitanika i 91 pacijent sa PB, od kojih je 14 bilo *de novo*, odnosno sa tek otkrivenom bolesti bez terapije, a 77 je lečeno odgovarajućom terapijom. Svi pacijenti su podeljeni prema polu, starosti ispitanika i životnoj dobi u kojoj je postavljena dijagnoza, dužine trajanja bolesti i H&Y stadijuma¹². Zastupljenost muškaraca i žena u ispitivanim grupama je pokazala da nije statistički značajna ($\chi^2 = 0,810$; $p = 0,428$). Kao što je prikazano u Tabeli 4, prosečna starost zdravih ispitanika iznosila je $58,70 \pm 7,62$, a pacijenata $64,66 \pm 7,92$ godina, pri čemu je većina pacijenata bila muškog pola (70 %). Prosečna starost ispitanika kada je bolest dijagnostikovana bila je $58,41 \pm 9,06$ godine, dok je prosečna dužina trajanja bolesti bila $6,25 \pm 4,02$ godina. Zastupljenost obolelih u početnom H&Y stadijumu bolesti bila je najmanja, dok su H&Y stadijum 2 i 3, očekivano, najzastupljeniji (38,5 % odnosno 29,7 %, respektivno) (Tabela 4).

Tabela 4. Demografski i klinički podaci zdravih ispitanika (Kontrole) i pacijenata sa PB (Pacijenti).

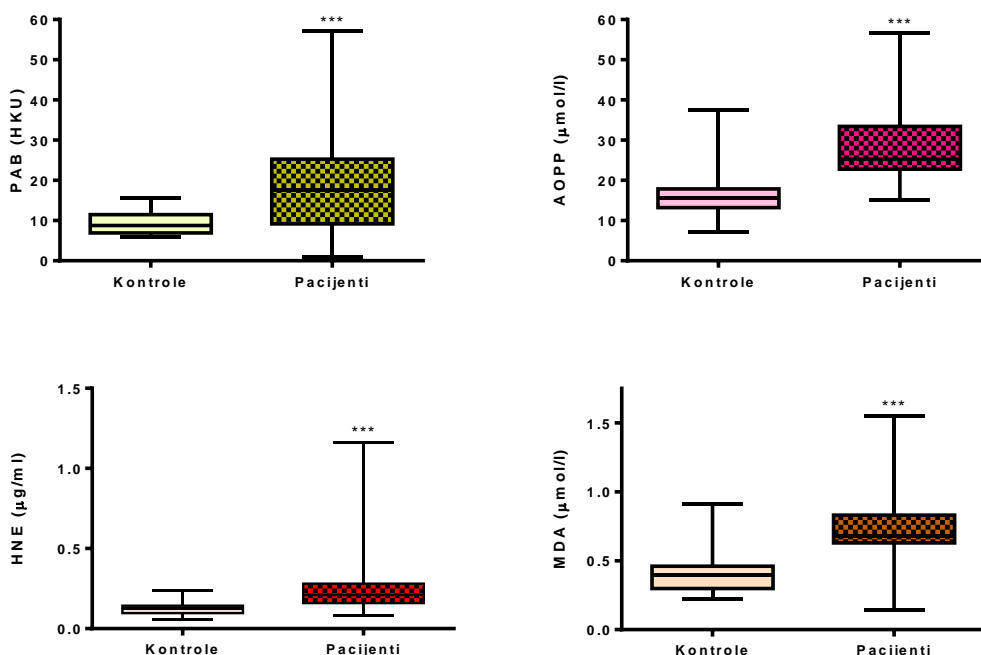
	Kontrole	Pacijenti	χ^2	p
Pol, N (%)				
Muškarci	12 (60)	64 (70)	0,810	0,428
Žene	8 (40)	27 (30)		
Starost ispitanika (godine)	$58,70 \pm 7,62$	$64,66 \pm 7,92$		
N (%)				
<59		18 (19,8)		
59-70		52 (57,1)		
> 70		21 (23,1)		
Starost ispitanika kada se bolest javila (godine)		$58,41 \pm 9,06$		
Dužina trajanja bolesti (godine)		$6,25 \pm 4,02$		
N (%)				
≤ 3		27 (29,7)		
4 - 8		40 (44,0)		
≥ 9		24 (26,4)		
H&Y stadijum, N (%)				
1		10 (11)		
2		35 (38,5)		
3		27 (29,7)		
4		19 (20,9)		
Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD, N – broj ispitanika, (%) – udeo u odnosu na N				

¹² U ovoj studiji, pacijenti su bili raspoređeni u 5 grupa prema H&Y skali, gde su u H&Y stadijumu 0 bili *de novo* pacijenti, dok su ostali pacijenti klasifikovani u stadijume 1 do 4. Ni jedan pacijent nije bio u H&Y stadijumu 5.

4.1 Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na kontrole

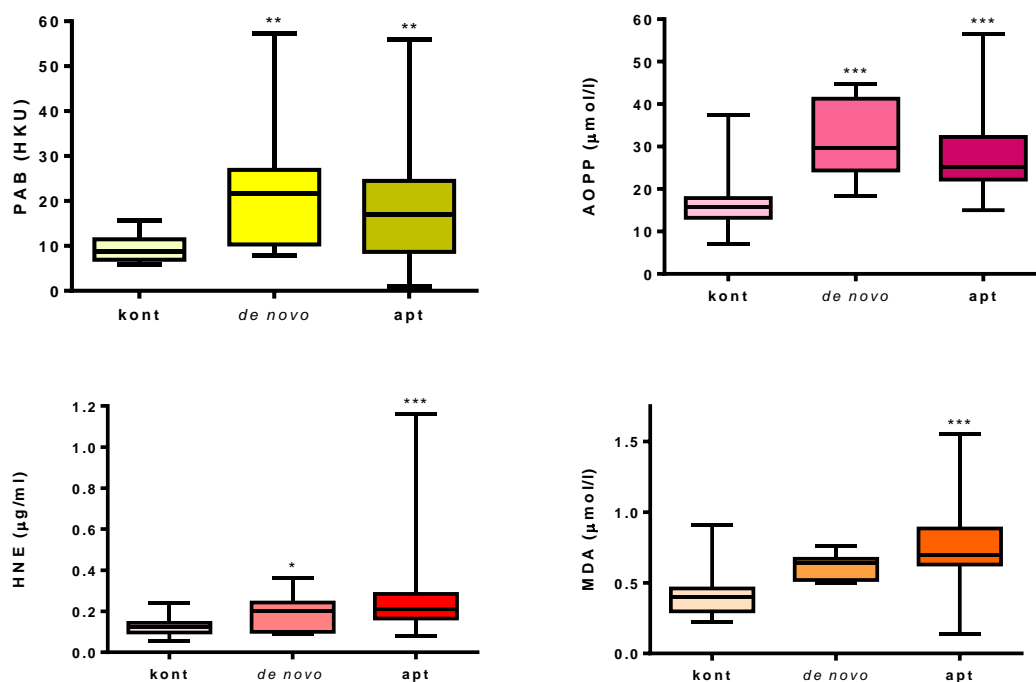
4.1.1 Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od PB u odnosu na kontrole

Na Slici 12 prikazane su dobijene vrednosti za ispitivane OS parametre (PAB, AOPP, HNE i MDA) kod zdravih ispitanika (Kontrole) i pacijenata sa PB (Pacijenti), dok su na Slici 13 predstavljeni rezultati kontrola i pacijenata koji su dodatno podeljeni na one koji nisu na terapiji (*de novo*) i na one koji su već neko vreme lečeni antiparkinsonom terapijom (apt). Naime, povećanje nivoa PAB i AOPP bilo je statistički značajno pri poređenju zdravih ispitanika sa svim pacijentima ($p < 0,001$ za PAB i AOPP) (Slika 12) odnosno sa pojedinačnim grupama pacijenata (za obe grupe pacijenata $p < 0,01$ za PAB odnosno $p < 0,001$ za AOPP) (Slika 13).



Slika 12. Nivo ispitivanih OS parametara, PAB, AOPP i LPO (HNE, MDA), kod zdravih ispitanika (Kontrole) i pacijenata obolelih od PB (Pacijenti). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75 % izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, *** $p < 0,001$ (Mann Whitney).

Sličan trend je detektovan i za HNE (statistička značajnost od $p < 0,001$ uočena je pri poređenju kontrolne grupe i svih pacijenata, odnosno $p < 0,05$ za *de novo* i $p < 0,001$ za apt pacijente u odnosu na kontrole) (Slika 12 i 13), dok se koncentracija MDA ($\mu\text{mol/l}$) statistički razlikuje samo pri poređenju kontrola i apt pacijenata ($p < 0,001$) (Slika 13).



Slika 13. Nivo ispitivanih OS parametara, PAB, AOPP i LPO (HNE, MDA), kod zdravih ispitanika (kont) i *de novo* (de novo) odnosno pacijenata na antiparkinsonoj terapiji (apt). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75 % izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Dunn test).

4.1.2 Lipidni profil plazme kontrolne grupe i pacijenata sa PB

Detaljan opis detektovanih pikova kod kontrola i pacijenata je prikazan u Tabeli 5.

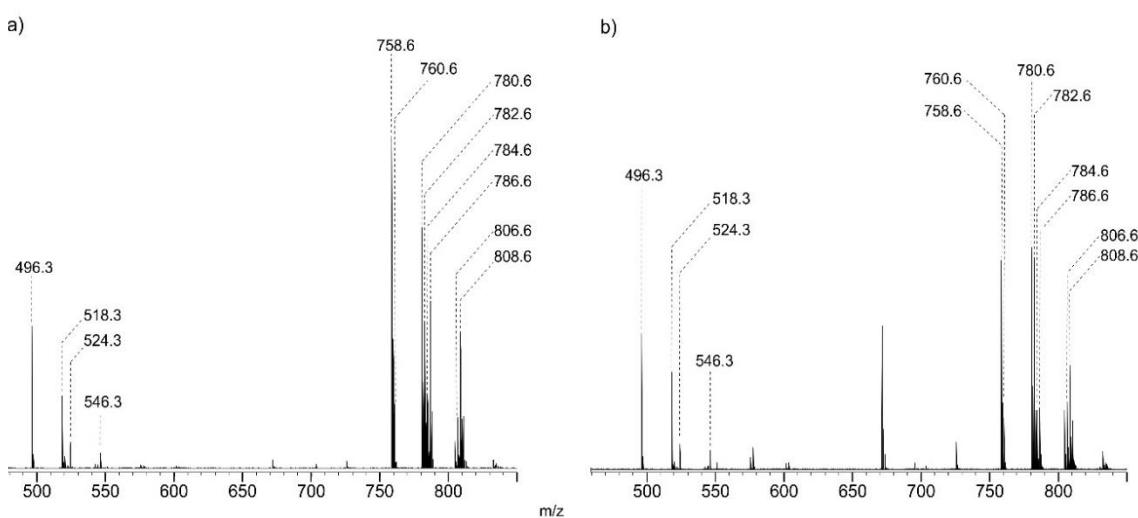
U ovoj eksperimentalnoj postavci, pored karakterističnih pikova fosfolipida (PL) (Slika 14), takođe su identifikovani i pikovi koji odgovaraju sfingomijelinu (SM), posebno SM 16:0 (m/z 703,6 i 725,6). Veoma intenzivan pik na poziciji m/z 671,6 može se dodeliti holesterol estru 18:2, kao dobro poznatom konstituentu plazme, koji se normalno detektuje kada se koristi manje polaran ekstrakcioni rastvarač. Treba istaći da su pored navedenih pikova, uočeni i pikovi u masenom intervalu m/z 550 do 750, koji se ne mogu dodeliti ni jednoj specifičnoj vrsti. Najverovatnije pojava nekih od tih pikova (m/z 545,0 and 551,0) proizilazi od korišćenja DHB matrice, dok drugi (m/z 577,5 i 603,5) predstavljaju fragmentacione produkte triacilglicerola koji se u velikoj količini nalaze u ekstraktima plazme.

Tabela 5. Pikovi detektovani pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra snimljeni u pozitivnom modu.

m/z	Pikovi
496,3	LPC 16:0 (+H ⁺)
518,3	LPC 16:0 (+Na ⁺)
520,3	LPC 18:2 (+H ⁺)
522,3	LPC 18:1 (+H ⁺)
524,3	LPC 18:0 (+H ⁺)
542,3	LPC 18:2 (+Na ⁺)
544,3	LPC 18:1 (+Na ⁺)
546,3	LPC 18:0 (+Na ⁺)
726,6	SM 16:0 (+Na)
758,6	PC 16:0,18:2 (+H ⁺)
760,6	PC 16:0,18:1 (+H ⁺)
780,6	PC 16:0,18:2 (+Na ⁺)
782,6	PC 16:0,18:1 (+Na ⁺) i PC 16:0,20:4 (+H ⁺)
784,6	PC 18:0,18:3 (+H ⁺)
786,6	PC 18:0,18:2 (+H ⁺)
804,6	PC 16:0,20:4 (+Na ⁺)
806,6	PC 18:0,18:3 (+Na ⁺)
808,6	PC 18:0,18:2 (+Na ⁺)
810,6	PC 18:0,20:4 (+H ⁺) i PC 18:0,18:1 (+Na ⁺)
832,6	PC 18:0,20:4 (+Na ⁺)
834,6	PC 18:0,22:6 (+H ⁺)
835,6	SM 24:1 (+Na ⁺)
879,7	TAG 52:3 (+Na ⁺)
881,7	TAG 52:2 (+Na ⁺)

Kao što je prikazano na Slici 14, najintenzivniji detektovani PC pikovi bili su: PC 16:0, 18:2 $[M+H]^+$ (m/z 758,6) i PC 16:0, 18:2 $[M+Na]^+$ (m/z 780,6); PC 16:0, 18:1 $[M+H]^+$ (m/z 760,6) i PC 16:0, 18:1 $[M+Na]^+$ (m/z 782,6); PC 18:0, 18:2 $[M+H]^+$ (m/z 786,6) i PC 18:0, 18:2 $[M+Na]^+$ (m/z 808,6); PC 18:0, 18:3 $[M+H]^+$ (m/z 784,6) i PC 18:0, 18:3 $[M+Na]^+$ (m/z 806,6). Po intenzitetu se izdvajaju skoro isključivo dve LPC vrste: LPC 16:0 $[M+H]^+$ (m/z 496,3) i $[M+Na]^+$ (m/z 518,3); LPC 18:0 $[M+H]^+$ (m/z 524,3) i $[M+Na]^+$ (m/z 546,3) (Slika 14).

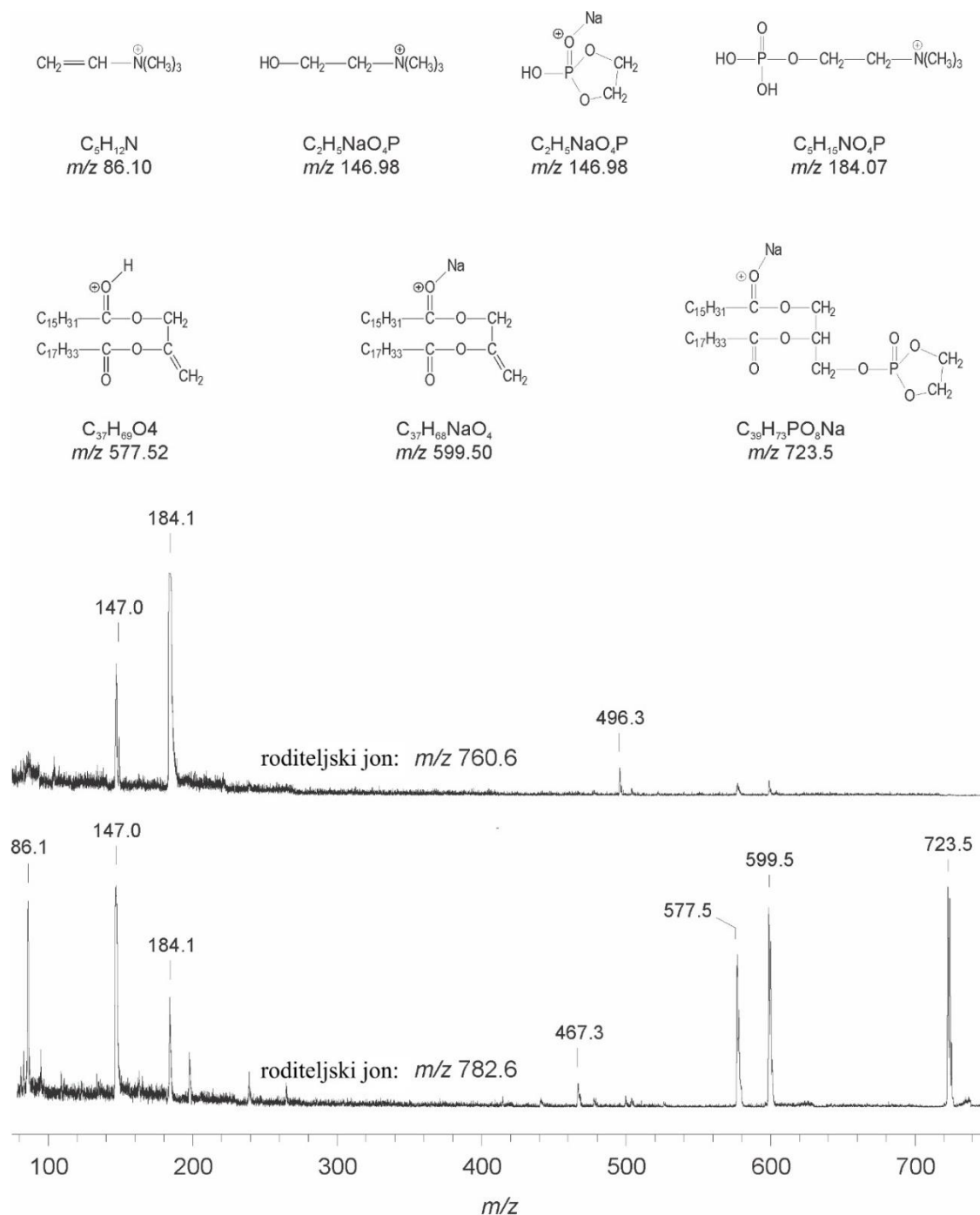
Takođe, uočeni su i LPC 18:1 (m/z 522,3 i 544,3) i LPC 18:2 (m/z 520,3 i 542,3), ali znatno nižeg inteziteta. Stoga su ovi pikovi isključeni iz dalje analize.



Slika 14. Karakteristični PC i LPC pikovi za a) kontrole i b) pacijente istovremeno detektovani u pozitivnom modu DHB matricom.

Za potvrdu identifikovanih pikova korišćenih za kvantitativnu analizu, snimljeni su i PSD spektri najintenzivnijih pikova. Stoga su na Slici 15, prikazani i eksperimentalno dobijeni jonski spektri PSD fragmenata H^+ (m/z 760,6) i Na^+ (m/z 782,6) adukta pretpostavljenog PC (PC 16:0/18:1). U gornjem delu Slike 15 prikazani su svi veliki fragmenti jona, pri čemu oba adukta daju različite fragmentacione produkte: H^+ adukt daje posebne jone koji su karakteristični za PC grupu hidrofilne glave (m/z 147,0 i 184,1), dok se diacilglicerol analog (koji omogućuje dodavanje masnih acilnih ostataka) može posebno detektovati u PSD spektru Na^+ adukta. Ovi rezultati (zajedno sa m/z 496,3 u

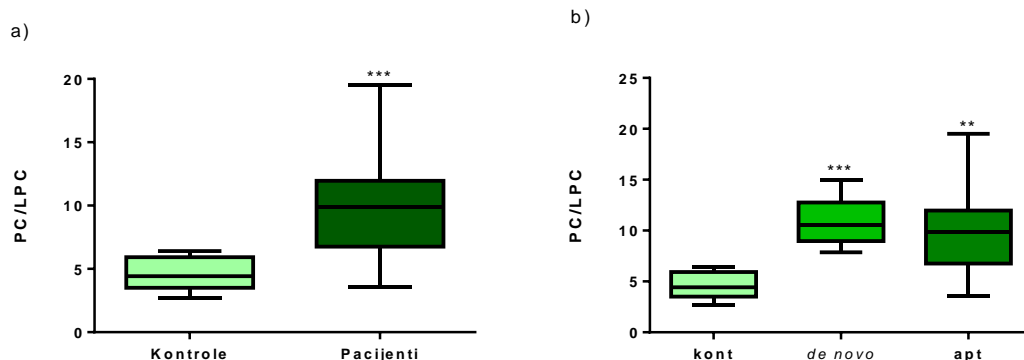
gornjem spektru koje pripadaju LPC 16:0) potvrđuju dobijene PC strukture, iako se masne kiseline ne mogu direktno detektovati u ovim eksperimentalnim uslovima.



Slika 15. PSD spektri nekih najprisutnijih pikova.

Od najintenzivnijih PC i LPC pikova izračunat je njihov odnos (Slika 16). Dobijeni rezultati ukazuju na značajno veći PC/LPC intenzitet pikova kod pacijenata sa PB u

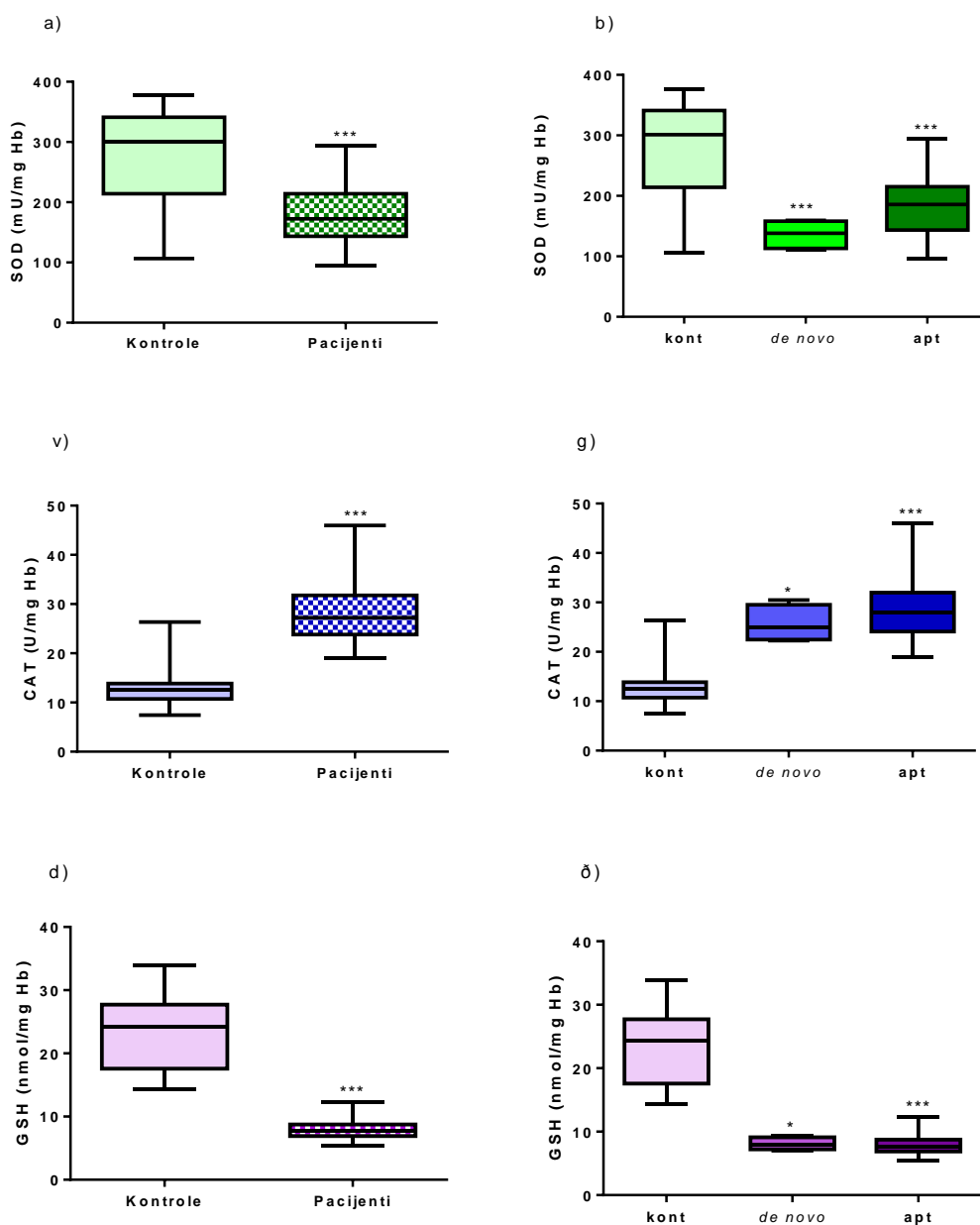
poređenju sa kontrolama ($t = 5,55$; $p < 0,001$) (Slika 16a), odnosno povećan odnos kako kod *de novo* pacijenata ($t = 4,97$; $p < 0,001$), tako i kod apt u odnosu na kontrolnu grupu ($t = 3,83$; $p < 0,01$) (Slika 16b), dok statistička značajnost nije uočena između ispitivanih grupa pacijenata.



