

**Univerzitet u Beogradu  
Farmaceutski fakultet**

**Miron D. Sopić**

**ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE  
ADIPONEKTINSKIH RECEPTORA ADIPOR1 I  
ADIPOR2 I NIVOVA ADIPONEKTINA U KRVI KOD  
PACIJENTA SA KORONARNOM BOLEŠĆU I  
PACIJENATA SA HRONIČNOM BUBREŽNOM  
INSUFICIJENCIJOM**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

**Univerzitet u Beogradu  
Farmaceutski fakultet**

**Miron D. Sopić**

**ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE  
ADIPONEKTINSKIH RECEPTORA ADIPOR1 I  
ADIPOR2 I NIVOVA ADIPONEKTINA U KRVI KOD  
PACIJENTA SA KORONARNOM BOLEŠĆU I  
PACIJENATA SA HRONIČNOM BUBREŽNOM  
INSUFICIJENCIJOM**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

*Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije*

---

*Prof. dr Zorana Jelić Ivanović, mentor*  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

*Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor*  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

*dr Gordana Joksić,*  
*Naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“*

*Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Zorane Jelić-Ivanović i prof. dr Vesne Spasojević-Kalimanovske. Uzorci su sakupljeni u Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije i Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije. U toku izrade i pisanja doktorske disertacije imao sam ogromnu podršku i pomoć i zato se iskreno zahvuljem:*

*Mentoru, prof. dr Zorani Jelić-Ivanović na ukazanom poverenju, podršci, razumevanju i motivaciji koje mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije;*

*Mentoru prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj na podršci i poverenju koje mi je ukazala, kao i strpljenju koje je imala da sasluša sve moje dileme;*

*Dr Gordani Joksić na ostvarenoj saradnji, ljubaznosti i razumevanju;*

*Prof. dr Slavici Spasić na svemu što sam od nje naučio o statistici i naučnom radu;*

*Prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević i prof. dr Jeleni Kotur Stevuljević čija su stečena znanja u oblasti ispitivanja nivoa genske ekspresije i statističke obrade podataka u mnogome olakšala moj naučno-istraživački rad;*

*Doc. dr Ani Ninić koja me je strpljivo, korak po korak uvodila u metodologiju naučnog istraživanja genske ekspresije, ne mareći za moje početničke greške motivisala me iz dana u dan da napredujem;*

*Prof. dr Dimitri Kalimanovskoj-Oštrić sa Instituta za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije i prof. dr Sanji Simić-Ogrizović na požrtvovanom zalaganju u skupljanju uzoraka biološkog materijala;*

*Doc. dr Jeleni Vekić, doc. dr Aleksandri Zeljković i doc. dr Aleksandri Stefanović na bezgraničnoj podršci, ljubavi i razumevanju, kao i na svim korisnim savetima koje su mi pružile;*

*Svim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju, a posebno kolegama asistentima, Tamari Gojković, Milici Miljković i Jasmini Ivanišević koji nisu direktno učestvovali u izradi ove doktorske disertacije, ali su mi svojim bezrezervnim razumevanjem i podrškom pomogli da prevaziđem sve prepreke i izazove koje naučno-istraživački život sa sobom donosi;*

*Koleginici Jeleni Joksić na prijateljstvu, neverovatnoj podršci, nesebičnom deljenju znanja i ideja, kao i optimizmu kojim je osvetlila ponekad sumorne dane laboratorijskog života;*

*Svojoj porodici na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju, a posebno mojim roditeljima koji su u meni razvijali kritičku misao i radoznalost.*



# Određivanje genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 i nivoa adiponektina u krvi kod pacijenata sa koronarnom bolešću i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom

Razvoj procedura za dijagnozu kardiovaskularnih bolesti (KVB) kao i uvođenje lekova iz grupe statina u terapiju pacijenata koji pate od KVB, krajem dvadesetog veka u stručnoj javnosti doveo je do optimističkih procena da će se visoka učestalost mortaliteta uzrokovan komplikacijama KVB značajno umanjiti. Međutim, poslednji podaci Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) svedoče da su bolesti srca i krvnih sudova i dalje vodeći uzrok smrtnosti u srednje i visoko razvijenim zemljama. Navedeni poražavajući podaci ukazuju na potrebu u ispitivanja novih markera koji bi doprineli boljem razumevanju nastanka i razvoja KVB kao i ranom otkrivanju, efikasnijoj terapiji i pouzdanijoj prognozi ishoda bolesti.

KVB se često javljaju kao posledica metaboličkih promena koje se dešavaju u sklopu neke druge bolesti. Jedno od takvih stanja je hronična bubrežna insuficijencija (HBI) koja je praćena kompleksnim metaboličkim promenama koji omogućavaju progresivan tok ateroskleroze, pa su pacijenti sa HBI svrstani u grupu sa najvećim rizikom za razvoj KVB.

Gojaznost je jedan od tradicionalnih faktora rizika za razvoj KVB. Masno tkivo predstavlja vrlo moćan sekretorni organ koji oslobađa veliki broj molekula sa endokrinim potencijalom utičući tako na različite fiziološke procese. Prekomerna akumulacija masnog tkiva praćena je promenom u funkciji adipocita koji stvarajući proinflamatornu sredinu olakšavaju razvoj ateroskleroze koja leži u osnovi svih KVB. Adiponektin je jedan od najznačajnijih molekula koje oslobađaju adipociti i za razliku od većine drugih pokazuje antiinflamatorno, antiapoptotsko, antiaterosklerotsko i kardioprotektivno dejstvo. Navedeni efekti ostvaruju se aktivacijom adiponektinskih receptora, označenih kao AdipoR1 i AdipoR2. Uprkos njegovim zaštitnim efektima utvrđeno je da su povišene vrednosti adiponektina u koronarnoj srčanoj bolesti (KSB) i HBI povezane sa povećanim rizikom od smrtnosti. Smatra se da bi jedan od mogućih uzroka ovog paradoksa mogao biti poremećaj na nivou ose ligand/receptor koji dovodi do kompenzatornog porasta koncentracije adiponektina.

Cilj našeg istraživanja je bio da se ispituju koncentracije cirkulišućeg adiponektina i nivoi genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u grupi zdravih ispitanika, pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na

hemodijalizi. Kako bi ispitali da li postoji povezanost razvoja KSB sa promenom koncentracije cirkulišućeg adiponektina i genske ekspresije adiponektinskih receptora pacijente koji pate od KSB smo podelili prema nalazu koronarografije na grupu pacijenata bez značajne stenozе i grupu pacijenata sa značajnom stenozom.

U istraživanju je učestvovalo 133 ispitanika: 69 osoba sa KSB, 31 osoba sa HBI i 33 zdrava ispitanika. Istraživanje je planirano i izvedeno u skladu sa Deklaracijom iz Helsinkija. Nivoi genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2 određeni su *real-time PCR* metodom, a koncentracija cirkulišućeg adiponektina određena je ELISA metodom. Ostali biohemijski parametri određeni su standardnim laboratorijskim metodama.

Značajno više koncentracije adiponektina uočene su kod pacijenata koji pate od KSB sa i bez značajne stenozе u odnosu na zdrave ispitanike ( $P < 0,001$ ,  $P = 0,001$ , redom) dok između ove dve grupe pacijenata nije postojala značajna razlika u koncentraciji adiponektina. Obe grupe pacijenata sa KSB imale su značajno niži nivo iRNK AdipoR1 u odnosu na zdrave ispitanike ( $P < 0,001$  u oba slučaja), dok razlike u nivou iRNK AdipoR2 nisu bile značajne. Takođe, nije bilo značajne razlike u nivoima iRNK adiponektinskih receptora između pacijenata koji pate od KSB sa i bez značajne stenozе. Pacijenti sa HBI na hemodijalizi imali su takođe značajno više vrednosti cirkulišućeg adiponektina ( $P = 0,038$ ) i niže nivoe iRNK AdipoR1 u odnosu na zdrave ispitanike ( $P = 0,034$ ), dok razlike u nivoima iRNK AdipoR2 nije bilo. Zdravi ispitanici sa visokim vrednostima adiponektina imali su značajno više vrednosti HDL-H ( $P < 0,001$ ), kao i značajno niže vrednosti insulina ( $P = 0,05$ ) i HOMA IR indeksa ( $P = 0,04$ ) u odnosu na zdrave ispitanike koji su imali niže koncentracije adiponektina, dok ovakva povezanost nije uočena kod pacijenata sa KSB. Pacijenti sa HBI na hemodijalizi koji su imali visoke vrednosti adiponektina takođe su imali značajno više vrednosti HDL-H ( $P = 0,022$ ) i značajno niže vrednosti insulina ( $P = 0,005$ ) u odnosu na pacijente sa nižim vrednostima adiponektina. Zdravi ispitanici sa višim vrednostima BMI imali su značajno niže vrednosti adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike sa nižim vrednostima BMI ( $P = 0,001$ ). Ovakva veza između masnog tkiva i koncentracije adiponektina nije uočena kod pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na hemodijalizi. S druge strane, pacijenti sa KSB koji su imali više vrednosti BMI imali su značajno niže nivoe iRNK AdipoR1 u odnosu na pacijente sa nižim vrednostima BMI ( $P = 0,015$ ), a ovakva povezanost nije pronađena kod zdravih ispitanika i pacijenata sa HBI na hemodijalizi. U grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi uočena je značajna negativna korelacija između koncentracije insulina i nivoa iRNK AdipoR1 ( $\rho = -0,469$ ,  $P = 0,021$ ). Osobe ženskog pola u sve tri ispitivane grupe imale su značajno višu koncentraciju adiponektina u odnosu na osobe muškog pola (KG:  $P < 0,001$ ; KSB:  $P = 0,015$ ;

HBI:  $P=0,004$ ). U grupi zdravih ispitanika uočeno je da žene imaju značajno niže nivoe iRNK AdipoR2 u odnosu na muškarce ( $P=0,027$ ). Terapija statinima, ACEI i pušenje nisu značajno uticali na nivoe cirkulišućeg adiponektina i iRNK adiponektinskih receptora.

Dobijeni rezultati ukazuju da je nedostatak zaštitnih efekata adiponektina kod pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI posledica nemogućnosti adiponektina da ostvari svoje efekte usled nishodne regulacije AdipoR1. Značajno niži nivoi iRNK AdipoR1 kod pacijenata koji pate od KSB sa značajnom stenozom, tako i kod pacijenata koji pate od KSB bez značajne stenozu, u odnosu na zdrave ispitanike ukazuju da se razvoj adiponektinske rezistencije javlja već u ranim fazama bolesti.

Rezultati naše studije ukazuju da bi pacijenti sa KSB i pacijenti sa HBI mogli biti u stanju tkz. adiponektinske rezistencije, te da je povećanje adiponektina kod ovih pacijenata posledica kompenzatornog mehanizma. Nishodna regulacija AdipoR1 i povišene vrednosti cirkulišućeg adiponektina uočeni su kako u uznapredovalim tako i u početnim stadijumima KSB što ukazuje da bi protektivni efekti adiponektina mogli biti umanjeni već u ranim fazama ateroskleroze. Čini se da su insulinska rezistencija, gojaznost i odsustvo adiponektinskih efekata deo jednog začaranog kruga, ali ostaje nejasno koji od ovih faktora je prvi događaj u nizu patološke kaskade.

Ključne reči: adiponektin; AdipoR1; AdipoR2; genska ekspresija; koronarna srčana bolest; hronična bubrežna insuficijencija.

Naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.171.6:[616.12-009.72:616.61-008.6(043.3)

## Measurement of gene expression levels of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 and adiponectin levels in blood of patients with coronary artery disease and patients with chronic kidney disease

Development of powerful procedures for diagnosis of cardiovascular diseases (CVDs) as well as introduction of statin therapy to patients with various CVD has led scientific community to an optimistic assessment that by the end of 1990s prevalence of CVD related mortality will be dramatically decreased. However, latest World Health Organization reports show that CVD are still leading cause of mortality worldwide indicating a need for constant search for new biomarkers which would contribute to better understanding of CVD development and progression, and enable early detection, more efficient therapy and more reliable prognosis.

CVD are often consequence of metabolic rearrangements associated with several other diseases. One good example for such scenario is chronic kidney disease (CKD) which is associated with complex metabolic changes and progressive atherosclerosis. CKD patients are considered to be at very high risk of CVD mortality.

Obesity is considered to be one of the traditional risk factors for CVD development. Adipose tissue is very powerful secretory organ which synthesizes and secretes a vast number of molecules with endocrine potential thus influencing different physiological processes. Accumulation of fat is followed by adipocytes hypertrophy and over secretion of pro-inflammatory molecules which facilitate atherosclerosis progression. Adiponectin is most abundant protein produced by adipose tissue, and unlike most other adipokines has anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-atherosclerotic and cardio-protective properties. These effects are mainly achieved by activation of two adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. However, despite its effects it has been shown that increased, rather than decreased, levels of adiponectin are associated with higher mortality in patients with CVD or CKD. Previous studies suggested that one of the reasons for this paradox is dysfunction of ligand/receptor axis which leads to compensatory rise of adiponectin.

In our study we sought to investigate if circulating levels of adiponectin and gene expression of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are changed in patients with coronary artery disease (CAD) and patients with CKD on hemodialysis compared to healthy subjects. In order to investigate if development of

CAD is associated with changes in adiponectin levels and gene expression of adiponectin receptors we have divided CAD patients according to coronary angiography to patients without and patients with significant stenosis.

This study included 133 subjects: 69 CAD patients, 31 CKD patients and 33 healthy subjects (CG). This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. Circulating adiponectin levels were measured by ELISA, while PBMCs AdipoR1 and AdipoR2 mRNA levels were determined by real-time PCR.

CAD patients without and with significant stenosis had significantly higher adiponectin levels compared to CG ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ , respectively), while there was no significant differences in adiponectin levels between these two groups of patients. Significantly lower AdipoR1 mRNA levels were observed in CAD patients without and with significant stenosis compared to CG ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ , respectively). There were no significant differences in AdipoR2 mRNA levels between compared groups. CAD patients without and with significant stenosis had similar AdipoR1 and AdipoR2 mRNA levels. CKD patients on hemodialysis also had increased adiponectin levels ( $P = 0.038$ ) and decreased AdipoR1 mRNA levels ( $P = 0.034$ ) than CG, while difference in AdipoR2 mRNA levels was not significant. Healthy subjects with high adiponectin levels had significantly higher HDL-C levels ( $P < 0.001$ ) and significantly lower insulin levels ( $P = 0.05$ ) and HOMA IR index ( $P = 0.004$ ) compared to healthy subjects with lower levels of adiponectin. These findings were not observed in CAD patients. CKD patients on hemodialysis with high adiponectin levels had significantly higher HDL-C levels ( $P = 0.022$ ) and significantly lower insulin levels ( $P = 0.005$ ) than patients with lower adiponectin levels. Healthy subjects with high BMI had significantly lower adiponectin levels compared with healthy subjects with lower levels of adiponectin ( $P = 0.001$ ), which was not observed in CAD or CKD patients. On the other hand, CAD patients with high BMI had significantly lower AdipoR1 mRNA levels compared to CAD patients with lower BMI ( $P = 0.015$ ), which was not observed in CKD patients or CG. AdipoR1 mRNA levels positively correlated with AdipoR2 mRNA levels in CG and CAD patients, but not in CKD patients. Strong negative association of AdipoR1 mRNA levels and insulin was found in CKD patients ( $\rho = -0.469$ ,  $P = 0.021$ ). Females had significantly higher adiponectin levels groups compared to males in all three investigated (CG:  $P < 0.001$ ; CAD:  $P = 0.015$ ; CKD:  $P = 0.004$ ). AdipoR2 mRNA levels were significantly lower in females but only in CG ( $P = 0.027$ ). Statins, ACEI and smoking haven't had significant influence on adiponectin levels or gene expression of adiponectin receptors.

These findings suggest that CAD and CKD patients may be in the state of “adiponectin resistance” and that adiponectin increase in these patients may be part of compensatory mechanisms. Decreased AdipoR1 mRNA levels and increased circulating adiponectin levels in advanced stages of CAD as well as in patients without significant stenosis compared to CG, implies that protective effects of adiponectin could be diminished, even in early stages of atherosclerosis. It seems that insulin resistance, obesity and absence of adiponectin effects are all parts of the same vicious circle, but it remains unclear what is the first event in this pathological cascade.

Keywords: adiponectin; AdipoR1; AdipoR2; gene expression; coronary artery disease; chronic kidney disease.

Scientific field: Medical biochemistry

UDK broj: 577.171.6:[616.12-009.72:616.61-008.6(043.3)

# SKRAĆENICE U TEKSTU

**AdipoR1** – adiponektinski receptor 1

**AdipoR2** – adiponektinski receptor 2

**AIM** – akutni infarkt miokarda

**AKT** – protein kinaza B

**AMPK** – adenzin monofosfat zavisna protein kinaza

**BMI** – indeks telesne mase

**cDNK** – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

**Ct** – ciklus u kome fluorescencija prelazi definisani prag

**CVB** – cerebrovaskularne bolesti

**DNK** – deoksiribonukleinska kiselina

**ELISA** – enzimski imunoesej

**FOXO1** – *forkhead box* protein O 1

**HBI** – hronična bubrežna insuficijencija

**HDL-H** –holesterol u lipoproteinima visoke gustine

**HMW** – oligomer adiponektina visoke molekulske mase

**HOMA** – *homeostatic model assesment*

**HOMA IR indeks** – HOMA indeks insulinske rezistencije

**hsCRP** – visoko osetljivi C-reaktivni protein

**IL-6** – interleukin 6

**iRNK** – informaciona ribonukleinska kiselina

**KSB** – koronarna srčana bolest

**KVB** – kardiovaskularne bolesti

**LDL-H** – holesterol u lipoproteinima niske gustine

**LKB** – jetrena kinaza B

**LMW** – oligomer adiponektina male molekulske mase

**miRNA** – mikro ribonukleinska kiselina

**MMW** – oligomer adiponektina srednje molekulske mase

**NFkB** – nuklearni faktor kapa B

**PAI-1** – inhibitor aktivacije plazminogena 1

**PCR** – reakcija lančane polimerizacije

**PI3K** – fosfoinozimid-3 kinaza

**PPAR** – receptor peroksizomskog proliferatora

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**SirT1** – sirtuin 1

**SREBP** – sterol regulatorni element vezujući protein

**SZO** – Svetska Zdravstvena Organizacija

**TG** – trigliceridi

**TNF** – faktor nekroze tumora

**UH** – ukupni holesterol

**VEGF** – faktor rasta vaskularnog endotela

**VLDL** – lipoproteini veoma niske gustine



## Sadržaj

Miron D. Sopić .....	0
Miron D. Sopić .....	1
SKRAĆENICE U TEKSTU .....	8
UVOD .....	1
1.1. Kardiovaskularne bolesti .....	1
1.2. Etiologija i patogeneza ateroskelroze .....	2
1.3. Gojaznost i ateroskleroza .....	3
1.4. Adiponektin .....	5
1.5. Adiponektinski receptori i transdukcija signala .....	8
1.6. Metabolički efekti adiponektina na nivou različitih tkiva .....	10
1.7. Značaj ispitivanja koncentracije adiponektina u koronarnoj srčanoj bolesti i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji .....	13
1.8. Transkriptom mononuklearnih ćelija periferne krvi kao dijagnostičko sredstvo .....	15
2. CILJ .....	17
3. MATERIJAL I METODE .....	18
3.1. Ispitanici .....	18
3.2. Određivanje koncentracije adiponektina u plazmi .....	20
3.2.1. Princip Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA .....	20
3.2.2. Obrada rezultata .....	21
3.2.3. Metrološke karakteristike testa: Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA... ..	23
3.3. Određivanje nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi .....	24
3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	25
3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	25
3.3.3. Određivanje koncentracije RNK i procena čistoće uzorka .....	26
3.3.4. Provera integriteta RNK u uzorku .....	27
3.3.5. Reakcija reverzne transkripcije .....	29
3.3.6. <i>Real-time PCR</i> metoda .....	30
3.2. Metode za određivanje ostalih biohemijskih parametara .....	46
3.3. Statistička analiza .....	47
4. REZULTATI .....	48
4.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike kontrolne grupe, pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na hemodijalizi .....	48
4.2. Analiza koncentracije adiponektina u posmatranim grupama .....	51

4.2.1. Analiza koncentracije adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB.....	51
4.2.2. Analiza koncentracije adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi.....	54
4.3. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama ...	56
4.3.1. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB .....	56
4.3.2. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi .....	58
4.4. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije u posmatranim grupama.....	59
4.4.1. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u kontrolnoj grupi	60
4.4.2. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa KSB.....	64
4.4.3. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi .....	68
4.4.4. Ispitivanje povezanosti adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije u kontrolnoj grupi .....	72
4.4.5. Ispitivanje povezanosti adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije kod pacijenata sa KSB .....	79
4.4.6. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi .....	86
4.5. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama.....	91
4.5.4. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi.....	91
4.5.5. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB.....	93
4.5.6. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi .....	95
4.6. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama .....	97
4.6.4. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi.....	97

4.6.5. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB .....	99
4.6.6. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi.....	101
4.7. Uticaj pušenja na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB .....	103
4.7.4. Uticaj pušenja na koncentraciju cirkulišućeg adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi .....	103
4.7.5. Uticaj pušenja na koncentraciju cirkulišućeg adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB .....	105
4.8. Uticaj lekova na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB .....	107
4.8.4. Uticaj statina na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB.....	107
4.8.5. Uticaj ACE inhibitora na koncentraciju na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB .....	110
5. DISKUSIJA .....	112
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	126
Biografija autora.....	145

# UVOD

## 1.1. Kardiovaskularne bolesti

Bolesti srca i krvotoka su već decenijama unazad vodeći uzrok obolevanja, radne nesposobnosti i prevremene smrtnosti (pre 65. godine života) u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju (1). Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) kardiovaskularne bolesti (KVB) su uzrok smrtnosti 17,5 miliona ljudi godišnje, što čini oko 31% svih uzorka smrtnosti širom sveta, a čak 75 % smrtnih ishoda koji su posledica KVB otpada na slabo razvijene zemlje i zemlje u razvoju (2). Samo od akutnog infarkta miokarda (AIM) godišnje oboli oko 6 miliona ljudi, od čega se smrtni ishod javlja kod približno 25% slučajeva (1). Prema projekcijama SZO 2020. godine KVB biće vodeći uzrok smrtnosti kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju (2).

