

## PREDIKTIVNI ZNAČAJ MIJELOPEROKSIDAZE ZA NASTANAK POSTOPERATIVNIH VASKULARNIH KOMPLIKACIJA

Bojan Vučinić<sup>1</sup>, Drakče Radovanović<sup>2,3</sup>, Dragan Čanović<sup>2,3</sup>, Marko Spasić<sup>2,3</sup>, Mladen Pavlović<sup>2,3</sup>, Bojan Milošević<sup>2,3</sup>,

Saša Dimić<sup>1</sup>, Boban Mitrović<sup>1</sup>, Nikola Petković<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kliničko bolnički centar, Kosovska Mitrovica

<sup>2</sup>Klinika za opštu i grudnu hirurgiju, Klinički centar „Kragujevac“, Kragujevac

<sup>3</sup>Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac

<sup>4</sup>Dom zdravlja „Medicus Universalis“, Kraljevo

## PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF MYELOPEROXIDASE FOR THE OCCURRENCE OF POSTOPERATIVE VASCULAR COMPLICATIONS

Bojan Vucinic<sup>1</sup>, Drakce Radovanovic<sup>2,3</sup>, Dragan Canovic<sup>2,3</sup>, Marko Spasic<sup>2,3</sup>, Mladen Pavlovic<sup>2,3</sup>, Bojan Milosevic<sup>2,3</sup>,

Sasa Dimic<sup>1</sup>, Boban Mitrovic<sup>1</sup>, Nikola Petkovic<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Clinical Hospital Centre, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>2</sup> Clinic for General and Thoracic Surgery, Clinical Center “Kragujevac”, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> Health Center “Medicus Universalis”, Kraljevo, Serbia

### SAŽETAK

Nova saznanja o delovanjima mijeloperoksidaze u toku inflamatornog procesa povezanog sa infekcijama i vaskularnim lezijama ukazuju na njenu ulogu u stanju oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije i na njen prediktivni značaj za nastanak kardiovaskularnih insulta. Produkti delovanja mijeloperoksidaze predstavljaju integrativni mehanizam koji povezuje lezije tkiva, infekcijski, inflamatorni proces, oksidativni stres, endotelnu disfunkciju i nastanak vaskularnih insulta (najčešći su arterijska i venska tromboza i konsekutivne embolije). Najčešće komplikacije operativnog hirurškog lečenja su vaskularne. Posmatrano s konzervativnog stanovišta najčešće su arterijska i venska tromboza, ali šire gledano dehiscencija sutura bi se mogla smatrati posledicom poremećene mikrocirkulacije. Sama operativna procedura kao i osnovni patološki supstrat dovode do aktiviranja inflamatorne kaskade sa aktivisanjem ćelija mijeloidne loze, pri čemu dolazi do oslobađanja i aktivisanja mijeloperoksidaze koja pored antimikrobnog ispoljava mnogostruka vaskularna dejstva. Povećana koncentracija mijeloperoksidaze u plazmi i do tri meseca pre kliničke ekspresije vaskularnog insulta ukazuje na njen prediktivni značaj. Aktuelna istraživanja predočavaju mogućnost uspešnog korigovanja posledica delovanja mijeloperoksidaze i prevenciju vaskularnih komplikacija.

**Ključne reči:** peroksidaza; hirurške procedure, operativne; postoperativni period.

### UVOD

Najčešće i najznačajnije komplikacije operativnog hirurškog lečenja su vaskularne što nalaže dalje istraživanje etioloških i faktora rizika za njihov nastanak. Delovanje mijeloperoksidaze povezuje infekcijsko-inflamatorne procese sa vaskularnim patološkim procesima, a određivanje njene koncentracije u plazmi i metabolita nastalih njenim delovanjem ima prediktivni

### ABSTRACT

New findings on the activity of myeloperoxidase in the course of an inflammatory process associated with infections and vascular lesions indicate its role in the state of oxidative stress and endothelial dysfunction as well as its predictive value for cardiovascular insults. The products of actions by myeloperoxidase represent an integrative mechanism connecting the tissue lesions, infectious, inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and the development of vascular insult (the most common are the arterial and venous thrombosis and consecutive embolism). The most common complications of an operative surgical treatment are vascular. Seen from a conservative standpoint the most common are arterial and venous thrombosis, but more broadly suture dehiscence could be considered as a consequence of the impaired microcirculation. Operational procedures as well as the underlying pathology lead to the activation of inflammatory cascade with the activation of myeloid lineage cells whereby a release and activation of myeloperoxidase, which in addition to antimicrobial exerts multiple vascular operations. Increased concentrations of myeloperoxidase in the plasma up to three months before the clinical expression of vascular insult indicates its predictive value. Current research portrays the possibility of adjusting the successful result of the action of myeloperoxidase and prevention of vascular complications.

**Key words:** peroxidase; surgical procedures, operative; postoperative period.

značaj s obzirom na povišenje njenog nivoa i do tri meseca pre samog vaskularnog insulta.

Proces oksidativnog stresa je izuzetno značajan za nastanak endotelne disfunkcije i postoperativnih kardiovaskularnih komplikacija od kojih su najznačajnije miokardna ishemija, koronarna, sistemska arterijska i venska tromboza i posledične embolije. Ovo stanje je uzrokovano osnovnim patološkim supstratom i samom