Slika 16. PC/LPC intezitet pikova. Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25 - 75 % izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. a) PC/LPC intezitet pikova kod kontrolne grupe (Kontrole) i pacijenata obolelih od PB (Pacijenti). Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata. *** $p < 0,001$ (Mann Whitney test). b) PC/LPC intezitet pikova kod kontrolne grupe (kont), *de novo* (de novo) odnosno pacijenata na antiparkinsonskoj terapiji (apt). Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Dunn test).

4.1.3 Promena ispitivanih parametara antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od PB u odnosu na kontrole

Na Slici 17(a, v, d) prikazana je promena parametara AO zaštite (SOD, CAT i GSH) kod pacijenata sa PB u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Aktivnost enzima SOD bila je statistički značajno smanjena kod obe grupe pacijenata u poređenju sa kontrolnom (Slika 17a, b). Pri poređenju aktivnosti CAT između kontrolne i *de novo* grupe uočava se povećanje koje je statistički značajno ($p < 0,05$), dok je ono kod apt pacijenata značajnije ($p < 0,001$) (Slika 17g). Sa druge strane, koncentracija GSH je bila statistički značajno smanjena ($p < 0,05$ kod *de novo* i $p < 0,001$ apt pacijenata u odnosu na kontrolu) (Slika 17d, đ). Nivo ispitivanih parametara između pacijenata nije pokazao statističku značajnost.



Slika 17. Nivo ispitivanih parametara AO zaštite, SOD, CAT i GSH, kod zdravih ispitanika (Kontrole) i pacijenata obolelih od PB (Pacijenti) (a, v, d). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75 % izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata. *** $p < 0,001$ (*Mann Whitney test*). Nivo ispitivanih parametara AO zaštite, kod kontrola (kont) i *de novo* (*de novo*) odnosno pacijenata na antiparkinsonskoj terapiji (apt) (b, g, đ). Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (*Dunn test*). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost.

4.2 Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti

Povezanost parametara OS (PAB, AOPP, HNE, MDA) i AO (SOD, CAT, GSH), kao PC/LPC intenziteta pikova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike (pol, starost ispitanika, dužina trajanja bolesti i H&Y stadijum) prikazana je u Tabelama 6-12 i na Slikama 18-26. Vrednosti ispitivanih parametara OS i AO zaštite podeljene u tri grupe: najnižih 25 % vrednosti (25 % percentil), srednjih 50 % (25-75) i najviših 25 %.

4.2.1 Promena ispitivanih parametara oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika

Vrednosti dobijene za PAB podeljene u tri grupe: < 9,46; 9,46 – 24,96 i > 24,96 (HKU).

Kod 24 bolesnika PAB je bio u niskom opsegu vrednosti (< 9,46 HKU), kod 46 osoba u srednjem (9,46 – 24,96 HKU), a kod 21 u visokom (24,96 HKU). U Tabeli 6, pored statističke značajnosti između pola i PAB vrednosti ($p < 0,05$), uočava se i značajnost ispitivane varijable u odnosu na starost ispitanika ($p < 0,05$) i H&Y stadijum ($p < 0,01$). Naime, 71 % pacijenata starosti 59 - 70 godina ima visoku PAB vrednost, dok istu visoku vrednost PAB-a ima samo 10% pacijenata starosti preko 70 godina. Kod 37,0 % pacijenata u H&Y stadijumu 2, odnosno 30,4 % pacijenta u H&Y stadijumu 4, PAB je registrovan u srednjem opsegu vrednosti, dok je kod 58,3 % pacijenata u H&Y stadijumu 3 bio u niskom opsegu vrednosti. Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima PAB-a između različitih starosnih grupa pacijenata ($p < 0,05$). Statistička značajnost niskih, srednjih i visokih vrednosti PAB-a i dužine trajanja bolesti nije zabeležena ($p = 0,901$).

Tabela 6. PAB u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

PAB (HKU)		< 9,46	9,46 - 24,96	> 24,96	χ^2	p
	N	24	46	21		
	Srednja vrednost \pm SD	6,36 \pm 2,27	17,41 \pm 5,10	37,27 \pm 12,36		
Pol (N, %)	Žene	3 (12)	14 (30)	10 (48)	6,643	0,036
	Muškarci	21 (88)	32 (70)	11 (52)		
Starost (godine) (N, %)	<59	9 (38)	5 (11)	4 (19)	10,240	0,037
	59-70	10 (42)	27 (59)	15 (71)		
	>70	5 (21)	14 (30)	2 (10)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	\leq 3	8 (33)	14 (30)	5 (24)	1,055	0,901
	4-8	11 (46)	20 (44)	9 (43)		
	\geq 9	5 (21)	12 (26)	7 (33)		
H&Y stadijum (N, %)	1	1 (4)	6 (13)	3 (14)	17,676	0,007
	2	9 (38)	17 (37)	9 (43)		
	3	14 (58)	9 (20)	4 (19)		
	4	0 (0)	14 (30)	5 (24)		

*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

Pored praćenja ravnoteže između oksidativnog i antioksidativnog statusa, ispitivan je i nivo AOPP ($\mu\text{mol/L}$) kao pokazatelja uznapredovalih produkata oksidacije proteina (Tabela 7). Ukupno 16 pacijenata imalo je niske vrednosti AOPP ($< 21,80 \mu\text{mol/L}$), 58 srednje ($21,80 - 33,40 \mu\text{mol/L}$), a 17 visoke ($>33,40 \mu\text{mol/L}$). Statistički značajna razlika nije uočena za vrednosti AOPP između žena i muškaraca ($p = 0,896$). Iako značajna interakcija nije pronađena između AOPP i starosti ($p = 0,616$), kao i dužine trajanja bolesti ($p = 0,564$), 65 % pacijenata starosti između 59 - 70 godina i 59 % sa dužinom trajanja bolesti od 4 do 8 godina ima AOPP u visokom opsegu vrednosti koncentracija (Tabela 7).

Tabela 7. AOPP u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

AOPP ($\mu\text{mol/L}$)		< 21,80	21,80 - 33,40	> 33,40	χ^2	p
	N	16	58	17		
	Srednja vrednost \pm SD	19,10 \pm 1,76	26,73 \pm 3,68	39,99 \pm 6,08		
Pol (N, %)	Žene	4 (25)	18 (31)	5 (29)	0,220	0,896
	Muškarci	12 (75)	40 (69)	12 (71)		
Starost (godine) (N, %)	<59	4 (25)	10 (17)	4 (24)	2,659	0,616
	59-70	7 (44)	34 (59)	11 (65)		
	>70	5 (31)	14 (24)	2 (12)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	≤ 3	4 (25)	20 (34)	3 (18)	2,961	0,564
	4-8	8 (50)	22 (38)	10 (59)		
	≥ 9	4 (25)	16 (28)	4 (23)		
H&Y stadijum (N, %)	1	4 (25)	6 (10)	0 (0)	6,372	0,383
	2	5 (31)	22 (38)	8 (47)		
	3	3 (19)	18 (31)	6 (35)		
	4	4 (25)	12 (21)	3 (18)		

*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

HNE vrednosti podeljene su u tri grupe: niske ($< 0,14$), srednje ($0,14 - 0,28$) i visoke vrednosti ($> 0,28 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 8). Statistički značajna razlika u vrednostima HNE utvrđena je između polova ($p < 0,05$). Srednji opseg vrednosti ima 84 % muškaraca, dok žena samo 16 %. Takođe, visok opseg vrednosti detektovan je kod 67 % muškaraca, dok kod žena 33 %. S druge strane, iako nije pokazana statistička značajnost, uočena je tendencija porasta nivoa ispitivanog parametra LPO u odnosu na dužinu trajanja bolesti ($p = 0,076$). Kod 62 % pacijenata čija je dužina trajanja bolesti u intervalu 4 - 8 godina, HNE je imao visoke vrednosti, dok je u srednjem intervalu vrednost HNE bila jednaka za dužine trajanja bolesti ≤ 3 i ≥ 9 godina (35 %). Takođe, statistički značajna razlika nije pronađena u vrednostima (niskim, srednjim, visokim) HNE u odnosu na starost ($p = 0,847$) i stadijum bolesti ($p = 0,100$).

Tabela 8. HNE u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

HNE ($\mu\text{g/mL}$)		$< 0,14$	$0,14 - 0,28$	$> 0,28$	χ^2	p
	N	21	49	21		
	Srednja vrednost \pm SD	$0,12 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,29$		
Pol (N, %)	Žene	12 (57)	8 (16)	7 (33)	11,912	0,0026
	Muškarci	9 (43)	41 (84)	14 (67)		
Starost (godine) (N, %)	< 59	4 (19,0)	11 (22,4)	3 (14)	1,386	0,847
	59-70	11 (52)	27 (55)	14 (67)		
	> 70	6 (29)	11 (22)	4 (19)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	≤ 3	6 (29)	17 (35)	4 (19)	8,456	0,076
	4-8	12 (57)	15 (31)	13 (62)		
	≥ 9	3 (14)	17 (35)	4 (19)		
H&Y stadijum (N, %)	1	3 (14)	7 (14)	0 (0)	10,644	0,100
	2	8 (38)	14 (29)	13 (62)		
	3	8 (38)	15 (31)	4 (19)		
	4	2 (10)	13 (26)	4 (19)		

*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

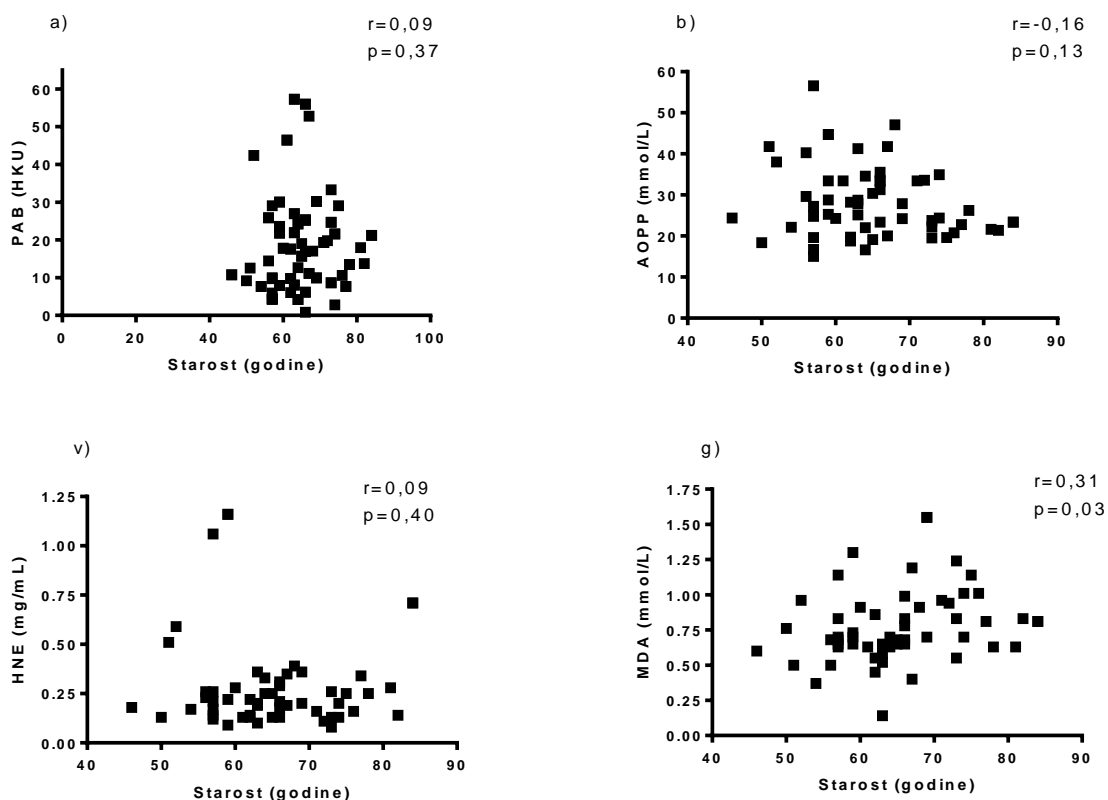
U Tabeli 9 prikazani su rezultati nivoa MDA u odnosu na kliničko-patološke karakteristike. Kao i u prethodno ispitivanom parametru LPO, vrednosti dobijene za MDA su podeljene na tri grupe: < 0,63; 0,63 - 0,89; > 0,89 $\mu\text{mol/L}$. Niske vrednosti MDA detektovane su kod 30 pacijenata, srednje kod 42 pacijenta, dok su visoke vrednosti detektovane kod njih 19. Statistički značajna razlika u vrednostima MDA utvrđena je između polova ($p < 0,05$). Niska vrednost uočena je kod 80 % muškaraca i kod svega 20 % žena. Srednji opseg vrednosti MDA zabeležen je kod 74 % muškaraca i 26 % žena dok je kod 53 % muškaraca onosno 47 % žena izmereni parametar bio u visokom opsegu vrednosti. Takođe, statistička značajnost uočena je pri poređenju dobijenih vrednosti za MDA u odnosu na H&Y stadijum ($p < 0,001$). U H&Y stadijumu 3,68 % pacijenata ima visoke vrednosti MDA, dok u stadijumu 2 52 % ima srednje vrednosti MDA. Iako nije detektovana statistički značajna promena niskih, srednjih i visokih vrednosti MDA u odnosu na dužinu trajanja bolesti ($p = 0,180$) i starost ($p = 0,126$), najizraženije promene uočene su u intervalu od 4 - 8 godina trajanja bolesti gde je čak 58 % pacijenata imalo visoke vrednosti MDA; dok je 64 % pacijenata starosti između 59 - 70 godina imalo je koncentraciju MDA je u srednjem opsegu vrednosti.

Tabela 9. MDA u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

MDA ($\mu\text{mol/L}$)		< 0,63	0,63 - 0,89	> 0,89	χ^2	p
	N	30	42	19		
	Srednja vrednost \pm SD	0,52 \pm 0,13	0,72 \pm 0,07	1,12 \pm 0,20		
Pol (N, %)	Žene	6 (20)	11 (26)	10 (53)	6,389	0,041
	Muškarci	24 (80)	31 (74)	9 (47)		
Starost (godine) (N, %)	<59	9 (30)	7 (17)	2 (10)	7,192	0,126
	59-70	16 (53)	27 (64)	9 (47)		
	>70	5 (17)	8 (19)	8 (42)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	≤ 3	9 (30)	11 (26)	7 (37)	6,273	0,180
	4-8	13 (43)	16 (38)	11 (58)		
	≥ 9	8 (27)	15 (36)	1 (5)		
H&Y stadijum (N, %)	1	7 (23)	2 (5)	1 (5)	26,088	0,0002
	2	9 (30)	22 (52)	4 (21)		
	3	5 (17)	9 (21)	13 (68)		
	4	9 (30)	9 (21)	1 (5)		

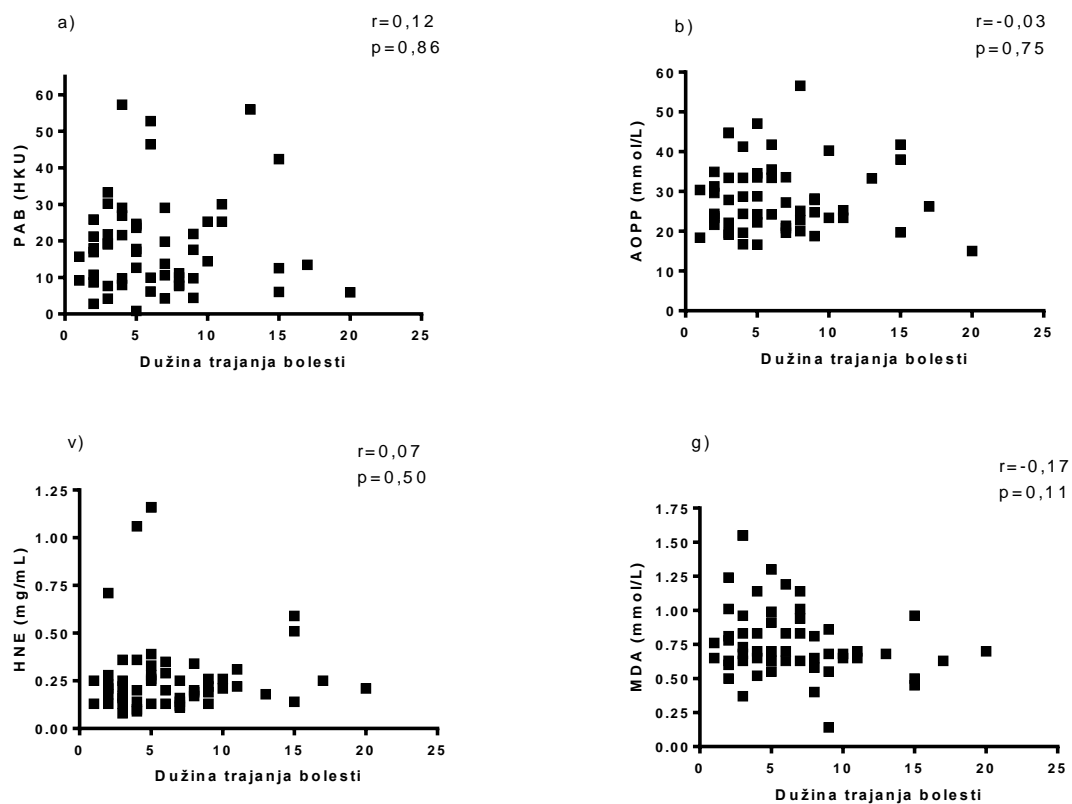
*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

Rezultati korelacione analize su pokazali da je starost pacijenata u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa MDA ($r = 0,31$; $p = 0,03$) (Slika 18g), dok ostala tri ispitivana parametra OS nisu pokazala značajnu povezanost sa godinama starosti ispitanika (za PAB $r = 0,09$; $p = 0,37$ (Slika 18a), AOPP $r = -0,16$; $p = 0,13$ (Slika 18b) i HNE $r = 0,09$; $p = 0,40$ (Slika 18v)).



Slika 18. Korelacija između starosti i a) PAB, b) AOPP, v) HNE i g) MDA u plazmi pacijenata obolelih od PB.

U ovoj eksperimentalnoj postavci nije uočena statistički značajna korelacija između dužine trajanja bolesti i nijednog od ispitivanih oksidativnih parametara: PAB ($r = 0,12$; $p = 0,86$) (Slika 19a), AOPP ($r = -0,03$; $p = 0,75$) (Slika 19b), HNE ($r = 0,07$; $p = 0,50$) (Slika 19v) i MDA ($r = -0,17$; $p = 0,11$) (Slika 19g).



Slika 19. Korelacija između dužine trajanja bolesti i a) PAB, b) AOPP, v) HNE i g) MDA i u plazmi pacijenata obolelih od PB.

4.2.2 Promena ispitivanih parametara antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika

U Tabeli 10 prikazani su rezultati niskih, srednjih i visokih SOD aktivnosti u odnosu na kliničko-patološke karakteristike. Dobijene vrednosti za SOD su podeljene na tri grupe: < 143,4; 143,4 - 214,2; > 214,2 mU/mg Hb. Kod dobijenih niskih, srednjih i visokih vrednosti SOD-a nije uočena statistički značajna razlika između muškaraca i žena ($p = 0,837$). Statistička značajnost nije uočena ni u izmerenim vrednostima SOD i starosti ispitanika ($p = 0,420$), kao ni kod dužine trajanja bolesti ($p = 1,000$). Takođe, statistički značajna razlika nije uočena između izmerenih vrednosti SOD i H&Y stadijuma bolesti ($p = 0,518$). Zaključak je da raspodela niskih, srednjih i visokih vrednosti SOD-a nije zavisna od pola, starosti ispitanika, dužine trajanja bolesti i stadijuma bolesti.

Tabela 10. SOD aktivnost u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

SOD (mU/mg Hb)		< 143,4	143,4 - 214,2	> 214,2	χ^2	p
	N	22	46	23		
	Srednja vrednost \pm SD	124,71 \pm 13,64	179,0 \pm 22,46	233,80 \pm 22,90		
Pol (N, %)	Žene	15 (68,2)	31 (67,4)	14 (60,9)	0,356	0,837
	Muškarci	7 (31,8)	15 (32,6)	9 (39,1)		
Starost (godine) (N, %)	<59	10 (45,5)	12 (26,1)	6 (26,1)	3,897	0,420
	59-70	8 (36,4)	26 (56,5)	11 (47,8)		
	>70	4 (18,2)	8 (17,4)	6 (26,1)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	<3	5 (22,7)	10 (21,7)	5 (21,7)	0,05	1,000
	3-8	8 (40,0)	17 (38,6)	8 (34,8)		
	>8	9 (45,0)	19 (43,2)	10 (43,5)		
H&Y stadijum (N, %)	1	4 (18,2)	14 (30,4)	6 (26,1)	5,206	0,518
	2	7 (31,8)	11 (23,9)	9 (39,1)		
	3	8 (36,4)	15 (32,6)	8 (34,8)		
	4	3 (13,6)	6 (13,0)	0 (0,0)		

*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

Vrednosti aktivnosti CAT podeljene su na niske (< 23,83), srednje (23,83 - 31,77) i visoke (> 31,77) u odnosu na kliničko-patološke karakteristike (Tabela 11). Merenjem aktivnosti CAT statistički značajna razlika nije uočena u učestalosti svih vrednosti u odnosu na pol ($p = 0,634$). Ne postoji statistički značajna razlika ni u niskim, srednjim i visokim vrednostima CAT u odnosu na starost ($p = 0,857$), dužinu trajanja bolesti ($p = 0,877$) i H&Y stadijum bolesti ($p = 0,879$). Zaključak je da raspodela niskih, srednjih i visokih vrednosti CAT nije zavisna od pola, starosti ispitanika, dužine trajanja bolesti i stadijuma bolesti.