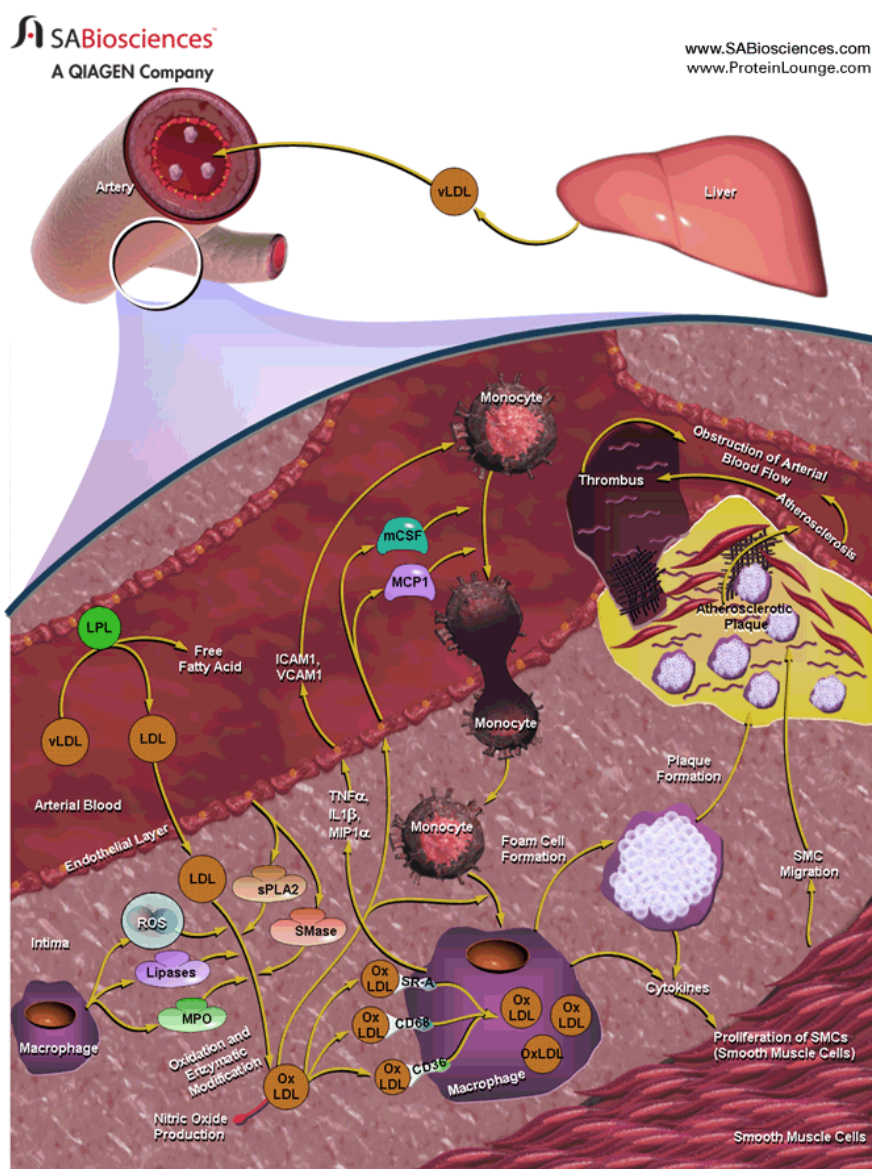
Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ iz 2009. godine KVB u Srbiji su bile uzročnik smrtnosti u 54,6% slučajeva, od čega 23% otpada na smrtnost izazvanu koronarnom srčanom bolešću (KSB), 29% na smrtnost izazvanu cerebrovaskularnim bolestima (CVB), a 48% na smrtnost izazvanu drugim bolestima srca i krvotoka (3).

KVB se često razvijaju sekundarno kao komplikacije neke druge primarne bolesti. U tom smislu hronična bubrežna insuficijencija (HBI) svakako predstavlja vrlo bitno patološko stanje jer brojne studije svedoče da HBI prate teška i progresivna ateroskleroza i ishemijska vaskularna bolest (4). Smatra se da više od 50% bolesnika sa HBI umre od komplikacija KVB pre nego što se počne sa metodama lečenja za zamenu funkcije bubrega. Prema organizaciji *American Heart Association* bolesnici sa HBI svrstani su u grupu bolesnika sa najvećim kardiovaskularnim rizikom (4). Procenjeno je da se negde oko 2 miliona ljudi trenutno leči nekom od metoda za zamenu funkcije bubrega (hemodijaliza, peritoneumska dijaliza, transplatacija bubrega). Porast broja obolelih od HBI tokom druge polovine XX i početka XXI veka je u direktnoj vezi sa porastom učestalosti hipertenzije i dijabetesa (4).

Izneti podaci ukazuju na aktuelnost KVB i naglašavaju neminovnost ispitivanja novih markera koji bi doprineli ranom otkrivanju, efikasnijoj terapiji i pouzdanijoj prognozi ishoda bolesti.

## 1.2. Etiologija i patogeneza ateroskleroze

Pojam KSB obuhvata četiri patološka stanja: anginu pektoris, akutni infarkt miokarda, iznenadnu srčanu smrt i ishemijsku kardiomiopatiju, a u osnovi svih navedenih stanja leži ateroskleroza (3). Takođe, HBI je praćena izuzetno progresivnim aterosklerotskim promenama koja uzrokuje čestu pojavu kardiovaskularnih komplikacija (4). Ateroskleroza predstavlja hronično oboljenje zida velikih i srednjih arterija koje karakteriše endotelna disfunkcija, vaskularna inflamacija i progresivna akumulacija lipida i komponenti matriksa, što dovodi do formiranja ateroma tj. fibroznog plaka i suženja lumena krvnog suda (5,6).



Slika 1. Kompleksne interakcije različitih mehanizama odgovornih za nastanak i razvoj ateroskleroze (Preuzeto iz: SABiosciences website)

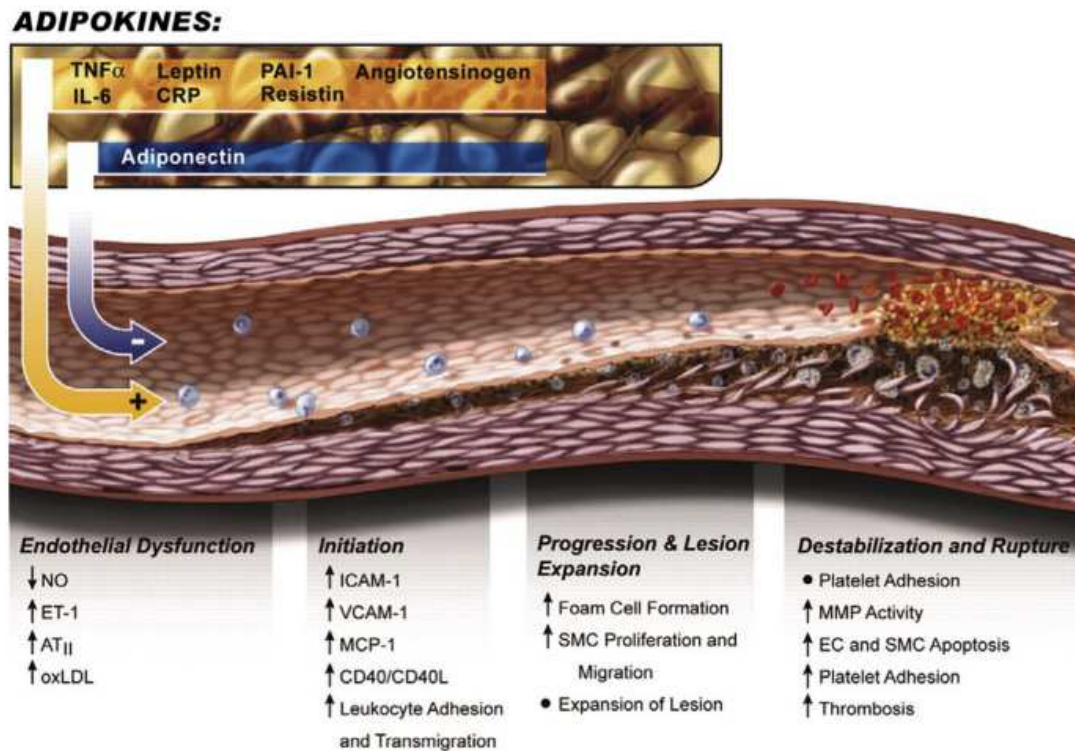
Postoji više različitih hipoteza koje definišu uzroke i mehanizme razvoja aterosklerotskog procesa. Hipoteza koja se zasniva na odgovoru organizma na oštećenje endotela predstavlja sveobuhvatnu i sveopšte prihvaćenu hipotezu prema kojoj povreda endotela uzrokuje vaskularnu inflamaciju, praćenu fibroproliferativnim odgovorom (7). Odgovor endotela na oštećenje obuhvata adheziju monocita i trombocita, kao i pojačan prelazak lipida u zonu intime koji se dešava kao posledica povećane vaskularne permeabilnosti. Endotelne ćelije na mestu povrede, kao i nakupljeni monociti i trombociti oslobađaju faktore rasta koji stimulišu proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i njihov prodor u intimu. Aktivirani monociti se diferenciraju u makrofage koje nekontrolisano akumuliraju lipide i tako prelaze u penaste ćelije, koje uz glatke mišićne ćelije čine osnovu fibroznog plaka. Sve faze aterosklerotskog procesa, od inicijalnih do terminalnih, kontinuirano prati proces inflamacije koji obuhvata sudelovanje različitih proinflamatornih faktora (Slika 1).

Ateroskleroza se često označava kao multifaktorsko oboljenje čiji je nastanak i razvoj uslovljen sinergističnim dejstvom različitih faktora rizika. Tradicionalnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze smatraju se: muški pol, starost, pozitivna porodična anamneza na rani razvoj kardiovaskularnih bolesti, nepovoljan lipidni profil (povišene vrednosti ukupnog holesterola i LDL-holesterola, a snižene vrednosti HDL-holesterola), hipertenzija, pušenje, gojaznost, dijabetes (8). S obzirom na aktuelnost kardiovaskularnih bolesti, konstantni naponi se ulažu u pronalaženje novih markera čija bi interpretacija uz tradicionalne faktore rizika olakšala prepoznavanje ranih aterosklerotskih promena i time unapredila prevenciju ove bolesti. U tom smislu, sledeći markeri su posle intenzivnih evaluacija stekli status novih faktora rizika: apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, trigliceridi i trigliceridima bogati lipoproteinski remnanti, male guste LDL čestice i oksidovane LDL čestice, lipoprotein(a), homocistein i hsCRP (8).

### **1.3. Gojaznost i ateroskleroza**

Gojaznost svakako predstavlja značajan faktor rizika za razvoj ateroskleroze, naročito ako se uzme u obzir njena učestalost u visoko i srednje razvijenim zemljama danas. Relevantnost masnog tkiva u kontekstu rizika za pojavu ateroskleroze tumači se kako kroz njegovu povezanost sa nepovoljnim lipidnim profilom i povećanom koncentracijom cirkulišućih slobodnih masnih kiselina, tako i kroz njegov endokrini potencijal (9-11). Slobodne masne kiseline indukuju pojavu insulinske rezistencije na nivou skeletnih mišića,

jetre i endotelnih ćelija i aktivirajući NFκB put stimulišu produkciju proinflamatornih molekula (12).



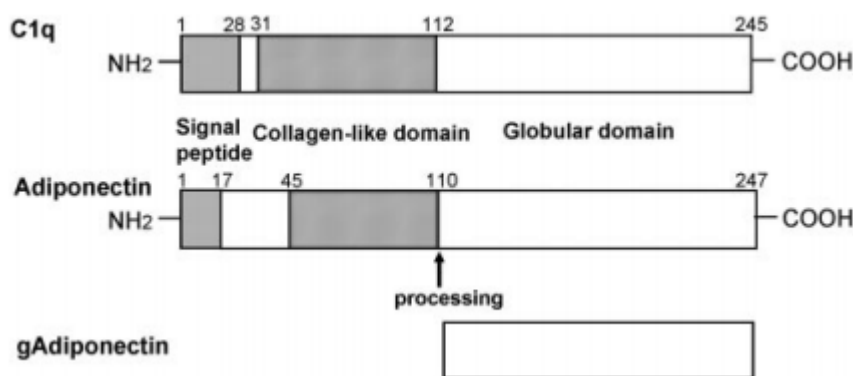
Slika 2. Uloga adipokina u razvoju aterosklerotkog plaka (Preuzeto iz: Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2005 May 1;288(5):H2031-41.)

Masno tkivo sekretuje veliki broj molekula koji se nazivaju adipokini ili adipocitokini preko kojih vrši uticaj na homeostazu različitih fizioloških procesa (9-11). Neki od najznačajnijih molekula iz grupe adipokina su: TNF- $\alpha$ , IL-6, leptin, adiponektin, PAI-1, VEGF, MCP-1 (10). Prekomerna akumulacija masnog tkiva praćena je hipertrofijom adipocita, što za posledicu ima povećanu produkciju proinflamatornih adipokina, na prvom mestu TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, i smanjenu produkciju antiinflamatornog adiponektina (10, 11). Ovakav disbalans adipokina izaziva niz efekata koji olakšavaju nastanak i ubrzavaju sam tok aterosklerotskog procesa (Slika 2). Pored disbalansa adipokina, kao mogući mehanizmi koji povezuju prekomernu akumulaciju masnog tkiva i ateroskleroze istaknuti su: endotelna disfunkcija, vaskularna inflamacija, aktivacija NLRP3 u makrofagama, promena crevne mikroflore, gubitak autofagnog fluksa i promocija oksidativnog stresa (9).

Kao adipokin koji ima anti-inflamatorni potencijal i koga adipociti sekretuju u daleko najvećoj količini, adiponektin je do sada u brojnim studijama naznačen kao jedan od ključnih faktora koji povezuju gojaznost, insulinsku rezistenciju i kardiovaskularne bolesti (13-19).

## 1.4. Adiponektin

Adiponektin je protein od 30kDa iz grupe adipokina koga prevashodno sintetišu i sekretuju adipociti, mada skorija istraživanja ukazuju na postojanje njegove iRNK u endotelnim ćelijama krvnih sudova, kao i u ćelijama skeletnog i srčanog mišića (20-34). Kompletan protein se sastoji od 247 aminokiselina, a među sisarima je uočen vrlo visok stepen konzerviranosti aminokiselinske sekvence (35). Adiponektin spada u proteinsku familiju komplementa C1 (Slika 3), na čijem se N-terminalnom kraju nalazi signalna sekvenca, koju prati kolagenu sličan domen i C-terminalni globularni domen. Ispitivanje kristalografske strukture ukazalo je na zapanjujuću sličnost trodimenzionalne strukture ovog molekula sa faktorom nekroze tumora (TNF) (36). Međutim, uprkos izuzetnoj sličnosti između ova dva molekula nije dokazana mogućnost adiponektina da aktivira TNF receptore.



Slika 3. Struktura mišijeg (A) i humanog (B) adiponektina (Preuzeto iz: Kadowaki T, Yamauchi T.

Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005 May 1;26(3):439-51.)

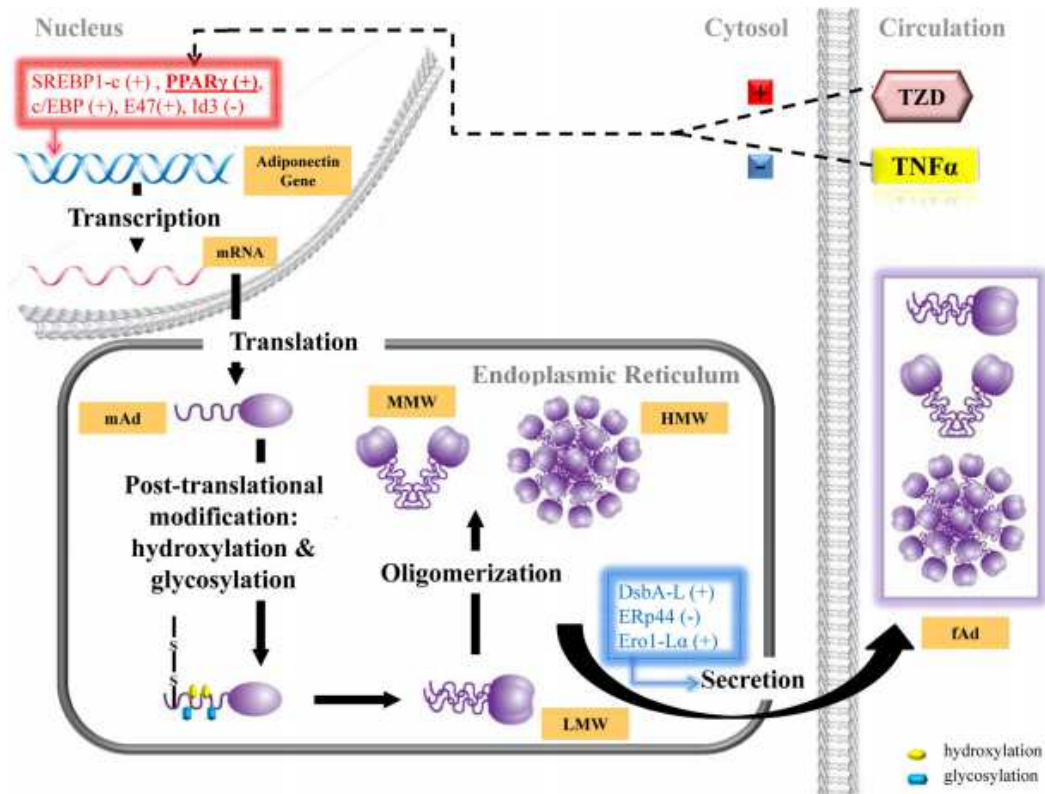
1

gena za adiponektin su: *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR $\gamma$ ), *CAAT enhancer binding protein* (C/EBP), *sterol regulatory element binding protein* (SREBP,) E47 i Id3 protein. *Forkhead box protein O1* (FOXO1) uz pomoć sirtuina 1 (SirT1) stvara kompleks sa C/EBP aktivirajući tako transkripciju gena za adiponektin (37-39). Iako su ovi procesi nepobitno značajni, za sada nije jasno da li su nivoi adiponektina primarno regulisana na nivou transkripcije ili se primarna kontrola odvija na nivou kompleksnih posttranslacionih modifikacija.