hirurškom intervencijom (lezija tkiva, inflamacija, infekcija, anestezija, primena nekih lekova). Mijeloperoksidaza (MPO) povezana je uzročno-posledično sa oksidativnim stresom (endotelnom disfunkcijom) zbog čega ispoljava izraženo protrombotičko i aterosklerotično delovanje. Ona je enzim fiziološki prisutan u azurofilnim granulama mnogih podvrsta leukocita, neutrofilima, monocitima i nekim tkivnim makrofazima. Neutrofili koji infiltrišu mesta lezija, endocitozom uklanjaju strani materijal (detritus) oslobađaju pored MPO i druge intracelularne enzime kao što su elastaza, endopeptidaza koji liziraju tkivo. Makrofazi koriste NADPH oksidazu za produkciju superoksidnog anjona, čiju dismutaciju do  $H_2O_2$  katališe SOD. MPO iz makrofaga i neutrofila katališe nastanak hipohloraste kiseline (HOCl) iz  $H_2O_2$  koja kao potentniji oksidans ima jače citotoksično delovanje od superoksidnog anjona i vodonik-peroksida. Ona je jedini enzim u organizmu sisara sposoban da katališe ovu reakciju. Mijeloperoksidaza pored antimikrobnog delovanja ima i proaterogeno delovanje. Ona je integrativni enzim koji povezuje oksidativni stres i inflamaciju dva ključna procesa u nastanku kardiovaskularnih komplikacija. Mijeloperoksidaza multiplim mehanizmima preko produkcije hipohloraste kiseline učestvuje u generisanju hloramina, tirozil radikala koji dovode do povećanja: produkcije slobodnih reaktivnih radikala kiseonika i azota, klirensa azot-monoksida, adhezivnosti trombocita, matriksnih metaloproteinaza, makrofagne asimilacije LDL čestica, disfunkcije HDL i modifikacije LDL čestica što ima za posledicu endotelnu disfunkciju s arterijskom i venskom trombozom, posledičnim embolijama i ishemijskom kao krajnjim rezultatom. Pacijenti sa nivoom MPO većim od 350  $\mu\text{g/l}$  imaju povećan rizik od nastupanja akutnog koronarnog insulta, kao i drugih vaskularnih lezija i pored normalnog nivoa troponina. Ovi podaci ukazuju na prognostičko preimućstvo MPO u odnosu na klasične biomarkere ishemijske i nekroze.

Mijeloperoksidaza je prvi put izolovana 1941. godine iz psećeg gnoja i purulentnog sadržaja iz tuberkuloznog empijema kao intenzivno zeleni protein koji sadrži atom gvožđa i ispoljava peroksidazno delovanje. Pripada hem peroksidazama i uvrštena je superfamiliju II peroksidaza kojoj pripadaju i laktoperoksidaza (LPO) i tiroidna peroksidaza (TPO). MPO je katjonski protein molekulske mase 144 KD, sastoji se od dva identična dimera povezana disulfidnim vezama. Teški i laki lanac dimera sadrže po jednu identičnu hem grupu. Smeštena je u azurofilnim granulama mnogih podvrsta leukocita, neutrofilima, monocitima i nekim tkivnim makrofazima. Promijelociti i promijelomonociti aktivno sintetišu mijeloperoksidazu tokom diferencijacije u koštanoj srži. Sinteza MPO počinje u toku mijeloidne diferencijacije u koštanoj srži, a

završava se pred otpuštanje granulocita u cirkulaciju, čini 2–5% ukupnih proteina neutrofila (2–4  $\text{mg}/10^6$  ćelija) i oko 1% monocita (1, 2). Enzim sa identičnom funkcijom prisutan je i u eozinofilima – eozinofilna peroksidaza (EPO) koja za razliku od mijeloperoksidaze neutrofila i monocita sadrži dva polipeptida od oko 15 i 55 kDa. Ona katališe formiranje hipobromaste kiseline preko vodonik-peroksidaze i halidnog jona (dominantno bromida). HOBr reaguje s primarnim aminima do oblika bromamina koji konvertuje tirozin do 3-brom-tirozina.

U stanju inflamacije povezane sa infekcijama, lezijama tkiva, aterosklerozom i ostalim vaskularnim lezijama dolazi do aktivisanja različitih ćelija imunološkog sistema pri čemu se aktivišu enzimi i oslobađaju mnogobrojni medijatori. MPO je povezana sa svim stadijumima ateroskleroze počev od inicijalnih lezija, propagacije, endotene disfunkcije do terminalnog stadijuma s rupturom plaka i nastankom komplikacija. Ona je integrativni enzim koji povezuje oksidativni stres i inflamaciju – dva ključna procesa u nastanku ateroskleroze. Mijeloperoksidaza je jedan od najznačajnijih enzima koji se aktivišu tokom inflamatornog procesa. Osim antimikrobnog delovanja, ima i izuzetno značajna vaskularna delovanja. MPO je visoko katjonski protein s jakim aterogenim potencijalom, može se vezivati za endotelocite, leukocite i LDL čestice, gde pojačava oksidacione procese. MPO generiše različite reaktivne radikale kao što su hipohlorasta kiselina, hloramini, tirozil radikali, azot-dioksid, koji oksidišu proteine, lipide i antioksidativne komponente LDL. Značajna koncentracija HOCl pronađena je u aterosklerotskim plakovima (3,4,5).

Delovanja mijeloperoksidaze iz didaktičkih razloga opisuju se kao primarna, a pod njima se podrazumeva katalizovanje reakcije  $H_2O_2$  s različitim molekulima, pri čemu nastaju primarni produkti, koji zatim reaguju i grade sekundarne produkte sa biološkim kosekvencama, što predstavlja sekundarna delovanja. MPO katališe reakciju halidnih (X, tj. Cl, Br i I) i pseudohalidnih [SCN – (tiocijanat)] jona s vodonik-peroksidom, pri čemu nastaje hipohalidna kiselina HOCl (hipohlorasta), HOBr (hipobromasta) i HOSCN (hipotiocijanatna kiselina). Takođe katališe reakcije sa azot-dioksidom ( $NO_2$ ) i amino-kiselinama, dominantno tirozinom (Tyr).

Vodonik-peroksid potreban za ove reakcije dobija se dismutacijom superoksidnog anjona pod katalitičkim dejstvom SOD, koji nastaje delovanjem NADPH oksidaze makrofaga. Reakcijom  $H_2O_2$  sa različitim halidima, prvenstveno hloridom, nastaje hipohlorit (HOCl). MPO je jedini enzim u organizmu sisara sposoban da katališe ovu reakciju. Hipohlorit kao potentniji oksidans od superoksidnog anjona i vodonik-peroksida dominantno je sredstvo za liziranje mikroorganizama koje se odvija u fagocitima neutrofila, a mijeloperoksidaza oslobađa u fagocitne vakuole iz

citoplazmatskih granula. U patološkim uslovima permanentnog aktivisanja MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistema prekomerni hipohlorit ispoljava patološka delovanja. HOCl u reakciji sa vodonik-peroksidom sposoban je da inicira modifikujuću reakciju lipida, DNK i (lipo)proteina uključujući halogenisanje, nitriranje i oksidativno unakrsno povezivanje. U reakciji sa hidroperoksidom HOCl indukuje generisanje singletnog molekularnog kiseonika. HOCl može reagovati i sa masnim kiselinama i fosfolipid-peroksidima. Pronađene su visoke koncentracije MPO/HOCl i ROOH na mestu inflamacije i u sekundarnim lipid/protein oksidovanim produktima. Hlorohidriini nastaju adicijom HOCl na dvostruke veze prezentovane na holesterolu ili različitim nezasićenim estar ili etar fosfolipid jedinjenjima (vrstama).