Tabela 11. CAT aktivnost u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

CAT (U/mg Hb)		< 23,83	23,83 - 31,77	> 31,77	χ^2	p
	N	22	47	22		
	Srednja vrednost \pm SD	21,65 \pm 1,66	27,75 \pm 2,64	37,23 \pm 3,45		
Pol (N, %)	Žene	16 (73)	31 (66)	13 (59)	0,911	0,634
	Muškarci	6 (27)	16 (34)	9 (41)		
Starost (godine) (N, %)	<59	7 (32)	15 (32)	6 (27)	1,323	0,857
	59-70	12 (54)	21 (45)	12 (54)		
	>70	3 (14)	11 (23)	4 (18)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	≤ 3	6 (27)	10 (21)	4 (18)	1,206	0,877
	4-8	6 (27)	18 (38)	9 (41)		
	≥ 9	10 (46)	19 (40)	9 (41)		
H&Y stadijum (N, %)	1	6 (27)	11 (23)	7 (32)	2,402	0,879
	2	8 (36)	13 (28)	6 (27)		
	3	7 (32)	18 (38)	6 (27)		
	4	1 (5)	5 (11)	3 (14)		

*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

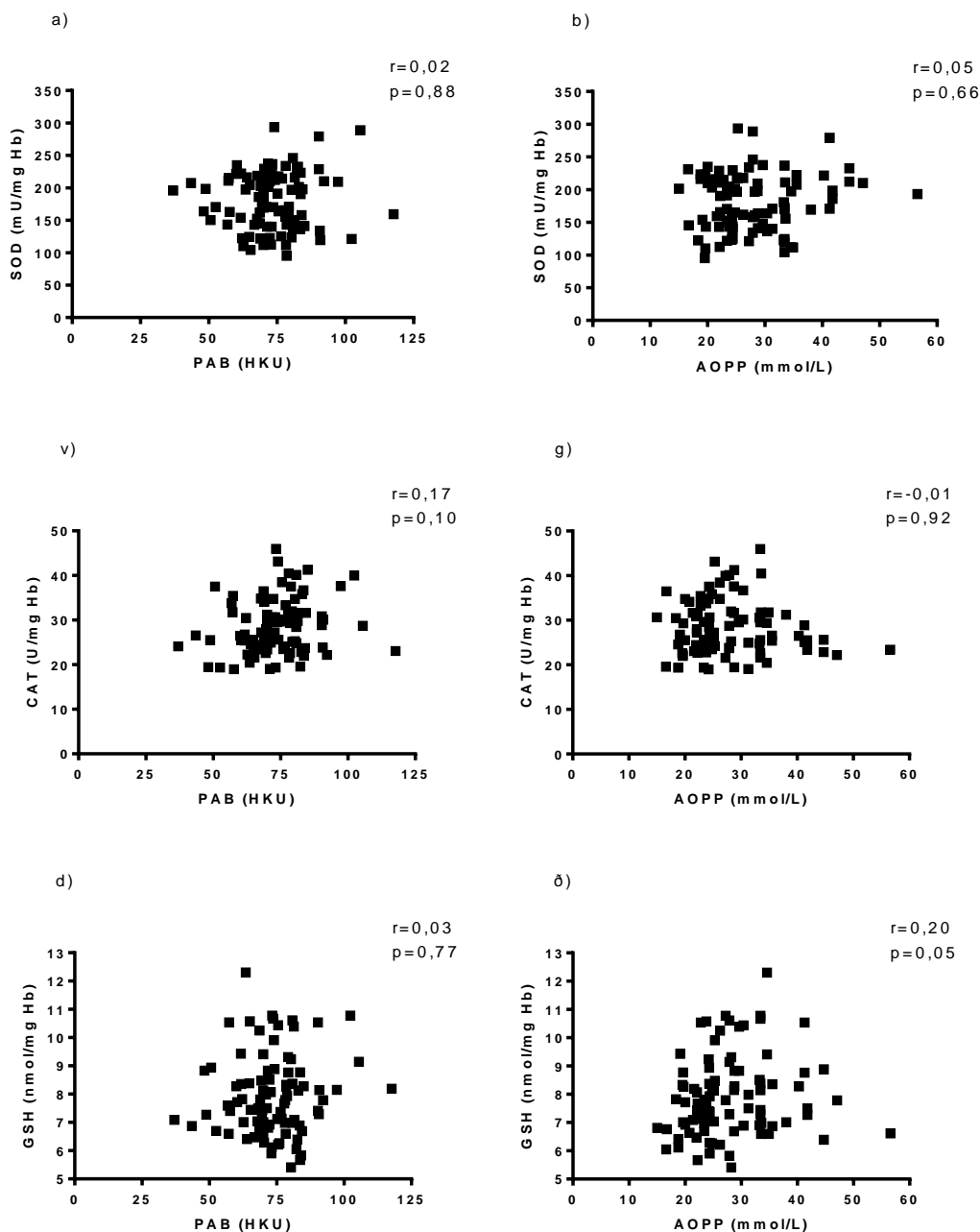
Izmerene vrednosti koncentracije GSH (Tabela 12) ne pokazuju statistički značajnu razliku u raspodeli niskih, srednjih i visokih vrednosti između žena i muškaraca ($p = 0,183$). Statistički značajna razlika nije uočena ni u jednoj vrednosti koncentracije GSH u odnosu na starost ($p = 0,418$), dužinu trajanja bolesti pacijenata ($p = 0,741$) i H&Y stadijum bolesti ($p = 0,172$).

Tabela 12. GSH aktivnost u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kliničko-patološke karakteristike.

GSH (nmol/mg Hb)		< 6,91	6,91 - 8,76	> 8,76	χ^2	p
	N	22	47	22		
	Srednja vrednost \pm SD	6,37 \pm 0,41	7,69 \pm 0,52	9,94 \pm 0,92		
Pol (N, %)	Žene	15 (68)	34 (72)	11 (50)	3,395	0,183
	Muškarci	7 (32)	13 (28)	11 (50)		
Starost (godine) (N, %)	<59	8 (36)	16 (34)	4 (18)	3,916	0,418
	59-70	12 (54)	21 (45)	12 (54)		
	>70	2 (9)	10 (21)	6 (27)		
Dužina trajanja bolesti (godine) (N, %)	≤ 3	7 (32)	9 (19)	4 (18)	1,974	0,741
	4-8	8 (36)	17 (36)	8 (36)		
	≥ 9	7 (32)	21 (45)	10 (46)		
H&Y stadijum (N, %)	1	4 (18)	11 (23)	9 (41)	9,024	0,172
	2	4 (18)	17 (36)	6 (27)		
	3	10 (46)	14 (30)	7 (32)		
	4	4 (18)	5 (11)	0 (0)		

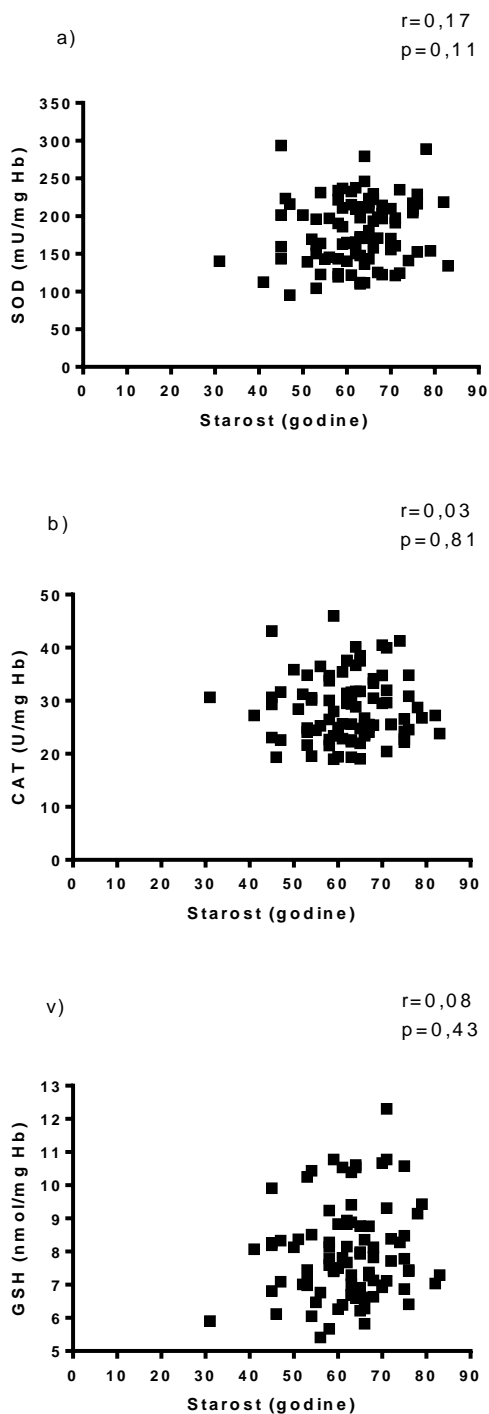
*Statistička značajnost; N - broj pacijenata; % udela u odnosu na N; p - statističke vrednosti.

Univarijantna korelaciona analiza parametara AO zaštite sa PAB odnosno AOPP pokazuje pozitivnu korelaciju samo za AOPP i GSH ($r = 0,20$; $p = 0,05$) (Slika 20đ), dok ostali ispitivani parametri nisu u korelaciji (za PAB i SOD $r = 0,02$; $p = 0,88$ (Slika 20a), za PAB i CAT $r = 0,17$; $p = 0,10$ (Slika 20v), za PAB i GSH $r = 0,03$; $p = 0,77$ (Slika 20d) odnosno AOPP i SOD $r = -0,05$; $p = 0,66$ (Slika 20b) i za AOPP i CAT $r = -0,01$; $p = 0,92$ (Slika 20g).



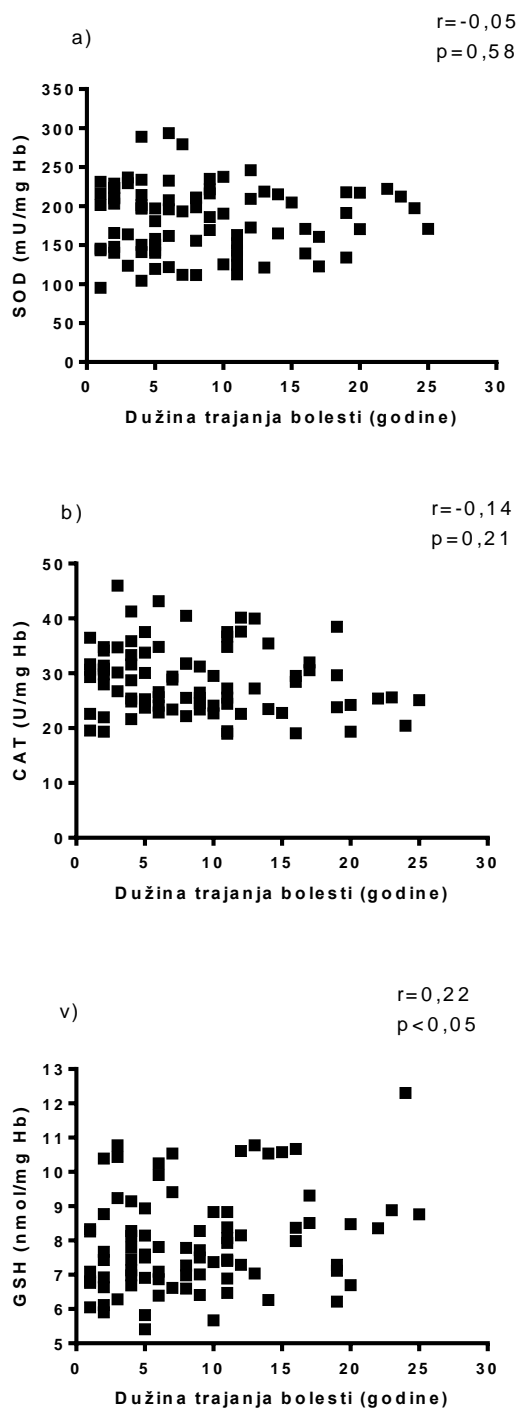
Slika 20. Korelacija između PAB i parametara AO zaštite, a) SOD v) CAT i d) GSH u plazmi pacijenata obolelih od PB odnosno korelacija između AOPP i b) SOD g) CAT i đ) GSH u plazmi pacijenata obolelih od PB.

Korelisanjem kliničko-patološke karakteristike, starost i parametara AO zaštite nije dobijena korelacija ni za jedan ispitivani parametar (između starosti i SOD $r = 0,17$; $p = 0,11$ (Slika 21a) odnosno starosti i CAT $r = 0,03$; $p = 0,81$ (Slika 21b) i starosti i GSH ($r = 0,08$; $p = 0,43$) (Slika 21v).



Slika 21. Korelacija između starosti i parametara AO zaštite, a) SOD b) CAT i v) GSH u plazmi pacijenata obolelih od PB.

Poređenjem dužine trajanja bolesti i ispitivanih parametara AO zaštite statistički značajna pozitivna korelacija detektovana je sa koncentracijom GSH ($p < 0,05$) (Slika 22v), dok je odsustvo korelacije uočeno ne samo kod SOD ($r = -0,05$, $p = 0,58$) već i CAT ($r = -0,14$, $p = 0,21$) (Slika 22a, b).

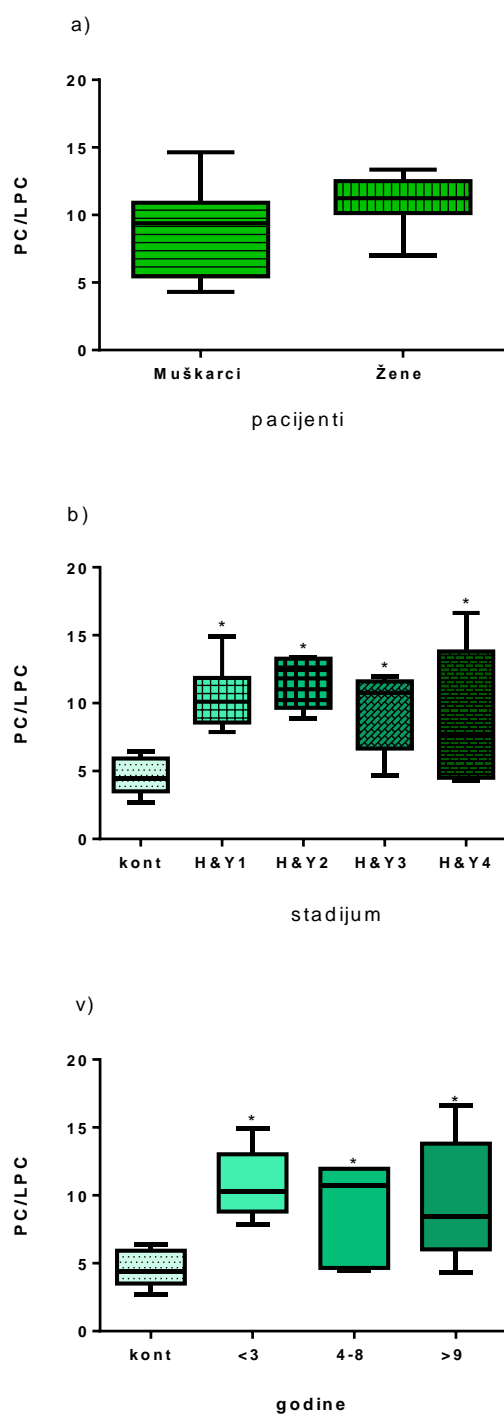


Slika 22. Korelacija između dužine trajanja bolesti i parametara AO zaštite, a) SOD b) CAT i v) GSH u plazmi pacijenata obolelih od PB.

4.2.3 Promena PC/LPC inteziteta pikova kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika

U ovoj eksperimentalnoj postavci nije dobijena statistički značajna razlika između PC/LPC inteziteta pikova i pola, iako se blagi porast primećuje kod žena (Slika 23a). Poređenjem PC/LPC intenziteta pikova između kontrolne grupe i pacijenata u različitim stadijumima PB uočena je statistički značajna razlika ($F = 6,815$; $p < 0,001$). Intenzitet pikova PC/LPC je kod svih pacijenata bez obzira na stadijum bolesti bio statistički značajno viši u odnosu na zdrave ispitanike (p vrednosti su: 0,007; 0,012; 0,041; 0,045 respektivno) (Slika 23b). Kao što je prikazano na Slici 23v kod pacijenata se uočava statistički značajno viši PC/LPC intenzitet pikova u odnosu na kontrole, nezavisno od dužine trajanja bolesti što ukazuje da dužina trajanja bolesti ne utiče na PC/LPC intenzitet.

Iako je pokazana statistički značajna korelacija PC/LPC inteziteta između kontrola i stadijuma bolesti pacijenata sa jedne strane, kao i dužine trajanja bolesti sa druge strane, međusobnim poređenjem vrednosti ispitivanog parametra između samih pacijenata korelacija nije uočena ($p > 0,05$).



Slika 23. Nivo PC/LPC inteziteta pikova kod pacijenata obolelih od PB u zavisnosti od kliničko-patoloških karakteristika. Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Nivo PC/LPC inteziteta pikova u odnosu na a) pol (Mann Whitney test), b) stadijuma bolesti gde je oznakom * prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata manja od 0,05 (Dunn test), v) dužine trajanja bolesti gde je oznakom * prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata manja od 0,05 (Dunn test).

4.3 Uticaj terapije na promene ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i PC/LPC intenziteta pikova kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti

L-dopa i dopaminski agonisti su osnovni medikamenti u terapiji pacijenata sa PB nezavisno od faze bolesti. Radi poređenja inteziteta doza različitih medikamenata i u ovoj studiji kao koristan „alat“ uveden je LED.

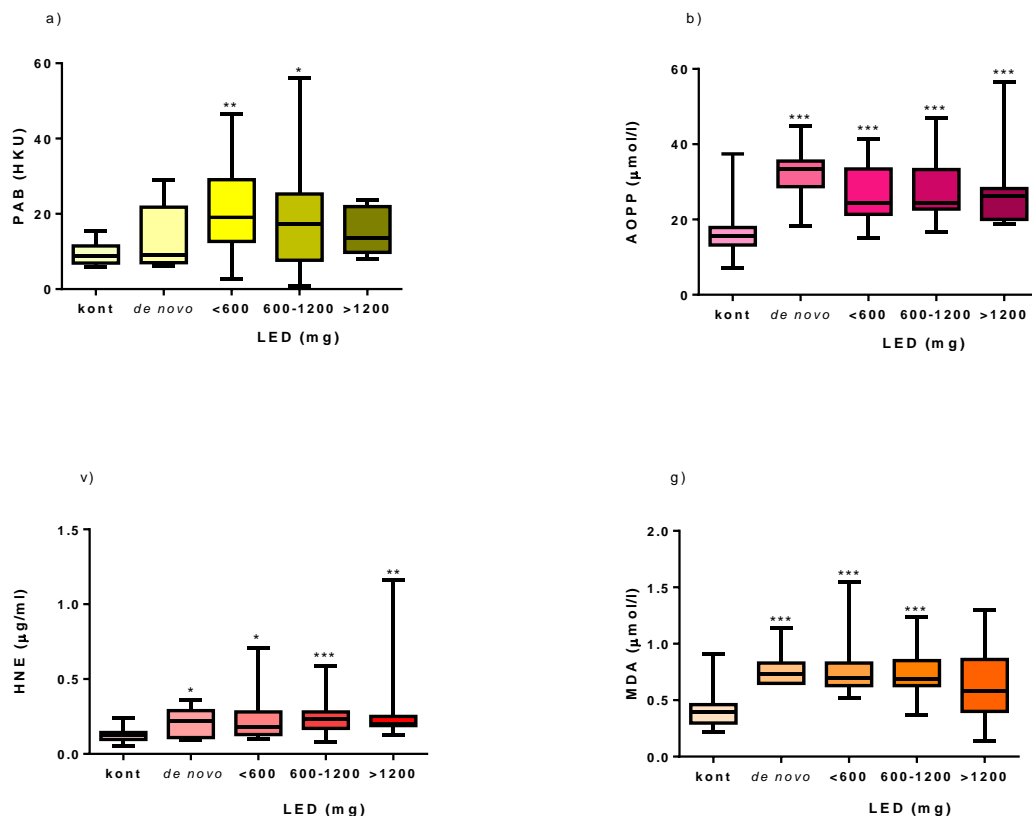
Pored prvobitne podele pacijenata na *de novo* i apt, pacijenti koji pripadaju apt grupi podeljeni su na osnovu doze medikamenata koje primaju, odnosno, LED ekvivalenta¹³. Stoga, pacijenti su podeljeni na one koji su u:

- „početnoj fazi” –doza LED < 600 mg,
- „srednjoj fazi” – doza LED: 600 - 1200 mg,
- „uznapredovanoj/kasnoj fazi” – doza LED > 1200 mg.

U ovoj studiji, zapaženo je značajno variranje nivoa PAB parametra između grupa ispitanika ($H = 14,72$; $p < 0,01$). U odnosu na kontrole, statistički značajno povećanje uočeno je kod pacijenata koji primaju niske i srednje LED doze ($p < 0,01$ za LED < 600, odnosno $p < 0,05$ za LED 600 - 1200 mg) (Slika 24a). Sa druge strane, nije detektovana statistički značajna razlika između pacijenata koji nisu na terapiji i pacijenata na različitim terapijskim dozama lekova. U slučaju AOPP, promena se uočava kod svih grupa ($H = 39,49$; $p < 0,001$), dok u poređenju sa kontrolom kod svih ispitivanih grupa pacijenata bez obzira na količinu primljene terapije, statistička analiza pokazuje značajnost ($p < 0,001$) (Slika 24b) što ukazuje da nezavisno od doze leka postoji razlika u AOPP između pacijenata i kontrolne grupe. Međutim, test nije pokazao da doza primeljenog leka utiče na koncentraciju parametra OS, već na to utiče samo prisustvo bolesti. Za LPO parametare, HNE i MDA, takođe uočava se statistička značajnost među ispitivanim grupama (za HNE $H = 24,93$; $p < 0,001$ i za MDA $H = 29,14$; $p < 0,001$). Kod grupe ispitanika koja nije primila terapiju i onih čija je terapija sa najnižim LED ekvivalentom u odnosu na zdrave ispitanike, promena HNE je statistički značajna ($p < 0,05$), dok je u intervalu LED 600 - 1200 mg ta značajnost čak $p < 0,001$ (Slika 24v)

¹³ Podela je arbitrarna i urađena je na osnovu iskustva neurologa o dozi i reakciji pacijenata na terapiju.