Nakon translacije, adiponektin podleže procesu oligomerizacije koji se odvija u nekoliko koraka. Početni korak predstavlja interakcija globularnih domena pojedinačnih molekula adiponektina koji formiraju trimer, nakon čega sledi korak međusobnog vezivanja kolagenskih domena disulfidnim mostovima preko cisteina na položaju 39 (40). Ovako sastavljen trimer adiponektina označen je kao adiponektin male molekulske mase (LMW).



Posttranslacione modifikacije podrazumevaju reakcije hidroksilacije i glikozilacije na četiri konzervirana lizinska ostatka u okviru kolagenskog domena čime se omogućava formiranje većih oligomera označenih kao adiponektin srednje molekulske mase (MMW) i adiponektin visoke molekulske mase (HMW) (41).



Slika 4. Kontrola transkripcije, translacije, posttranslacionih modifikacija, oligomerizacije i sekrecije adiponektina (Preuzeto iz: Dadson K, Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. Front Endocrinol (Lausanne). 2011 Nov 8;2:62.)

Sekrecija adiponektina je specifično regulisana na nivou endoplazmatskog retikuluma (Slika 4). Šaperon proteini endoplazmatskog retikuluma koji imaju značajnu ulogu u procesu pravilnog savijanja i oslobađanja adiponektinskih oligomera su DsbA-L, ERp44 i Ero1-1(42, 43). Ukoliko se kovalentna veza formira između cis39 adiponektina i ERp44, adiponektin se zadržava u endoplazmatskom retikuluma, dok vezivanje Ero1-1 za ERp44 dovodi do oslobađanja adiponektina. DcbA-L je tiol-oksidoreduktaza koja katalizuje formiranje navedenih kovalentnih veza. Povišena sekrecija adiponektina pod dejstvom lekova iz grupe tiazolidindiona objašnjava se njihovom sposobnošću da aktiviraju PPAR $\gamma$  koji istovremeno uzrokuje ushodnu regulaciju samog gena za adiponektin, ali i pojačanu ekspresiju šaperon proteina ERp44 i Ero1-1(43, 44). U gojaznosti dolazi do slabljenja funkcije endoplazmatskog

retikuluma usled razvoja stanja poznatog kao stres endoplazmatkog retikuluma što se smatra jednim od značajnih faktora koji doprinose sniženju koncentracije adiponektina (45).

Adiponektin se u cirkulaciji može naći u formi HMW oligomera, MMW heksamera i LMW trimera (46). Kombinacija ovih oligomernih formi se često naziva i adiponektin pune dužine (fAd). S druge strane, u cirkulaciji se u izuzetno malim koncentracijama može naći i globularni domen adiponektina (gAd), koji se nastaje proteolitičkim cepanjem pod dejstvom leukocitne elastaze na mestu inflamacije (46, 47).

Koncentracije adiponektina kod zdravih osoba se kreću u rasponu od 2 do 20 mg/L, što čini oko 0,01-0,05% proteina plazme (48). Žene imaju više koncentracije adiponektina u odnosu na muškarce, pri čemu se ova razlika uočava ne samo na nivou ukupne koncentracije adiponektina već i na nivou distribucije pojedinih formi (49-51). Naime, kod žena je više zastupljena HMW forma adiponektina, dok je kod muškaraca ravnoteža više pomerena ka MMW i LMW formama. Za sada nema jasnih podataka na koji način bi polni hormoni, estrogen i testosteron, mogli uticati na nivo cirkulišućeg adiponektina. Ipak, viši nivoi adiponektina kod žena mogli bi biti objašnjenje zašto su žene osetljivije na dejstvo insulina u odnosu na muškarce (52).

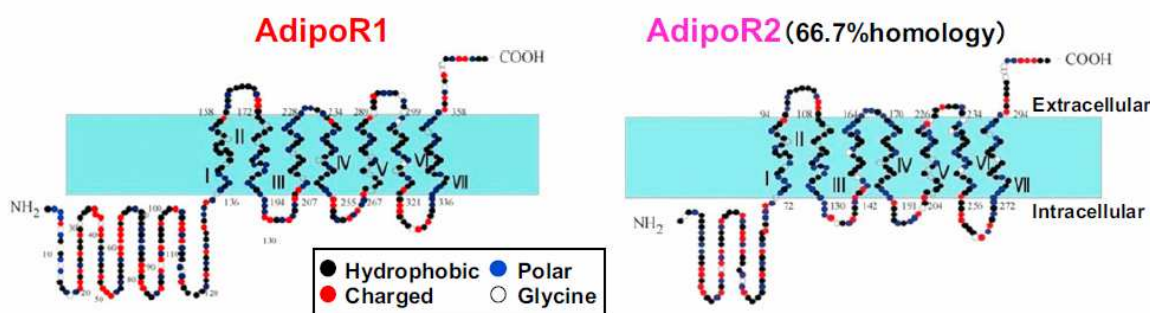
Iako je adiponektin veoma stabilan molekul sa minimalnim stepenom degradacije u cirkulaciji, njegovo poluvreme života je iznenađujuće kratko i iznosi između 45 i 75 minuta u zavisnosti od tipa oligomera (53, 54). Smatra se da pojedine reakcije u okviru post-translacionih modifikacija imaju veliki uticaj na vreme zadržavanja adiponektina u cirkulaciji. Pokazano je da vezivanje sijalinske kiseline na ostatke treonina značajno produžava poluvreme života adiponektina u cirkulaciji, dok enzimsko uklanjanje ovih ostataka značajno ubrzava njegovo uklanjanje iz cirkulacije (55). Jetra predstavlja glavni organ koji uklanja i razgrađuje adiponektin iz cirkulacije, dok bubrezi imaju ulogu samo u eliminaciji nastalih razgradnih produkata (54).

Nivoi adiponektina, a naročito HMW forme, su pod uticajem cirkadijalnog ritma, pri čemu je koncentracija adiponektina niža tokom noći u odnosu na druge periode dana (56).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da adiponektin pojačava osetljivost perifernih tkiva na insulin, deluje antiinflamatorno i antiapoptotski, te da njegov nedostatak može biti povezan sa razvojem različitih bolesti. Ovi efekti su pre svega posredovani vezivanjem adiponektina za njegova dva receptora označena kao AdipoR1 i AdipoR2 koja su prisutna na ćelijama različitih tkiva.

## 1.5. Adiponektinski receptori i transdukcija signala

Adiponektinski receptori predstavljaju integralne membranske proteine koji prema topologiji izuzetno podsećaju na receptore vezane za G-protein (GPCR), ali za razliku od njih poseduju N-terminalni domen unutar ćelije, dok je C-terminalni segment smešten ekstracelularno (Slika 5) (57). Geni za AdipoR1 i AdipoR2 se kod ljudi nalazi na prvom i dvanaestom hromozomu (1q32; 12p13) (58). Iako postoji veoma velika strukturna sličnost između ova dva receptora (67% aminokiselinske sekvence je identično), oni različitim afinitetom vezuju različite oligomernne forme adiponektina (57). AdipoR1 je receptor koji poseduje visok afinitet za globularni adiponektin, dok AdipoR2 prevashodno vezuje adiponektin pune dužine (HMW) (57).



Slika 5. Predložena struktura adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 (Preuzeto iz: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005 May 1;26(3):439-51.)

Adiponektinski receptori su klonirani 2003. godine i od tada je dokazano njihovo prisustvo na ćelijama različitih tkiva i organa (skeletalni mišići, slezina, jetra, srce, masno tkivo, bubrezi, pluća, pankreas, monociti, makrofage). Međutim, zastupljenost ovih receptora nije ista u svim organima. Ćelije skeletnih mišića predominantno ekspimiraju AdipoR1, dok ćelije jetre ekspimiraju pre svega AdipoR2 (56).

Aktivacija adiponektinskih receptora pokreće veći broj signalnih puteva unutar ćelije (Slika 6). Vezivanje adiponektina za AdipoR1 dovodi do fosforilacije AMP-zavisne protein kinaze i inhibicije acetil-KoA karboksilaze čime se povećava oksidacija masnih kiselina i transport glukoze u mišićima, a smanjuje ekspresija enzima glukoneogeneze (fofoenolpiruvat-karboksilaze i glukoza-6-fosfataze) u jetri (59-61). Adiponektin preko AdipoR1 takođe povećava intracelularnu koncentraciju Ca<sup>2+</sup> i dovodi do aktivacije Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-zavisne protein-kinaza kinaze β, nakon čega dolazi do aktivacije SirT1,

povećanja ekspresije i smanjenja acetilacije PPAR $\gamma$  koaktivatora 1 $\alpha$  i povećanja broja mitohondrija u skeletnim mišićima (62). N-terminalni domen AdipoR1 vezuje adaptorni protein APPL1 (sadrži plekstrin homologni domen, domen koji vezuje fosforilisane ostatke tirozina i motiv leucinskog rajsferšlusa), a ova interakcija je takođe važna za procese aktivacije AMP-zavisne protein kinaze, oksidacije masnih kiselina i preuzimanja glukoze (63). Pored APPL1, pokazano je da i drugi adaptorni proteini kao što su RACK1, ERp46 i CK2 $\beta$  prepoznaju intracelularni domen AdipoR1 (64-66).

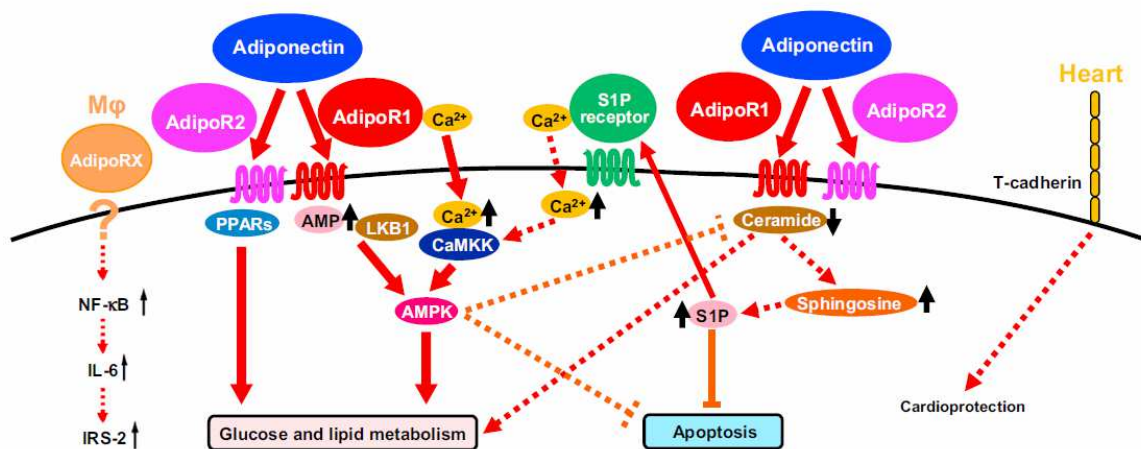
Adiponektin povećava aktivnost PPAR $\alpha$  liganada kao i ekspresiju samog PPAR $\alpha$  preko AdipoR2, stimulišući tako oksidaciju masnih kiselina i sveukupnu potrošnju energije u ćeliji (67). Ovi efekti delimično se ostvaruju zahvaljujući povećanoj ekspresiji UCP-2 i acetil-KoA oksidaze koji u svojim promotornim regionima sadrže elemente za vezivanje PPAR $\alpha$  (68).

Pored navedenih signalnih puteva, adiponektin aktivira i tkz. ceramidski put u okviru koga se u ćeliji povećava ceramidazna aktivnost, smanjuje koncentracija ceramida i povećava koncentracija sfingozin-1-fosfata (69). Kako ceramid blokira translokaciju iz citoplazme na ćelijsku membranu i promovira defosforilaciju Akt/PKB, smanjujući tako osetljivost ćelija na insulin, smanjenje njegove koncentracije u ćeliji može biti značajan korak u borbi adiponektina protiv insulinske rezistencije. S druge strane, povećanje koncentracije sfingozin-1-fosfata igra značajnu ulogu u odbrani ćelija od apoptoze (69). Da bi se ceramidski put aktivirao neophodno je da adiponektin ostvari interakciju sa oba svoja receptora. S obzirom da adiponektinski receptori pripadaju PAQR (progesteron i adipoQ receptor) porodici membranskih proteina koji sadrže sekvencu homolognu alkalnoj ceramidazi, ostaje nejasno da li ceramidazna aktivnost potiče od samih receptora ili se za sada nepoznatim mehanizmom vrši aktivacija ceramidaze u citoplazmi (69).

Signali koji se pokreću vezivanjem adiponektina za AdipoR1 i AdipoR2 smanjuju aktivaciju NF- $\kappa$ B u stanjima pojačane inflamacije (70, 71). S druge strane, dokazano je da adiponektin povećava produkciju IL-6 u makrofagama upravo aktivirajući NF- $\kappa$ B, ali ova aktivacija ne uključuje AdipoR1 i AdipoR2, već novi, za sada neopisan, receptor označen kao AdipoRX (72, 73).

Efekti adiponektina nisu isključivo posledica njegove interakcije sa AdipoR1 i AdipoR2. Membranski protein T-kaderin pokazuje visok afinitet prema MMW i HMW adiponektinu (74). Ovaj membranski protein ne poseduje intracelularni domen i samim time nije u stanju da promovira stvaranje signala u ćeliji, pa se smatra da je njegovo prisustvo neophodno kako bi se obezbedilo adekvatno vezivanje adiponektina. To potvrđuju i

eksperimenti na T-kaderin deficijntnim miševima kod kojih adiponektin nije bio u stanju da se veže za srčane mišićne ćelije i ostvari svoje dejstvo (75).



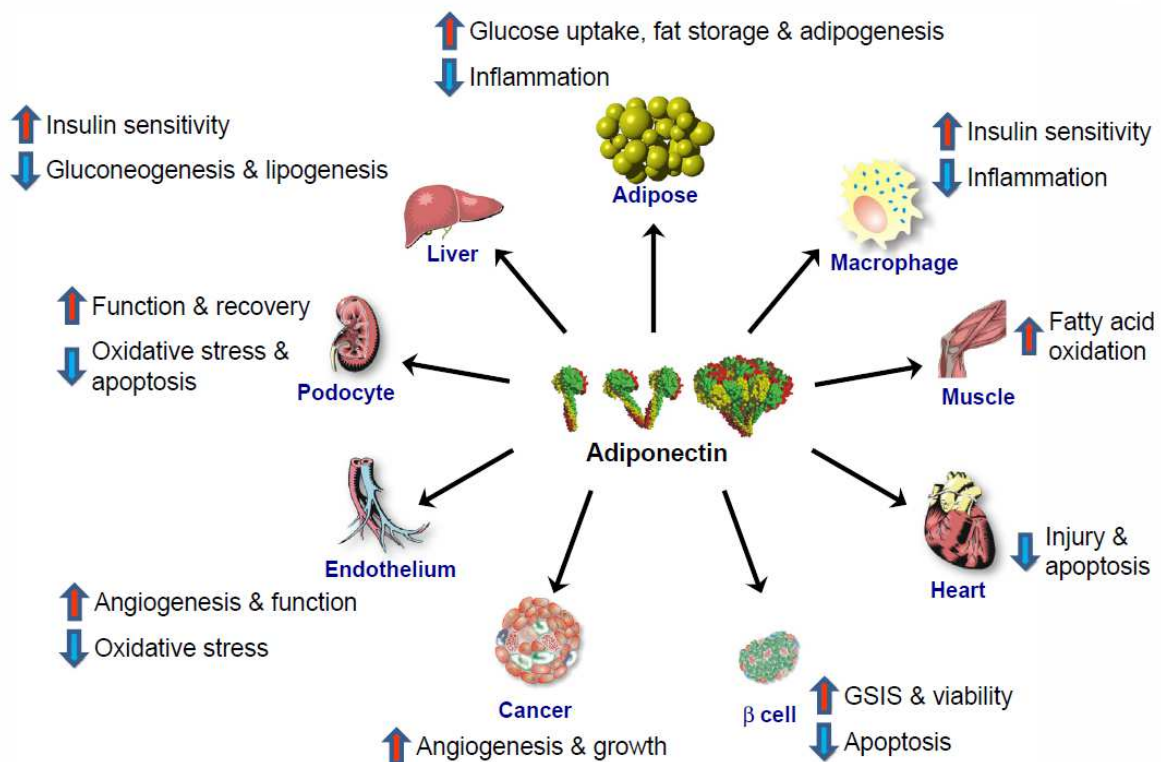
Slika 6. Ćelijska signalizacija nizvodno od adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 (Preuzeto iz: Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. Cell metabolism. 2013 Feb 5;17(2):185-96.

## 1.6. Metabolički efekti adiponektina na nivou razliĉitih tkiva

Široka distribucija adiponektinskih receptora u organizmu, kao i veliki broj signalnih puteva koji se pokreću njihovim aktiviranjem omogućava adiponektinu da ostvari znaĉajno delovanje na veliki broj razliĉitih tkiva i organa. Anti-inflamatorni i anti-aterosklerotski efekti adiponektina kao i njegovo suprotstavljanje insulinskoj rezistenciji su posledica istovremenog dejstva ovog adipokina na više ciljnih tkiva (Slika 7).

Kardioprotektivno dejstvo adiponektina ogleda se u njegovoj sposobnosti da smanji mogućnost razvoja ishemije miokarda što je demonstrirano u eksperimentima na adiponektin deficijntnim i T-kaderin deficijntnim miševima (74, 75). Ne sme se izgubiti iz vida ni to da adiponektin istovremenim vezivanjem za AdipoR1 i AdipoR2 aktivira ceramidski put u kome se povećava produkcija sŕingozin-1-fosfata koji je potentan inhibitor apoptoze srĉanih mišićnih ćelija (69). S druge strane, hiperinsulinemija indukovana gojaznošću smanjuje ekspresiju AdipoR1 na srĉanim mišićnim ćelijama preko PI3K/Akt i FoxO1 puta (76). Smanjena ekspresija AdipoR1 na srĉanim mišićnim ćelijama onemogućava aktivaciju AdipoR1/LKB/AMPK puta preko koga adiponektin stimuliše produkciju VEGF u srĉanom mišiću i tako kontroliše procese srĉane angiogeneze i remodelovanja srĉanog mišića (77).

Adiponektin ispoljava i značajan antiaterosklerotski efekat na nivou endotela krvnih sudova inhibicijom ekspresije adhezivnih molekula kao što su intracelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1), vaskularni celularni adhezivni molekul-1 (VCAM) i E-selektin (78). Zahvaljujući sposobnosti da aktivira AMP kinaza-eNOS i cAMP-PKA signalne puteve, adiponektin smanjuje intenzitet oksidativnog stresa u endotelnim ćelijama krvnih sudova, dok aktivacijom kalretikulin/CD91-PI3K-Akt-COX2 puta promoviše revaskularizaciju u mišićima koji su oštećeni ishemijom (79-82).