Najznačajniji preostali ostaci lizofosfolipida formirani od HOCl posreduju oštećenje ester/eter-fosfolipida (plazmalogena) što dovodi do poremećaja membranske dinamike sa posledičnom citolizom. Delovanjem HOCl na etar fosfolipide (prisutne u biološkim membranama i lipoproteinskim česticama) nastaju 2-hlorheksadekanal [2-chlorohexadecanal (2-ClHDA)] hlorinisani lipoaldehyd široko rasprostranjen u aterosklerotskim lezijama i infarktovanom miokardu. 2-ClHDA ispoljava snažno hemoatraktano dejstvo na cirkulišuće neutrofile u zoni inflamacije i podstiče endotelnu disfunkciju. HOCl-om modifikovani epitopi na endotelnoj površini dalje privlače mijeloperoksidazu koja je oblaže i modifikuje (6). Delovanjem HOCl na nukleinske kiseline nastaje 5-hlorouracil (marker DNK inflamatornih lezija) kojom su bogata aterosklerotska tkiva. Delujući indirektno preko hlornog gasa HOCl dovodi do generisanja 3-hlortirozina čije je prisustvo utvrđeno u aterosklerotskim lezijama i lipoproteinima izolovanim iz lezija respiratornog trakta i neutrofilima indukovanim hepatičnim lezijama (7). U uslovima smanjene koncentracije Cl<sup>-</sup> u odnosu na fiziološku formiranje tirozil radikala podstiče unakrsno povezivanje proteina preko formiranja ditirozina, pri čemu azot-dioksid generiše nitrirane lipide. Obe vrste radikala mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju. HOCl-om modifikovani lipoproteini deluju na fagocite i ćelije vaskulature učestvujući u inflamatornom procesu tokom ateroskleroze. Apo B-100 je najznačajniji supstrat lipoproteina za delovanje HOCl. Preuzimanje i razgradnja HOCl-om modifikovanih lipoproteina makrofazima preko skavendžer receptora ključni je događaj u formiranju holesterolom bogatih penastih ćelija. HOCl-modifikovani lipoproteini su visokoafinitetni signalni prenosni ligandi za krajnje produkte glikozilacije (RAGE), kao multiligandni receptor koji vezuje krajnje produkte glikacije koji dovodi do inflamatornih komplikacija. Oksidacija amino-kiselinskih lanaca predstavlja specifičan mehanizam tokom HOCl-om modifikovane fragmentacije proteina. Prvi korak je nastanak hloramina

dominantno sa lizinske strane lanca. Navedeni radikali mogu kasnije u obliku karbonskog središnjeg radikala u petidnoj vezi posledično da podstiču fragmentaciju i/ili lipidnu peroksidaciju. Ovi radikali u prisustvu preformiranog ROOH mogu indukovati lipidnu peroksidaciju. Aktivnost mijeloperoksidaze je marker ekstravazacije neutrofila koja je značajno smanjena kod pacijenata tretiranih sepiapterinom koji poboljšava bioraspoloživost azot-monoksida.

## MIJELOPEROKSIDAZA I DEJSTVO NA LIPIDE

MPO deluje i na lipide. Osnovne dve promene su lipidna peroksidacija (delovanje HOCl) i hlorinacija lipidnih struktura

Hlorinacija plazmalogena koji su glicerofosfolipidi prisutni u plazma membranama sisara. Stimulisani neutrofili preko mijeloperoksidaze hlorinišu plazmalogene [(etanolamin (plazmeniletalomin) ili hlorin (plazmenilholin)] u  $\alpha$ -hlorolipid-aldehyd, 2-hloroheksadekanal i 2-hlorooktadekanal pogađajući 16 i 18 karbonski vinil-etersku vezanu alifatičnu grupu neutrofilskih plazmalogena.  $\alpha$ -hlorolipid-aldehydi imaju fiziološku ulogu u recirkulaciji neutrofila. MPO/ vodonik-peroksid/hlorid sistem stimuliše hlorinaciju tirozinskih ostataka u peptidu Gly-Gly-Tyr-Arg. Hipohlorit inicijalno reaguje sa aminogrupom gradeći hloramin koja dalje reaguje s tirozinskim ostacima konvertujući ih u hlortirozin.

Medijatori inflamacije indukuju mobilizaciju i aktivisanje leukocita. Minimalno modifikovane LDL čestice u intimi započinju influks monocita koji sazrevaju u statične makrofage koji sadrže i oslobađaju značajne količine MPO. Zatim se cirkulišući neutrofili adheriraju i vezuju za ledirani endotel. Oslobođena MPO iz makrofaga i adherisanih neutrofila vezuje se za endotel, a potom transcitozom prodire u subendotelni matriks. U subendotelnom matriksu pored MPO nalaze se i drugi izvori SRR: NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza i nespregnuta eNOS. Nastali superoksidni anjon, vodonik-peroksid su kosupstrati svih reakcija katalizovanih MPO-om. MPO pojačava oksidativni potencijal vodonik-peroksida produkujući različite reaktivne oksidante, kao što su hlorinišući i nitrišući agensi.