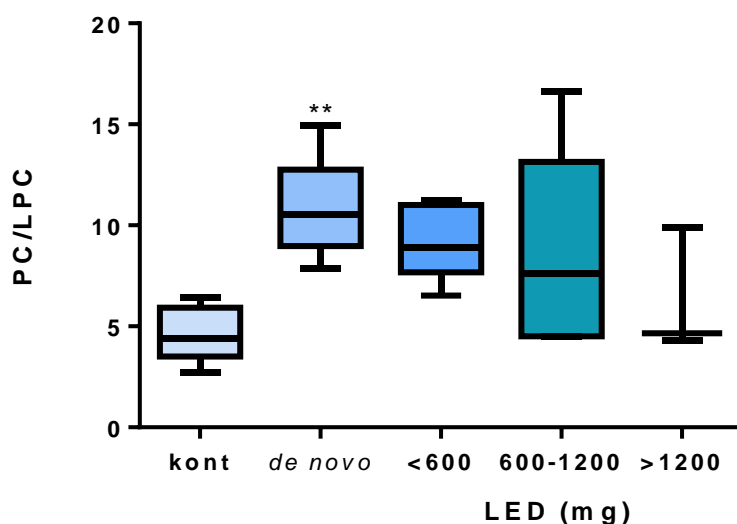
u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, apt pacijenti koji primaju visoke doze ne pokazuju statistički značajne razlike u promeni MDA u poređenju sa kontrolnom grupom, dok se kod ostale tri grupe pacijenata ona uočava ($p < 0,001$ za *de novo* i apt LED < 600 pacijente, odnosno, $p < 0,001$ za one apt pacijente iz LED 600 - 1200 mg grupe) (Slika 24g). Ispitivanjem doze primenjene terapije uočeno je da ne utiče na koncentraciju HNE i MDA ,već na to utiče samo prisustvo bolesti.



Slika 24. Nivo ispitivanih OS parametara (a) PAB, (b) AOPP i (v, g) LPO ((v) HNE, (g) MDA) kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, LED < 600 mg, LED: 600 - 1200 mg i LED > 1200 mg. Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*Dunn test*).

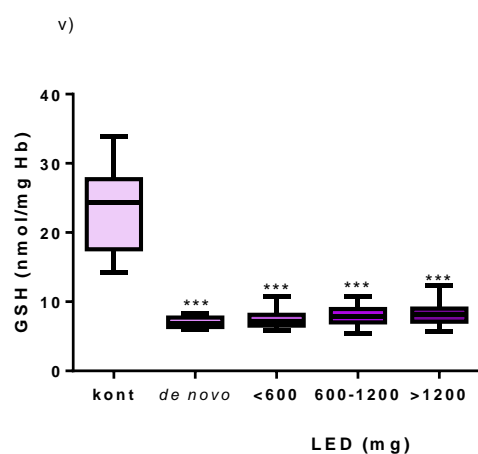
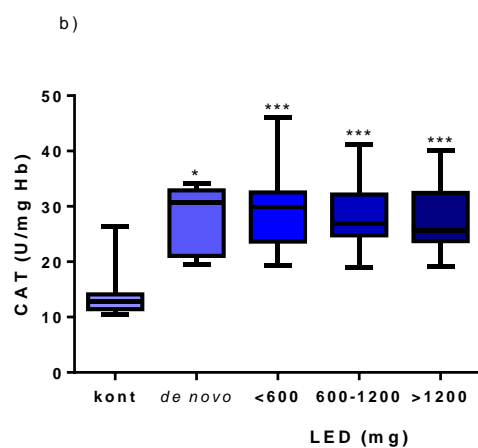
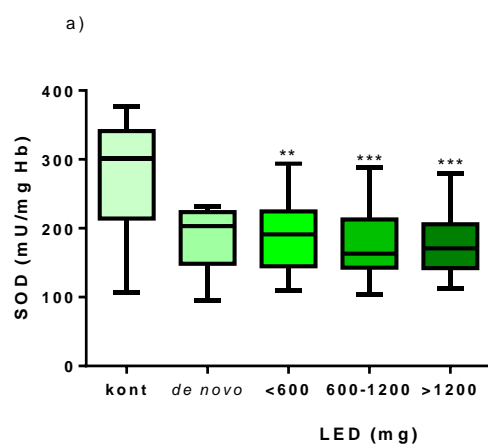
Osim promena OS parametara, zapaženo je i značajno variranje PC/LPC intenziteta između grupa ispitanika ($H = 17,69$; $p < 0,001$). Posmatrano pojedinačno, povećanje PC/LPC inteziteta primećeno je kod svih grupa pacijenata u poređenju sa

kontrolnom grupom, mada je ono bilo statistički značajno samo kod *de novo* grupe ($p < 0,01$) (Slika 25).



Slika 25. PC/LPC intenzitet pikova kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, LED < 600 mg, LED: 600 - 1200 mg i LED > 1200 mg. Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, ** $p < 0,01$ (Dunn test).

Statistički značajna promena uočena je između svih grupa ispitanika za sva tri ispitivana parametara AO zaštite, SOD ($H = 29,32$; $p < 0,001$), CAT ($H = 40,26$; $p < 0,001$) i GSH ($H = 54,03$; $p < 0,001$) (Kruskal-Wallis). Dunn testom ispitivane su razlike između grupa i uočeno je da kod *de novo* pacijenata aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu grupu nije bila statistički značajno promenjena, dok je kod apt pacijenata bila statistički značajno smanjena ($p < 0,01$ za LED < 600 mg, odnosno, $p < 0,001$ kod ostalih LED grupa) (Slika 26a). Nije uočena statistički značajna razlika u SOD aktivnosti između pacijenata na različitim terapijskim režimima. Aktivnost CAT (Slika 26b) je bila povećana kod svih PB pacijenata, s tim što je značajnost od $p < 0,05$ uočena kod *de novo* pacijenata, dok u svim ostalim grupama bez obzira na terapiju ona je znatno veća ($p < 0,001$). U poređenju sa kontrolama, izmerena koncentracija GSH je statistički značajno smanjena u svim ispitivanim grupama pacijenata ($p < 0,001$) (Slika 26v).

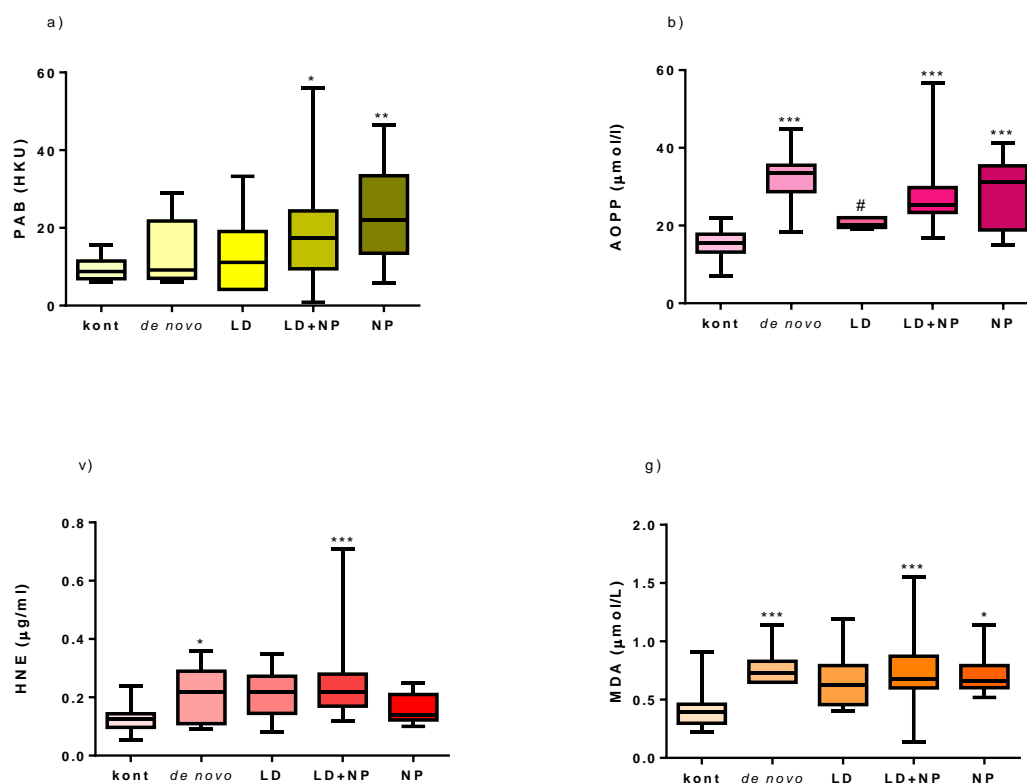


Slika 26. Nivo ispitivanih parametara AO zaštite, a) SOD, b) CAT, v) GSH, kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, LED < 600 mg, LED 600 - 1200 mg i LED > 1200 mg. Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu

izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*Dunn test*).

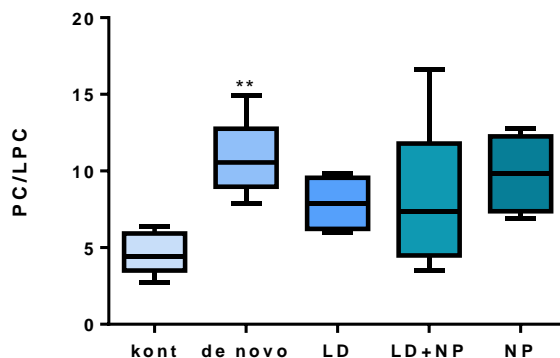
Dodatno, apt pacijenti su pored pomenute podele na osnovu primljene doze, klasifikovani i na osnovu vrste terapije na: one koji primaju L-dopu (LD), one koji koriste samo neuroprotektivne medikamente (NP) i one koji primaju oba tipa medikamenata (LD+NP).

Kod NP i LD+NP pacijenata, vrednosti PAB-a bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. ($p < 0,05$ za LD+NP odnosno $p < 0,01$ za NP pacijente) (Slika 27a). Rezultati statističke analize su pokazali da su koncentracije AOPP bile statistički značajno više kod pacijenata koji nisu primali terapiju, LD+NP pacijenata i NP pacijenata u odnosu na zdrave ispitanika (Slika 27b). LD pacijenti su imali statistički značajno niže vrednosti AOPP u poređenju sa pacijentima koji nisu još uvek počeli terapiju. Između ostalih ispitivanih grupa nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji AOPP. Statistička analiza pokazala je da su koncentracije HNE bile statistički značajno više kod pacijenata koji nisu primali terapiju i LD+NP pacijenata u odnosu na kontrole (Slika 27v). Isti rezultati dobijeni su kada je izmerena koncentracija MDA, s tim što je pored statistički značajnog povećanja koje je uočeno kod pacijenata koji ne primaju terapiju i LD+NP pacijenata, statistički značano povećanje uočeno je kod NP pacijenata (Slika 27g) Kod oba ispitivana LPO parametra poređenje između ostalih ispitivanih grupa nije uočena statistički značajna razlika.



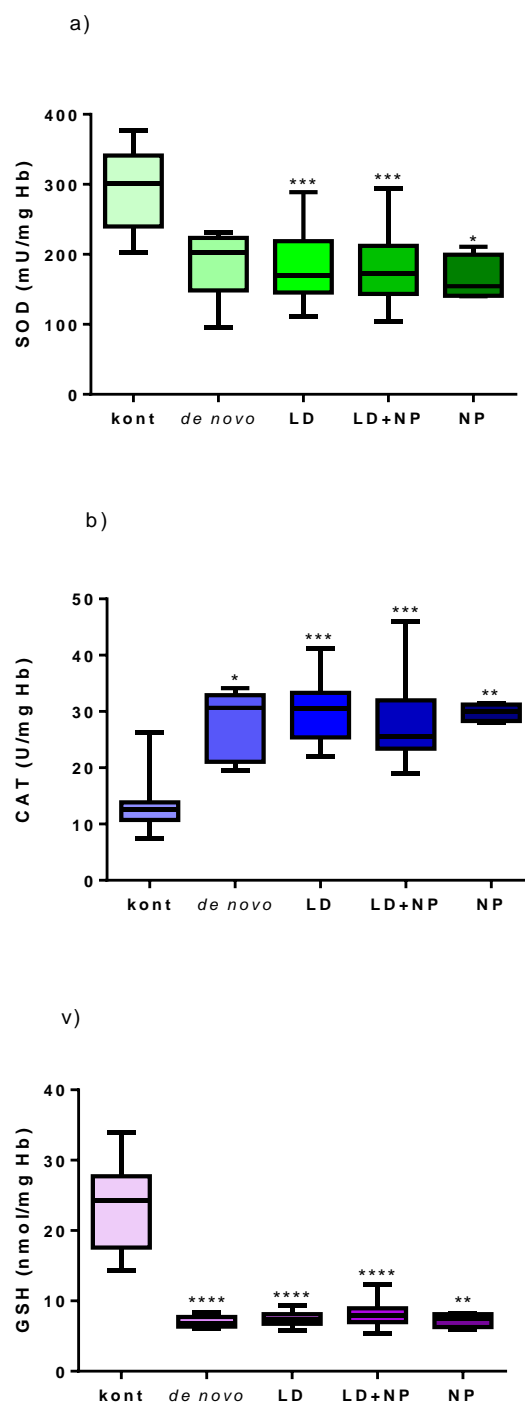
Slika 27. Nivo ispitivanih OS parametara a) PAB, b) AOPP, v) HNE, g) MDA kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, pacijenti koji primaju L-dopa (LD), pacijenti na neuroprotektivnim medikamentima (NP) i one čija terapija se sastoji iz kombinacije medikamenata (LD+NP). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika sa kontrolom, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Dunn test), oznakom # prikazana razlika između *de novo* i LD grupe pacijenata ($p < 0,05$) (Dunn test).

Kruskal-Wallis testom pokazana je statistička razlika nivoa PC/LPC intenziteta između svih grupa ispitanika ($H = 17,16$; $p < 0,001$). Kao što je prikazano na Slici 28, PC/LPC intenzitet pika je povećan kod svih grupa pacijenta u odnosu na kontrolnu, iako je statistička značajnost uočena samo kod *de novo* pacijenta ($p < 0,01$) (*Dunn test*).



Slika 28. PC/LPC intenzitet pikova kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, pacijenti koji primaju L-dopa (LD), pacijenti na neuroprotektivnim medikamentima (NP) i one čija terapija se sastoji iz kombinacije medikamenata (LD+NP). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata. ** $p < 0,01$ (*Dunn test*).

Kruskal-Wallis testom pokazana je statistička razlika nivoa svih ispitivanih parametara AO zaštite između grupa, za SOD $H = 34,50$; $p < 0,001$ i CAT $H = 45,84$; $p < 0,001$ odnosno GSH $H = 52,76$; $p < 0,001$. Međusobnom komparativnom analizom (*Dunn test*) ispitivane su razlike između grupa. Dobijeni rezultati statističke analize su pokazali da je aktivnost SOD-a statistički značajno manja kod LD, LD+NP i NP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, dok se značajnost ne uočava kod *de novo* pacijenata (Slika 29a). Kod svih ispitivanih pacijenata detektovano je statistički značajno povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu. Pacijenti koji su primali LD i LD+NP pokazuju statističko povećanje od 0,1 %, dok je 5 % povećanje uočeno kod *de novo* pacijenata (Slika 29b). Takođe, rezultati statističke analize pokazali su da je koncentracija GSH bila statistički značajno manja kod svih ispitivanih pacijenata u odnosu na kontrolu (Slika 29v). Između ostalih ispitivanih grupa nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti SOD, CAT kao i koncentraciji GSH.



Slika 29. Nivo ispitivanih parametara AO zaštite a) SOD, b) CAT, v) GSH kod zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od PB koji su podeljeni u četiri podgrupe: *de novo*, pacijenti koji primaju L-dopa (LD), pacijenti na neuroprotektivnim medikamentima (NP) i one čija terapija se sastoji iz kombinacije istih (LD+NP). Rezultati su prikazani kao apsolutne vrednosti: 25-75% izmerenih vrednosti obuhvaćeno je „kućicom“, linija u sredini označava medijanu, crtice iznad i ispod kućice označavaju najnižu i najvišu izmerenu vrednost. Oznakom * je prikazana statistička razlika između kontrola i pacijenata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Dunn test).

4.4 GLM analiza

Na kraju, ispitivani parametri OS i AO zaštite, kao i PC/LPC intenzitet pikova su testirani GLM (generalni linearni model) analizom da bi se utvrdilo da li i u kojoj meri njihova varijabilnost zavisi od kliničko-patoloških osobina i primenjene antiparkinsone terapije.

Individualne asocijacije između ispitivanih (PAB, AOPP, HNE, MDA, SOD, CAT, GSH, PC/LPC) i kliničko-patoloških parametara predstavljene su u Tabeli 13, gde eta vrednost predstavlja meru varijabilnosti i jačinu asocijacije, a p-vrednost statističku značajnost. Univarijantna GLM analiza je pokazala da starost ispitanika značajno utiče na varijansu PC/LPC intenziteta (39,8 %), dok dužina trajanja bolesti značajno utiče na nivo svih ispitivanih parametara, osim za HNE, gde ona iznosi svega 11,9 %. Stadijum bolesti značajno determiniše varijansu svi ispitivanih parametara, sa tim što je ona posebno izražena kada je u pitanju koncentracija GSH (84,2 %). Analiza je pokazala da i terapija (doza i tip terapije) imaju statistički značajan efekat na sve ispitivane parametre OS, AO zaštite, kao i PC/LPC intenzitet pikova, pri čemu je njen najveći efekat na koncentraciju GSH (84,1 %), dok najmanji ima kada su u pitanju koncentracije PAB (16,7 %) i HNE (16,8 %). Rezultati analize su pokazali da pol i starost ispitanika ne utiču statistički značajno na promene parametara OS i AO zaštite i intenziteta pika PC/LPC.

Tabela 13. Univarijaciona GLM analiza asocijacija između ispitivanih parametara (PAB, AOPP, HNE, MDA, SOD, CAT, GSH, PC/LPC) i kliničko-patoloških osobina. Varijanse komponenata su kvantifikovane kao eta, F je nezavisni faktor, dok p predstavlja statističku značajnost.

		PAB	AOPP	4-HNE	MDA	SOD	CAT	GSH	PC/LPC
Pol	F	1,205	4,181	0,183	0,049	1,207	0,264	2,047	0,524
	p	0,276	0,045	0,670	0,820	0,275	0,609	0,156	0,474
	eta	0,017	0,056	0,003	0,001	0,013	0,003	0,022	0,016
Starost	F	0,726	0,534	0,242	1,042	1,293	0,099	1,743	10,559
	p	0,489	0,589	0,786	0,360	0,280	0,906	0,181	p<0,001
	eta	0,028	0,021	0,010	0,040	0,029	0,002	0,038	39,810
Dužina trajanja bolesti	F	0,106	8,445	2,304	7,445	19,663	26,602	140,738	6,985
	p	p<0,05	p<0,001	0,067	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	eta	0,154	0,332	0,119	0,305	0,424	0,499	0,840	0,411
H&Y stadijum	F	2,647	8,653	3,682	7,120	15,735	20,654	112,987	5,993
	p	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	eta	0,165	0,392	0,216	0,347	0,426	0,493	0,842	0,444
LED	F	2,808	8,877	3,548	6,757	19,894	25,762	141,849	4,178
	p	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05
	eta	0,142	0,343	0,173	0,284	0,427	0,491	0,841	0,385
Tip terapije	F	3,411	9,066	3,437	6,189	19,926	25,733	141,585	4,231
	p	p<0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05
	eta	0,167	0,348	0,168	0,267	0,427	0,490	0,841	0,337

Da bi se ispitaio sinergistički efekat ispitivanih parametara primenjena je multivarijantna GLM analiza. Dvofaktorska analiza (Tabela 14a) stadijuma i dužine bolesti pokazala je glavni efekat H&Y stadijuma na koncentraciju AOPP ($F = 8,022$; $p < 0,001$), HNE ($F = 3,784$; $p < 0,001$), MDA ($F = 8,301$; $p < 0,001$) i PC/LPC intenzitet ($F = 4,975$; $p < 0,05$). Glavni efekat dužine trajanja bolesti, kao i interakcioni efekat stadijuma i dužine trajanja bolesti nije pokazao statistički značajan efekat ni na jedan od ispitivanih parametara (Tabela 14a). Ispitivanje uticaja LED i tipa terapije (Tabela 14b) na merene parametre u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazalo je interakcioni efekat na koncentraciju PAB ($F = 3,980$; $p < 0,05$) i AOPP ($F = 3,992$; $p < 0,05$). Pored interakcionog detektovan je i glavni efekat i LED ($F = 4,954$; $p < 0,05$) i tipa terapije ($F = 4,530$; $p < 0,05$) na koncentraciju PAB. Kod svih ostalih ispitivanih parametara niti je uočen statistički značajan glavni uticaj doze i tipa terapije, niti njihov interakcioni efekat (Tabela 14b). U Tabeli 14v utvrđen je statistički značajan interakcioni efekat uticaja LED i dužine trajanja bolesti na PC/LPC intenzitet pikova ($F = 4,018$; $p < 0,05$), dok je glavni efekat LED ispoljen na koncentraciju AOPP ($F = 6,931$; $p < 0,001$), HNE

($F = 2,810$; $p < 0,05$) i MDA ($F = 7,094$; $p < 0,001$). Ostale asocijacije nisu pokazale statističku značajnost.

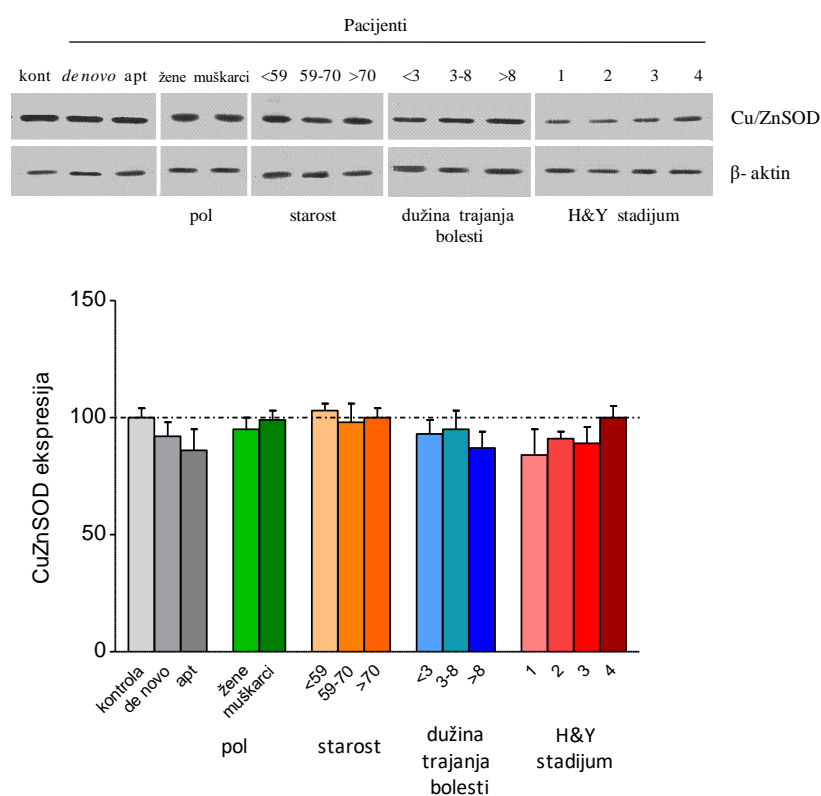
Tabela 14. Multivarijaciona GLM analiza asocijacija između ispitivanih parametara (PAB, AOPP, HNE, MDA, SOD, CAT, GSH, PC/LPC) i kliničko-patoloških osobina. Varijanse komponenata su kvantifikovane kao eta, F je nezavisni faktor, dok p predstavlja statističku značajnost.