Slika 7. Fiziološki efekti adiponektina (Preuzeto iz: Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? Molecular metabolism. 2013 Aug 31;2(3):133-41.)

Rezultati nekoliko studija izvedenih na miševima svedoče da adiponektin štiti podocyte od oksidativnog stresa i smanjuje njihovu propustljivost za albumin na osnovu čega bi se moglo zaključiti da adiponektin ostvaruje zaštitni efekat na nivou bubrega (83, 84). Međutim, pacijenti sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom imaju paradoksalno povišene vrednosti cirkulišućeg adiponektina sa zasada nepoznatim uzrokom.

Na nivou pankreasa adiponektin aktivacijom PPAR $\gamma$ , MEK-Erk i PI3K-Akt signalnih puteva promoviše sekreciju insulina stimulisanu glukozom (GSIS), sprečava apoptozu i povećava preživljavanje  $\beta$ -ćelija pankreasa pod različitim uslovima (85-87). Slično kao i u slučaju srčanih mišićnih ćelija, navedeni efekti su vezani za aktivaciju ceramidskog puta (69).

Pod uticajem adiponektina osetljivost jetre na insulin se povećava što vodi ka značajnom smanjenju u jetrenoj produkciji glukoze čak i pri niskim koncentracijama insulina (48). Aktiviranje AdipoR1/LKB1/AMPK puta smanjuje aktivnost i ekspresiju regulatornih enzima u procesu glukoneogeneze, fosfoenolpiruvat karboksilaze i glukoza-6-fosfataze (58, 89). S druge strane, aktiviranje ovog signalnog puta smanjuje ekspresiju SREBP1c i inhibira aktivnost acetil-KoA karboksilaze što za posledicu ima sniženje koncentracije triglicerida i neesterifikovanih masnih kiselina u cirkulaciji (88). Preko ceramidskog puta adiponektin takođe smanjuje lipotoksične efekte u jetri i poboljšava osetljivost hepatocita na insulin. Značajno je naglasiti da krajnje hipoglikemijsko dejstvo adiponektina mnogo više zavisi od njegove sposobnosti da smanji jetrenu produkciju glukoze, nego što zavisi od njegovog uticaja na potrošnju glukoze od strane perifernih tkiva (48).

Anti-inflamatorni efekti adiponektina posledica su njegovog direktnog delovanja na makrofage. Adiponektin usmerava diferencijaciju makrofaga od pro-inflamatornog M1 tipa ka anti-inflamatornom M2 tipu IL-4/SATAT6 zavisnim mehanizmom i inhibira ekspresiju *scavenger* receptora klase A-1 smanjujući tako preuzimanje oksidovanog LDL i nastajanje penastih ćelija (90, 91).

Adipozno tkivo ne predstavlja samo izvor cirkulišućeg adiponektina, već i vrlo značajno ciljno tkivo. Na nivou adipocita adiponektin povećava preuzimanje glukoze i skladištenje lipida, a smanjuje produkciju onih citokina koji deluju kao posrednici u razvoju insulinske rezistencije u mišićnim ćelijama (91, 92). Skladištenje lipida pod uticajem adiponektina usmerava se prema subkutanom masnom tkivu, umesto prema jetri i visceralnom masnom tkivu (88). Kod gojaznih pacijenata bez metaboličkih poremećaja adiponektin je izdvojen kao jedan od mogućih promotora anti-inflamatornog dejstva (93).

Adiponektin u skeletnim mišićima pokreće niz signala koji dovode do povećane aktivnosti mitohondrija i oksidacije masnih kiselina. Aktivacijom AMPK puta inhibira se acetil-KoA karboksilaza, povećava ekspresija acetil-KoA oksidaze i UCP-2, aktivira p38, MAPK, i PPAR $\alpha$ , povećava koncentracija intracelularnog Ca<sup>2+</sup> i stimuliše aktivnost Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-zavisne protein-kinaza kinaze  $\beta$  (59-62). Svi navedeni podaci rezultat su *in vitro* ili *in vivo* eksperimenta u kojima je stimulacija receptora vršena globularnim adiponektinom, čija je koncentracija u cirkulaciji izuzetno mala što stavlja pod znak pitanja fiziološku relevantnost delovanja adiponektina na skeletne mišiće (48). S druge strane, eksperimenti sa obeleženim adiponektinom nisu pokazali da skeletni mišići predstavljaju značajno ciljno mesto delovanja ovog adipokina (54). Za sada ostaje nejasno kako bi



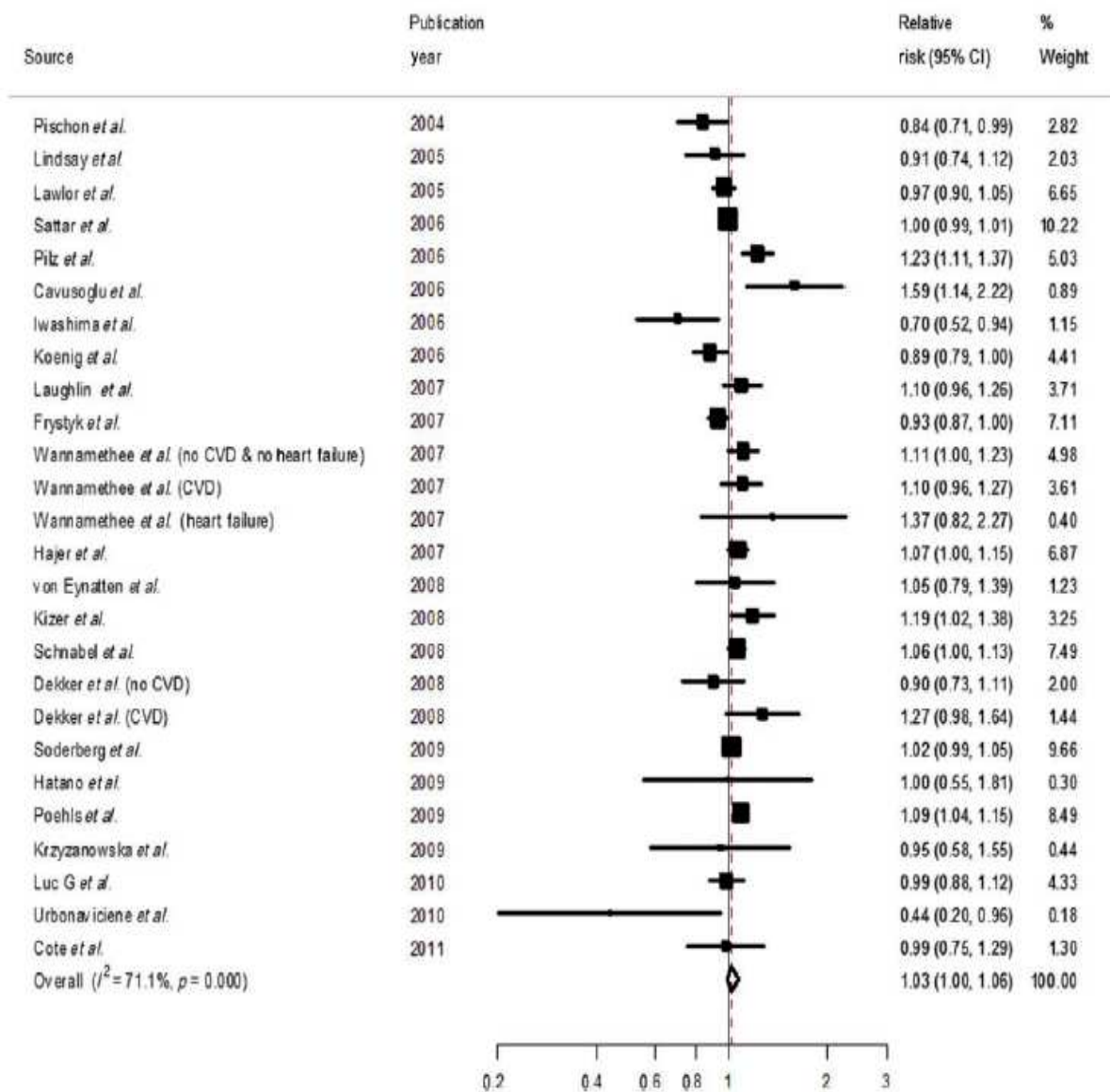
visokomolekularni oligmerni kompleksi adiponektina uopšte mogli proći kroz endotelnu barijeru i ostvariti adekvatno dejstvo na svoje receptore u ćelijama skeltenih mišića (88).

Prikazani rezultati dokazuju značajnu ulogu adiponektina u homeostazi različitih fizioloških procesa i ukazuju na njegov potencijalni značaj u definisanju rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

### **1.7. Značaj ispitivanja koncentracije adiponektina u koronarnoj srčanoj bolesti i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji**

U skladu sa opisanim efektima adiponektina, istraživanja na pacijentima koji pate od gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma nedvosmisleno ukazuju da su navedena stanja udružena sa niskim koncentracijama cirkulišućeg adiponektina (94-98). Takođe, skorija meta-analiza je pokazala da osobe sa višim vrednostima adiponektina imaju manji rizik za razvoj dijabetesa tipa 2 (99). Međutim, kada je reč o ulozi adiponektina u koronarnoj srčanoj bolesti, rezultati dosadašnjih studija su nekonzistentni (Slika 8) (100-118). Određeni broj studija pokazao da su više vrednosti adiponektina kod osoba sa KSB udružene sa manjim rizikom od smrtnog ishoda. S druge strane, 2013. godine izvršena je opsežna i sistematična meta-analiza koja obuhvatila čak 24 prospektivne studije (30.945 subjekata) o povezanosti adiponektina i KSB (119). Rezultati ove meta-analize ukazuju da su povišene vrednosti cirkulišućeg adiponektina udružene sa povećanim rizikom od ukupnog mortaliteta i mortaliteta povezanog sa KVB. Nije u potpunosti jasno koji mehanizmi leže u osnovi ove paradoksalne veze između adiponektina i mortaliteta u KSB i zašto njegovi zaštitni efekti demonstrirani u brojnim eksperimentalnim modelima nisu potvrđeni u kliničkim studijama na pacijentima sa KSB. Jedan od mogućih uzroka oko koga se spekulise nekoliko poslednjih godina jeste i razvoj adiponektinske rezistencije, stanja u kome bi nishodna regulacije adiponektinskih receptora bila odgovorna za izostajanje njegovih zaštitnih efekata što bi posledično dovelo i do kompenzatornog povećanja njegove koncentracije (34, 67). S obzirom da već postoje klinička ispitivanja zasnovana na primeni agonista adiponektina i terapijskih agenasa koji povećavaju produkciju adiponektina trebalo bi uzeti u obzir mogućnost izostajanja pozitivnih efekata adiponektina usled razvoja rezistencije (120).





Slika 8. Relativni rizici za razvoj KV događaja po povećanju jedne standardne devijacije logaritamski transformisane vrednosti adiponektina u studijama obuhvaćenim meta-analizom koju su sproveli Lee i saradnici. Veličina kvadrata predstavlja značaj svake od analiziranih studija. (Preuzeto iz: Lee ES, Park SS, Kim E, Yoon YS, Ahn HY, Park CY, Yun YH, Oh SW. Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. International journal of epidemiology. 2013 Jun 4:087.)

Povišene vrednosti adiponektina kod pacijenata sa HBI insuficijencijom dokazane su u brojnim studijama. Međutim, kao i u slučaju KSB dosadašnje studije nisu dale jednoglasan odgovor na pitanje da li povišene vrednosti adiponektina igraju zaštitnu ulogu kod pacijenata sa HBI. Prve studije izvedene na relativno malom broju pacijenata ukazuju da su visoke vrednosti adiponektina udružene sa manjim rizikom od smrtnosti povezane sa KVB (121, 122), dok skorije i opsežnije studije pokazuju suprotno (123-125). Rezultati MDRD studije ukazuju da povećanje koncentracije cirkulišućeg adiponektina za 1 $\mu$ g/mL povećava rizik od mortaliteta udruženim sa KVB za 6% (124), dok je u studiji na 438 pacijenata koji pate od dijabetesa tipa 1 pokazano da visoke vrednosti adiponektina predviđaju progresiju ka terminalnim stadijumima HBI, kao i da su udruženi sa povećanim rizikom od mortaliteta (125). Uzroci povišenih vrednosti adiponektina u HBI za sada nisu u potpunosti poznati. Kao mogući uzroci navode se poremećaji na nivou ose receptor/ligand (126), smanjen bubrežni klirens adiponektina (127), metabolički rearanžman u uremiji (128), promene u zatupljenosti pojedinih oligomera (124), kao i poremećaji na nivou post-translacionih modifikacija koji uzrokuju stvaranje forme adiponektina koja je manje biološki aktivna (124). Ne sme se izgubiti iz vida ni to da gubitak telesne mase prati HBI, te da povećanje koncentracije adiponektina delimično može biti posledica smanjenja BMI.

Kontradiktornost rezultata prethodnih studija i mogućnost razvoja adiponektinske rezistencije naglašava potrebu za istraživanjima koja nedostatak protektivnog efekta adiponektina ne bi posmatrala samo kroz prizmu njegove koncentracije u krvi već i kroz sposobnost ciljnih ćelija da odgovore na njegovo dejstvo. U tom smislu određivanje nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora moglo bi pružiti dodatne odgovore zašto i pored visokih koncentracija adiponektin nije u stanju da ostvari svoje efekte.

## **1.8. Transkriptom mononuklearnih ćelija periferne krvi kao dijagnostičko sredstvo**

S obzirom da su tkiva koja su zahvaćena određenim patološkim procesom često teško dostupna, veći broj studija ispitivao je mogućnost upotrebe mononuklearnih ćelija periferne krvi kao surogat tkiva čiji bi transkriptom mogao poslužiti u dijagnozi i prognozi različitih bolesti. Dosadašnje studije ukazuju da mononuklerane ćelije periferne krvi mogu biti značajan izvor korisnih informacija kada je u pitanju profil genske ekspresije u bolestima ne-hematološkog porekla (130, 131). Promene u ekspresionom profilu ćelija periferne krvi do sada su uočene kod pacijenata sa juvenilnim artiritom, hipertenzijom, kancerom, hroničnim umorom, neurološkim povredama, lupusom, transplatacijom, šizofrenijom, kao i usled uticaja

fizičke aktivnosti, pušenja i izlaganja različitim toksičnim agensima (130, 131). Mononuklearne ćelije periferne krvi su lako dostupne, sadrže veliki broj aktivnih gena, dolaze u kontakt sa gotovo svim delovima organizma, a promene u sredini u kojoj se nalaze utiču na njihovu gensku ekspresiju. Smatra se da usled kontinuiranih interakcija između ćelija krvi i ostatka organizma, male promene na nivou različitih tkiva koje su posledica neke bolesti mogu dovesti do specifičnih promena u genskoj ekspresiji krvnih ćelija koje bi bile odraz inicijalnog stimulusa (130).

Uzimajući u obzir da su jetra, skeletni mišići, srčani mišić, adipociti i endotel krvnog suda tkiva koja predstavljaju značajna ciljna mesta za delovanje adiponektina teško dostupna, u našoj studiji je nivo ekspresije adiponektinskih receptora određen u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

## 2.CILJ

Rezultati velikog broja *in vitro* i *in vivo* eksperimenata na životinjama svedoče o izuzetno značajnim antiinflamatornim, antiaterosklerotskim, antiapoptotskim i kardioprotektivnim efektima adiponektina. Veliki broj studija potvrdio je pozitivne efekte adiponektina kod osoba koje pate od gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma. Međutim, kada je reč o KSB i HBI rezultati dosadašnjih studija povezuju povišene vrednosti adiponektina sa povećanim rizikom od ukupnog mortaliteta bez jasnog odgovora šta bi mogao biti uzrok ovakvog paradoksa. Pojedini autori kao uzrok nedostatka adiponektinskih efekata navode mogućnost pojave adiponektinske rezistencije koja se manifestuje nishodnom regulacijom adiponektinskih receptora i kompenzatornim rastom koncentracije adiponektina. Kako bi proverili da li je adiponektinska rezistencija udružena sa KSB i HBI postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Odrediti nivo genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom i utvrditi razlike u odnosu na zdrave ispitanike.
- Odrediti nivo cirkulišućeg adiponektina u plazmi pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom i utvrditi razlike u odnosu na zdrave ispitanike.
- Ispitati povezanost genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i nivoa cirkulišućeg adiponektina sa stepenom stenoze kod pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću.
- Ispitati povezanost nivoa genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i cirkulišućeg adiponektina sa antropometrijskim karakteristikama ispitanika i tradicionalnim lipidnim i nelipidnim faktorima rizika.
- Ispitati povezanost insulinske rezistencije sa nivoom genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i nivoom cirkulišućeg adiponektina u plazmi ispitanika.

# 3.MATERIJAL I METODE

## 3.1. Ispitanici

Ova studija je obuhvatila 133 ispitanika. Grupu pacijenata sa KSB činilo je 69 osoba (35 muškaraca i 34 žene) starosti od 32 do 82 godine. Grupa pacijenata sa HBI na hemodijalizi sastavljena je od 31 ispitanika (19 muškaraca i 12 žena), starosti od 27 do 76 godina. Kontrolna grupa je formirana od 33 zdrava ispitanika (15 muškaraca i 18 žena), starosti od 27 do 60 godina.

Pacijenti sa KSB su lečeni na Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije tokom 2012. i 2013. godine. Svi pacijenti podvrgnuti su postupku koronarne angiografije kako bi se procenila težina koronarnog oboljenja. Indikacije za koronarnu angiografiju bile su: stabilna angina pektoris, nestabilna angina pektoris, post-ishemična revaskularizacija, infarkt miokarda, atipičan bol u grudima sa pozitivnom istorijom KVB u porodici, srčana insuficijencija, valvulopatije i prisustvo nespecifičnih simptoma (astenia, sinkopa i dispnea). Pacijenti sa dijagnozom akutnog infarkta miokarda, dijabetes mellitus (tip I i II) ili hronične bubrežne insuficijencije nisu bili uključeni u ovu studiju. Tokom koronarne angiografije vršena je procena suženja na desnoj koronarnoj arteriji, levoj descendentnoj arteriji i levoj cirkumfleksus arteriji. Nalaz koronarne angiografije procenjivan je od strane dva iskusna kardiologa bez prethodnog znanja o stanju pacijenata, a odluka se donosila konsenzusom. Prema tome da li u najmanje jednom od tri navedena krvna suda postoji smanjenje lumena veće ili jednako 50% pacijenti su podeljeni u dve grupe: pacijenti bez značajne stenozе (15 muškaraca i 28 žena) i pacijenti sa značajnom stenozom (20 muškaraca i 6 žena). Demografski podaci pacijenata koji obuhvataju starost, telesnu težinu, visinu, pušački status, krvni pritisak kao i podaci o terapiji prikupljeni su anketiranjem ispitanika.

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi lečeni su na Nefrološkoj klinici Kliničkog centra Srbije tokom 2011 godine. Osnovni uzroci koji su kod ovih ispitanika doveli do terminalne faze oštećenja bubrega su: hronični glomerulonefritis (n=6), hronična bubrežna insuficijencija nepoznatog uzroka (n=4), nefroangioskleroza (n=6), nefropatija uzrokovana mokraćnom kiselinom (n=2); Good-Pasture sindrom (n=2), bubrežna kalkuloza (n=2), vezikouretralni refluks (n=2), hipertenzija (n=1); atrofija renis segmentalis (n=1), lupus nefritis (n=1), endemska nefropatija (n=1), hronični pijelonefritis (n=1), bubrežna tuberkuloza (n=1), bubrežni vaskulitis (n=1). Vreme koje je prošlo od kada su pacijenti na hemodijalizi trajalo je od 3 do 248 dana (u proseku 90 dana).