HDL čestice preveniraju kasnu oksidaciju u vaskularnom zidu vezivanjem jona prelaznih metala, uklanjaju oksidovane različite oblike lipida i kratkolančane aldehide poreklom iz ćelijskih struktura i LDL čestica. Posle preuzimanja oksidisani proizvodi bivaju metabolisani na jedan od dva načina: 1) hidrolizom katalizovanom enzimima povezanim sa HDL česticama kao što su trombocitni aktivirajući faktor acetilhidrolaza i paraoksonaza ili 2) manji deo se eliminiše hepatičnim

preuzimanjem HDL čestica koje sadrže oksidovane produkte. Antiinflamatorni efekti HDL čestica realizuju se zahvaljujući antioksidativnom delovanju jer mnogi oksidovani lipidi imaju proinflamatorno delovanje prvenstveno na vaskularni zid. HDL čestice smanjuju ekspresiju adhezionih molekula na endotelocitima, čime se smanjuje adhezija monocita i drugih proinflamatornih ćelija. Kod akcelerisane ateroskleroze pronađene su disfunkcionalne HDL čestice, koje mogu imati i proaterogene efekte preko prooksidativnog i posledično proinflamatornog delovanja (8). Apolipoprotein A-I (apoA-I) je dominantni objekat delovanja MPO jer imaju specifična mesta za njeno vezivanje. MPO preko HOCl, HOSCN i OCN<sup>-</sup> dovodi do nitriranja i halogenisanja tirozinskih ostataka pri čemu nastaju nitrotirozin i hlortirozin što ima za posledicu disfunkciju HDL čestica (6, 9). Dokazana je uska povezanost između apoA-I modifikacije i prevalence kardiovaskularnih bolesti. HDL čestice vezuju MPO zadržavajući njenu enzimsku aktivnost. MPO modifikovane HDL čestice imaju povećan afinitet za MPO, što predstavlja *circulus vitiosus* (10).

Posledice delovanja HOCl na HDL čestice su redukovana eliminacija holesterola HDL česticama i redukovano antiinflamatorno delovanje apoA- I.

HOCl deluje na apolipoprotein A1 (dominantni apolipoprotein HDL čestica). HOSCN dovodi do oksidacije triptofanskih ostataka HDL-a. OCN<sup>-</sup> indukuje karbamilaciju lizinskih ostataka, pri čemu nastaje homocitrulin. HOSCN i OCN<sup>-</sup> značajnije oksidišu apoA-I u rHDL (remant HDL). Izlaganje lipid slobodnih apo A-I HOCl-u i OCN<sup>-</sup>-u redukuje mogućnost oslobađanja holesterola iz holesterolom opterećenih makrofaga u odnosu na nemodifikovane apo A-I. Koncentracija tiocijanata (SCN<sup>-</sup>) povišena je kod pušača. Apo A-I izolovan iz plazme i aterosklerotskih lezija pacijenata s koronarnom arterijskom bolešću sadrži povišenu koncentraciju biomarkera HOCl 3-hlor-tirozina. Utvrđena je inverzna korelacija između 3-Cl-Tyr i eliminacionog kapaciteta apo A-I. Do disfunkcije apo A-I dolazi zbog oksidacije metionina i hlorinisanja tirozina na mestu Tyr 192 kao i zbog modifikujućeg delovanja HOCl na triptofanske ostatke. Smanjena je sposobnost HDL čestica da inhibišu TNF $\alpha$ -om uzrokovanu ekspresiju VCAM-1 na endotelocitima. Smanjena je sposobnost modifikovanih LDL čestica da se vezuju za skavendžerski receptor B1 [SR-B1 (scavendžer receptor B1)] što zavisi od oksidacije metionina, tirozina i triptofana (11). MPO modifikovane HDL čestice imaju proinflamatorno delovanje jer izložene endotelocitima aktivišu jedarni faktor  $\kappa$ B [nuclear factor  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B)] koji u kaskadnom sistemu dovodi do povećane ekspresije VCAM-1, koji podstiče dalju još intenzivniju adheziju leukocita na endotel što predstavlja *circulus vitiosus*.

SCN<sup>-</sup> je dominantni supstrat za MPO i biva za više od 50% u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obrađen mijeloperoksidazom. To rezultuje povećanom oksidacijom tiola i smanjenjem 3-Cl-Tyr (12).

Koncentracija tiocijanata predstavlja rani marker ateroskleroze jer njegoa povišena koncentracija u serumu korelira sa koncentracijom u masnim prugama i lipidima opterećenim makrofazima.

MPO katališe oksidaciju tiocijanata SCN<sup>-</sup> do cijanata OCN<sup>-</sup> značajnog za karbamilaciju lizinskih ostataka koja rezultuje nastankom i povišenjem koncentracije homocitrulina [homocitrulline (HCit)] koja je pronađena u aterosklerotskim lezijama. Karbamilacija lizinskih ostataka HDL-a dovodi do njihove disfunkcije (13). Produkcija HOSCN je povišena kod pušača jer nastaje kao rezultat reakcije cijanovodonika iz dima cigarete. Reakcijom HOSCN i OCN<sup>-</sup> sa lipid slobodnim apoA-I i rHDL (rekonstruisanim diskidnim HDL česticama) dokazan je kompleks apo A-I sa fosfatidilholinom. Modifikacija lipid slobodnog Apo A1 HOSCN-om i OCN<sup>-</sup>-om značajno smanjuje eliminacioni kapacitet za holesterol ovih partikula. Izlaganje rHDL čestica HOSCN-u nema efekata na antiinflamatorna svojstva što je istraženo preko sposobnosti rHDL čestica da inhibišu ekspresiju ćelijskih adhezionih molekula (VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina) na humanim koronarnim endotelnim ćelijama [human coronary artery endothelial (HCAECs)] koje su aktivisane TNF $\alpha$ -om. Suprotno delovanju HOSCN hipohlorit dovodi do poremećaja antinflatorne funkcije rHDL koje sadrže apoA-1 i 1-palmitoil-2-oleoiln-glicero-3-fosfoholin [1-palmitoil-2-oleoiln- glycero-3-phosphocholine (POPC)]. N-hloramini imaju ulogu u vezivanju MPO-om modifikovanih HDL čestica na receptore endotelocita što ima za posledicu aktivisanje NF- $\kappa$ B i ekspresiju VCAM-1 (11). HOSCN modifikuje triptofanske ostatke apoA-I, što dovodi do formiranja produkata oksiindoilalanina i dioksiindoilalanina – derivata hidroksitriptofana i dihidroksitriptofana (14).