			PAB	AOPP	HNE	MDA	SOD	CAT	GSH	PC/LPC
a)	H&Y stadijum	F	2,184	8,022	3,784	8,301	0,095	1,530	0,609	4,975
		p	0,067	0,000	0,005	0,000	0,984	0,201	0,657	0,014
		eta	0,148	0,389	0,231	0,397	0,005	0,070	0,029	0,255
	Dužina trajanja bolesti	F	0,326	2,425	0,237	0,308	0,114	1,640	0,004	0,064
		p	0,570	0,124	0,628	0,581	0,736	0,204	0,947	0,802
		eta	0,005	0,037	0,004	0,005	0,001	0,020	0,000	0,002
	Interakcija	F	0,779	1,924	1,722	2,603	0,454	1,186	0,642	0,007
		p	0,510	0,135	0,171	0,060	0,769	0,323	0,634	0,993
		eta	0,036	0,084	0,076	0,110	0,022	0,055	0,031	0,000
<hr/>										
			PAB	AOPP	HNE	MDA	SOD	CAT	GSH	PC/LPC
b)	LED	F	4,954	1,189	0,61	2,542	1,040	0,415	0,273	1,684
		p	0,010	0,175	0,546	0,087	0,357	0,661	0,762	0,203
		eta	0,134	0,053	0,019	0,074	0,02	0,008	0,005	0,104
	Tip terapije	F	4,530	0,082	0,028	0,099	1,353	0,016	0,340	2,330
		p	0,014	0,922	0,973	0,096	0,263	0,984	0,713	0,115
		eta	0,124	0,003	0,001	0,003	0,026	0,000	0,007	0,139
	Interakcija	F	3,980	3,992	0,686	1,888	0,929	1,395	0,166	0,015
		p	0,023	0,023	0,507	0,160	0,398	0,253	0,848	0,904
		eta	0,111	0,111	0,021	0,056	0,018	0,026	0,003	0,001
<hr/>										
			PAB	AOPP	HNE	MDA	SOD	CAT	GSH	PC/LPC
v)	LED	F	2,257	6,931	2,810	7,094	0,621	0,971	0,224	1,899
		p	0,072	0,000	0,032	0,000	0,603	0,411	0,879	0,168
		eta	0,122	0,299	0,147	0,304	0,022	0,034	0,008	0,116
	Dužina trajanja bolesti	F	0,130	0,269	0,410	2,938	0,023	1,181	0,009	3,542
		p	0,720	0,606	0,524	0,091	0,881	0,280	0,925	0,070
		eta	0,002	0,004	0,006	0,043	0,000	0,014	0,000	0,109
	Interakcija	F	0,616	1,452	1,060	0,729	0,203	0,765	0,177	4,018
		p	0,543	0,242	0,352	0,486	0,894	0,517	0,911	0,029
		eta	0,019	0,043	0,032	0,022	0,007	0,027	0,006	0,217

4.5 Promena ekspresije ispitivanih enzima antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na kontrole

S obzirom da su uočene promene aktivnosti ispitivanih enzima AO zaštite, u ovoj studiji praćena je i potencijalna modulacija ekspresije proteina Cu/ZnSOD i CAT koje mogu biti posledica pojave OS detektovanog kod PB pacijenata.

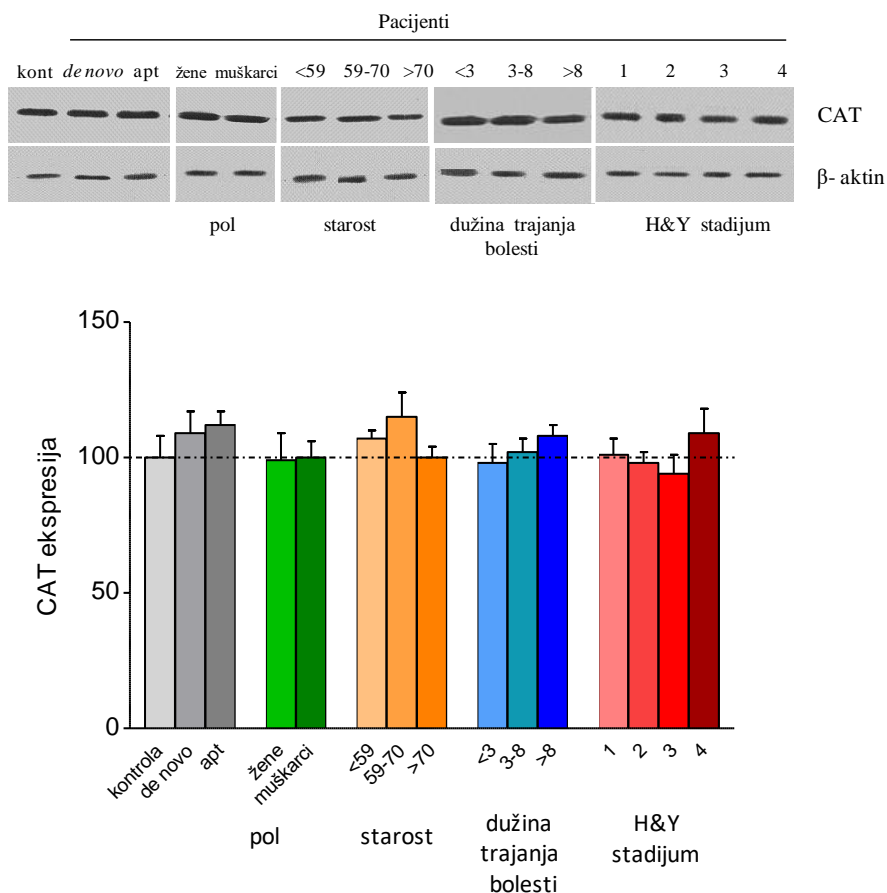
Nivo Cu/ZnSOD proteina u krvi zdravih ispitanika i pacijenata sa PB prikazan je na Slici 30. Za razliku od aktivnosti enzima koja je smanjena u obe grupe pacijenata u poređenju sa kontrolnom, ekspresija Cu/ZnSOD nije bila statistički značajno promenjena (bez obzira na pol, starost ispitanika, dužinu trajanja bolesti i H&Y stadijum), što ukazuje da se s bolešću modifikuje katalitička efikasnost enzima, a ne nivo ovog proteina.



Slika 30. Relativna količina Cu/ZnSOD proteina u krvi zdravih ispitanika i pacijenata. Reprezentativni imunoblotovi za Cu/ZnSOD kontrola (kont), *de novo* (*de novo*) i pacijenata koji primaju antiparkinson terapiju (apt), kao i pacijenata koji su podeljeni u odnosu na pol, starost, dužinu trajanja bolesti i H&Y stadijum (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije Cu/ZnSOD predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) i izražena kao procenat od kontrole (B).

U istim eksperimentalnim uslovima, nije uočena promena ekspresije CAT pri poređenju kontrola i pacijenta, kao ni pri međusobnom poređenju pacijenata podeljenih u različite podgrupe na osnovu kliničko-patoloških karakteristika (Slika 31). Dobijeni

rezultati ukazuju da se sa bolešću menja enzimska efikasnost, a da ne dolazi do *de novo* sinteze ovog proteina.



Slika 31. Relativna količina CAT proteina u krvi zdravih ispitanika i pacijenata. Reprezentativni imunoblotovi za CAT kontrola (kont), *de novo* (*de novo*) i pacijenata koji primaju antiparkinson terapiju (apt), kao i pacijenata koji su podeljeni u odnosu na pol, starost, dužinu trajanja bolesti i H&Y stadijum (A). Kvantifikacija proteinske ekspresije CAT predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) i izražena kao procenat od kontrole (B).

Diskusija

Literaturni podaci ukazuju da se povećana proizvodnja slobodnih radikala ili/i smanjena AO zaštita mogu povezati sa procesima starenja, ali i sa razvojem i napredovanjem bolesti poput neurodegenerativnih [221–224]. Iako je predmet dugogodišnjih istraživanja, tačna molekularna patogeneza neurodegeneracije kod pacijenata sa PB ostaje nejasna [19]. Pretpostavlja se da, između ostalog, nastaje kao posledica poremećaja redoks ravnoteže i osetljivosti neurona na oksidativna oštećenja zbog visokog sadržaja PNMK u membranama neurona, velike potrošnje kiseonika i slabe AO zaštite.

Poslednjih godina izdvojeno je nekoliko potencijalnih markera koji se povezuju sa neurodegenerativnim bolestima, uključujući PAB, AOPP, lipidne perokside, GSH, i druge [225–228].

Za odvojeno/pojedinačno određivanje koncentracija brojnih oksidanasa i antioksidanasa u plazmi (ili u serumu) postoji veliki broj različitih laboratorijskih testova koji se koriste u naučno-istraživačkim laboratorijama [221–224]. Međutim, istovremeno određivanje i OS i AO statusa je često neophodno pa je stoga uveden parametar za procenu prooksidativne/antioksidativne ravnoteže (PAB)¹⁴ [211]. Promena nivoa PAB, kao pokazatelja koji promoviše i kontroliše sistemski OS, je prvi pokazatelj narušene ravnoteže, i „ukazuje“ da je produžena produkcija toksičnih vrsta povezana sa ćelijskim/tkivnim povredama izazvanim OS, što na kraju može da dovede do kliničke manifestacije bolesti. U ovoj doktorskoj disertaciji nivo PAB-a kod PB pacijenata u poređenju sa kontrolama bio je povećan (Slika 12 i 13), odnosno pokazan je veći nivo oksidanasa, u poređenju sa antioksidansima što ukazuje na postojanje intenzivnog OS kod ispitivanih pacijenata. Literaturni podaci ukazuju da je kod idiopatske PB i u genetičkim slučajevima OS uobičajni uzročnik ćelijske disfunkcije i propadanja [226,230]. Kod pacijenata sa PB uočen je povišen nivo oksidovanih lipida, proteina i DNK, kao i smanjen nivo GSH u DA neuronima usled prekomerne produkcije RKV, koje nastaju tokom metabolizma DA, mitohondrijske disfunkcije i neuroinflamacije [231–233]. DA neuroni su skloni OS-u zbog prisustva tirozin hidrosilaze i MAO enzima, ali i zbog toga što sadrže gvožđe koje katalizuje Fentonovu reakciju pri čemu superoksidni ostaci i H₂O₂

¹⁴ PAB se može smatrati merilom neravnoteže između produkcije slobodnih radikala (H₂O₂, terc-butilhidroperoksida, hloramina T i HClO) i antioksidanasa (vitamin C, trolok, GSH, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin i ceruloplazmin) [229].

mogu doprineti daljem OS [226]. Slični rezultati dobijeni su i u drugim oboljenjima kao što je šizofrenija [234], dijabetes tipa II [229] i dr.

Mnogobrojni molekuli su mete RKV/RAV, poput proteina, što za posledicu ima produkciju AOPP [235]. Određivanje njihovih nivoa u cilju praćenja oštećenja proteina izazvanih OS, značajno je kod nekih neurodegenerativnih bolesti kao što su multipla skleroza ili mitohondrijalna miopatija i lateralna amiotrofična skleroza [236]. Detaljnije poznavanje uloge AOPP-a u patofiziološkim procesima može da pruži važne informacije o poreklu i razvoju bolesti [237]. Međutim, slični podaci za PB i njenu progresiju su retki [238]. Garcija-Moreno i saradnici [239] pokazali su da je nivo AOPP veći u serumu i CST kod pacijenata sa PB, kod kojih je uočeno da se formira hipohlorna kiselina (HOCl) i hloramin iz hlorida što za posledicu ima povećanje H_2O_2 i formiranje AOPP [212] što je katalizovano mijeloperoksidazom. S obzirom da AOPP može da reaguje sa humanim serumom albuminom (HSA) pri čemu dolazi do formiranja konjugata AOPP-HSA, inflamatornog parametra [240], stoga se može pretpostaviti da AOPP može biti povezan i sa upalnim procesima u PB. Do sličnih saznanja nedavno su došli Medeiros i saradnici [238] koji su utvrdili povećan nivo AOPP u serumu pacijenata sa PB u odnosu na kontrole. Ovakvi rezultati potvrđeni su i u ovoj doktorskoj disertaciji u kojoj je detektovano statistički značajno povećanje nivoa AOPP-a u plazmi pacijenata sa PB u odnosu na kontrole (Slika 12 i 13). Dobijeni rezultat ukazuje da se nivo AOPP može koristiti kao potencijalni marker za procenu oštećenja proteina koja je povezana sa OS kod pacijenata sa PB.

Kod PB, tačan uzrok koji dovodi do oštećenja neurona nije poznat, ali postoje dokazi da OS učestvuje u ovom procesu; slobodni radikali reaguju sa membranskim lipidima i uzrokuju LPO i ćelijsku smrt [241]. Stoga, LPO se može smatrati jednim od glavnih posrednika u mehanizmu ćelijskog starenja koje nastaje kao posledica dejstva faktora spoljašnje sredine ili starenja koje nastaje kao posledica neurodegenerativnih bolesti. Peroksidacijom PNMK kao rezultat nastaju reaktivni aldehidi (kao što je MDA) i konjugati diena. Povećan nivo MDA, detektovan je u uzorcima SNpc pacijenata sa PB [166,242] uz pretpostavku da se MDA može koristiti kao marker OS, odnosno kao *in vivo* marker LPO. Osim toga, različite grupe istraživača su pokazale povećan nivo MDA u plazmi pacijenata sa PB [242–244], kao i povećan nivo TBK reaktivnih supstanci, koji predstavljaju markere LPO [245]. Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji

ukazuju na povećanu koncentraciju ispitivanog parametra LPO kod pacijenata u odnosu na kontrole (Slika 12 i 13). Veliki broj studija pokazao je povećanu LPO i u drugim neurodegenerativnim bolestima, kao što je AB [246]. Povećan nivo LPO produkata, kao što je HNE, pronađen je i u životinjskim model sistemima [247], kao i u mozgu, CST i plazmi pacijenata sa AB [247–250] i Huntingtonovom bolesti (HB) [103]. Proteomičkom analizom pokazano je da je HNE uključen u procese nastanka slobodnih radikala [251–253], dok je u kasnijim stadijumima AB uočeno da HNE može direktno uticati na interneuronsku komunikaciju preko modifikacije ključnih proteina [254] i enzima energetskog metabolizma (ATP sintaza, aldolaza i dr) [255], kao i enzima AO zaštite (SOD, hem oksidaza i dr) [256]. Usled disfunkcije ovih enzima delovanjem HNE, odbrana neuronskog tkiva protiv oksidativnog oštećenja je dodatno oslabljena. LPO, takođe, dovodi do pojave α -sinuklein derivata. HNE- α -sinuklein ima značajno povećan oligomerizacioni potencijal pri čemu se smatra da formiranje ovog adukta dovodi do procesa agregacije [257] koji u patološkim procesima karakterističnim za PB, potvrđen je otkrićem prisustva HNE u Levijevim telašcima [103]. HNE, takođe, ima ulogu i u stvaranju oligomera koji se razlikuju po sposobnosti prenosa informacija sa ćelije na ćeliju [258]. Osim toga, pronađena je i povezanost nivoa HNE sa transportom DA. Naime, HNE narušava vezivanje DA za transporter i inhibira njegov unos što dalje doprinosi gubitku DA-zavisnih i DA-sekretornih neurona [259], i rezultira daljem napredovanju PB. Rezultati ove studije ukazuju na povećanje oba ispitivana parametra LPO (Slika 10, 11) što je u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljenih studija [245,260]. Sharma i saradnici [261] predlažu tri moguća mehanizma koji dovode do povećane LPO kod pacijenata sa PB: a) niži nivo antioksidanasa; b) više substrata za oksidaciju; i v) prisustvo još neidentifikovanih peroksida u plazmi. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pomeren oksidativni i antioksidativni balans ka oksidativnom, zajedno sa povećanim nivoom AOPP i povećanom produkcijom LPO, sugerišu na stanje intenzivnog OS kod pacijenata sa PB.

Od sadržaja masnih kiselina lipidnih membrana zavise njene biofizičke osobine, uključujući propustljivost, fluidnost i naelektrisanje [262,263]. Stoga, gubitak važnih nezasićenih masnih kiselina, koje su u velikoj meri prisutne u neuronima, smatra se da doprinosi membranskom oštećenju u patogenezi neurodegenerativnih bolesti [264]. Veliki broj studija pokazao je smanjen nivo PNMK-sadržajućih fosfolipida, i u mozgu i

u plazmi pacijenata koji imaju AB [265,266], posebno PC-a [267,268]. Gonzales i saradnici [269] su prvi put opisali paralelno povećanje nivoa PC koji sadrže i zasićene i kratke lance masnih kiselina u serumu pacijenata sa AB. Stoga, izmenjeni profil masnih kiselina pojedinačnih fosfolipida može da naruši biosintezu i remodelovanje acil lanaca fosfolipida u skladu sa povećanom razgradnjom i resintezom fosfolipida usled prevelike aktivacije PLA₂ [270].

Predstavljeni rezultati studije su pokazali značajno povećanje ispitivanog odnosa intenziteta pikova PL, PC i LPC, kod pacijenata sa PB (Slika 16). Promene u njihovom odnosu kod pacijenata sa AB, detektovali su Mulder i saradnici [172] koji su pokazali smanjenje LPC/PC, usled pada nivoa LPC kod pacijenata u poređenju sa kontrolom, dok je nivo PC bio nepromenjen. Uočene promene u sadržaju lipida mogu biti povezane sa ubrzavanjem procesa starenja, kao i pojavom i napredovanjem različitih neurodegenerativnih bolesti, uključujući i PB, što je pokazano i u životinjskim modelima, kao i na humanim uzorcima periferne krvi, CST i na mozgu [172,269,271–274]. S obzirom na oskudnost literaturnih podataka vezanih za PC/LPC intenzitet kod pacijenata obolelih od PB, dobijeni rezultati mogu doprineti razumevanju uloge lipida u nastanku i progresiji PB. Do sličnih rezultata došli su i Prasad i saradnici [272] koji su pokazali da ne postoje promene u nivou PC u različitim regionima mozga pacijenata sa AB, poput hipokampusa. LPC, kao sekundarni glasnik, metabolit PC-a nastao delovanjem enzima PLA₂, predstavlja parametar koji karakteriše inflamatorne procese u organizmu [275] i može biti senzitivniji parametar za praćenje promena metabolizma PC-a od samog PC-a. Aktivnost PLA₂ pratili su Fuchs i saradnici [182], kao i Pruzanski i saradnici [276] koji su pokazali da je aktivnost ovog enzima značajno povišena u serumu i sinovijalnoj tečnosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. Pored toga, eksperimentalni podaci dobijeni na životinjskim modelima ukazuju da bar jedan od metaboličkih PLA₂ enzima može imati izmenjenu aktivnost tokom hroničnog OS [104]. Poznato je da je niska aktivnost PLA₂ povezana sa smanjenom detoksikacijom oksidovanih fosfolipida i da utiče na akumulaciju toksičnih lipidnih peroksida, kao što su MDA i HNE, doprinoseći tako patogenezi bolesti [104]. Modifikovana aktivnost PLA₂ doprinosi formiranju RKV i lipidnih peroksida oslobađanjem arahidonske kiseline koja se posle oksidativno metaboliše [277]. Kada se uklanjanje lipidnih peroksida ne odvija na odgovarajući način ili odgovarajućom brzinom, stvoreni reaktivni aldehidi mogu doprineti generisanju

lipidnih slobodnih radikala i daljoj oksidaciji okolnih fosfolipida i proteina [278,279]. Štaviše, kod miševa sa nedostatkom PLA₂, kao životinjskog modela PB, primećena je pojačana otpornost na indukovanu neurotoksičnost [280], dok u Valerijskoj (eng. *Wallerian*) degeneraciji PLA₂ ima glavnu ulogu u degradaciji mijelina i stimulaciji fagocitoze [281]. Dobijeni LPC dalje izaziva upalni odgovor koji za uzvrat reguliše aktivnost PLA₂. Stoga, PLA₂ bi mogao biti ključni igrač u ćelijskom odgovoru na oštećenja izazvana slobodnim radikalima katalizovanjem „cepanja” fosfolipidnih molekula i stvaranjem slobodnih masnih kiselina i LPC, što kao posledicu ima smanjenje njegove aktivnosti [282] i promovisanje dodatne promene na nivou LPC. Analiza uloge PLA₂ na LPO u različitim patološkim stanjima CNS-a predstavlja izazov kako zbog različitih formi PLA₂, višestrukih izvora RKV-a, tako i zbog nedostatka PLA₂-specifičnih inhibitora [283]. Pored narušene aktivnosti PLA₂ u neurodegenerativnim poremećajima, otkrivena je i narušena aktivnost lizofosfolipidne aciltransferaze [104,284]. Za ovaj fosfolipid-metabolišući enzim je pokazano da utiče na pojavu i intenzitet OS u *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima [285–288] time što dovodi do re-acilovanja LPC-a u PC [285–287]. Međutim, Ross i saradnici [284] nisu detektovali nikakve promene u aktivnosti ovog enzima u SNpc pacijenata obolelih od PB. Dobijeni rezultat može se objasniti nedovoljnim OS koji dovodi do oštećenja i disfunkcije ovog enzima, ili prilagođavanjem na dugoročni OS. S obzirom da su prethodne studije pokazale promene aktivnosti ovih enzima u SNpc, nakon smrti ispitanika [104,284], potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdila aktivnost oba enzima u plazmi, zajedno sa njihovim učešćem u metabolizmu lipida kod pacijenata sa PB.

Posmatrano u odnosu na kliničko-patološke karakteristike, u ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da pol pacijenata utiče na nivo PAB, HNE, i MDA u plazmi pacijenata sa PB (Tabela 6, 8, 9). Ovakvi rezultati ukazuju na moguće postojanje razlike u podložnosti bolesti između žena i muškaraca. Takođe, dobijeni rezultati pokazuju da je odnos obolelih muškaraca i žena od PB 2:1, sa kasnijom pojavom bolesti kod žena u odnosu na muškarce (Tabela 6, 8, 9). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima [5,289–291]. Kod žena, kasnija pojava PB može biti povezana sa reproduktivnim ciklusom. Pretpostavlja se da ženski polni hormoni, estrogene, imaju protektivno dejstvo i da mogu odložiti početak PB i njegovu progresiju [289]. Takođe, potvrđena je i povezanost između kasnijeg ulaska u menopauzu i smanjenog rizika od

nastanka PB [292]. Uslovi koji dovode do ranijeg smanjenja nivoa estrogena i raniji ulazak u menopauzu povećavaju rizik od nastajanja PB kod žena [293].