Za potrebe ovog istraživanja kontrolna grupa je formirana od zdravih ispitanika koji su odabrani nakon procene njihovog zdravstvenog stanja. Procena zdravstvenog stanja ispitanika obuhvatila je merenje debljine intime-medije obe karotidne arterije, određivanje parametara lipidnog statusa, prikupljanje osnovnih demografskih podataka anketiranjem (starost, telesna težina, visina, krvni pritisak, pušački status, podaci o eventualnoj terapiji lekovima, porodična istorija KVB u prvostepenom srodstvu). Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz studije prilikom formiranja kontrolne grupe bili su:

- prisustvo KVB ili bilo koje druge sistemske inflamatorne ili metaboličke bolesti, bolesti jetre ili bubrega;
- prisustvo KVB u porodičnoj istoriji;
- debljina intime-medije veća od 1 mm u bar jednoj karotidnoj arteriji;
- prisustvo hipertenzije (dijastolni krvni pritisak  $\geq 90$  mm Hg i/ili sistolni krvni pritisak  $\geq 140$  mm Hg) ili terapija antihipertenzivnim lekovima;
- nepovoljan lipidni profil definisan Adult Treatment Panel III preporukama: UH  $> 5,16$  mmol/L, LDL-H  $> 3,35$  mmol/L, HDL-H  $< 1,03$  mmol/L, TG  $> 1,70$  mmol/L ili upotreba lekova iz grupe hipolipemika;
- koncentracija glukoze u plazmi na tašte  $> 6,1$  mmol/L;
- prisustvo gojaznosti (BMI  $> 30$  kg/m<sup>2</sup>).

Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Deklaracijom iz Helsinkija, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta. Svi ispitanici su dali pisani pristanak za učestvovanje u istraživanju.

Uzorci krvi su uzeti iz prednje kubitalne vene od svih ispitanika nakon dvanaestočasovnog noćnog gladovanja. Venekpunkcija je izvođena dok su ispitanici bili u sedećem položaju. Krv je sakupljena u epruvete sa EDTA (za dobijanje plazme) ili separacionim gelom (za dobijanje seruma). Serum i plazma odvojeni su od krvnih ćelija u roku od jednog sata, nakon čega su uzorci podeljeni u više porcija i zamrznuti na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nakon odvajanja plazme, sediment ćelija je korišten za izolovanje mononuklearnih ćelija periferne krvi na *Ficoll-Paque Plus* (GE Healthcare Life Science) gustinskom gradijentu. Izolovane mononuklearne ćelije potom su isprane u PBS puferu, suspendovane u TRIZOL reagensu i zamrznute na  $-80^{\circ}\text{C}$  do izolacije RNK. Osnovni biohemijski parametri i adiponektin određeni su u uzorcima EDTA plazme. Koncentracije insulina i hsCRP određene su u uzorcima seruma. Nivo iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 određen je u izolovanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

## 3.2. Određivanje koncentracije adiponektina u plazmi

Koncentracija adiponektina određena je ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) tehnikom, korišćenjem testa *Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA (R&D)*.

### 3.2.1. Princip Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA

Princip metode zasniva se na kvantitativnoj sendvič enzim-imunoesej tehnici. Bazeni ploče u kojoj se određivanje izvodi prethodno su (od strane proizvođača) obloženi monoklonskim antitelima specifičnim za globularni domen adiponektina. Slepa proba, standardi i uzorci se potom nanose u bazene ploče pri čemu svi molekuli adiponektina bivaju vezani monoklonskim antitelima čime se postiže njihova imobilizacija. Nakon dvočasovne inkubacije, ispiranjem se vrši uklanjanje svih nevezanih supstanci, a potom dodaje monoklonsko antitelo obeleženo enzimom (peroksidaza rena) koje je specifično za globularni domen adiponektina. Ova reakcija takođe zahteva dvočasovnu inkubaciju. Ispiranjem se uklanjaju nevezana monoklonska antitela obeležena enzimom nakon čega dodajemo rastvor supstrata (vodonik-peroksid i 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) pri čemu se razvija boja koja je proporcionalna koncentraciji inicijalno vezanog adiponektina. Bojena reakcija se zasniva na oksidaciji TMB do obojenog 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin diimina. Naime, peroksidaza rena oksiduje TMB uz pomoć vodonik-peroksida, pri čemu se razvija plava boja. Reakcija se zaustavlja dodatkom 2N sumporne kiseline što dovodi do promene boje rastvora iz plave u žutu. Intenzitet boje meri se na 450 nm.

Prema uputstvu proizvođača uzorci su pre nanošenja na ploču razblaženi 100 puta upotrebom reagens diluenta (puferovani rastvor proteina sa konzervansima) koji je obezbeđen od strane proizvođača (10 µL plazme + 990 µL reagens diluenta).

Za potrebe izrade standardne krive liofilizovan standard dopremljen od strane proizvođača je rekonstituisan upotrebom odgovarajućeg diluenta. Od ovako pripremljenog primarnog standarda, prema uputstvima proizvođača, serijskim razblaženjem dobijeno je 6 standarda sledećih koncentracija: 125 µg/L, 62,5 µg/L, 31,2 µg/L, 15,6 µg/L, 7,8 µg/L i 3,9 µg/L. Svi standardi su na ploču nanošeni u duplikatu.

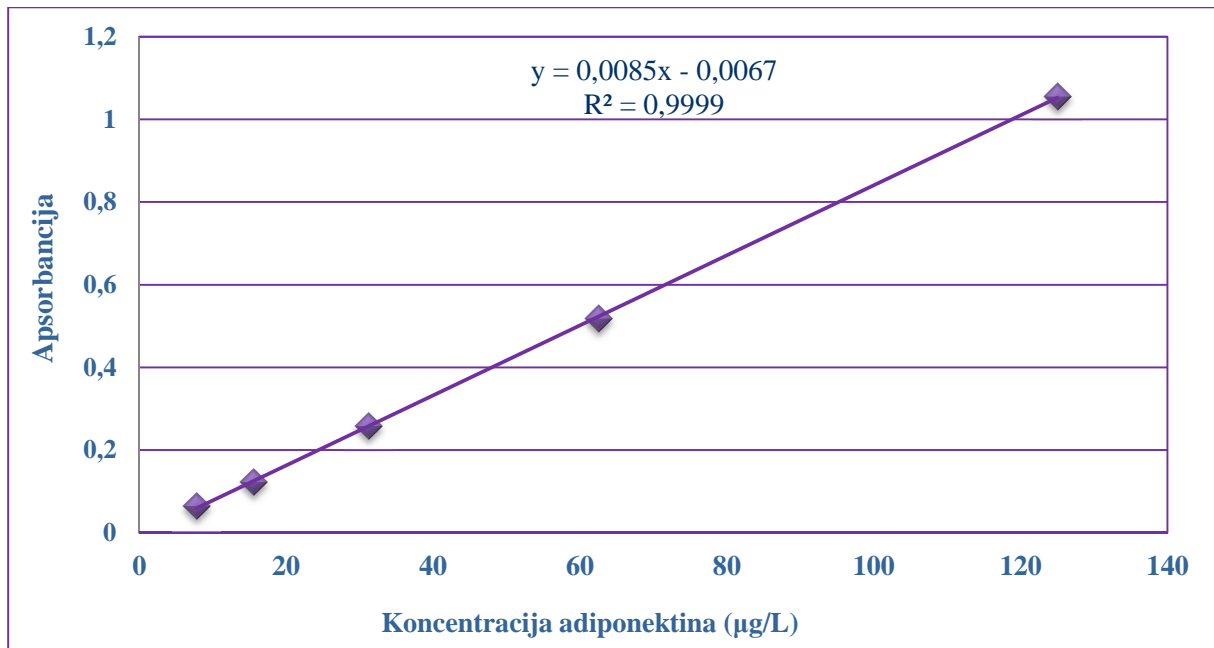
Kao slepa proba upotrebljen je reagens diluent.

Slepa proba, standardi i razblaženi uzorci su na ploču nanošeni u količini od 50 µL.

Uzorci pacijenata koji pate od KSB bili su nanoseni na jednu ploču, dok su uzorci pacijenata sa HBI na hemodijalizi i zdravih ispitanika nanoseni na drugu ploču.

### 3.2.2. Obrada rezultata

Koncentracija adiponektina u plazmi ispitanika izračunata je iz dobijenih jednačina standardne krive uzimajući u obzir početno razblaženje uzorka. Svi uzorci čije su apsorbancije bile van opsega odgovarajuće standardne krive, razblaženi su 200 puta i određivanje adiponektina je ponovljeno. Dobijeni rezultati izraženi su u mg/L.

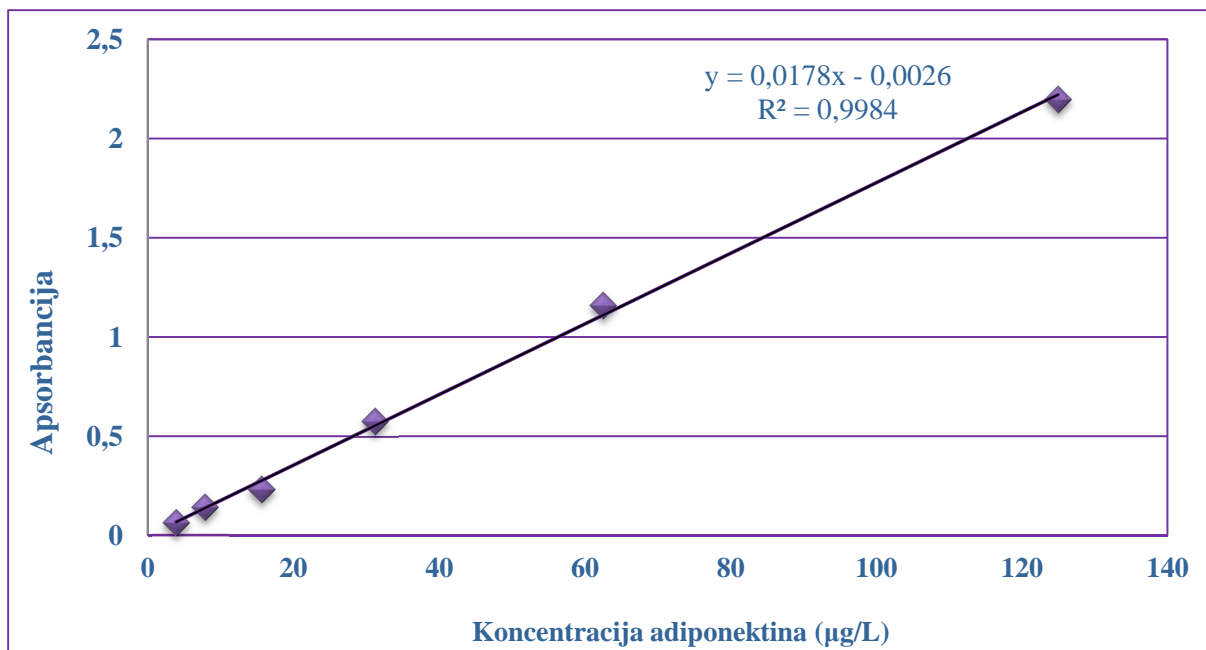


Slika 9. Standardna kriva prema kojoj je izračuna vrednost koncentracije adiponektina za pacijente sa KSB.

Koncentracija adiponektina u uzorcima pacijenta sa KSB izračunata je prema sledećoj formuli:

$$C_{\text{adiponektin}} = \frac{100 * (A - 0,0067)}{0,0085}$$

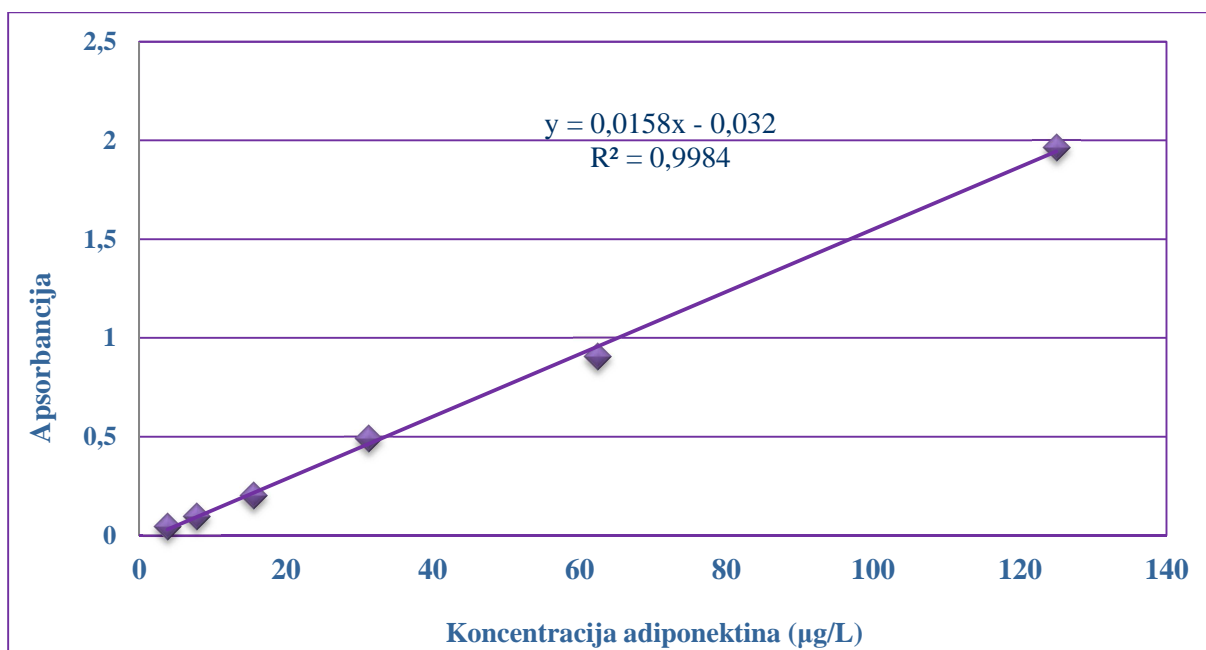




Slika 10. Standardna kriva prema kojoj je izračunata vrednost koncentracije adiponektina za pacijente sa HBI na hemodijalizi i zdrave ispitanike

Konzentracija adiponektina u uzorcima pacijenta sa HBI i zdravih ispitanika izračunata je prema sledećoj formuli:

$$C_{\text{adiponektin}} = \frac{100 * (A - 0,0026)}{0,0178}$$



Slika 11. Standardna kriva prema kojoj je izračunata vrednost koncentracije adiponektina za sve uzorke koji su ponovljeni nakon razblaženja od 200 puta

Koncentracija adiponektina u ponovljenim uzorcima izračunata je prema sledećoj formuli:

$$C_{\text{adiponektin}} = \frac{200 * (A - 0,0032)}{0,0158}$$

### 3.2.3. Metrološke karakteristike testa: Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA

Proizvođač je dao detaljne podatke testa za preciznost, osetljivost, linearnost i očekivane vrednosti u zdravoj populaciji.

Da bi se procenila preciznost unutar serije korištena su tri uzorka poznate koncentracije na jednoj ploči (Tabela 1). Preciznost između serija procenjena je upotrebom tri uzorka poznate koncentracije na 40 različitih ploča (tabela). U izvođenu eksperimenata za određivanje preciznosti učestvovala su najmanje tri osobe koje su koristile dva različita lota reagenasa.

Tabela 1. Preciznost Human Total Adiponectin/Acrp 30 Quantikine® ELISA testa unutar i između serija (Preuzeto iz uputstva proizvođača).

Uzorak	Preciznost unutar serije			Preciznost između serija		
	1	2	3	1	2	3
<b>N</b>	20	20	20	40	40	40
<b>Srednja vrednost (µg/L)</b>	19,8	69,9	143	20,5	74,4	157
<b>Standardna devijacija</b>	0,50	2,40	6,76	1,40	4,30	10,8
<b>Koeficijent varijacije (%)</b>	2,5	3,4	4,7	6,8	5,8	6,9

Osetljivost testa je 0,891 ng/mL. Opseg merenja testa iznosi 3,90-125 ng/mL. U uzorcima 60 zdravih ispitanika proizvođač je odredio koncentraciju adiponektina. Prosečna koncentracija iznosila je 6641 ng/mL sa standardnom devijacijom od 3665 ng/mL. Ukrštena reaktivnost sa poznatim molekulima slične strukture (4-1BB, APRIL, BAFF/BlyS, CD27, CD30 ligand, CD40 ligand, Fasligand, GITR ligand, LIGHT, LT-α1/β2, LT-α2/β1, OX40 ligand, TNF-α, TNF-β, TRAIL, TRANCE, TWEAK, VEGI) manja je od 0,5%.

### 3.3. Određivanje nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Nivoi iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi određeni su *real-time PCR* metodom pri čemu je za kvantifikaciju korišćena metoda relativne standardne krive. Određivanju nivoa iRNK adiponektinskih receptora prethodili su sledeći koraci:

- izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi
- izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi
- određivanje koncentracije RNK i procena čistoće uzorka
- provera integriteta RNK u uzorku
- reakcija reverzne transkripcije

Tokom svih navedenih faza eksperimenta poštovani su svi protokoli kako bi se obezbedio odgovarajući nivo kvaliteta, izbegla eventualna ukrštena kontaminacija reagenasa i uzoraka ili izazvala razgradnja RNK. To podrazumeva da se pre rada sve radne površine i pipete prebrišu 10% rastvorom hipohlorita (razaranje eventualno prisutnih nepoželjnih RNK i DNK molekula), 70% rastvorom etanola (rastvaranje hipohlorita kako ne bi ostvario razarajuće dejstvo na uzorke od značaja) i RNaseZap<sup>®</sup> maramica (inhibicija eventualno prisutnih RNAza). Tokom svih faza rada korišteni su isključivo sterilni nastavci za pipete, vialice i ploče za izvođenje *PCR* reakcije. Sav potrebni materijal je pre početka rada izložen delovanju UV lampe najmanje 20 minuta. Pored svega navedenog, da bi bili sigurni da tokom samog rada nije došlo do značajne kontaminacije korištena su tri nivoa kontrole:

- TF- *transcriptase free* kontrola služi kako bi se otkrilo postojanje kontaminacije genomskom DNK koja bi mogla biti detektovana tokom *real-time PCR* reakcije. Ova kontrola se priprema tokom faze reverzne transkripcije i sadrži sve što je potrebno za reakciju osim enzima reverzne transkriptaze.
- NTRT – *no template reverse transcription* je nivo kontrole kojim se proverava da li je došlo do kontaminacije reagenasa potrebnih za izvođenje reakcije reverzne transkripcije. Ova kontrola se takođe priprema tokom faze reverzne transkripcije i sadrži sve komponente neophodne za reakciju osim uzorka.
- NTC – *no template control* je nivo kontrole kojim se proverava da li je došlo do kontaminacije reagenasa potrebnih za izvođenje *real-time PCR*. Ova kontrola se

priprema tokom faze *real-time PCR* i sadrži sve komponente neophodne za reakciju osim uzorka.

### **3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi**

Mononuklearne ćelije periferne krvi predstavljaju krvne ćelije okruglog jedra, kao što su monociti, T i B limfociti i NK ćelije.

Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi izvršena je upotrebom *Ficoll-Paque Plus* (GE Healthcare Life Science) reagensa prema modifikovanom protokolu proizvođača. Puna krv je uzeta u epruvete sa EDTA radi dobijanja plazme. Nakon centrifugiranja na 3000 obrtaja (RPM) 10 min izdvojena plazma je u potpunosti uklonjena od sedimenta, a zatim je izvršeno sakupljanje ćelija sa površinskog dela sedimenta tkz. *buffy coat* (oko 1 mL). Ovako sakupljene ćelije su potom razblažene sa 1 mL sterilnog PBS pufera i tako razblažen uzorak nanošen je pažljivo na 2 mL *Ficoll-Paque Plus* gustinskog gradijenta koji je prethodno postigao sobnu temperaturu. Uzorak je zatim centrifugiran 20 minuta na 1000xg u centrifugi sa *swing-out* rotorom. Tokom centrifugiranja, ćelije se razdvajaju prema gustini tako da eritrociti i granulociti prolaze kroz gustinski gradijent i talože se na samom dnu epruvete, dok mononuklearne ćelije periferne krvi zaostaju na granici faza između gustinskog gradijenta i vode. Nakon centrifugiranja izvršeno je sakupljanje izdvojenih mononuklearnih ćelijama koje su potom ispirane PBS i centrifugirane na 500xg. Talog mononuklearnih ćelija je potom resuspendovan u 1 mL TRIzol<sup>®</sup> reagensa i zamrznut na -80°C do izolacije RNK.

### **3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi**

Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi sprovedena je uz pomoć TRIzol<sup>®</sup> reagensa prema uputstvu proizvođača. TRIzol<sup>®</sup> reagens predstavlja monofazni rastvor fenola, gvanidin izotiocijanata i drugih komponenti koje omogućavaju izolaciju različitih vrsta RNK. Ovaj reagens održava integritet RNK jer deluje kao efikasan inhibitor RNAzne aktivnosti, olakšava liziranje ćelija i rastvara ćelijske komponente.

Nakon odmrzavanja, mononuklearne ćelije periferne krvi iz uzorka su prvo homogenizovane, a zatim je dodato 200 µL hloroforma, snažno izmešano i posle stajanja na sobnoj temperaturi centrifugirano na 12000xg, 15 minuta pri temperaturi od 4°C. Tokom centrifugiranja dolazi do formiranja 3 faze, donje fenol-hloroformske u kojoj se nalaze proteini i DNK, interfaze i gornje vodene faze u kojoj se nalaze RNK. Vodena faza je zatim pažljivo sakupljena uz oprez da se istovremeno ne sakupi sadržaj iz interfaze ili donje faze. U sakupljenu vodenu fazu je zatim dodat izopropanol (u zapremini približno istoj zapremini

vodene faze) koji vrši taloženje RNK i nakon petnaestominutne inkubacije na sobnoj temperaturi izvršeno je centrifugiranje na 12000xg, 10 minuta pri temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a talog RNK rastvoren u 75% etanolu, promešan i ponovo centrifugiran na 7500xg, 5 minuta na 4°C. Posle centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog sušen na vazduhu. Korak sušenja taloga se smatra kritičan jer ukoliko traje kratko kasnija analiza može pokazati visoku kontaminaciju organskim rastvaračima, dok ukoliko proces traje dugo i dođe do potpunog sušenja taloga značajno će se smanjiti njegova rastvorljivost pa će kasnija analiza ukazivati na loš odnos apsorbancija 260/280 (<1,6).

Adekvatno osušen talog RNK se potom rastvori u 50μL vode PCR nivoa čistoće (RT-PCR Grade Water, ThermoFisher Scientific) i skladišti na -80°C do sledeće faze rada.

### **3.3.3. Određivanje koncentracije RNK i procena čistoće uzorka**

Da bi se nivo iRNK odredio *real-time PCR* metodom primenom relativne standardne krive neophodno je poznavati podatak o koncentraciji RNK u uzorku. S obzirom da nukleinske kiseline (DNK i RNK) pokazuju apsorpcioni maksimum na 260 nm koncentraciju RNK moguće je odrediti spektrofotometrijski (molarni ekstinkcioni koeficijent RNK na 260nm iznosi 40 μg/mL). Međutim, proces izolacije koji je primenjen sa sobom nosi mogućnost da se u konačnom uzorku pored RNK nađe i određena količina DNK, proteina, kao i različite komponente TRIzol<sup>®</sup> reagensa (fenol, gvanidin izotiocijanat). Reakcija lančane polimerizacije od koje zavisi sam ishod merenja može biti do određenog stepena inhibirana prisutnim nečistoćama što sa sobom nosi rizik od dobijanja nepouzdanih rezultata. Od proteinskih nečistoća koje mogu usloviti dobijanje nejasnih rezultata izdvajaju se RNaze (razgrađuju RNK) i proteaze (mogu razgraditi enzime koji se koriste u okviru reakcija reverzne transkripcije i *PCR*). Takođe, treba imati u vidu da prisustvo DNK u uzorku izolovane RNK može dvojako kompromitovati dobijene rezultate. S jedne strane, upotreba prajmera za *PCR* koji nisu adekvatno dizajnirani može dovesti do toga da se određeni segmenti genomske DNK amplifikuju tokom *PCR* dajući lažno povišene rezultate. S druge strane, ne treba izgubiti iz vida da DNK i RNK imaju apsorpcioni maksimum na 260 nm. To praktično znači da ukoliko u uzorku izolovane RNK postoji izvesna količina DNK očitana vrednost apsorbancije biće lažno povišena pa će i konačna koncentracija RNK biti pogrešna. Kako bi se izbegli svi navedeni problemi, postavljeni su odgovarajući kriterijume čistoće koji svaki uzorak mora da zadovolji. Uzorci koji nisu zadovoljili dole navedene kriterijume, nisu korišteni u daljoj analizi.

Nakon odmrzavanja uzoraka prethodno izolovane RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, za spektrofotometrijsku analizu uzeto je 5 µL koncentrovanog rastvora i razblaženo sa 595 µL sterilne vode (*aqua pro injeksione*). Upotreba destilovane vode ovde nije preporučljiva jer u uslovima slabo kisele sredine koji karakterišu destilovanu vodu dolazi do neželjenih promena u vrednostima apsorbcije RNK na 260 nm. U svakom uzorku je vršeno merenje apsorbcije na:

- 230 nm – apsorbcija potiče od organskih rastvarača (gvanidin izotiocijanat, fenol)
- 260 nm – apsorbcija potiče od RNK
- 280 nm – apsorbcija potiče od proteina
- 320 nm – apsorbcija potiče od prisustva različitih partikula koje rasipaju svetlost

Kako bi se procenilo da li je prisustvo nečistoća značajno u svakom uzorku izračunati su odnosi apsorbcija:  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$ . Smatrali smo da uzorak ne sadrži značajnu količinu nečistoća, te da se može koristiti u daljoj analizi, ukoliko su zadovoljeni sledeći kriterijumi čistoće:

- $A_{260/280} \sim 2,0$
- $A_{260/280} \sim 2,0-2,2$
- $A_{320} \sim 0,0$

Sva spektrofotometrijska merenja izvedena su na spektrofotometru UV-1800 UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu).

Konačna koncentracija RNK u uzorku izračunata je prema obrascu:

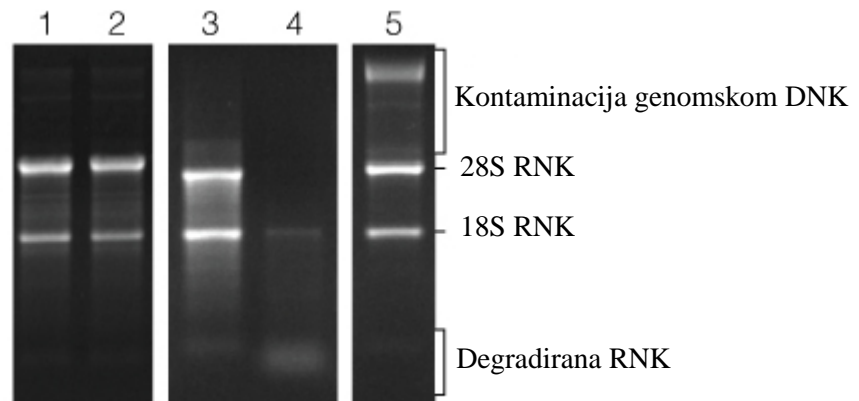
$$C_{\text{RNK}} = A_{260} \times 40 \text{ µg/mL} \times \text{faktor razblaženja (120)}$$

### 3.3.4. Provera integriteta RNK u uzorku

Integritet RNK je pojam koji se odnosi na stepen očuvanosti RNK molekula. Naime, RNK molekul je vrlo nestabilan i podložan razgradnji delovanjem enzima RNaza koji su široko rasprostranjeni i neselektivno deluje na sve vrste RNK molekula razgrađujući ih na manje fragmente. Uzorci RNK koji imaju loš integritet (nizak stepen očuvanosti usled razgradnje) nisu dobri kandidati za dalju analizu jer dobijeni rezultati mogu biti vrlo nepouzdati i nejasni. U tom smislu, od velikog značaja je proveriti integritet RNK u svakom uzorku.

Integritet RNK u uzorku je proveren metodom *submarine* elektroforeze na agaroznom gelu. Ova jednostavna metoda provere integriteta zasniva se na razdvajanju RNK molekula u električnom polju prema naelektrisanju, pri čemu se smatra da je migracija RNK molekula

proporcionalna logaritmovanoj vrednosti molekulske mase. Najveći broj iRNK po svojoj veličini nalazi se između 18S i 28S rRNK. Ukoliko se nakon elektroforeze uočavaju jasne i oštre trake 18S i 28S rRNK, može se smatrati da je integritet iRNK očuvan. U suprotnom, ukoliko su trake razvučene i nejasne integritet iRNK nije zadovoljavajući (Slika 12).



Slika 12. Elektroforegram RNK različitog integriteta: trake 1 i 2 pokazuju uzorke RNK dobro očuvanog integriteta; traka 3 predstavlja uzorak u kome je došlo do delimične razgradnje RNK; traka 4 predstavlja uzorak RNK u kome je došlo do potpune degradacije RNK; traka 5 predstavlja uzorak RNK u kome postoji kontaminacija genomskom DNK.

Za potrebe izvođenja elektroforeze korišten je 1% rastvor agaroze (*Normal melting agarose for DNA electrophoresis*, Serva) dobijen rastvaranjem 0,75 g agaroze u 100 mL destilovane vode uz zagrevanje. Rastvorena agarosa je potom ohlađena na 60°C, a gel je izliven uz pomoć *HE 100 casting kit* (Amersham Pharmacia Biotech) koristeći češljic sa zupcima srednjeg promera. Za izvođenje elektroforeze korišten je TAE pufer pH=8,3 (40mM Tris, 20 mM sirćetne kiseline i 1 mM EDTA) razblažen 50 puta. Odmrznuti uzorci pre nanošenja na gel pomešani su sa rastvorom za potapanje i vizualizaciju (2,5 g *Ficoll-Paque Plus* i 0,25 g bromfenol plavog je rastvoreno u 10 mL destilovane vode) u odnosu 4:5. 5µL ovakve smeše je pažljivo nanoseno na gel potopljen u TAE pufer. Elektroforetsko razdvajanje RNK vršilo se u kadi za horizontalnu *submarine* elektroforezu sa hlađenjem *Hoefler Super Sub* (Amersham Pharmacia Biotech) na 4°C, 30 minuta pri naponu od 200V, jačini struje od 300mA i snazi od 40W. Nakon elektroforeze, gel je tretiran 2% rastvorom etidijum-bromida (proizvođač) i posmatran pod UV lampom radi vizualizacije razdvojenih frakcija. U svim uzorcima uočene su jasno vidljive i oštre frakcije na mestima koja odgovaraju 18S i 28S rRNK što svedoči o očuvanosti integriteta RNK od interesa.

### 3.3.5. Reakcija reverzne transkripcije

*Real-time PCR* metoda zasniva se na delovanju enzima *Taq*-polimeraze koji je po svojoj prirodi DNK polimeraza i kao supstrat koristi molekul DNK. Zbog toga je pre izvođenja same merne reakcije neophodno u posebnom koraku izvršiti prevođenje RNK u DNK. Ovaj korak izvodi se u reakciji reverzne transkripcije. Ključnu ulogu u ovom koraku ima enzim reverzna transkriptaza koji na osnovu informacije sa matične RNK vrši sintezu jednolančane, komplementarne DNK (cDNK). Treba naglasiti da se u ovom procesu postiže nizak stepen selektivnosti u pogledu vrsta RNK koje se prevode u cDNK.

Za potrebne reverzne transkripcije korišten je reagens *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit* (AppliedBiosystems), a sam postupak je izveden prema protokolu proizvođača. Ovaj set reagenasa sadrži:

- RT pufer – obezbeđuje optimalne uslove za proces reverzne transkripcije;
- RT nasumične prajmere – sekvence od nekoliko nukleotida koje se vezuju za sebi komplementarne delove na RNK iz uzorka omogućavajući početak delovanja reverzne transkriptaze;
- Smešu dNTP – gradivni blokovi za sintezu cDNK;
- *MultiScribe<sup>TM</sup>* reverznu transkriptazu – enzim koji prepoznaje prajmere vezane za RNK uzorka i vrši sintezu cDNK;
- Inhibitor RNAza – inhibira dejstvo eventualno prisutnih RNAza u uzorku i time smanjuje mogućnost razgradnje matičnih RNK molekula.

Prema protokolu proizvođača ukupna zapremina reakcione smeše treba da iznosi 20  $\mu$ L i sastoji se od:

- 2  $\mu$ L RT pufera
- 0,8  $\mu$ L dNTP
- 2  $\mu$ L nasumičnih prajmera
- 1  $\mu$ L enzima *MultiScribe<sup>TM</sup>*
- 1  $\mu$ L inhibitora RNAza
- 3,2  $\mu$ L vode *PCR* nivoa čistoće
- 10  $\mu$ L uzorka

Tokom pripreme i nanošenja svi reagensi su prema preporukama proizvođača držani na ledu kako bi se sprečilo neželjeno i nekontrolisano otpočinjanje procesa reverzne transkripcije.



Iz svakog uzorka je nakon odmrzavanja uzeta odgovarajuća količina rastvora RNK, koja je potom razblažena vodom *PCR* nivoa čistoće do zapremine od 10 µL čime je postignuto da svi uzorci imaju istu krajnju koncentraciju RNK.

Proces reverzne transkripcije je izveden korišćenjem uređaja 7500 *real-time PCR system* (Applied Biosystems), a uslovi reakcije su podešeni prema preporukama proizvođača:

1. **korak:25°C, 10 minuta;**
2. **korak:37°C, 120 minuta;**
3. **korak:85°C, 5 minuta;**

Nakon procesa reverzne transkripcije svi uzorci su zamrznuti na -80°C do sledećeg koraka.

### **3.3.6. Real-time PCR metoda**

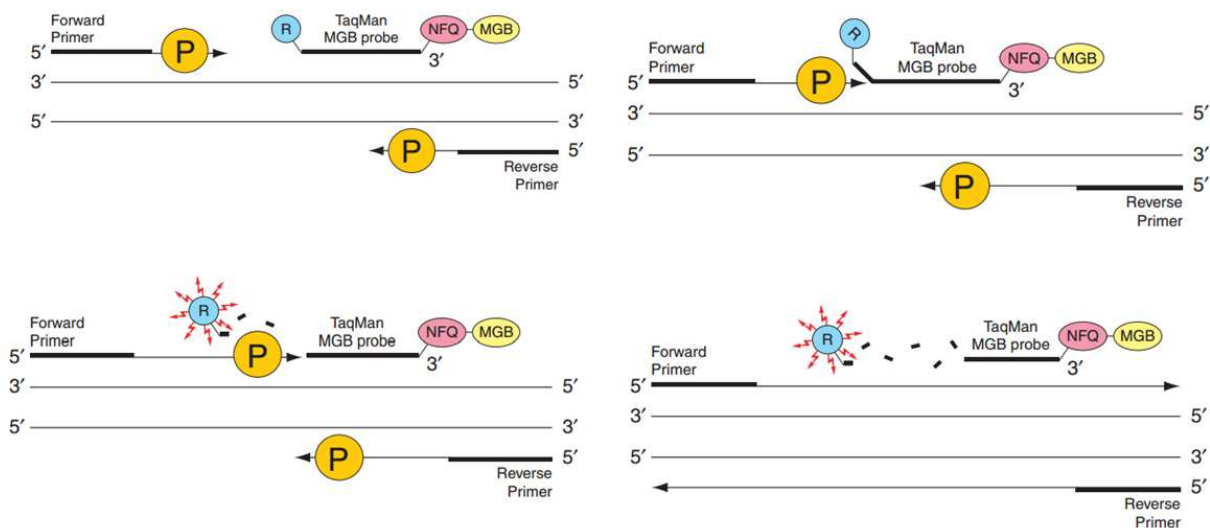
*Real-time PCR* metoda omogućava praćenje reakcije lančane polimerizacije tokom njenog odvijanja pomoću fluorescentnog signala koji se generiše tokom svakog ciklusa. Mehanizmi nastanka fluorescentnog signala su različiti, a najčešće se zasnivaju na upotrebi različitih interkalirajućih boja ili specifično dizajniranih oligonukleotidnih proba. S obzirom da metode zasnovane na upotrebi oligonukleotidnih proba karakteriše mnogo viša specifičnost i reproducibilnost određivanje nivoa iRNK adiponektinskih receptora vršeno je *TaqMan*<sup>®</sup>-proba *real-time PCR* metodom.

#### **3.3.6.1. Princip real-time PCR metode zasnovane na TaqMan<sup>®</sup>-proba hemiji**

Princip *real-time PCR* metode zasnovane na *TaqMan*<sup>®</sup>-proba hemiji podrazumeva upotrebu:

- *TaqMan*<sup>®</sup> polimeraze – vrsta DNK polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja poseduje 5'-3' egzonuleaznu aktivnost;
- *TaqMan*<sup>®</sup> probe – specijalno dizajnirana oligonukleotidna sekvenca na čijem 5' kraju se nalazi signalna fluorescentna boja, a na 3' kraju „gasilac“ (*quencher*). Dok je proba intaktna, „gasilac“ se nalazi u neposrednoj blizini signalne boje i ne dozvoljava emitovanje fluorescentnog signala zbog fluorescentno rezonantno elektronskog transfera (FRET). Sekvenca nukleotida probe nije nasumična, već precizno dizajnirana da komplementarno odgovara jednom segmentu *antisense* lanca amplikona od interesa;
- *Forward* prajmer - vezuje za 3' kraj *antisense* lanca amplikona od interesa;
- *Reverse* prajmer- vezuje za 3' kraj *sense* lanca amplikona od interesa;

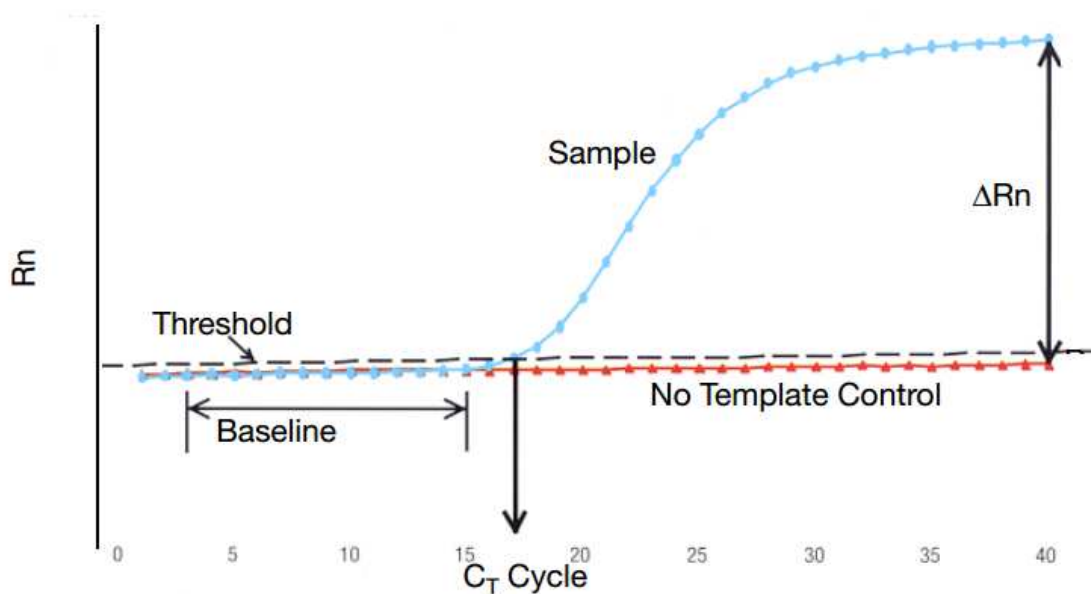
*PCR* reakcija se odvija kroz 40 uzastopnih ciklusa. Svaki ciklus obuhvata korak denaturacije cDNK na temperaturi od 95°C koju prati korak sniženja temperature na 60°C u okviru koga se odvija vezivanje prajmera i proba, kao i reakcija polimerizacije. Ukoliko u uzorku postoji sekvenca komplementarna sekvencama prajmera i probe doći će do njihovog vezivanja za matrični lanac. *TaqMan*<sup>®</sup> polimeraza prepoznaje mesta gde su vezani prajmeri i vrši sintezu novih lanaca. Tokom faze polimerizacije enzim nailazi na vezanu probu što pokreće njegovu 5'-3' egzonuleaznu aktivnost i dovodi do postepenog uklanjanja nukleotida probe. Uklanjanjem probe oslobađa se signalna boja koja više nije pod uticajem „gasioca“ i javlja se fluorescentni signal koji registruje detektor (Slika 13). Takođe, treba imati u vidu da enzim u potpunosti uklanja probu i završava započeto produžavanje vezanih prajmera do kraja matričnog lanca tako da prisustvo probe ne remeti kontinuitet *PCR* procesa. Prajmeri su dizajnirani tako da prepoznaju samo sekvencu od interesa (amplikon) koja se jedina amplifikuju tokom lančane reakcije polimeraze čime se postiže izuzetno visoka specifičnost procesa. Tokom svakog sledećeg ciklusa oslobodiće se novi molekuli signalne boje povećavajući intenzitet fluorescencije proporcionalno količini nastalog amplikona. Što je veća početna koncentracija ciljnog molekula u uzorku, to će ranije doći do stvaranja fluorescentnog signala visokog intenziteta. Nakon završenih 40 ciklusa softverski se određuje kritična vrednost označena kao  $C_t$  (*threshold cycle*) za svaki pojedinačni uzorak.