### ***Oksidacija LDL čestica katalisana mijeloperoksidazom***

Fiziološki do oksidacije LDL čestica dolazi pod dejstvom superoksida i azot-monoksida fagocitnog i nefagocitnog porekla. Ovaj proces se odvija preko dva dominantna mehanizma: zavisnog od prelaznih metala i mehanizma zavisnog od peroksinitrita. Reakcija HOCl sa LDL dovodi do modifikacije apoB sa minimalnom oksidacijom lipidne komponente, pri čemu dolazi do reakcije sa lizinskim ostacima apoB i formiranja N-hloramina (15). Hloramini modifikuju deponujuća svojstva LDL čestica indukujući nekontrolisano preuzimanje modifikovanih LDL čestica makrofazima i

formiranje holesterolom preopterećenih penastih ćelija. Neutrofilima posredovana oksidacija LDL-a može se odvijati NADPH osidaza i MPO zavisnim mehanizmima. U toku ovog procesa dolazi i do nastanka fosfatidililiholin i holesterolskih esrera hidroperoksida. Navedene procese inhibiše SOD. Formiranje hloramina je inicijalni korak u procesu oksidativne modifikacije LDL-a. MPO/vodonik-peroksid/hlorid sistem reaguje sa L-tirozinom do oblika p-hidroksifenilacetaldehida. Aktivisani neutrofili stimulišu formiranje p-hidroksifenilacetaldehid preko produkcije hloramina kao intermedijera tokom oksidacije LDL-a. Drugi modalitet MPO katalisane oksidativne modifikacije LDL-a je formiranje 3-hlortirozina.

Interakcija MPO/vodonik-peroksid/hlorid sistema sa sa LDL/om dovodi do hlorinacije tirozilskih rezidua proteina. HOCl je presudan za formiranje 3-hlortirozina jer on nije detektovan u LDL česticama oksidanim pod dejstvom hidroksil radikala, bakra, gvožđa, peroksinitrita i ostalih oksidanasa.

HOCl nije jedini molekul koji dovodi do hlorinisanja LDL-a. Drugi potentan hlorinišući agens otkriven u vitro uslovima je molekularni hlor (hlorid) koji nastaje od HOCl u uslovima acidoze pri izlaganju LDL čestica aktivisanim fagocitima. Molekularni hlor može nastati i u in vivo uslovima jer pH može biti ispod 4 u toku makrogane fagocitoze kao u ishemičnim tkivima i aterosklerotskim plakovima usled otežane difuzije kiseonika kroz ledirani endotel.

Ekspozicija LDL čestica MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> sistemu rezultuje formiranjem hloriniranih sterola:

Holesterol → HOCl → Cl<sub>2</sub> →holesterol hlorohidriini + dihlroholesterol

MPO-vodonik-peroksid-hlorid sistem fagocita indukuje formiranje lipidnih peroksida u LDL česticama (16). HOCl može izdvojiti lipidne hidroperoksidge formirane pod uticajem akoksil radikala. Hloramini formirani u ovom procesu oslobađaju slobodne radikale koji započinju lipidnu peroksidaciju.

Na osnovu navedenog MPO može katalisati formiranje hloriniranih produkata u medijumima koji sadrže hloridne jone. MPO katališe lipidnu peroksidaciju i nitraciju proteina u medijumima koji sadrže fiziološku koncentraciju nitritnih jona. U interakciji aktivisanih monocita sa LDL česticama u prisustvu nitritnih jona dolazi do nitracije tirozinskih ostataka apolipoproteina B-100 i generisanja produkata lipidne peroksidacije 9-hidroksi-10,12-oktadekadienoata i 9-hidroksi-10,12-oktadekadienoiniske kiseline. Navedeni procesi ukazuju na dva mehanizma katalitičke aktivnosti MPO. U uslovima niske koncentracije azot-monoksida proces se može inhibisati katalazom i inhibitorima MPO, ali ne i SOD-om. Inicijacija oksidacije LDL reaktivnim azotovim vrstama je važan *in vivo* proces jer su LDL čestice poreklom iz

humane aterosklerotične aorte bogate nitrotirozinom. Azotove vrste produkovane od strane MPO-vodonik-peroksid-nitrat sistema monocita mogu da formiraju nitrirani LDL-NO<sub>2</sub> koji lako biva degradisan makrofazima, što rezultuje masivnim deponovanjem holesterola i nastankom penastih ćelija. Ova modifikacija LDL čestica dovodi do njihovog visokog preuzimanja i u uslovima fiziološkog nivoa hlorida i odsustva jona prelaznih metala ali u prisustvu nitratnih jona. Još jedan mehanizam oksidacije LDL čestica pod dejstvom MPO je lipidna peroksidacija. MPO neutrofila katališe oksidaciju triptofana čija je plazmatska koncentracija slična tirozinu, a koji ima jednoelektronski redukcionni potencijal, koji doprinosi oksidativnom stresu u inflamatornom medijumu (17). Oksidacija LDL čestica inicirana delovanjem slobodnih reaktivnih radikala na dialil mesta nezasićenih masnih kiseline. Bakrom ili produktima endotelocita inicirana LDL oksiacija rezultuje obimnim formiranjem monohidroksi derivata linolenske i arahidonske kiseline u ranom stadijumu reakcije. Tokom reakcije smanjuje se nivo ovih produkata, a pojavljuju se monohidroksi derivati oleinske kiseline. Monohidroksi derivati nezasićenih kiseline su dominantni produkti oksidacije LDL-a. U aterosklerotskim plakovima su identifikovani produkti nastali oksidacijom holesterola (oksisteroli) holest-5-en-3β,4α-diol, holest-5-en-3β, 4β-diol i holestan-3β, 5α, 6α-triol.

Oksidacija LDL je povećana kod dijabetičara. Hiperglikemija pospešuje bakrom i gvožđem indukovanu oksidaciju LDL-a, što je mereno formiranjem konjugovanih diena. Hiperglikemija nema efekta na metal nezavisnu oksidaciju LDL-a slobodnim reaktivnim radikalima. Metal jon zavisna ali ne i slobodnim radikalima posredovana oksidacija može se potpuno inhibisati SOD-om.