Pored pola pokazano je da na pojavu PB utiče i starost, pri čemu veću predispoziciju za nastanak bolesti imaju starije osobe [5,294]. „Slobodno radikalna teorija“ starenja, kasnije nazvana teorija starenja OS-a, predlaže da su strukturna oštećenja povezana sa starenjem posledica oksidativnih oštećenja na makromolekulima (lipidi, DNK, proteini) delovanjem RKV/RAV [295]. Međutim, tačan mehanizam starenja izazvanog OS još uvek nije jasan, ali povećan nivo RKV/RAV verovatno dovodi do ćelijskog starenja, fiziološkog mehanizma koji zaustavlja ćelijsku proliferaciju kao odgovor na oštećenja. U ovoj doktorskoj disertaciji uočeno je da starost statistički značajno utiče samo na promenu nivoa PAB-a (Tabela 6), dok kod ostalih ispitivanih OS parametara statistička značajnost nije detektovana.

Rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije ukazuju na to da H&Y stadijum bolesti utiče na nivo OS parametara PAB (Tabela 6) i MDA (Tabela 9). Ovakav ishod može ukazati na viši nivo OS, odnosno na narušeni oksidativni-antioksidativni balans, kao i da se MDA može koristiti kao parametar za praćenje težine OS kroz stadijume bolesti i/ili da stadijum bolesti može biti povezan sa intenzitetom OS. Na Slici 18 prikazane su korelacije između godina starosti pacijenata i ispitivanih parametara OS-a, pri čemu se statistički značajna korelacija uočava samo za MDA. Ovi rezultati su u suprotnosti sa studijom u kojoj je uočena negativna korelacija nivoa MDA u odnosu na starost [296], dok sa druge strane u drugoj ona uopšte ne postoji [225]. Molina i saradnici [296] su pokazali da je koncentracija MDA u serumu pacijenata u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa godinama starosti pacijenata kao i sa dužinom trajanja bolesti, što sugeriše da bi povećan nivo LPO u serumu mogao da predstavlja faktor rizika za raniji početak PB, dok su Younes i saradnici [225] uočili odsustvo korelacije starosti i TBARS u plazmi pacijenata sa PB. Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj disertaciji može se pretpostaviti da dolazi do molekulskih oštećenja povezanih sa starenjem kao odgovor na povećanu sistemsku LPO kod pacijenata sa PB.

Korelacije između dužine trajanja bolesti i ispitivanih OS parametara nije uočena (Slika 19). Dobijeni rezultati su u skladu sa Medeiros i saradnicima [238], kao i Agilom i saradnicima [297], čija istraživanja su pokazala nedostatak iste korelacije s obzirom na

to da se klinički simptomi kod pacijenata sa PB javljaju kada je PB već uznapredovala i kada je oko 80% dopaminergičkih neurona u SNpc već mrtvo. Oni su konstatovali povećanu LPO kod pacijenata sa PB, kao i povećanu osetljivost plazme na LPO u odnosu na kontrole. Na osnovu dobijenih rezultata su zaključili da je plazma pacijenata sa PB osetljivija na LPO u odnosu na kontrole. Takođe, uočili su odsustvo korelacije između stadijuma i dužine bolesti sa ispitivanim parametrima.

Uprkos prethodnim studijama koje su ukazale na važnost praćenja ukupnih koncentracija PC i LPC, kao i njihovog odnosa u različitim bolestima i stanjima [172,182], do sada nije bilo istraživanja o odnosu PC i LPC inteziteta u plazmi pacijenata koji boluju od PB. U ovoj doktorskoj disertaciji detektovana je razlika između PC/LPC inteziteta pikova kod pacijenata sa PB u odnosu na kontrole, u različitim stadijumima bolesti i između zdravih ispitanika i pacijenata sa različitom dužinom trajanja bolesti (Slika 23). Na osnovu dobijenih rezultata moglo bi se pretpostaviti da su uočene promene PC/LPC inteziteta pika prouzrokovane sistemskim OS kod pacijenata sa PB. Prethodne studije [226,230,298] ukazuju da OS može da indukuje aktiviranje različitih procesa, uz modifikaciju metaboličke aktivnosti - najverovatnije kroz oštećenje i disfunkciju enzima koji su odgovorni za konverziju ispitivanih lipidnih vrsta. Nedostatak statističkih razlika između PC/LPC intenziteta pikova između grupa pacijenata u različitim stadijumima bolesti i pacijenata sa različitom dužinom trajanja bolesti može ukazati da je većina DA neurona u SNpc već izgubljena, a bolest je već uznapredovala kada je dijagnostikovana.

Dodatno je praćen uticaj terapije na promenu ispitivanih OS parametara. U novijoj literaturi su kontradiktorni podaci o vezi između terapije L-dopom i intenziteta OS. Dobro poznata *in vitro* toksičnost uzrokovana L-dopom i DA nije pokazana u *in vivo* uslovima [299–301], dok su klinička ispitivanja pokazala da nema štetnih uticaja L-dope na progresiju bolesti [195,302]. Rezultati ove studije su ukazali da se nivoi OS parametara (PAB, AOPP, HNE, MDA), kao i PC/LPC inteziteta pikova statistički značajno razlikuju između kontrola i pacijenata (Slika 24 i 25) koji su podeljeni u grupe prema dozi korišćene terapije. Posmatrano po grupama, značajnost se ne uočava za PAB kod *de novo* pacijenata i onih čija je doza terapije najviša (Slika 24a), dok se kod svih ostalih parametara javlja statistička značajnost u odnosu na kontrole (Slika 24). Pri međusobnom poređenju različitih grupa pacijenata ne uočava se statistička značajnost ni za jedan od ispitivanih parametara. S obzirom da je u grupi ispitanika bilo pacijenata koji jesu i onih

koji nisu bili na terapiji, može se zaključiti da terapijska doza ne doprinosi OS odnosno progresiji bolesti. Slične rezultate dobili su i Prigione i saradnici [303] koji ističu da promene OS parametara, nivo unutarćelijskog RKV i aktivnost glutation-reduktaze (GR), kod pacijenata sa PB nisu povezane sa unosom L-dope koja u stvari može imati zaštitnu funkciju, jer su uočili da dnevna doza L-dope pokazuje značajnu obrnutu korelaciju sa produkcijom RKV. Stoga, detektovano povećanje OS kod pacijenata sa PB smatra se da nije povezano sa unosom L-dope.

Nekoliko *in vitro* studija pokazalo je porast oksidacije i posledičnu neurotoksičnost izazvanu L-dopom [304–306], dok su druge ukazale na odsustvo uticaja L-dope i dodatnih oštećenja nigrostrijalnih neurona [299]. Predstavljeni rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na promene nivoa OS parametara i PC/LPC inteziteta pikova pacijenata koji su bili tretirani različitom vrstom terapije u odnosu na kontrole, dok se ispitivanjem parametara između grupa pacijenata jedino uočava statistički značajna razlika nivoa AOPP u odnosu na *de novo* pacijente. Kod pacijenata koji primaju monoterapiju L-dopom ni za jedan od ispitivanih parametra (PAB, AOPP, HNE, MDA, PC/LPC) ne uočava se razlika u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 27 i 28) što ukazuje da tip terapije ne doprinosi intezitetu OS.

U kliničkoj praksi DA agonisti pokazali su dobre rezultate u lečenju PB [307]. Oni se obično koriste kao monoterapija pre početka uvođenja L-dope, posebno kod mlađih pacijenata [308]. Kod pacijenata koji primaju monoterapiju DA agonistima često se ne ispoljavaju motoričke fluktuacije, ali obično je potrebno duže vreme za postizanje terapijskog efekta u odnosu na pacijente tretirane L-dopom [309]. Posle određenog vremenskog perioda kako bi se simptomi bolesti ublažili [310], odnosno nakon ispoljavanja motoričkih komplikacija [311], uvodi se kombinovana terapija DA agonista i L-dope. Međutim, u ovoj studiji dobijeni su potpuno neočekivani rezultati. Pacijenti koji primaju monoterapiju sa agonistima DA (Slika 27) i kombinovanu terapiju pokazuju povećanje svih OS parametara (Slika 27), osim kada je u pitanju HNE kod pacijenata koji su na monoterapiji NP (Slika 27v) u poređenju sa kontrolom. Ovo se može objasniti time da bez obzira na uvođenje DA agonista, proces periferne transformacije male količine L-dope u DA nije u potpunosti blokiran inhibitorima dopa-dekarboksilaze i da pacijenti mogu biti izloženi povećanom nivou L-dope i DA u plazmi, samim tim i povećanom OS. Takođe, de Faris i saradnici [312] su detektovali da korišćena terapija nema efekat na OS

biomarkere, poput lipidnih peroksida u plazmi (MDA) što je u saglasnosti sa *in vitro* i kliničkim studijama koji pokazuju da monotretman L-dopom ne povećava oksidativna oštećenja [301,313]. Takođe su uočili da korišćenje kombinovane terapije utiče na značajno povećanje C - reaktivnog proteina (CRP) što je u saglasnosti sa studijom u kojoj je detektovano i povećanje proinflamatornih citokina u plazmi i mozgu pacijenata sa PB [314]. Iako povećani CRP u PB može biti posledica lekova koje pacijent prima, postoje dokazi o povećanom nivou pro-inflamatornih citokina, uključujući IL-6 (koji reguliše nivo CRP-a u plazmi) u plazmi i mozgu pacijenata sa PB [314]. Ova grupa autora pretpostavlja da antiparkinsoni lekovi nisu umanjili RKV/RAV, dok je kombinovana terapija čak povećala inflamatorno stanje [314]. S obzirom da su procesi koji se javljaju delovanjem reaktivnih vrsta nalaze u osnovi patofiziologije PB, može se zaključiti da bi lečenje pacijenata bilo efikasnije kada bi se standardnoj/trenutnoj antiparkinsonskoj terapiji dodali AO lekovi koji utiču na LPO.

Postoji nekoliko različitih mehanizama, enzimskih i neenzimskih, koji imaju funkciju zaštite organizma od štetnih uticaja RKV/RAV. Ovi mehanizmi su odgovorni za održavanje ravnoteže između pro- i antioksidansa i ublažavanje OS. Osnovne komponente enzimske AO zaštite su SOD, CAT, GPx i GR, dok neenzimski antioksidanti uključuju GSH, tioredoksin, vitamine A, E i C, flavonoide, elemente u tragovima i proteine, npr. albumin, ceruloplazmin i metalotionein. Ispitivanje različitih parametara OS i AO zaštite dalo je nedosledne rezultate i još uvek je izazovno njihovo određivanje u perifernoj krvi pacijenata sa PB. Ono što je poznato, to je da se aktivnost enzima AO zaštite i molekula koji učestvuju u AO zaštiti regulišu putem AO sistema kako bi se nosili sa akutnim ili blagim OS; međutim ozbiljan ili prolongiran OS može izazvati njihove promene.

U ovoj doktorskoj disertaciji pored ispitivanih OS i lipidnih parametara i njihove povezanosti sa kliničko-patološkim karakteristikama, ispitivane su i specifične AO varijable: aktivnost enzima SOD i CAT, kao i koncentracija GSH. Rezultati pokazuju statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD kod obe grupe pacijenata sa PB (*de novo* i apt) u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 17a, b). Uočena smanjena aktivnost SOD može biti posledica njegove inaktivacije posredstvom RKV ili usled postranslacionih modifikacija, kao što je pokazano u istraživanju Hu i Rena [315]. Smanjena aktivnost SOD u krvi otkrivena je i kod mnogih hroničnih bolesti kao što su opstrukcija pluća [316],

bolesti bubrega [317], kao i kod nekih neuroloških poremećaja [318]. Singh i saradnici [319] navode kao mogući razlog za smanjenje nivoa SOD-a polimorfizam gena i to onih koji kodiraju proteine uključene u toksikaciju-detoksikaciju i dopaminergičke puteve PB, s tim da ne postoje razlike u genotipu i frekvenciji alela za MnSOD. Njihovi podaci sugerišu da polimorfizam gena uključenih u detoksikaciju i regulaciju DA može biti povezan sa rizikom za razvoj PB. Takođe, Ihara i saradnici [320] smatraju da smanjenje SOD aktivnosti može imati ulogu u visokom OS kod pacijenata sa PB, kao i da dolazi do narušavanja aktivnosti mitohondrija i da se kod takvih pacijenata produkuje više RKV. Slično objašnjenje dali su i de la Torre i saradnici [321], kao i Abraham i saradnici [322] koji su pokazali da redukcija aktivnosti SOD dovodi do povećanja superoksid radikala. Superoksid radikali mogu, takođe, da reaguju sa NO generišući ONOO⁻ koji se smatra potencijalnim neurotoksinom. Ćelijski nivoi reaktivnih vrsta mogu biti redukovani preko mehanizma zaštite u koji su uključeni enzimi AO zaštite i mali molekuli [323]. Sa druge strane, u ostalim studijama aktivnost SOD je povećana [225,245,324,325] ili je nepromenjena [326,327]. Povećanu aktivnost SOD de Faris i saradnici [312] su objasnili kao kompenzatorni mehanizam za sprečavanje povećane proizvodnje superoksidnih radikala. Povećanje aktivnosti SOD poboljšava uklanjanje O₂^{-•}, međutim stvara se H₂O₂, pri čemu gvožđe može postati dodatni izvor RKV. Sharma i saradnici [261] otkrili su da se povećana aktivnost SOD može pripisati efektima različitih RKV, koji se stvaraju tokom hroničnog OS kod ovih bolesnika.

CAT, enzim koji se nalazi u peroksizomima većine tkiva i lako prolazi kroz membrane, zajedno sa GPx ima važnu ulogu u zaštiti od OS [328]. Iako je poznato da učestvuju u razgradnji H₂O₂ do vode i kiseonika, njihova uloga još uvek nije do kraja razjašnjena [329,330]. Kada je u pitanju aktivnost eritrocitne CAT, veliki broj studija pokazao je oprečne rezultate. Na primer, u nekoliko studija nisu zabeležene značajne promene njene aktivnosti kod pacijenata sa PB u poređenju sa zdravim ispitanicima [165,327]. Nasuprot tome, uočena smanjena aktivnost CAT [260,312,322,331] može se objasniti povećanim OS koji oksiduje hemprotein subjedinice CAT, i da zbog oksidacije može doći do disocijacije tetramernog hemoproteinskog molekula što rezultira gubitkom katalazne aktivnosti. Međutim, rezultati dobijeni u zadatim eksperimentalnim uslovima u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali povišenu aktivnost CAT u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 17v, g). Do sličnih rezultata došli su i Lovell i saradnici [332]

u uzorcima homogenizata tkiva mozga kadavera, koji ističu da je mozak u AB pod uticajem povećanog OS-a i pokazuje da se peroksidacija lipida menja najizraženije u srednjim strukturama temporalnog režnja, gde su degenerativne promene najistaknutije. S obzirom da je CAT ključni enzim u uklanjanju H_2O_2 u višim koncentracijama [333] (dok aktivnost GPx preovlađuje u fiziološki niskim nivoima H_2O_2 [334]), povećana aktivnost CAT u krvi pacijenata sa PB može potvrditi opšti zaključak ove studije da su pacijenti sa PB izloženi hroničnom OS i da se javlja kompenzatorno povećanje aktivnosti ovog enzima AO zaštite [335].

Kao što je prikazano na Slici 17 (v, đ) koncentracija GSH u krvi pacijenata sa PB je statistički značajno smanjena u poređenju sa zdravim ispitanicima. Fiziološke uloge GSH uključuju održavanje redoks potencijala tiola, „čišćenje“ metaboličkog otpada, ali se GSH ponaša i kao rezervoar za aminokiseline [233]. Budući da je GSH uključen u AO zaštitu i regulaciju ćelijskih metaboličkih funkcija, od ekspresije gena i sinteze proteina do transdukcije signala, proliferacije ćelije i apoptoze [336], njegovo smanjenje može imati veliki uticaj na mnoge fiziološke i patološke procese. Tako na primer, disregulacija GSH homeostaze i promenjena aktivnost GSH-zavisnih enzima se može povezati sa pokretanjem i napredovanjem neurodegenerativnih bolesti [337]. Nedostatak GSH doprinosi i oksidativnom/azotnom stresu, koji su povezani sa patogenezom mnogih bolesti, poput malignih bolesti, cistične fibroze, infekcije i bolesti starenja, uključujući PB [338,339]. Michley i saradnici [336] konstatovali su smanjenje GSH u punoj krvi pacijenata sa PB i predložili su da se praćenje koncentracije GSH u krvi može smatrati kao potencijalni biomarker PB.

Nije uočena značajna povezanost između kliničko-patoloških karakteristika (pol, starost, dužina i stadijum bolesti) i ispitivanih parametara AO zaštite (Tabela 10, 11 i 12). Pored toga, u ovoj disertaciji ispitivane su korelacije parametara AO zaštite sa OS (PAB i AOPP) i kliničko-patološkim karakteristikama. Rezultati korelacione analize su pokazali da je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji GSH sa AOPP, dok ostali ispitivani parametri OS nisu pokazali statistički značajnu povezanost (Slika 20đ) što može ukazati na vezu GSH i promenjeni intenzitet OS, tačnije narušene oksidativne modifikacije proteinskih molekula. U životinjskom model sistemu PB pokazano je da oksidovani glutation ubrzava proteinsku agregaciju [340], a smrt neurona povezanih sa

α -sinukleinom može se „sprečiti“ reakcijama koje povećavaju redukciju GSH [123] čime se povezuju oksidativne modifikacije proteina sa patofiziologijom PB.

Na Slikama 21 i 22 prikazana je korelacija parametara AO zaštite sa godinama starosti pacijenata (Slika 21) i dužinom trajanja bolesti (Slika 22). Statistički značajna korelacija uočena je samo između GSH i dužine trajanja bolesti (Slika 22v). Smanjena aktivnost SOD, bez konstatovane statistički značajne korelacije sa starošću (Slika 21a) i dužinom trajanja bolesti (Slika 22a) u saglasnosti su sa rezultatima Younes i saradnika [225], dok u drugim studijama uočena je negativna korelacija između dužine trajanja bolesti i aktivnosti ovog enzima [341,342].

Dalje, statistički značajna korelacija između godina starosti ispitanika i dužine trajanja bolesti i aktivnosti CAT nije pronađena (Slika 21 i 22). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Younes-Mhenni i saradnika [225] kada je u pitanju korelacija godina starosti ispitanika i dužine trajanja bolesti, za razliku od stadijuma bolesti. Korelacija između GSH i dužine trajanja bolesti pacijenata sa PB, detektovana je u ispitivanim uzorcima pacijenata u ovoj studiji (Slika 22v) što je važno jer promena nivoa GSH utiče na brojne molekularne procese, kao i na progresiju bolesti. Smanjenje ukupnog nivoa GSH uočeno je da se smanjuje u SNpc sa napredovanjem PB [343]. Kako smanjenje nivoa GSH nije uočeno u drugim regionima mozga različitih neurodegenerativnih bolesti, pomenuta korelacija može biti specifična samo za SNpc kod pacijenata kojima je dijagnostifikovana PB [243]. Na osnovu nekih studija, u SNpc kod PB pacijenata uočen je povećan nivo GSSG paralelno sa već pomenutom GSH redukcijom [344,345]. Kako je odnos između redukovane i oksidovane forme GSH važan indikator redoks stanja, i u isto vreme doprinosi ostvarenju molekulskih mehanizama koji su u osnovi ćelijske proliferacije, diferencijacije ili apoptoze [147], ovo bi mogao biti prvi korak koji dovodi do slabljenja ili smanjenja AO ćelijskog mehanizma i time aktivira degeneraciju nigralnih neurona, uzrokujući PB [152]. Sa druge strane, u nekim studijama uočeno je smanjenje koncentracije GSH, bez povećanja GSSG forme [346]. Stoga, razjašnjavanje mehanizama putem kojih je GSH uključen u metaboličke procese od presudnog su značaja za razvijanje naprednih terapija za suzbijanje ili ublažavanje bolesti [338]. Da bi se nadoknadilo ovo smanjenje, istražuju se mogući načini terapijske kompenzacije GSH. Oni uključuju intranazalnu [347] ili intravensku [348] aplikaciju GSH, a neke od ovih metoda pokazale su obećavajući efekat u lečenju PB [349].

Statistički značajne razlike u parametrima AO zaštite uočavaju se prilikom poređenja pacijenata i kontrola, međutim međusobnim poređenjem među pacijentima ne uočava se statistički značajna razlika ni za primenjenu dozu ni za tip terapije (Slika 26 i 29). Studije o ulozi terapije u OS i AO zaštiti kod PB su brojne, ali rezultati su kontradiktorni. Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da je promena nivoa parametara AO zaštite posledica samog toka bolesti i da efekat terapije nema uticaj na razvijanje OS kod ispitivanih pacijenata. Buhmann i saradnici [350] su pokazali da su ispitivani OS parametri niži kod pacijenata koji su bili na terapiji L-dopom u odnosu na one pacijente koji nisu primali terapiju, pri čemu je značajnost uočena kod pacijenata koji su bili na L-dopa monoterapiji i kod onih koji su primali niske doze terapije. Takođe, njihovi rezultati nisu pokazali promenu u antioksidansima bez obzira na tip korišćene antiparkinson terapije. Ovakvi rezultati ukazuju da OS biva „olakšan“ L-dopom i da DA agonisti pokazuju potencijalni AO efekat, koji nije statistički relevantan zbog limitiranog broja pacijenata na monoterapiji uključenih u studiju. Takođe, Younes-Mhennini i saradnici [225] ističu da terapija ne utiče statistički značajno na parametere OS i AO zaštite i da je OS uključen u patogenezu PB. Nedavno, Agil i saradnici [297] otkrili su negativnu povezanost između endogenih i egzogenih LPO u plazmi i unosa L-dope u zavisnosti od doze, ukazujući na AO efekat L-dope. Suprotno tome, Buhmann i saradnici [350] pokazali su smanjenje antioksidanasa u plazmi pacijenata sa PB čime se potvrđuje zaključak o potencijalnoj prooksidativnoj ulozi L-dope.