Slika 13. Princip *real-time PCR* metode zasnovane na *TaqMan*<sup>®</sup>-proba hemiji (Preuzeto iz uputstva proizvođača: *TaqMan*<sup>®</sup> Gene expression Assays Protocol, Applied Biosystems, Life Technologies<sup>™</sup>, 2010.)

S obzirom na mogućnost značajnih fluktuacija fluorescencije tokom reakcije neophodno je izvršiti normalizaciju fluorescentnog signala koji potiče od signalne boje.

Normalizacija signala se vrši u odnosu na intenzitet pasivne referentne boje koja je deo reakcione smeše (ROX™). Normalizovana vrednost fluorescencije označava se kao  $R_n$  vrednost.  $R_{n+}$  vrednost predstavlja normalizovanu vrednost fluorescencije u onim reakcijama u kojima postoji uzorak cDNK, dok se  $R_{n-}$  vrednost dobija iz NTC kontrolnog uzorka. Razlika između ove dve vrednosti daje  $\Delta R_n$ .  $C_t$  vrednosti predstavlja ciklus na kome je prvi put detektovan statistički značajan porast  $\Delta R_n$  vrednosti iznad definisanog praga koji se definiše kao standardna devijacija  $R_n$  vrednosti u ranim ciklusima. Jednostavnije rečeno,  $C_t$  vrednost predstavlja ciklus na kome je prvi put uočen izuzetno značajan porast fluorescencije tokom PCR (Slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz toka *real-time PCR* procesa. *No template control (NTC)* je kontrolni uzorak koji sadrži sve komponente reakcione smeše sem uzorka.  $R_n$  predstavlja normalizovanu vrednost fluorescencije.  $\Delta R_n$  predstavlja razliku između vrednosti fluorescencije koje potiču iz uzorka i NTC. *Threshold* je vrednost koja predstavlja standardnu devijaciju  $R_n$  vrednosti u ranim ciklusima.  $C_t$  vrednost predstavlja broj ciklusa na kome je prvi put detektovan značajan porasta fluorescentnog signala iznad definisanog praga (*threshold*). (Preuzeto iz uputstva proizvođača: Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems; Chemistry Guide; Applied biosystems 2005.)

Za potrebe izvođenja *real-time PCR* reakcije korišten je *TaqMan*® *Gene Expression MasterMix* (Applied Biosystems) koji sadrži: *AmpliTaqGold*® DNK polimerazu, mešavinu dNTP (sa dTTP/dUTP i uracil-DNK glikozilazom (UDG) kako bi se smanjila *carry-over PCR* kontaminacija) i pasivnu referentnu boju ROX™. Obe vrste prajmera i proba obezbeđeni su u

optimalnim koncentracijama u okviru zasebnih eseja za svaku analiziranu iRNK (Applied Biosystems).

Prema protokolu proizvođača ukupna zapremina reakcione smeše treba da iznosi 50  $\mu\text{L}$  i sastoji se od:

- 25  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Master Mix*
- 2,5  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* eseja
- 22,5  $\mu\text{L}$  uzorka koji sadrži cDNK

*Real-time PCR* je izveden korišćenjem uređaja 7500 *real-time PCR system* (Applied Biosystems), a uslovi reakcije su podešeni prema preporukama proizvođača:

1. korak aktivacije uracil-DNK glikozilaze: 50°C, 2 minuta;
2. korak aktivacije *AmpliTag Gold*<sup>®</sup> DNK polimeraze: 95°C, 10 minuta;
3. PCR (40 ciklusa):
  - a) denaturacija: 95°C, 15 sekundi;
  - b) vezivanje prajmera i probe i polimerizacija: 60°C, 1 minut;

Nakon završenih 40 ciklusa podaci su analizirani uz pomoć softverskog paketa SDS 1.4.1. Dobijene  $C_t$  vrednosti dalje su analizirane metodom relativne standardne krive.

#### **1.1.1.1. Odabir *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* eseja za *AdipoR1* i *AdipoR2***

Esej za određivanje genske ekspresije sadrži odgovarajuće *forward* i *reverse* prajmere, kao i specijalno dizajniranu probu neophodnu za generisanje fluorescentnog signala. S obzirom na strukturu samog gena (broj i položaj egzona i introna), odnosno njegovog transkripta (iRNK od interesa) postoji veliki broj različitih mogućnosti po pitanju odabira mesta na transkriptu gde će se vezati *forward* i *reverse* prajmeri, odnosno proba. Sekvenca na transkriptu koja je ograničena *forward* i *reverse* prajmerom i koja će se zapravo amplifikovati tokom *PCR* procesa naziva se amplikon. Pri dizajnu prajmera vodi se računa da:

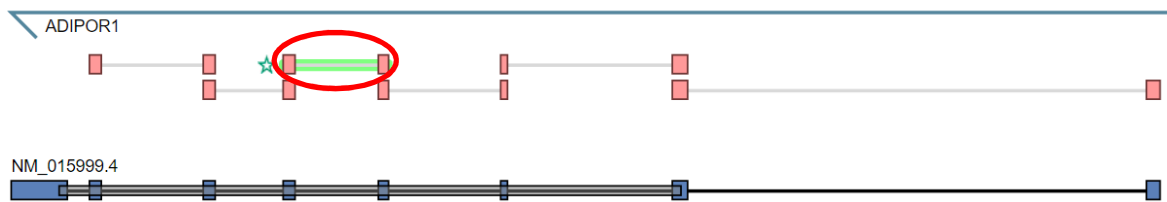
- optimalna dužina prajmera bude do 20 nukleotida
- ne postoji preklapanje sekvenci između prajmera i probe
- sadržaj gvanina i citozina bude u opsegu od 20-80%
- ne postoje preterana ponavljanja nukleotidnih sekvenci unutar prajmera
- 3' kraj prajmera sadrži više od 2 gvanina ili citozina

Takođe, kada je reč o izboru amplikona treba voditi računa da on prelazi preko introna jer se na taj način izbegava amplifikacija ciljnog gena koji potiče iz genomske DNK (ukoliko je ona prisutna u uzorku kao nečistoća). Set prajmera mora da bude specifičan za gen od interesa da ne bi došlo do amplifikacije sličnog gena ili pseudogena. Probe koje nudi

proizvođač u okviru *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* eseja najčešće su obeležene FAM<sup>™</sup> (6-karboksifluorescein) ili VIC<sup>™</sup> (struktura i sastav zaštićeni od strane kompanije) fluorescentnim bojama, dok se kao „gasilac“ najčešće koristi TAMRA<sup>™</sup> (5-karboksitetrametilrodamin).

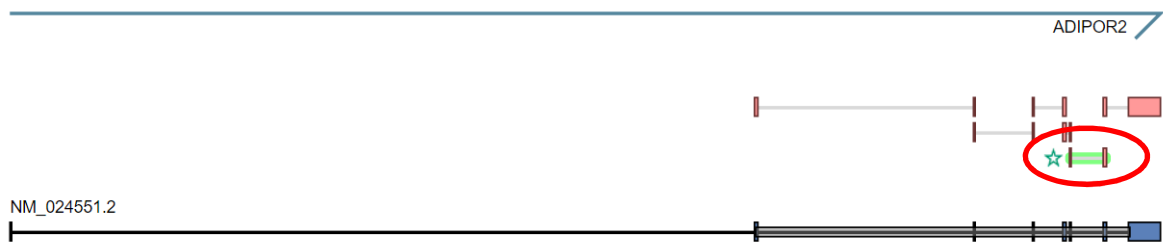
*Forward, reverse* prajmeri i proba se u okviru *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* eseja nalaze u koncentracijama koje optimizovane od strane proizvođača (Applied Biosystems), te ne zahtevaju ovakvu vrstu optimizacije pre upotrebe.

Za određivanje nivoa iRNK AdipoR1 korišten je *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* esej Hs01114951\_m1 (Applied Biosystems). Esaj je dizajniran tako da proba prelazi preko introna, što znači da upotrebom ovog eseja neće doći do detekcije genomske DNK tokom *PCR* (garantovano od strane proizvođača). Proba je obeležena FAM<sup>™</sup> signalnom bojom i TAMRA<sup>™</sup> kao „gasiocem“. Dužina amplikona iznosi 84 baze. *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* esej Hs01114951\_m1 proizvođač je označio oznakom „*Best Coverage*“ što znači da se radi o eseju sa najboljim karakteristikama. Položaj ciljnog amplikona na transkriptu prikazan je na slici 15.



Slika 15. Položaj ciljnog amplikona na transkriptu AdipoR1 gena (Preuzeto sa sajta proizvođača: ThermoFisher Scientific).

Za određivanje nivoa iRNK AdipoR2 korišten je *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* esej Hs00226105\_m1 (Applied Biosystems). Esaj je dizajniran tako da proba prelazi preko introna, što znači da upotrebom ovog eseja neće doći do detekcije genomske DNK tokom *PCR* (garantovano od strane proizvođača). Proba je obeležena FAM<sup>™</sup> signalnom bojom i TAMRA<sup>™</sup> kao „gasiocem“. Dužina amplikona iznosi 60 baza. *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* esej Hs00226105\_m1 proizvođač je označio oznakom „*Best Coverage*“ što znači da se radi o eseju sa najboljim karakteristikama. Položaj ciljnog amplikona na transkriptu prikazan je na slici 16.



Slika 16. Položaj ciljnog amplikona na transkriptu AdipoR2 gena (Preuzeto sa sajta proizvođača: ThermoFisher Scientific).

### 1.1.1.2. Odabir TaqMan® Gene Expression eseja za endogenu kontrolu (*housekeeping gene*)

Pouzdanost rezultata dobijenih *real-time PCR* metodom u mnogome zavisi od različitih varijacija koji se mogu javiti tokom procesa izolacije RNK, reverzne transkripcije ili same *PCR* reakcije (varijacije u rukovanju uzorcima, sadržaju izolovane RNK i efikasnosti reverzne transkripcije, različit stepen degradacije RNK ili prisustvo inhibitora u uzorcima RNK). Kako bi se smanjio uticaj navedenih varijacija na krajnji rezultat koristi se endogena kontrola koja se još naziva i referentni gen ili *housekeeping* gen. Geni koji se obično koriste kao endogena kontrola su konstantno i uniformno ekspimirani u različitim uzorcima, a nivoi njihove ekspresije najčešće nisu značajno izmenjeni pod uticajem različitih patoloških stanja. Geni koji se najčešće koriste kao endogena kontrola su: 18S rRNK,  $\beta$ -aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), fofogliceratkinaza-1 (PGK1), hipoksantinfosforiozil-transferaza-1 (HPRT1) itd. Gen koji je odabran za endogenu kontrolu se kvatifikuje *real-time PCR* postupkom kao i gen od interesa, a dobijene  $C_t$  vrednosti se koriste u daljoj analizi. Poređenje  $C_t$  vrednosti ciljnog gena i gena odabranog za endogenu kontrolu omogućava da se nivo genske ekspresije ciljnog gena normalizuje prema količini početne RNK (odnosno cDNK) koja je dodata u reakcionu smešu.

Za potrebe naše studije kao kandidati za endogenu kontrolu odabrana su prema literaturi dva najčešće korišćena gena  $\beta$ -aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) čije su karakteristike ispitane u preliminarnom eksperimentu i na osnovu dobijenih rezultata odabran je gen sa boljim karakteristikama.

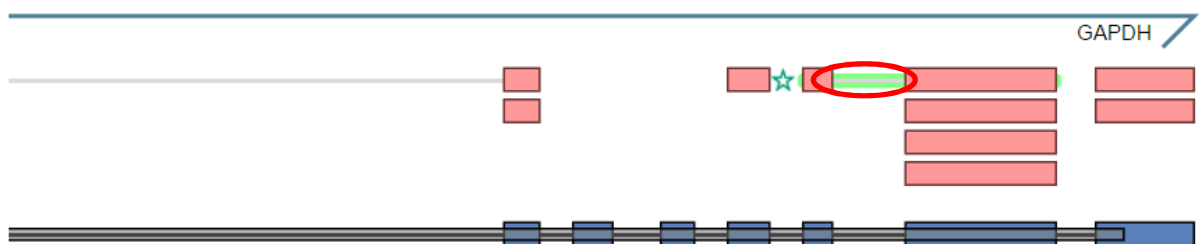
Za određivanje nivoa iRNK  $\beta$ -aktina korištena su dva tipa TaqMan® Gene Expression eseja Hs01060665\_g1 i Hs99999903\_m1 (Applied Biosystems). Naime, esej Hs01060665\_g1 je od strane proizvođača naveden kao „Best Coverage“, ali s obzirom da spada u grupu g1 eseja ovaj esej detektuje genomsku DNK, što svakako predstavlja problem jer može uzrokovati dobijanje nejasnih rezultata. Proba je obeležena FAM™ signalnom

bojom i TAMRA™ kao „gasiocem“. Dužina amplikona iznosi 63 baze. S druge strane, esej Hs99999903\_m1 je dizajniran tako da neće doći do detekcije genomske DNK (garantovano od strane proizvođača). Proba ovog eseja je takođe obeležena FAM™ signalnom bojom i TAMRA™ kao „gasiocem“, a dužina amplikona iznosi 171 bazu. Položaji ciljnih amplikona na transkriptu prikazani su na slici 17.



Slika 17. Položaj ciljnih amplikona na transkriptu gena za  $\beta$ -aktin (Preuzeto sa sajta proizvođača: ThermoFisher Scientific).

Za određivanje nivoa iRNK GAPDH korišten je *TaqMan*® *Gene Expression* esej hs02758991\_g1 koji je od strane proizvođača označen kao „Best Coverage“. Proba je obeležena FAM™ signalnom bojom i TAMRA™ kao „gasiocem“. Dužina amplikona iznosi 93 baze. S obzirom da ovaj esej nosi oznaku g1 dizajniran je tako da detektuje genomsku DNK. Položaji ciljnog amplikona na transkriptu prikazani su na slici 18.



Slika 18. Položaj ciljnog amplikona na transkriptu gena za GAPDH (Preuzeto sa sajta proizvođača: ThermoFisher Scientific).

### 1.1.1.3. Metoda relativne standardne krive i obrada rezultata

Metode relativne kvantifikacije ne daju rezultat koji predstavlja stvarnu količinu analiziranog materijala (broj kopija RNK ili DNK), već vrednost koja predstavlja odnos ekspresije ciljnog gena i endogene kontrole u uzorku. Najčešće korišćene metode relativne kvantifikacije *real-time PCR* su: metoda relativne standardne krive i komparativni  $C_t$  metod.

Komparativni  $C_t$  metod je izuzetno osetljiv na postojanje razlika u efikasnosti reakcije ciljnog gena i referentnog gena koji se koristi kao endogena kontrola (*housekeeping gene*), zbog čega smo se opredelili da kvantifikaciju vršimo metodom relativne standardne krive.

Izrada standardne krive zahteva prethodnu adekvatnu pripremu serijskih razblaženja standarda. Standardi iz kojih se konstruiše standardna kriva dobijaju iz „pula“ uzoraka. „Pul“ se priprema za svaku grupu ispitanika posebno mešanjem jednake količine cDNK svih uzoraka koji se analiziraju. Iz „pula“ se pripremaju standardi najviše koncentracije, a zatim se iz njih dvostrukim serijskim razblaženjem pripremaju ostali standardi. Kako je tok *PCR* procesa eksponencijalan, standardna kriva se konstruiše u koordinatnom sistemu u kome x-osa predstavlja logaritmovane vrednosti koncentracije cDNK, a y-osa  $C_t$  vrednost. Da bi standardna kriva bila upotrebljiva za dalju kvantifikaciju neophodno je da zadovolji sledeće zahteve:

- niska varijacija unutar serije
- odgovarajuća linearnosti ( $R^2 \geq 0,99$ )
- odgovarajući nagib ( $\beta \approx -3,32$ )

Varijacija unutar serije procenjuje se na osnovu standardne devijacije  $C_t$  vrednosti svakog razblaženja standarda. Svako razblaženje standarda se nanosi na ploču u četriplicatu, a smatra se da je varijacija unutar serije mala ukoliko je standardna devijacija dobijenih  $C_t$  vrednosti manja od 0,2. Ukoliko je pak standardna devijacija dobijenih  $C_t$  vrednosti veća od 0,2, pronalazi se standard koji drastično odstupa od srednje vrednosti i njegovu vrednost ne koristimo u konstruisanju standardne krive.

Nagib standardne krive je mera efikasnosti amplifikacije tokom reakcije lančane polimerizacije i najčešće se izražava u procentima. Ukoliko se tokom eksponencijalne faze *PCR* procesa količina amplikona sa svakim sledećim ciklusom poveća tačno dva puta smatra se da je efikasnost reakcije 100%. Odnos između efikasnosti i nagiba krive prikazan je sledećom jednačinom:

$$E = \left( 10^{-\frac{1}{\text{nagib}}} - 1 \right) \times 100$$



Nagib krive od -3,32 odgovara efikasnosti 100%. Ukoliko je nagib negativniji, efikasnost reakcije je manja, odnosno ukoliko je nagib pozitivniji efikasnost reakcije je veća. U praksi, prihvatljiv nagib standardne krive nalazi se u opsegu između -3,21 i -3,59 (što odgovara opsegu efikasnosti reakcije od 90-105%).

Najčešći uzroci koji dovode do odstupanja linearnosti i efikasnosti od zadatih kriterijuma jesu: greške tokom pipetiranja, prisustvo inhibitora u uzorcima i loše dizajnirani i optimizovani prajmeri.