Prooksidativni efekti gukoze na metal jon zavisnu oksidaciju LDL nastaju zbog smanjenja redukcije jona metala. HDL funkcioniše kao antioksidans, inhibiše bakrom ili produktima endotela indukovanu oksidaciju LDL-a. Lipidi HDL čestica lakše se oksidišu od lipida LDL čestica peroksil radikalima. HDL ima protektivnu ulogu prema LDL česticama redukujući holesteril ester hidroperoksidge do odgovarajućih hidroperoksidge. Tokom tog procesa HDL specifični ostaci metionina u apolipoproteinima AI i AII bivaju oksidirani (18).

MPO oksidativno modifikuje tirozin apolipoproteina B-100 (apoB-100) koristeći vodonik-peroksid i hlorid za generisanje 3-hlortirozina. Nitratnu grupu tirozina oksidiše nitrit (NO<sup>2-</sup>-), krajnji produkt metabolizma azot-monoksida generišući 3-nitrotirozin. Sistem MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub> je glavni put kojim MPO konvertuje nativni LDL-a u aterogeni LDL koji ima mnogo veći afinitet za akceptor CD36 na makrofazima. Posle fagocitoze modifikovanih LDL čestica makrofazi prelaze u penaste, „foam“ ćelije

(19). Hazen i Heinecke su pronašli šest puta veću koncentraciju 3-hlortirozina u humanim odmaklim aterosklerotskim lezijama nego u normalnom tkivu aorte. LDL čestice izolovane iz aterosklerotskih lezija sadrže 30 puta veću količinu 3-hlortirozina u odnosu na cirkulišuće LDL čestice (20). Mnogi od primarnih produkata oksidacije su labilni i funkcionišu kao reaktivni međuproizvodi koji stimulišu dalju oksidativnu modifikaciju LDL, unakrsno povezivanje i agregaciju. Koncentracija tiocijanata je značajno povećana u plazmi pušača, nalazi se u velikoj koncentraciji. MPO ga oksidiše do cijanata, koji dovodi do karbamilacije različitih proteina oštećujući njihovu strukturu i funkciju. Karbamilacija LDL čestica u intimi povećava njihov aterogeni potencijal, tj. konverziju u aterogeni oblik (13).

HDL čestice imaju snažna antiaterogena delovanja zahvaljujući svojoj ulozi u transportu holesterola, antioksidativnom i antiinflamatornom delovanju. Transportujući holesterol na mesta gde on ostvaruje svoja fiziološka delovanja (npr. u kaveolama gde se nalazi eNOS), HDL čestice ga pri tome štite od oksidacije. MPO-om katalizovana oksidacija HDL čestica narušava njihova delovanja (21).

MPO preko različitih mehanizama redukuje biorasplošivost NO. Fiziološki NO je supstrat peroksidaze i MPO koji funkcioniše kao katalitički regulator NO (22). Metaboliti nastali modifikacijom azot-monoksida MPO-om redukuju biorasplošivost NO. Hipohlorasta kiselina može reagovati sa atomom azota arginina pri čemu nastaju hlorinovani produkti arginina koji inhibišu NOS (23). MPO katalitičkim i nekatalitičkim mehanizmima redukuje biorasplošivost NO u vaskulaturi. Dokazana je obrnuto srazmerna povezanost između plazmatskog nivoa MPO i FMD brahijalne arterije. U studiji koju su sprovedi Baldus i saradnici dokazano je poboljšanje endotelzavisne relaksacije provocirane protokom kao i acetilholinom usled oslobađanja MPO iz subendotelnog prostora i medije posle primene heparina (24).

Disfunkcija sarkoplazmatskog retikuluma  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) uzrokovana delovanjem mijeloperoksidaze. Sarko/endoplazmatski retikulum [sarco/endoplasmic reticulum (SERCA)] ključna je organela u prometu elektrolita mišićnih ćelija. Ključni transportni mehanizam za skladištenje kalcijumovih jona u sarkoplazmatski retikulum je endogena pumpa za  $Ca^{2+}$ -ATP-aza čija funkcija zavisi od cisteinskih ostataka. HOCl i HOSCN nastali delovanjem mijeloperoksidaze oksidišu tiol grupe cisteina, što ima inhibitorno delovanje na SERCA, a dokazano je na humanim endotelnim ćelijama koronarnih arterija [human coronary artery endothelial cells (HCAEC)] (25).

## MPO I ATEROSKLEROZA

MPO je uključena u sve stadijume ateroskleroze, što potvrđuju epidemiološke studije koje pokazuju asociranost između visokih koncentracija MPO i povećanog kardiovaskularnog rizika nezavisnog od klasičnih faktora rizika kardiovaskularnih bolesti (25–29). MPO dovodi do destabilizacije aterosklerotičnog plaka aktivacijom proteazne kaskade oksidativnom inaktivacijom proteaznih inhibitora:  $\alpha$ 1-antitripsina, tkivnog inhibitora metaloproteaza [tissue inhibitors of metalloproteases (TIMs)] i inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1) kao i aktivacijom metaloproteinaza (MMPs) i latentnih proelastaza. Navedeni enzimi posebno MMPs dovode do destabilizacije, poremećaja remodelovanja i na kraju do rupture aterosklerotskog plaka. Više studija je pokazalo pozitivnu povezanost između plazmatskog nivoa MPO i akutnog anginoznog napada kao i kardiovaskularnog mortaliteta (30–32). MPO dovodi do destabilizacije plaka, koja aktivise neutrofile koji dovode do novog i još većeg oslobađanja MPO (33). HOCl indukuje agregaciju trombocita, apoptozu i deskvamaciju endotelocita. Ona aktivise promatrilizin (MMP-7) koji oštećuje ekstracelularni matriks fibrozne površine plaka dovodeći do njegove rupture (8). U aterosklerotskim lezijama dokazana je fizička povezanost između MPO i hipohloritom modifikovanih proteina. Makrofazi prisutni u masnim prugama pokazuju nisku aktivnost MPO, dok oni iz rupturiranih plakova imaju visoku aktivnost MPO. Slično prethodnim opservacijama u nestabilnim plakovima pronađena je višestruko veća koncentracija proteina modifikovanih hipohlorastom kiselinom u odnosu na stabilne plakove. Ove podatke potvrđuju ispitivanja aterosklerotskih plakova pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom. U aterosklerotskim plakovima pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom pronađena je obilna infiltracija monocitima i neutrofilima iz kojih se MPO oslobađa u fagolizozome, a zatim i u ekstracelularni prostor (34). MPO dovodi do povećane ekspresije i aktivnosti tkivnog faktora na endotelocitima, koji stimuliše trobozu, što su potvrdila *in vitro* istraživanja gde su endotelociti inkubisani sa niskim dozama MPO ili makrofazima.