Zaključci

Na osnovu predstavljenih rezultata mogu se izvesti sledeći pojedinačni zaključci:

1. Povećanje svih ispitivanih OS parametara (PAB, AOPP, HNE, MDA) kod pacijenata sa PB u poređenju sa zdravim ispitanicima ukazuje na povećan intenzitet OS-a, što kao posledicu može imati kliničku manifestaciju bolesti,
2. Promene ispitivanih OS parametara zavise od kliničko-patoloških karakteristika (pol, starost, H&Y stadijum bolesti, dužina bolesti). Naime, nivoi PAB i parametara LPO (HNE, MDA) zavise od pola pacijenata; nivo MDA i PAB od H&Y stadijuma bolesti dok nivo PAB-a od starosti pacijenata. Rezultati ove studije su pokazali da se PB češće javlja kod muškaraca nego kod žena, iste starosne dobi verovatno zbog protektivne uloge estrogena kod žena. Sa druge strane, intenzitet OS-a raste sa porastom stadijuma bolesti i starosti ispitanika, što može biti posledica napredovanja bolesti usled povećane produkcije reaktivnih vrsta. Narušenu oksidativnu ravnotežu ilustruje i pozitivna korelacija između starosti i MDA, što može dovesti do zaključka da sa godinama pacijenata raste OS,
3. Promene ispitivanih parametara AO zaštite (SOD, CAT, GSH) mogu doprineti povećanju intenziteta OS kod pacijenata u poređenju sa kontrolama. Smanjena aktivnost SOD-a, kao i smanjena koncentracija GSH kod pacijenata mogu se povezati sa povećanim OS, a povećanje aktivnosti CAT se može smatrati kompenzatornim mehanizmom zaštite organizma od OS. Dodatno, pozitivna korelacija GSH sa AOPP ukazuje na narušeni status AO zaštite i oksidativne ravnoteže,
4. Raspodela niskih, srednjih i visokih vrednosti ispitivanih parametara AO zaštite nije zavisna od kliničko-patoloških karakteristika što može ukazati da su promene njihovih aktivnosti odnosno koncentracije posledica pojave bolesti i povećanja intenziteta OS, a ne njene progresije odnosno da ne zavise od pola i starosti pacijenata. Sa druge strane, pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti i GSH upućuje na narušavanje neenzimske komponente AO zaštite, što za posledicu, takođe, može imati povećan intenzitet OS-a,
5. Povećanje odnosa intenziteta PL pikova, PC i LPC, kod pacijenata sa PB u odnosu na zdrave ispitanike ukazuje na narušavanje lipidnog profila usled povećanog

intenziteta OS-a i promenjenog statusa AO zaštite. Stoga, proučavanje PC/LPC inteziteta pikova može biti prvi korak u karakterizaciji lipidnih promena kod pacijenata sa PB kao indikator strukturnih lipidnih rekonfiguracija,

6. Nedostatak statističkih razlika za PC/LPC intezitet pikova između grupa pacijenata sa PB u različitim stadijumima bolesti, kao i pacijenata sa različitom dužinom trajanja bolesti, može ukazati da je narušeni lipidni profil karakteristika same bolesti kada je većina DA neurona u SNpc već izgubljena, a bolest je već uznapredovala i kada su se manifestovali klinički simptomi bolesti kod pacijenata,
7. Odsustvo statistički značajnih razlika ispitivanih parametara između pacijenata koji su podeljeni u grupe prema dozi i tipu terapije upućuje da terapija sveobuhvatno nije povezana sa povećanjem OS kod pacijenata sa PB.

Opšti zaključak

Predstavljeni rezultati odnosa fosfolipida su novi podaci u svetskoj literaturi koji ukazuju na narušeni lipidi sastav plazme usled povećanog intenziteta OS-a i promenjenog statusa AO zaštite pacijenata sa PB. Pored navedenog, rezultati ukazuju da se ispitivani parametri OS i AO zaštite, kao i PC/LPC inteziteti mogu koristiti kao potencijalni markeri u evaluaciji stanja pacijenata obolelih od PB.

Literatura

- [1] Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2016;**139**(S1):318–324.
- [2] Fahn S, Jankovic J, Hallett M. *Principles and practice of movement disorders*. 2nd ed. Elsevier/Saunders: Edinburgh ; New York, 2011.
- [3] Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA. Parkinson's Disease. *Subcell Biochem* 2012;**65**:389–455.
- [4] Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;**73**(4):363–370.
- [5] worldlifeexpectancy.com. Data source. WHO; 2014. Available from: <http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/parkinson-disease/by-country/>
- [6] Pringsheim T, Fiest K, Jette N. The international incidence and prevalence of neurologic conditions. *Neurology* 2014;**83**(18):1661–1664.
- [7] Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2014;**29**(13):1583–1590.
- [8] Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013;**62**:132–144.
- [9] Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 2009;**8**(12):1128–1139.
- [10] Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism — Chronic Treatment with L-Dopa. *N Engl J Med* 1969;**280**(7):337–345.
- [11] Yahr MD, Duvoisin RC, Schear MJ, Barrett RE, Hoehn MM. Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch Neurol* 1969;**21**(4):343–354.
- [12] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM . *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition* - New York: W.H. Freeman 2005
- [13] Ehringer H, Hornykiewicz O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 1960;**38**:1236–1239.
- [14] Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 1957;**180**(4596):1200.
- [15] McCallum SE, Parameswaran N, Perez XA, Bao S, McIntosh JM, Grady SR, et al. Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. *J Neurochem* 2006;**96**(4):960–972.
- [16] Zigmond MJ, Hastings TG. Neurochemical responses to lesions of dopaminergic neurons: implications for compensation and neuropathology. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 1998;**42**:788–792.
- [17] Ozansoy M, Başak AN. The central theme of Parkinson's disease: α -synuclein. *Mol Neurobiol* 2013;**47**(2):460–465.
- [18] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;**24**(2):197–211.
- [19] Kouli A, Torsney KM, Kuan W-L. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Codon Publications*: Brisbane (AU), 2018.

- [20] Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**(12):932.
- [21] Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2012;**27**(5):597–607.
- [22] Foltynie T, Brayne C, Barker RA. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 2002;**249**(2):138–145.
- [23] Hawkes CH. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2008;**23**(13):1799–1807.
- [24] Zou J, Weng R-H, Chen Z-Y, Wei X-B, Wang R, Chen D, et al. Position emission tomography/single-photon emission tomography neuroimaging for detection of premotor Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 2016;**22**(3):167–177.
- [25] Rietdijk CD, Perez-Pardo P, Garssen J, van Wezel RJA, Kraneveld AD. Exploring Braak's hypothesis of Parkinson's disease. *Front Neurol* 2017;**8**:37.
- [26] Hallett M, Poewe W (eds.). *Therapeutics of Parkinson's disease and other movement disorders*. Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, 2008.
- [27] Bartels AL, Leenders KL. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav* 2009;**45**(8):915–921.
- [28] Chen W, Hopfner F, Becktepe JS, Deuschl G. Rest tremor revisited: Parkinson's disease and other disorders. *Transl Neurodegener* 2017;**6**. doi:10.1186/s40035-017-0086-4.
- [29] Deuschl G, Papengut F, Hellriegel H. The phenomenology of Parkinsonian tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;**18**:S87–S89.
- [30] Dirkx MF, Zach H, Bloem BR, Hallett M, Helmich RC. The nature of postural tremor in Parkinson disease. *Neurology* 2018;**90**(13):e1095–e1103.
- [31] Louis ED, Levy G, Côte LJ, Mejia H, Fahn S, Marder K. Clinical correlates of action tremor in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2001;**58**(10):1630–1634.
- [32] Papengut F, Raethjen J, Binder A, Deuschl G. Rest tremor suppression may separate essential from parkinsonian rest tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;**19**(7):693–697.
- [33] Deuschl G, Raethjen J, Baron R, Lindemann M, Wilms H, Krack P. The pathophysiology of parkinsonian tremor: a review. *J Neurol* 2000;**247** **Suppl 5**:V33-48.
- [34] Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;**5**(4):275–283.
- [35] Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 2009;**8**(12):1158–1171.
- [36] Martin WE, Loewenson RB, Resch JA, Baker AB. Parkinson's disease. Clinical analysis of 100 patients. *Neurology* 1973;**23**(8):783–790.
- [37] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;**79**(4):368–376.
- [38] Vingerhoets FJ, Schulzer M, Calne DB, Snow BJ. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? *Ann Neurol* 1997;**41**(1):58–64.

- [39] Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Nelson J, Markesbery W, Davis D, et al. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol* 2004;**56**(4):532–539.
- [40] Hallett M, Khoshbin S. A physiological mechanism of bradykinesia. *Brain J Neurol* 1980;**103**(2):301–314.
- [41] Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain J Neurol* 2001;**124**(Pt 11):2131–2146.
- [42] Lozza C, Baron J-C, Eidelberg D, Mentis MJ, Carbon M, Marié R-M. Executive processes in Parkinson's disease: FDG-PET and network analysis. *Hum Brain Mapp* 2004;**22**(3):236–245.
- [43] Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;**51**(6):745–752.
- [44] Berardelli A, Sabra AF, Hallett M. Physiological mechanisms of rigidity in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983;**46**(1):45–53.
- [45] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl* 2004;**363**(9423):1783–1793.
- [46] Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC. Postural instability in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 2013;**27**(2):97–112.
- [47] Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 2009;**8**(5):464–474.
- [48] Schrempf W, Brandt MD, Storch A, Reichmann H. Sleep disorders in Parkinson's disease. *J Park Dis* 2014;**4**(2):211–221.
- [49] Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;**62**(5):436–446.
- [50] Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;**17**(1):10–15.
- [51] Ha AD, Jankovic J. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;**27**(4):485–491.
- [52] van Rooden SM, Heiser WJ, Kok JN, Verbaan D, van Hilten JJ, Marinus J. The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: a systematic review. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2010;**25**(8):969–978.
- [53] Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 1990;**40**(10):1529–1534.
- [54] Lewis SJG. Heterogeneity of Parkinson's disease in the early clinical stages using a data driven approach. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;**76**(3):343–348.
- [55] Liu P, Feng T, Wang Y, Zhang X, Chen B. Clinical heterogeneity in patients with early-stage Parkinson's disease: a cluster analysis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;**12**(9):694–703.
- [56] Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;**17**(5):427–442.
- [57] Ebersbach G, Baas H, Csoti I, Müngersdorf M, Deuschl G. Scales in Parkinson's disease. *J Neurol* 2006;**253**(4):iv32–iv35.
- [58] Ramaker C, Marinus J, Stiggelbout AM, Hilten BJ van. Systematic evaluation of rating scales for impairment and disability in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002;**17**(5):867–876.
- [59] Siderowf A, Stern MB. Preclinical diagnosis of parkinson's disease: Are we there yet? *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;**6**(4):295–301.

- [60] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;**79**(4):368–376.
- [61] Poewe W, Wenning G. The differential diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2002;**9 Suppl 3**:23–30.
- [62] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;**55**(3):181–184.
- [63] Berardelli A, Wenning GK, Antonini A, Berg D, Bloem BR, Bonifati V, et al. EFNS/MDS-ES/ENS [corrected] recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2013;**20**(1):16–34.
- [64] Emamzadeh FN, Surguchov A. Parkinson's disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Front Neurosci* 2018;**12**. doi:10.3389/fnins.2018.00612.
- [65] Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 2016;**15**(12):1257–1272.
- [66] Zesiewicz TA. Parkinson Disease. *Contin Minneap Minn* 2019;**25**(4):896–918.
- [67] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;**39**(6):889–909.
- [68] Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009;**18**(R1):R48-59.
- [69] Tolleson CM, Fang JY. Advances in the mechanisms of Parkinson's disease. *Discov Med* 2013;**15**(80):61–66.
- [70] Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2012;**27**(1):8–30.
- [71] Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;**2**(1). doi:10.1101/cshperspect.a008888.
- [72] Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 2001;**86**(2):122–127.
- [73] Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 2000;**21**(4):435–440.
- [74] Lai BCL, Marion SA, Teschke K, Tsui JKC. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2002;**8**(5):297–309.
- [75] Double KL, Ben-Shachar D, Youdim MBH, Zecca L, Riederer P, Gerlach M. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol* 2002;**24**(5):621–628.
- [76] Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 2015;**9**. doi:10.3389/fnana.2015.00091.
- [77] Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into neuroinflammation in Parkinson's disease: from biomarkers to anti-inflammatory based therapies. *BioMed Res Int* 2015;**2015**. doi:10.1155/2015/628192.
- [78] Ramalingam M, Kim S-J. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm* 2012;**119**(8):891–910.
- [79] Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**(Pt 5):1147–1150.
- [80] Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;**15**(4):186–190.

- [81] Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002;**16**(12):1997–2015.
- [82] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;**25**(3–4):207–218.
- [83] Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;**32**(3–4):307–326.
- [84] Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;**32**(9):797–803.
- [85] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;**257**(5074):1220–1224.
- [86] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2015.
- [87] Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998;**39**(8):1529–1542.
- [88] Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987;**25**(4):317–364.
- [89] Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem Rev* 2011;**111**(10):5944–5972.
- [90] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;**2014**:360438.
- [91] Volinsky R, Kinnunen PKJ. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J* 2013;**280**(12):2806–2816.
- [92] Kinnunen PKJ, Kaarniranta K, Mahalka AK. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1818**(10):2446–2455.
- [93] Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1772**(7):718–736.
- [94] Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1818**(10):2374–2387.
- [95] Ceaser EK, Moellering DR, Shiva S, Ramachandran A, Landar A, Venkartraman A, et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* 2004;**32**(Pt 1):151–155.
- [96] Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008;**28**(4):569–631.
- [97] Noguchi N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *J Clin Biochem Nutr* 2008;**43**(3):131–138.
- [98] Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O. Potential role of oxidized lipids and lipoproteins in antioxidant defense. *Free Radic Res* 2000;**33**(3):197–215.
- [99] Jacob C, Winyard PG. Introduction. In: *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Wiley-Blackwell, 2009: 1–11.
- [100] Spiteller P, Kern W, Reiner J, Spiteller G. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1531**(3):188–208.

- [101] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;**11**(1):81–128.
- [102] Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999;**1**(3):255–284.
- [103] Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 2015;**1852**(5):826–838.
- [104] Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Low activity of key phospholipid catabolic and anabolic enzymes in human substantia nigra: possible implications for Parkinson's disease. *Neuroscience* 1998;**83**(3):791–798.
- [105] Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003;**24**(4–5):149–159.
- [106] Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol Aspects Med* 2008;**29**(1–2):67–71.
- [107] Smathers RL, Fritz KS, Galligan JJ, Shearn CT, Reigan P, Marks MJ, et al. Characterization of 4-HNE modified l-fabp reveals alterations in structural and functional dynamics. *PLOS ONE* 2012;**7**(6):e38459.
- [108] Vatsyayan R, Lelsani PCR, Chaudhary P, Kumar S, Awasthi S, Awasthi YC. The expression and function of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial (RPE) cells is regulated by 4-hydroxynonenal (HNE) and glutathione S-transferaseA4-4. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;**417**(1):346–351.
- [109] Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chem* 2009;**284**(40):27438–27448.
- [110] Singh SP, Chen T, Chen L, Mei N, Mclain E, et al. Mutagenic effects of 4-hydroxynonenal triacetate, a chemically protected form of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal, as assayed in L5178Y/Tk/ mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**313**:855–861.
- [111] Brambilla G, Sciabà L, Faggin P, Maura A, Marinari UM, Ferro M, et al. Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat Res* 1986;**171**(2–3):169–176.
- [112] Barrera G, Di Mauro C, Muraca R, Ferrero D, Cavalli G, Fazio VM, et al. Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Exp Cell Res* 1991;**197**(2):148–152.
- [113] Pizzimenti S, Laurora S, Briatore F, Ferretti C, Dianzani MU, Barrera G. Synergistic effect of 4-hydroxynonenal and PPAR ligands in controlling human leukemic cell growth and differentiation. *Free Radic Biol Med* 2002;**32**(3):233–245.
- [114] Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 2013;**20**(12):1615–1630.
- [115] Chandra A, Srivastava SK. A synthesis of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and 4-(3H) 4-hydroxy-2-trans-nonenal. *Lipids* 1997;**32**(7):779–782.

- [116] Wang X, Lei XG, Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**382**(1):8–16.
- [117] Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges* 2010;**192**(5):275–283.
- [118] Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics* 2013;**92**:239–247.
- [119] Blair IA. DNA Adducts with Lipid Peroxidation Products. *J Biol Chem* 2008;**283**(23):15545–15549.
- [120] Garcia SC, Grotto D, Bulcão RP, Moro AM, Roehrs M, Valentini J, et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol* 2013;**36**(3):306–312.
- [121] Li G, Chen Y, Hu H, Liu L, Hu X, Wang J, et al. Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde. *Rejuvenation Res* 2012;**15**(3):257–264.
- [122] Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, et al. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;**13**(2):129–132.
- [123] Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, et al. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm* 2011;2011:891752.
- [124] Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol* 2013;**4**:242.
- [125] Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008;**153**(1):6–20.
- [126] Cheng J, Wang F, Yu D-F, Wu P-F, Chen J-G. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *Eur J Pharmacol* 2011;**650**(1):184–194.
- [127] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med* 2018;**54**(4):287–293.
- [128] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;**5**(1):9–19.
- [129] Che M, Wang R, Li, Wang HY, Zheng S. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today* 2016; **21**(1):143-9.
- [130] Halliwell B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 1997;**38**:3–20.
- [131] McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974;**185**(4150):529–531.
- [132] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;**64**:97–112.
- [133] Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005;**79**(1–2):157–165.

- [134] Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001;**34**(4):325–336.
- [135] Laughlin MH, Welshons WV, Sturek M, Rush JWE, Turk JR, Taylor JA, et al. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2003;**95**(1):250–264.
- [136] Maier CM, Chan PH. Book Review: Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist* 2002;**8**(4):323–334.
- [137] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009;**7**(1):65–74.
- [138] Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002;**53**(372):1331–1341.
- [139] Bafana A, Dutt S, Kumar S, Ahuja PS. Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit Rev Biotechnol* 2011;**31**(1):65–76.
- [140] Fukai T. Extracellular SOD and aged blood vessels. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 2009;**297**(1):H10–H12.
- [141] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**(3):337–349.
- [142] Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2004;**61**(2):192–208.
- [143] Djordjevic D, Cubrilo D, Macura M, Barudzic N, Djuric D, Jakovljevic V. The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Mol Cell Biochem* 2011;**351**(1–2):251–259.
- [144] Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 2005;**38**(7):995–1014.
- [145] Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000;**72**(2 Suppl):653S–69S.
- [146] Jones DP, Park Y, Gletsu-Miller N, Liang Y, Yu T, Accardi CJ, et al. Dietary sulfur amino acid effects on fasting plasma cysteine/cystine redox potential in humans. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 2011;**27**(2):199–205.
- [147] Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**973**:488–504.
- [148] Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989;**140**(2):531–554.
- [149] Cooper AJ, Pinto JT, Callery PS. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;**7**(7):891–910.
- [150] Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 2009;**15**(9):391–404.
- [151] Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* 2001;**20**(5 Suppl):464S–472S; discussion 473S–475S.
- [152] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001;**40**(8):959–975.

- [153] Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997;**69**(3):1196–1203.
- [154] Hastings TG. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2009;**41**(6):469–472.
- [155] Gluck MR, Zeevalk GD. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. *J Neurochem* 2004;**91**(4):788–795.
- [156] Lipski J, Nistico R, Berretta N, Guatteo E, Bernardi G, Mercuri NB. 1-DOPA: A scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? *Prog Neurobiol* 2011;**94**(4):389–407.
- [157] Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 2010;**345**(1–2):91–104.
- [158] Coppedè F, Armani C, Bidia DD, Petrozzi L, Bonuccelli U, Migliore L. Molecular implications of the human glutathione transferase A-4 gene (hGSTA4) polymorphisms in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2005;**579**(1–2):107–114.
- [159] Qin Z, Hu D, Han S, Reaney SH, Di Monte DA, Fink AL. Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem* 2007;**282**(8):5862–5870.
- [160] Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett* 2002;**319**(1):25–28.
- [161] Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(7):2696–2701.
- [162] Picklo MJ, Amarnath V, McIntyre JO, Graham DG, Montine TJ. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *J Neurochem* 1999;**72**(4):1617–1624.
- [163] Chahine L, Stern M, Chen-Plotkin A. Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;**20**(0 1):S99-103.
- [164] Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 1998;**33**(6):531–540.
- [165] Kiliç A, Yalçın AS, Yalçın D, Tağa Y, Emerk K. Increased erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in human Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1988;**87**(3):307–310.
- [166] Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989;**52**(2):381–389.
- [167] Sofic E, Sapcanin A, Tahirovic I, Gavrankapetanovic I, Jellinger K, Reynolds GP, et al. Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Suppl* 2006;(71):39–43.
- [168] Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2012;**37**(2):358–369.
- [169] Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MBH, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2011;**118**(6):939–957.

- [170] Drzazga A, Sowińska A, Koziolkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol--novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta Pol Pharm* 2014;**71**(6):887–899.
- [171] Farmer K, Smith C, Hayley S, Smith J. Major alterations of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine lipids in the substantia nigra using an early stage model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 2015;**16**(8):18865–18877.
- [172] Mulder C, Wahlund L-O, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, van Kamp GJ, et al. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2003;**110**(8):949–955.
- [173] Shamim A, Mahmood T, Ahsan F, Kumar A, Bagga P. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clin Nutr Exp* 2018;**20**:1–19.
- [174] Grey A, Bolland M. Clinical trial evidence and use of fish oil supplements. *JAMA Intern Med* 2014;**174**(3):460–462.
- [175] MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM, Suttorp MJ, et al. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 2006;**295**(4):403–415.
- [176] Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2012;**308**(10):1024–1033.
- [177] Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 1986;**235**(1):25–31.
- [178] Dembitsky VM, Rozentsvet OA, Pechenkina EE. Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry* 1990;**29**(11):3417–3421.
- [179] Dembitsky VM, Rozentsvet OA. Diacylglyceryltrimethylhomoserines and phospholipids of some green marine macrophytes. *Phytochemistry* 1989;**28**(12):3341–3343.
- [180] Chen Y, Wen S, Jiang M, Zhu Y, Ding L, Shi H, et al. Atherosclerotic dyslipidemia revealed by plasma lipidomics on ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 2017;**262**:78–86.
- [181] Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* 2000;**106**(1):1–29.
- [182] Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem* 2005;**38**(10):925–933.
- [183] Lobasso S, Tanzarella P, Vergara D, Maffia M, Cocco T, Corcelli A. Lipid profiling of parkin-mutant human skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 2017;**232**(12):3540–3551.
- [184] Lee E-SY, Chen H, Shepherd KR, Lamango NS, Soliman KFA, Charlton CG. Inhibitory effects of lysophosphatidylcholine on the dopaminergic system. *Neurochem Res* 2004;**29**(7):1333–1342.
- [185] Wood PL, Tippireddy S, Feriante J, Woltjer RL. Augmented frontal cortex diacylglycerol levels in Parkinson's disease and Lewy Body Disease. *PLOS ONE* 2018;**13**(3):e0191815.
- [186] Zhang J, Zhang X, Wang L, Yang C. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based quantitative lipidomics study of ganglioside-

- NANA-3 plasma to establish its association with Parkinson's disease patients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2017;**23**:5345–5353.
- [187] Seyfried TN, Choi H, Chevalier A, Hogan D, Akgoc Z, Schneider JS. Sex-related abnormalities in substantia nigra lipids in Parkinson's disease. *ASN Neuro* 2018;**10**:1759091418781889.
- [188] Lu Z, Wang J, Li M, Liu Q, Wei D, Yang M, et al. (1)H NMR-based metabolomics study on a goldfish model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Chem Biol Interact* 2014;**223**:18–26.
- [189] Huang X, Abbott RD, Petrovitch H, Mailman RB, Ross GW. Low LDL cholesterol and increased risk of Parkinson's disease: prospective results from Honolulu-Asia Aging Study. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2008;**23**(7):1013–1018.
- [190] Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008;**70**(21):1972–1979.
- [191] Huang X, Auinger P, Eberly S, Oakes D, Schwarzschild M, Ascherio A, et al. Serum cholesterol and the progression of Parkinson's disease: results from DATATOP. *PLoS One* 2011;**6**(8):e22854.
- [192] de Lau LML, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2006;**164**(10):998–1002.
- [193] Cassani E, Cereda E, Barichella M, Madio C, Canello R, Caccialanza R, et al. Cardiometabolic factors and disease duration in patients with Parkinson's disease. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 2013;**29**(11–12):1331–1335.
- [194] Morgan JC, Currie LJ, Harrison MB, Bennett JP, Trugman JM, Wooten GF. Mortality in levodopa-treated Parkinson's disease. *Park Dis* 2014;**2014**:426976.
- [195] Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004;**351**(24):2498–2508.
- [196] Olanow CW, Obeso JA. Levodopa toxicity and Parkinson disease: still a need for equipoise. *Neurology* 2011;**77**(15):1416–1417.
- [197] Mercuri NB, Bernardi G. The “magic” of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* 2005;**26**(7):341–344.
- [198] Papavasiliou PS, Cotzias GC, Düby SE, Steck AJ, Fehling C, Bell MA. Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N Engl J Med* 1972;**286**(1):8–14.
- [199] Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 2000;**342**(20):1484–1491.
- [200] Rascol O, Brooks DJ, Melamed E, Oertel W, Poewe W, Stocchi F, et al. Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet Lond Engl* 2005;**365**(9463):947–954.
- [201] Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 2009;**72**(21 Suppl 4):S1-136.
- [202] Konta B, Frank W. The treatment of Parkinson's disease with dopamine agonists. *GMS Health Technol Assess* 2008;**4**.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3011299/>.