## MPO I REMODELOVANJE MIOKARDA

Leukociti migriraju u peinekrotičnu zonu gde dalje pojačavaju oslobađanje SRR i inflamaciju, što rezultuje širenjem nekrotične zone. MPO je povezana sa disfunkcijom miokarda i neadekvatnim remodelovanjem miokarda nakon infarkta. MPO generise SRR i citotoksične agense kao što su aldehidi koji mogu kovalentno da modifikuju značajne ostatke u ključnim jonskim kanalima ili transporterima. To dovodi do poremećaja kontraktilne funkcije nakon ishemije.

Ishemijski ambijent i početak reperfuzije stimulišu mobilisanje polimorfonuklearnih leukocita (PMNs), što je povezano sa endotelnom disfunkcijom i smanjenom bioraspoloživšću NO. Glavni mehanizam nastanka ovih poremećaja je oslobađanje superoksidnog anjona katalisano NADPH-om, koji aktivira PMNs neutrofile u zoni inflamacije. MPO može kompromitovati postinfarktno modelovanje ventrikularnog miokarda aktivirajući različite proteaze. MPO katalizuje oksidaciju PAI-1, rezultuje povećanom aktivnošću plazmina, što dovodi do degeneracije matriksa, istanjivanja komorskog zida i dilatacije (35). Hereditarna deficijencija MPO povezana je sa redukovanom prevalecom kardiovaskularnih bolesti.

### *Mijeloperoksidaza i koronarna bolest*

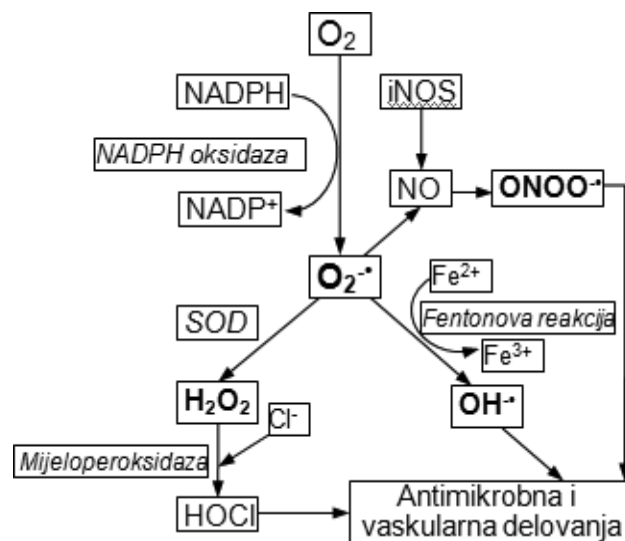
MPO je biomarker akutnog koronarnog sindroma čak i sa većom prediktornom i dijagnostičkom vrednošću od troponina. Kad je na osnovu određivanja troponina isključen akutni infarkt miokarda, povećani nivo MPO je prediktor nastupajućeg kardiovaskularnog ataka. Cirkulišući nivo troponina raste 3–6 sati nakon ishemije miokarda, dok je nivo MPO značajno povišen dva sata nakon nastupa simptoma kod pacijenata koji su imali negativan nalaz troponina. Povišen nivo MPO-a prethodi nekrozi, što ukazuje na to da je on prognostički znak vulnerabilnosti plaka. Nivo MPO korelira s klasičnim faktorima rizika, ali ne i sa troponinom T, CD 40 solubilnim ligandom, CRP i EKG znakovima ishemije i nekroze. Pacijenti sa nivoom MPO većim od 350  $\mu\text{g/l}$  imaju povećan rizik od nastupanja ACI i pored normalnog nivoa troponina. Ovi podaci ukazuju na prognostičko preimućstvo MPO u odnosu na klasične biomarkre ishemije i nekroze. MPO prezentuje stanje akutne inflamacije i oksidativnog stresa u vaskularnom zidu (i u plakovima) kao i u obim neutrofilne infiltracije, daje uvid u obim endotelne disfunkcije, a u odmaklom stadijumu ateroskleroze i u mogućnost rupture plaka. Povišena aktivnost MPO direktno pozitivno korelira s neutrofilnom aktivacijom i posledičnim oslobađanjem MPO. Intracelularna koncentracija MPO je snižena kod ispitanika sa ACI u odnosu na ispitanike sa stabilnom koronarnom bolešću. Kod pacijenata sa ACI s prisutnim EKG znacima ishemije povišen nivo MPO se održava, nema značajne razlike u nivou MPO neposredno pre i tokom ishemije i posle ishemije (nema značajne razlike u odnosu na trajanje ishemije). Oboleli s progresivnom koronarnom stenozom imaju znatno viši bazalni nivo MPO nego pacijenti sa stabilnom bolešću. Nivo HDL holesterola modifikuje ekspresiju MPO i njen odnos sa progresijom stenozе. Nivo MPO je povećan u miokardiopatiji i srčanjoj insuficijenciji.

## LABORATORIJSKO MERENJE MPO

Metode za određivanje MPO nisu standardizovane, što onemogućava komparabilnost rezultata dobijenih u različitim laboratorijama. U većini studija meren je lokalni nivo MPO koji direktno zavisi od koncentracije njenog supstrata  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je prisutan u visokoj koncentraciji u subendotelnom prostoru, posebno kod ispitanika s faktorima rizika kao što su arterijska hipertenzija, insulinska rezistencija, nikotinizam itd. Plazmatska aktivnost MPO se određuje posle davanja heparina koji mobilira MPO iz vasculature (24, 35, 36). Heparin indukuje oslobađanje MPO iz leukocita i neutrofila aktivisanih u koagulacionoj kaskadi (37). ELISA metodom može se određivati koncentracija MPO u neutrofilima kao degranulacioni indeks protočnom citometrijom pomoću hematoloških analizatora (38). Posude sa uzorkom krvi za merenje aktivnosti MPO treba držati na niskoj temperaturi, a plazma se može konzervirati citratom, EDTA-om ili heparinom koji povećava koncentraciju MPO. Neki autori preporučuju za konzervaciju EDTA-om, kao i određivanje odnosa MPO/proteini.

### *Biomarkeri aktivnosti mijeloperoksidaze*

Neki od stabilnih produkata oksidacije mogu biti biomarkeri MPO katalizovane oksidacije. Stabilni produkti aktivnosti mijeloperoksidaze, tj. povišenog nivoa HOCl jesu 3-Cl- Tyr (3-hlor-tyrozin) i HOCl. Modifikovani proteini mogu služiti kao biomarkeri, a detektovani su u aterosklerotskim lezijama. U produkciju 3-nitrotirozina može biti uključen i peroksinitrit. Suprotno od 3-nitrotirozina 3-hlortirozin jedino proizvodi MPO, što ga čini jedinim verodostojnim molekularnim biomarkerom MPO-om katalisane oksidacije.



Slika 1 Produkcija slobodnih reaktivnih radikala u neutrofilima i makrofazima, njihova delovanja.

## MPO I LEKOVI

Statini smanjuju nivo oksidanasa oslobođenih pod delovanjem MPO i NO, pretežno nitrotirozina, nezavisno od delovanja na redukciju nivoa lipida (39). Primena heparina dovodi do oslobađanja MPO iz vaskularnog zida u cirkulaciju, što ima za posledicu poboljšanje endotelne funkcije usled povećanja bioraspoloživosti NO (24).

## ZAKLJUČAK

Aktivnost mijeloperoksidaze je važan faktor rizika za nastanak postoperativnih vaskularnih komplikacija i ima važan prediktivni značaj, što je veoma važno za prevenciju vaskularnih komplikacija u toku operativnog tretmana i nakon njega, a stanje nastalo usled infekcije, inflamacije, osnovnog patološkog procesa i same lezije tkiva usled sekcije i manipulacije tkivima može se korigovati odgovarajućom terapijom.

## LITERATURA

- Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006; 445: 214–24.
- Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharm Therap* 2006; 111: 16–26.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598–625.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. *Circulation* 2003; 108: 1664–78.
- Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102–11.
- Malle E, Marsche G, Panzenboeck U, Sattler W. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch Biochem Biophys* 2006;445:245–255.
- Gujral JS, Liu J, Farhood A, Hinson JA, Jaeschke H. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G499–G507.
- Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342–74.
- Nicholls S, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 212–9.
- Marsche G, Furtmuller PG, Obinger C, Sattler W, Malle E. Hypochlorite-modified high-density lipoprotein acts as a sink for myeloperoxidase in vitro. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 187–94.
- Undurti A, Huang Y, Lupica J. A, Smith J.D, DiDonato JA, Hazen SL. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem* 2009; 284: 30825–35
- Talib J, Pattison DI, Harmer JA, Celermajer DS, Davies MJ. High plasma thiocyanate levels modulate protein damage induced by myeloperoxidase and perturb measurement of 3-chlorotyrosine. *Free Radical Biol Med* 2012; 53: 20–29
- Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007; 13: 1176–1184
- Hawkins CL, Pattison DI, Stanley NR, Davies MJ. Tryptophan residues are targets in hypothiocyanous acid-mediated protein oxidation. *Biochem J* 2008; 416: 441–52
- van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J* 1997; 327: 487–92
- Guttenberger H, Leis HJ, Tatzber F, Waeg G, Schaur RJ. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1139–48
- Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Abe Y. ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. *Hypertension* 2004; 43: 117–24.
- Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Rafferty M, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 1998; 273: 6080–7.
- Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res* 2006; 133: 143–9.
- Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997; 99: 2075–81.
- Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 322–8.



22. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 2000; 275: 37524–32.
23. Yang J, Ji R, Cheng Y, Sun JZ, Jennings LK, Zhang C. L-arginine chlorination results in the formation of a nonselective nitric-oxide synthase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 1044–9.
24. Baldus S, Rudolph V, Roiss M, et al. Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation* 2006; 113: 1871–8.
25. Liu RQ, Geren L, Anderson P, et al. Design of ruthenium-cytochrome c derivatives to measure electron transfer to cytochrome c peroxidase. *Biochimie* 1995; 77: 549–561.
25. Brevetti G, Schiano V, Laurenzano E, et al. Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Eur Heart J* 2008; 29: 224–30.
26. Dominguez-Rodriguez A, Samimi-Fard S, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Kaski JC. Prognostic value of admission myeloperoxidase levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and cardiogenic shock. *Am J Cardiol* 2008; 101: 1537–40.
27. Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart* 2007; 93: 826–31.
28. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 159–65.
29. Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A, Kastrati A. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 90–6.
30. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1143–6.
31. Stefanescu A, Braun S, Ndrepepa G, et al. Prognostic value of plasma myeloperoxidase concentration in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2008; 155: 356–60.
32. Kubala L, Lu G, Baldus S, Berglund L, Eiserich JP. Plasma levels of myeloperoxidase are not elevated in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2008; 394: 59–62.
33. Rudolph V, Steven D, Gehling UM, et al. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 460–5.
34. Naruko T, Ueda M, Haze K, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2894–900.
35. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 902–11.
36. Rudolph V, Steven D, Gehling UM, et al. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 460–5.
37. Shih J, Datwyler SA, Hsu SC, et al. Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clin Chem* 2008; 54: 1076–9.
38. Leckie MJ, Gomma AH, Purcell IF, et al. Automated quantitation of peripheral blood neutrophil activation in patients with myocardial ischaemia. *Int J Cardiol* 2004; 95: 307–13.
39. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003; 289: 1675–80.