- [203] Wolters EC, Francot C, Bergmans P, Winogrodzka A, Booij J, Berendse HW, et al. Preclinical (premotor) Parkinson's disease. *J Neurol* 2000;**247 Suppl 2**:II103-109.
- [204] Marsden CD, Parkes JD. "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. *The Lancet* 1976;**307**(7954):292–296.
- [205] Rinne UK. Problems associated with long-term levodopa treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 1983;**95**:19–26.
- [206] Pahwa R, Lyons KE. Treatment of early Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2014;**27**(4):442.
- [207] Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2010;**25**(15):2649–2653.
- [208] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;**226**(1):497–509.
- [209] Cífková E, Holčápek M, Lísa M, Ovčáčíková M, Lyčka A, Lynen F, et al. Nontargeted quantitation of lipid classes using hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry with single internal standard and response factor approach. *Anal Chem* 2012;**84**(22):10064–10070.
- [210] Lísa M, Netušilová K, Franěk L, Dvořáková H, Vrkoslav V, Holčápek M. Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection. *J Chromatogr A* 2011;**1218**(42):7499–7510.
- [211] Alamdari DH, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebat M, Ghafoori F, 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.
- [212] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;**49**(5):1304–1313.
- [213] Angelini R, Vortmeier G, Corcelli A, Fuchs B. A fast method for the determination of the PC/LPC ratio in intact serum by MALDI-TOF MS: An easy-to-follow lipid biomarker of inflammation. *Chem Phys Lipids* 2014;**183**:169–175.
- [214] Jaskolla TW, Onischke K, Schiller J. 2,5-dihydroxybenzoic acid salts for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric lipid analysis: simplified spectra interpretation and insights into gas-phase fragmentation. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 2014;**28**(12):1353–1363.
- [215] Schiller J, Süß R, Fuchs B, Müller M, Petković M, Zschörnig O, et al. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *Eur Biophys J EBJ* 2007;**36**(4–5):517–527.
- [216] Schiller J. MALDI-MS of lipids. In: *MALDI MS*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007: 215–243.
- [217] Schiller J, Süß R, Arnhold J, Fuchs B, Lessig J, Müller M, et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* 2004;**43**(5):449–488.

- [218] Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. 2nd ed. New York : Grune & Stratton, 1975 <https://trove.nla.gov.au/version/28600909>.
- [219] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**(1):265–275.
- [220] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680–685.
- [221] Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**(11–12):1173–1181.
- [222] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;**26**(9–10):1231–1237.
- [223] Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, De Sanctis MT, Incandela L, et al. A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol J Int Union Angiol* 1999;**18**(2):127–130.
- [224] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;**38**(12):1103–1111.
- [225] Younes-Mhenni S, Frih-Ayed M, Kerkeni A, Bost M, Chazot G. Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson’s disease. *Eur Neurol* 2007;**58**(2):78–83.
- [226] Hwang O. Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease. *Exp Neurobiol* 2013;**22**(1):11–17.
- [227] Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. doi:10.1155/2019/2105607.
- [228] Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LMM, Moreira WL, et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2011;**26**(1):59–68.
- [229] 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.
- [230] Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016;**53**(6):4094–4125.
- [231] Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson’s disease. *J Neurosci Res* 2007;**85**(5):919–934.
- [232] Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol* 2006;**2**(5):249–253.
- [233] Zeevalk GD, Razmpour R, Bernard LP. Glutathione and Parkinson’s disease: is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2008;**62**(4):236–249.
- [234] Zahedi Avval F, Mahmoudi N, Nosrati Tirkani A, Jarahi L, Hamidi Alamdari D, Sadjadi SA. Determining Pro-oxidant antioxidant balance (PAB) and total antioxidant capacity (tac) in patients with schizophrenia. *Iran J Psychiatry* 2018;**13**(3):222–226.
- [235] Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002;**162**(1):221–225.

- [236] Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G, et al. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: relation with clinical and demographic characteristics. *Clin Biochem* 2015;**48**(1–2):19–23.
- [237] Skvarilová M, Bulava A, Stejskal D, Adamovská S, Bartek J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov* 2005;**149**(1):83–87.
- [238] Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, Bochi GV, Baldissarelli J, Kegler A, et al. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers. *PLoS One* 2016;**11**(1):e0146129.
- [239] García-Moreno J-M, Martín de Pablos A, García-Sánchez M-I, Méndez-Lucena C, Damas-Hermoso F, Rus M, et al. May serum levels of advanced oxidized protein products serve as a prognostic marker of disease duration in patients with idiopathic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal* 2013;**18**(11):1296–1302.
- [240] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 2001;**78**:S108–113.
- [241] Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2003;**111**(6):785–793.
- [242] Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 1992;**32 Suppl**:S82–87.
- [243] Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 1994;**35**(1):38–44.
- [244] Ilic TV, Jovanovic M, Jovicic A, Tomovic M. Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. *Funct Neurol* 1999;**14**(3):141–147.
- [245] Serra JA, Domínguez RO, de Lustig ES, Guareschi EM, Famulari AL, Bartolomé EL, et al. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 2001;**108**(10):1135–1148.
- [246] Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, et al. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;**104**(2):113–122.
- [247] McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McILroy S, Passmore AP. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM Mon J Assoc Physicians* 2001;**94**(9):485–490.
- [248] Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2010;**1801**(8):924–929.
- [249] Di Domenico F, Tramutola A, Butterfield DA. Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med* 2017;**111**:253–261.

- [250] Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**(5):620–626.
- [251] Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 2001;**7**(12):548–554.
- [252] Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1768**(8):1976–1990.
- [253] Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, et al. H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp Neurol* 2003;**180**(2):144–155.
- [254] Perluigi M, Sultana R, Cenini G, Di Domenico F, Memo M, Pierce WM, et al. Redox proteomics identification of 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in Alzheimer's disease: Role of lipid peroxidation in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proteomics Clin Appl* 2009;**3**(6):682–693.
- [255] Sultana R, Boyd-Kimball D, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, et al. Proteomics analysis of the Alzheimer's disease hippocampal proteome. *J Alzheimers Dis JAD* 2007;**11**(2):153–164.
- [256] Wojsiat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/antioxidant imbalance in Alzheimer's disease: therapeutic and diagnostic prospects. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:6435861.
- [257] Xiang W, Schlachetzki JCM, Helling S, Bussmann JC, Berlinghof M, Schäffer TE, et al. Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Mol Cell Neurosci* 2013;**54**:71–83.
- [258] Bae E-J, Ho D-H, Park E, Jung JW, Cho K, Hong JH, et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal promotes seeding-capable oligomer formation and cell-to-cell transfer of α -synuclein. *Antioxid Redox Signal* 2013;**18**(7):770–783.
- [259] Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2011;**51**(7):1302–1319.
- [260] Nikam S, Nikam P, Ahaley SK, Sontakke AV. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem* 2009;**24**(1):98-101.
- [261] Sharma A, Kaur P, Kumar B, Prabhakar S, Gill KD. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;**14**(1):52–57.
- [262] Radanović T, Reinhard J, Ballweg S, Pesek K, Ernst R. An Emerging Group of Membrane Property Sensors Controls the Physical State of Organellar Membranes to Maintain Their Identity. *BioEssays* 2018;**40**(5):1700250.
- [263] Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;**19**(5):281–296.
- [264] Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 2000;**18**(4–5):383–399.
- [265] Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, et al. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2012;**29**(3):691–697.

- [266] Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, et al. Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimers Dis JAD* 2010;**19**(2):489–502.
- [267] Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 2000;**35**(12):1305–1312.
- [268] Igarashi M, Ma K, Gao F, Kim H-W, Rapoport SI, Rao JS. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J Alzheimers Dis JAD* 2011;**24**(3):507–517.
- [269] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics* 2014;**104**:37–47.
- [270] Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L. Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. *Neurochem Int* 1997;**30**(6):517–522.
- [271] Oresic M, Hänninen VA, Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol* 2008;**26**(12):647–652.
- [272] Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. Regional Membrane Phospholipid Alterations in Alzheimer's Disease. ;:8.
- [273] Whiley L, Sen A, Heaton J, Proitsi P, García-Gómez D, Leung R, et al. Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014;**35**(2):271–278.
- [274] Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T. From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin–plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011;**1218**(42):7713–7722.
- [275] Schiller J, Zschörnig O, Petković M, Müller M, Arnhold J, Arnold K. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR. *J Lipid Res* 2001;**42**(9):1501–1508.
- [276] Pruzanski W, Vadas P, Stefanski E, Urowitz MB. Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *J Rheumatol* 1985;**12**(2):211–216.
- [277] Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A2, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxidation In CNS pathologies. *BMB Rep* 2008;**41**(8):560–567.
- [278] Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2015;**74**:101–110.
- [279] Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995;**77**(3):147–161.
- [280] Farooqui AA, Ong W-Y, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 2006;**58**(3):591–620.
- [281] De S, Trigueros MA, Kalyvas A, David S. Phospholipase A2 plays an important role in myelin breakdown and phagocytosis during Wallerian degeneration. *Mol Cell Neurosci* 2003;**24**(3):753–765.
- [282] Cunningham TJ, Yao L, Lucena A. Product inhibition of secreted phospholipase A2 may explain lysophosphatidylcholines' unexpected therapeutic properties. *J Inflamm Lond Engl* 2008;**5**:17.

- [283] Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006;**40**(3):376–387.
- [284] Ross BM, Mamalias N, Moszczynska A, Rajput AH, Kish SJ. Elevated activity of phospholipid biosynthetic enzymes in substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience* 2001;**102**(4):899–904.
- [285] Alberghina M, Lupo G, Anfuso CD, el Ghonemy SH. Lipid peroxidation inhibits acyl-CoA:-1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase but not CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity in rat brain membranes. *Neurochem Int* 1995;**26**(5):477–487.
- [286] Alberghina M, Lupo G, Anfuso CD. Lipid peroxidation inhibits oleoyl-CoA: 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase in rat CNS axolemma-enriched fractions. *Neurochem Int* 1993;**23**(3):229–237.
- [287] Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, See R, Banerjee S, Murphy SA, et al. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 2008;**199**(1):110–115.
- [288] Miyaura S, Maki N, Byrd W, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids* 1991;**26**(12):1015–1020.
- [289] Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009;**30**(2):142–157.
- [290] Picillo M, Nicoletti A, Fetoni V, Garavaglia B, Barone P, Pellicchia MT. The relevance of gender in Parkinson's disease: a review. *J Neurol* 2017;**264**(8):1583–1607.
- [291] Haaxma CA, Bloem BR, Borm GF, Oyen WJG, Leenders KL, Eshuis S, et al. Gender differences in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;**78**(8):819–824.
- [292] Saunders-Pullman M MPH, Rachel, Derby C, Santoro N, Bressman S, Chiu B, Lipton R. Role of endogenous and exogenous hormone exposure on the risk of Parkinson's disease: results from the women's health initiative observational study. abstracts of the 61st meeting of the American academy of neurology. *Neurology* 2009;**72**:S23.
- [293] Benedetti MD, Maraganore DM, Bower JH, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, et al. Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: an exploratory case-control study. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2001;**16**(5):830–837.
- [294] Smith KM, Dahodwala N. Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Exp Neurol* 2014;**259**:44–56.
- [295] Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol* 2017;**11**:91–102.
- [296] Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Fernandez-Calle P, Lalinde L, Tenias JM, Pondal M, et al. Serum lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1992;**136**(2):137–140.
- [297] Agil A, Durán R, Barrero F, Morales B, Araújo M, Alba F, et al. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *J Neurol Sci* 2006;**240**(1–2):31–36.
- [298] Puspita L, Chung SY, Shim J-W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain* 2017;**10**(1):53.

- [299] Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV, et al. Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically. *J Neurochem* 1984;**43**(4):990–993.
- [300] Mytilineou C, Han SK, Cohen G. Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem* 1993;**61**(4):1470–1478.
- [301] Zeng BY, Pearce RK, MacKenzie GM, Jenner P. Chronic high dose L-dopa treatment does not alter the levels of dopamine D-1, D-2 or D-3 receptor in the striatum of normal monkeys: an autoradiographic study. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 2001;**108**(8–9):925–941.
- [302] Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Bonucelli U, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2004;**19**(9):997–1005.
- [303] Prigione A, Begni B, Galbusera A, Beretta S, Brighina L, Garofalo R, et al. Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiol Dis* 2006;**23**(1):36–43.
- [304] Colamartino M, Santoro M, Duranti G, Sabatini S, Ceci R, Testa A, et al. Evaluation of levodopa and carbidopa antioxidant activity in normal human lymphocytes in vitro: implication for oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2015;**27**(2):106–117.
- [305] Mytilineou C, Walker RH, JnoBaptiste R, Olanow CW. Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not an in vivo model of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**304**(2):792–800.
- [306] Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2003;**5**(3):165–176.
- [307] Yoshikawa T, Minamiyama Y, Naito Y, Kondo M. Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. *J Neurochem* 1994;**62**(3):1034–1038.
- [308] Brandt T, Caplan LR, Dichgans J, Diener H-C, Kennard C. Neurological Disorders: Course and Treatment. *Gulf Professional Publishing*, 2003.
- [309] Hely MA, Morris JGL, Reid W, O'Sullivan DJ, Williamson PM, Rail D, et al. The Sydney multicentre study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;**57**(8):903–910.
- [310] Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008;**15**(s1):14–20.
- [311] Brooks DJ. Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;**68**(6):685–689.
- [312] de Farias CC, Maes M, Bonifácio KL, Bortolasci CC, de Souza Nogueira A, Brinholi FF, et al. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. *Neurosci Lett* 2016;**617**:66–71.
- [313] Chen C-M, Liu J-L, Wu Y-R, Chen Y-C, Cheng H-S, Cheng M-L, et al. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2009;**33**(3):429–435.
- [314] Hassin-Baer S, Cohen OS, Vakil E, Molshazki N, Sela B-A, Nitsan Z, et al. Is C-reactive protein level a marker of advanced motor and neuropsychiatric complications in Parkinson's disease? *J Neural Transm* 2011;**118**(4):539–543.

- [315] Hu N, Ren J. Reactive oxygen species regulate myocardial mitochondria through post-translational modification. *React Oxyg Species* 2016;**2**(4):264–271.
- [316] Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant-antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 2013;**17**(8):1104–1109.
- [317] Aziz MA, Majeed GH, Diab KS, Al-Tamimi RJ. The association of oxidant-antioxidant status in patients with chronic renal failure. *Ren Fail* 2016;**38**(1):20–26.
- [318] Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxid Med Cell Longev* 2017;**2017**:2525967.
- [319] Singh M, Khan AJ, Shah PP, Shukla R, Khanna VK, Parmar D. Polymorphism in environment responsive genes and association with Parkinson disease. *Mol Cell Biochem* 2008;**312**(1–2):131–138.
- [320] Ihara Y, Chuda M, Kuroda S, Hayabara T. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *J Neurol Sci* 1999;**170**(2):90–95.
- [321] Rosario de la Torre M, Casado A, López-Fernández ME, Carrascosa D, Casado MC, Venarucci D, et al. Human aging brain disorders: Role of antioxidant enzymes. *Neurochem Res* 1996;**21**(8):885–888.
- [322] Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res* 2005;**121**(2):111–115.
- [323] Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 428010.
- [324] Kalra J, Rajput AH, Mantha SV, Prasad K. Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 1992;**110**(2):165–168.
- [325] Kocatürk PA, Akbostanci MC, Tan F, Kavas GO. Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol* 2000;**7**(1):63–67.
- [326] Barthwal MK, Srivastava N, Shukla R, Nag D, Seth PK, Srimal RC, et al. Polymorphonuclear leukocyte nitrite content and antioxidant enzymes in Parkinson's disease patients. *Acta Neurol Scand* 1999;**100**(5):300–304.
- [327] Sudha K, Rao AV, Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India* 2003;**51**(1):60–62.
- [328] Müller SE, Riedel HD-I, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 1997;**90**(12):4973–4978.
- [329] Nagababu E, Chrest FJ, Rifkind JM. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003;**1620**(1–3):211–217.
- [330] Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid Redox Signal* 2013;**18**(17):2274–2283.
- [331] Wei Z, Li X, Li X, Liu Q, Cheng Y. Oxidative stress in Parkinson's disease: a systematic review and meta-Analysis. *Front Mol Neurosci* 2018;**11**. doi:10.3389/fnmol.2018.00236.

- [332] Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995;**45**(8):1594–1601.
- [333] Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1994;**269**(2):1020–1025.
- [334] Flohé L, Loschen G, Günzler WA, Eichele E. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972;**353**(6):987–999.
- [335] Todorović A, Pejić S, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Pavlović I, et al. Antioxidative enzymes in irradiated rat brain-indicators of different regional radiosensitivity. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 2015;**31**(12):2249–2256.
- [336] Mischley LK, Standish LJ, Weiss NS, Padowski JM, Kavanagh TJ, White CC, et al. Glutathione as a biomarker in Parkinson's disease: associations with aging and disease severity. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 9409363.
- [337] Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mielal JohnJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 2012;**4**(10):1399–1440.
- [338] Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014;**5**:196.
- [339] Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;**52**:711–760.
- [340] Paik SR, Lee D, Cho H-J, Lee E-N, Chang C-S. Oxidized glutathione stimulated the amyloid formation of α -synuclein. *FEBS Lett* 2003;**537**(1):63–67.
- [341] Bostantjopoulou S, Kyriazis G, Katsarou Z, Kiosseoglou G, Kazis A, Mentenopoulos G. Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease. *Funct Neurol* 1997;**12**(2):63–68.
- [342] Urakami K, Sano K, Matsushima E, Okada A, Saito H, Takahashi K, et al. Decreased superoxide dismutase activity in erythrocyte in Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 1992;**46**(4):933–936.
- [343] Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 1989;**52**(2):515–520.
- [344] Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993;**52**(1):1–6.
- [345] Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994;**36**(3):348–355.
- [346] Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Tagliacozzi D, Santorelli FM, Carozzo R, et al. Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur J Clin Invest* 2001;**31**(11):1007–1011.
- [347] Mischley LK, Lau RC, Shankland EG, Wilbur TK, Padowski JM. Phase iib study of intranasal glutathione in Parkinson's disease. *J Park Dis* 2017;**7**(2):289–299.
- [348] Otto M, Magerus T, Langland JO. The use of intravenous glutathione for symptom management of Parkinson's disease: a case report. *Altern Ther Health Med* 2018;**24**(4):56–60.
- [349] Sechi G, Deledda MG, Bua G, Satta WM, Deiana GA, Pes GM, et al. Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996;**20**(7):1159–1170.

- [350] Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, et al. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol Dis* 2004;**15**(1):160–170.

Prilozi

Biografija

Jadranka Miletić Vukajlović rođena je 28. juna 1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu, kao i Treću beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Školske 2006/7. godine upisala je Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, gde je diplomirala jula 2011. godine. Master tezu pod nazivom “*Optička karakterizacija tankih filmova pentacene*” odradila je 2012. godine u kolaboraciji sa laboratorijom NanoDna sa Instituta za fiziku i odbranila sa ocenom 10.

Doktorske studije je upisala je školske 2012/13. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na odseku za medicinsku biohemiju. Od januara 2012. godine do novembra 2015. godine bila je zaposlena na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, a radni odnos nastavlja u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za fizičku hemiju.

Naučna aktivnost

Naučno-istraživački rad započela je kao gimnazijalac u Istraživačkoj stanici Petnica, nastavila tokom osnovnih i master studija na Institutu za fiziku, Univerziteta u Beogradu, a 2013. godine je započela eksperimentalnu izradu doktorske disertacije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, kao i u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“.

Od 2016. godine pa do danas boravila je na stručnim usavršavanjima u laboratorijama Medicinskog Univerziteta u Beču i Instituta za medicinsku fiziku i biofiziku, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Lajpcigu.

Autor je više naučnih publikacija u domaćim i međunarodnim naučnim časopisima.

Publikovani radovi

Kamceva T, Nesic M, Stoilkovic M, Popovic I, Miletic J, Rajcic B, et al. Determination of isotopic distribution of lead by a matrix assisted laser desorption/ionization versus a laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Chemical Industry Journal 2017; 71(1):19-26 DOI:10.2298/HEMIND151218013K

Popovic I, Milovanovic D, Miletic J, Nesic M, Vranjes M, Saponjic Z, et al. Dependence of the quality of SALDI TOF MS analysis on the TiO₂nanocrystals' size and shape. Optical and Quantum Electronics 2016; 48:113 DOI: 10.1007/s11082-016-0413-5

Publikovani radovi iz doktorske disertacije

Miletic Vukajlovic J, Drakulić D, Pejić S, Ilić TV, Stefanović A, Petković M, Schiller J. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. Rapid Communication in Mass Spectrometry 2019 DOI: 10.1002/rcm.8595

Miletic Vukajlovic J, Pejic S, Todorovic A, Valenta Sobot A, Drakulic D, Pavlovic I, et al. Antioxidant status and clinicopathological parameters in patients with Parkinson's disease. Vojno sanitetski pregled 2018. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180718148M>

Miletić J, Drakulić D, Pejić S, Petkovic M, Ilic T, Miljkovic M, et al. Prooxidant-antioxidant balance, advanced oxidation protein products and lipid peroxidation in Serbian patients with Parkinson's disease. The International Journal of Neuroscience. 2018;128(7):600-607. doi:10.1080/00207454.2017.1403916

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јадранка Милетић Вукајловић

Број индекса 15/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање зависности липидног састава плазме и параметара липидне пероксидације од стадијума и дужине трајања Паркинсонове болести и примене терапије

- 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, 20.11.2019.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јадранка Милетић Вукајловић

Број индекса 15/12

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада

Испитивање зависности липидног састава плазме и параметара липидне пероксидације од стадијума и дужине трајања Паркинсонове болести и примене терапије

Ментори: Проф др Александра Стефановић,

др Дуња Дракулић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 20.11.2019.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање зависности липидног састава плазме и параметара липидне пероксидације од стадијума и дужине трајања Паркинсонове болести и примене терапије

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, 20.11.2019.

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.