Standardna kriva (x-osa: logaritmovane koncentracije standarda, y-osa:  $C_t$  vrednosti) koja zadovoljava prethodno navedene kriterijume, koristi se kako bi se na osnovu  $C_t$  vrednosti za svaki pojedinačni uzorak izračunala količina cDNK od interesa (što je  $C_t$  vrednost manja, to će biti veća količina cDNK). Međutim, dobijena vrednost za količinu cDNK se ne smatra dovoljno pouzdanim podatkom zbog različitih varijacija koje su sastavni deo procesa izolacije, reverzne transkripcije i *PCR* (varijacije u rukovanju uzorcima, sadržaju izolovane RNK i efikasnosti reverzne transkripcije, različit stepen degradacije RNK ili prisustvo inhibitora u uzorcima RNK). Zato je neophodno izvršiti normalizaciju dobijene vrednosti prema količini cDNK endogene kontrole koja se određuje za svaki uzorak od interesa.

Normalizacija količine cDNK ciljnog gena prema količini cDNK endogene kontrole podrazumeva da standardne krive gena od interesa i endogene kontrole imaju optimalne karakteristike u istom opsegu koncentracija. Za kvantifikaciju se koristi standardna kriva od pet tačaka koje predstavljaju pet uzastopnih duplih razblaženja standarda. Kako bi se stekao uvid u kom opsegu koncentracija standardna kriva pokazuje najoptimalnije karakteristike, prethodno smo za svaki esej (AdipoR1: Hs01114951\_m1; AdipoR2: Hs00226105\_m1;  $\beta$ -aktin: Hs01060665\_g1 i Hs99999903\_m1; GAPDH: hs02758991\_g1;) i za svaku grupu ispitanika iz odgovarajućeg "pula" napravili osam uzastopnih duplih razblaženja standarda sledećih koncentracija: 12 ng/ $\mu$ L, 6 ng/ $\mu$ L, 3 ng/ $\mu$ L, 1,5 ng/ $\mu$ L, 0,75 ng/ $\mu$ L, 0,375 ng/ $\mu$ L, 0,1875 ng/ $\mu$ L, 0,09375 ng/ $\mu$ L. Nakon *PCR* procesa, dobijene podatke smo analizirali softverski.

Kao esej za endogenu kontrolu sa najboljim karakteristikama za našu studiju pokazao se esej za  $\beta$ -aktin Hs01060665\_g1. Naime, standardne krive u sve tri grupe ispitanika su pokazivale optimalne karakteristike u različitim opsezima koncentracija. Ovaj esej je detektovao genomsku DNK, ali je njena  $C_t$  vrednost je bila za 10 ciklusa udaljena od  $C_t$  vrednosti  $\beta$ -aktina što se smatra prihvatljivim (ne utiče značajno na konačan rezultat). Esej za GAPDH je takođe detektovao genomsku DNK. Međutim, u ovom slučaju  $C_t$  vrednosti za genomsku DNK i GAPDH su bile bliske (razlika  $C_t$  vrednosti  $\approx$  6 ciklusa) zbog čega ovaj esej

nije korišten u daljem radu. Kada je reč o eseju za  $\beta$ -aktinHs99999903\_m1, standardna kriva nije pokazivala optimalne karakteristike u opsegu koncentracija u kojima su standardne krive za gene od interesa (AdipoR1 i AdipoR2) pokazivale optimalne karakteristike, pa zbog toga ovaj esej nije korišten u daljem radu.

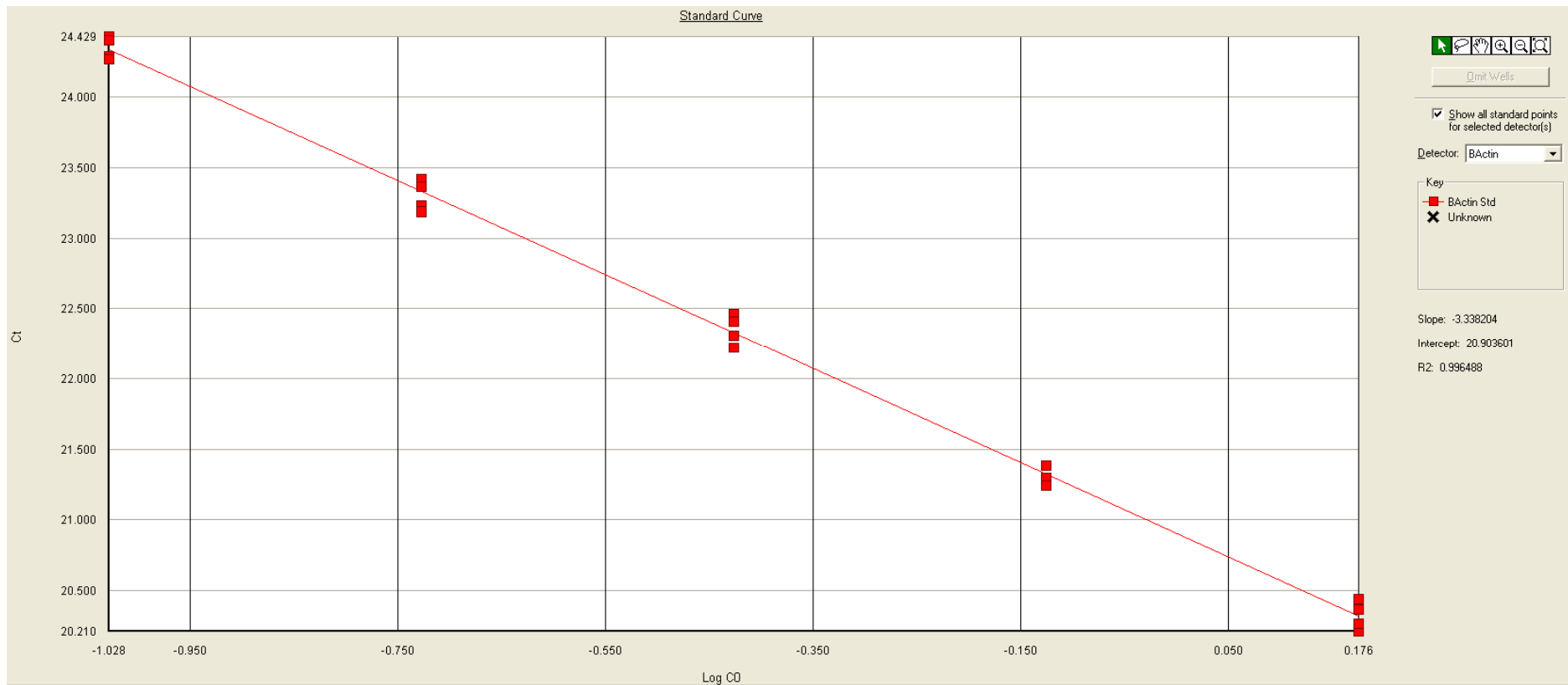
Optimalne karakteristike standardne krive za AdipoR1 (Slika 19), AdipoR2 (Slika 20) i  $\beta$ -aktin (Slika 18) u grupi pacijenata sa KSB i grupi zdravih ispitanika su pokazale u opsegu koncentracija od 1,5 ng/ $\mu$ L do 0,09375 ng/ $\mu$ L.

Kada je reč o grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi standardne krive za sva tri gena su pokazale optimalne karakteristike u opsegu koncentracija od 12 ng/ $\mu$ L do 0,75 ng/ $\mu$ L (Slike 21-23).

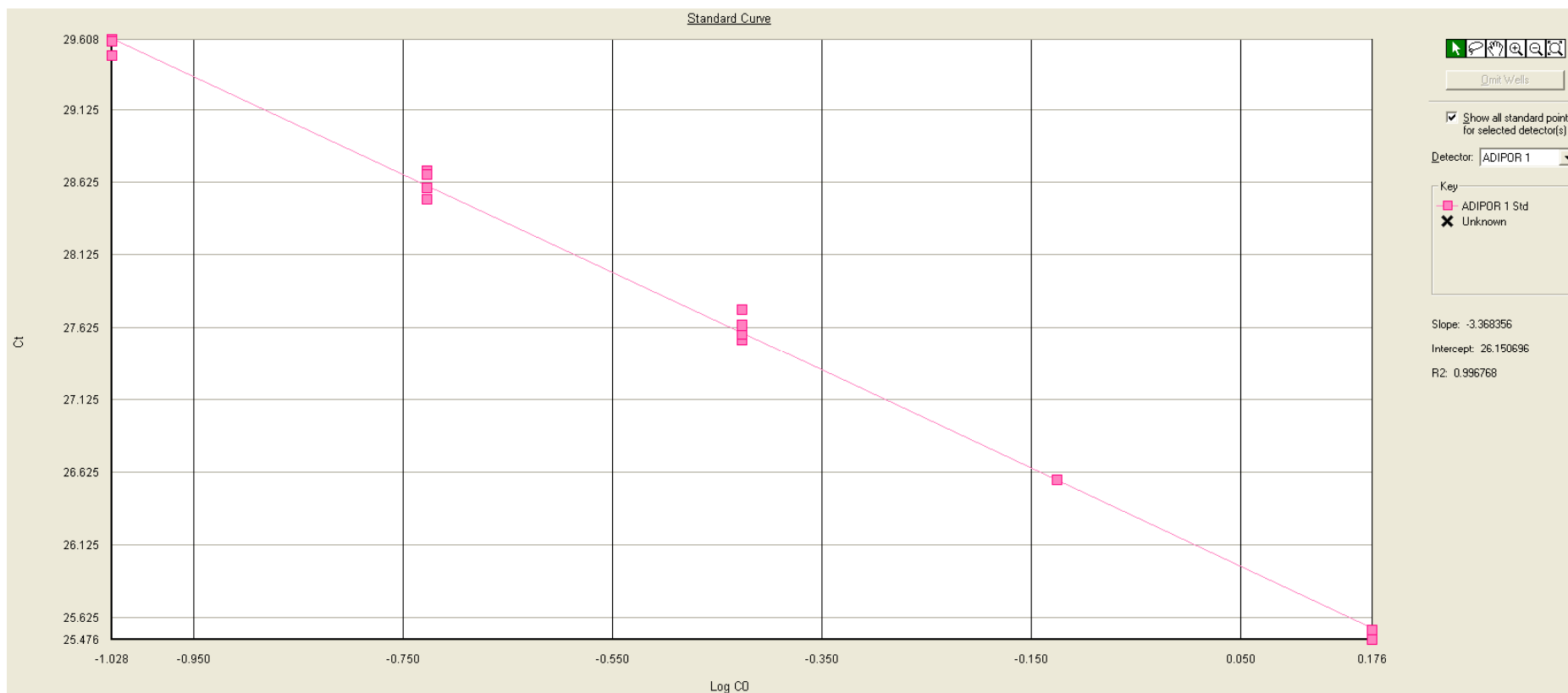
Koncentracija cDNK u uzorcima pacijenata sa KSB i zdravih ispitanika sa kojom je započet *real-time PCR* proces iznosila je 0,75 ng/ $\mu$ L, dok je u uzorcima pacijenata sa HBI na hemodijalizi iznosila 6 ng/ $\mu$ L.

Svi standardi su na ploču nanošeni u četriplicatu, dok su uzorci nanošeni u triplicatu. Da bi obezbedili uporedivost rezultata između serija (ploča), standardna kriva je konstruisana u svakoj seriji. Koncentracija cDNK u uzorku je izračunata na osnovu određene  $C_t$  vrednosti korišćenjem odgovarajuće standardne krive za tu seriju. S obzirom da su uzorci u seriji nalaze u triplicatu, na osnovu različitih pojedinačnih vrednosti za količinu izračunata je prosečna vrednost količine cDNK za taj uzorak. Međutim, ukoliko je standardna devijacija  $C_t$  vrednosti bila veća od 0,2 eliminisan je uzorak čija je  $C_t$  vrednost značajno odudarala, pa je srednja vrednost količine izračunata na osnovu vrednosti iz preostala dva uzorka. Ukoliko su postojale vrlo velike razlike u  $C_t$  vrednostima između uzoraka triplikata, kao i ukoliko je izračunata prosečna količina cDNK bila van opsega standardne krive, uzorak je ponovo analiziran u novoj seriji *real-time PCR*.

Dobijena količina cDNK ciljnog gena (AdipoR1 I AdipoR2) podeljena je sa dobijenom količinom cDNK endogene kontrole ( $\beta$ -aktin) u svakom uzorku i ovako izračunata vrednost je označena je kao normalizovani nivo iRNK AdipoR1 i AdipoR2 ili normalizovani nivo genske ekspresije AdipoR1 i AdipoR2.

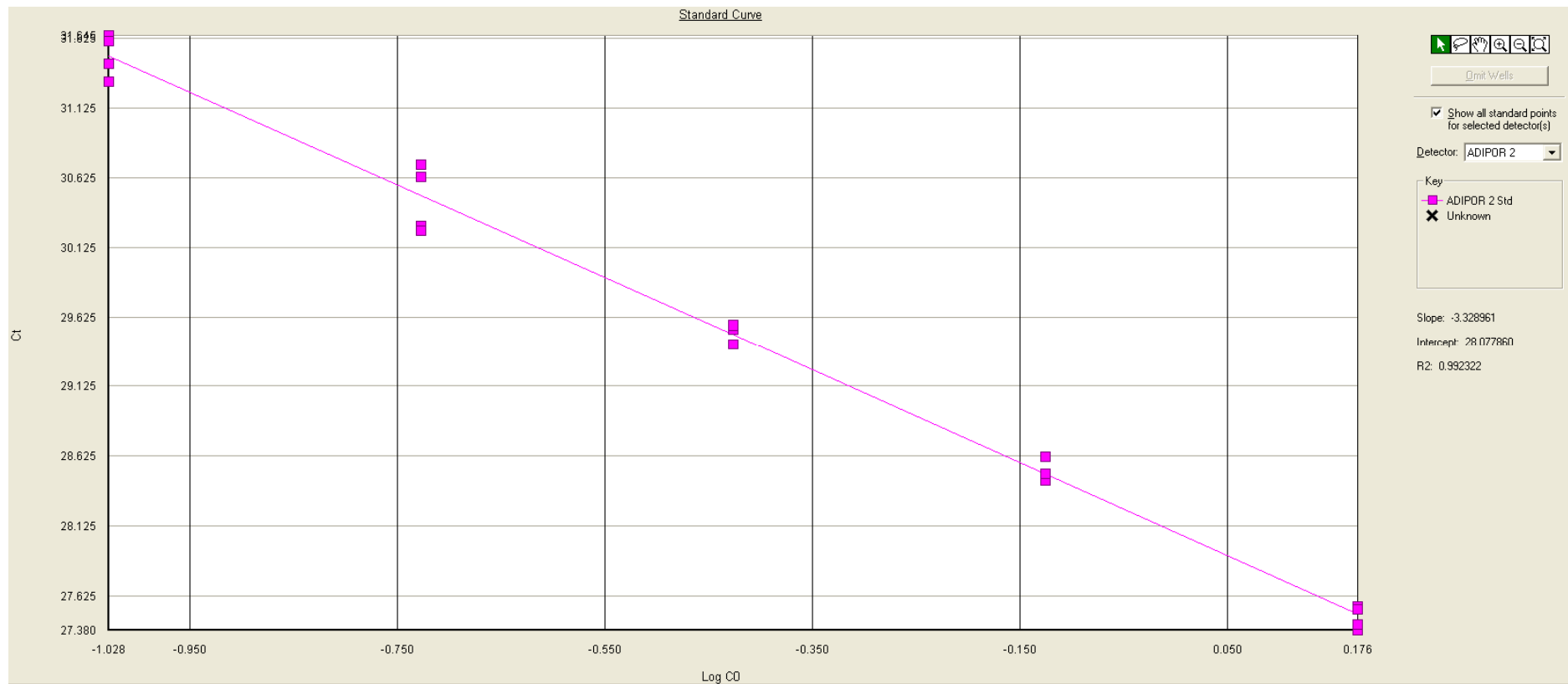


Slika 19. Standardna kriva za  $\beta$ -aktina koja je korišćena pri relativnoj kvantifikaciji kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB. Nagib standardne krive iznosi -3,33, a koeficijent korelacije 0,9965.



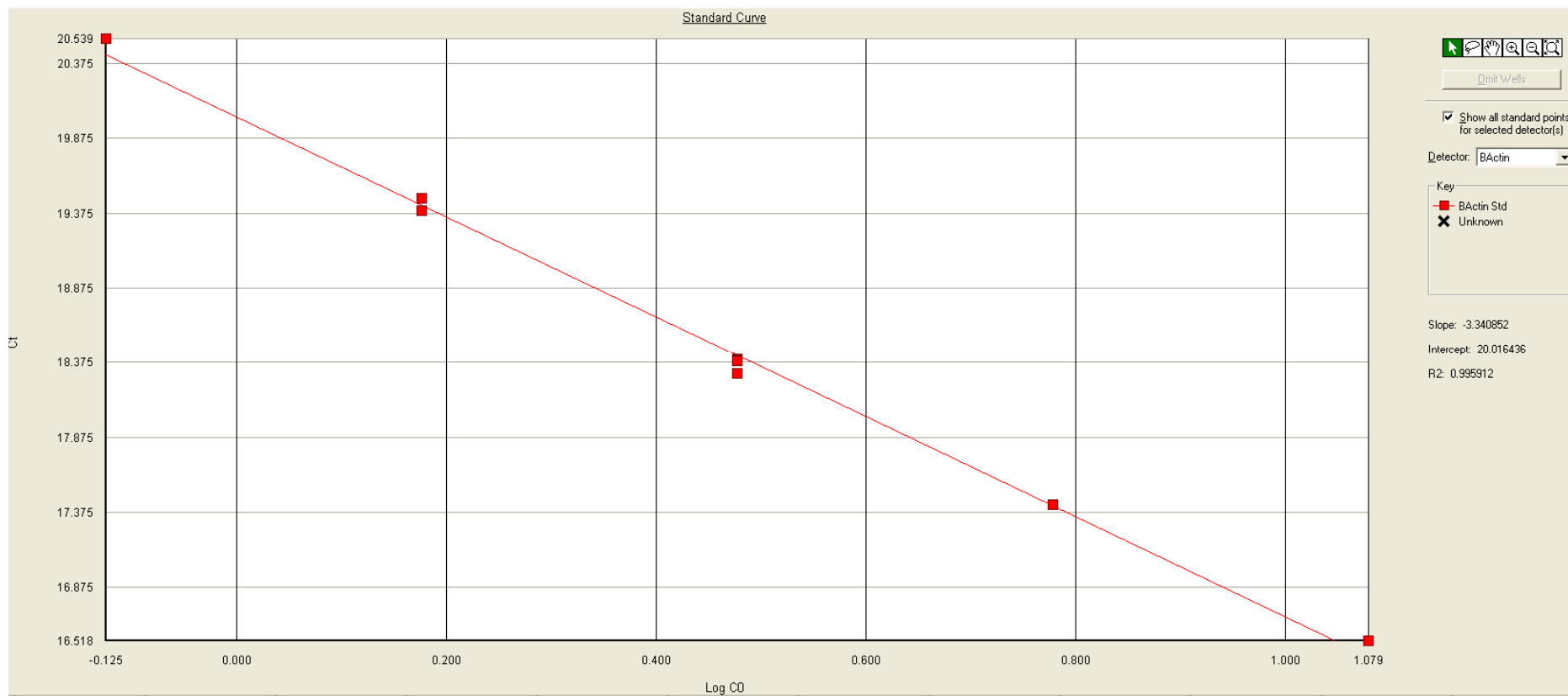
Slika 20. Standardna kriva za AdipoR1 koja je korišćena pri relativnoj kvantifikaciji kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB.

Nagib standardne krive iznosi -3,37, a koeficijent korelacije 0,9967.



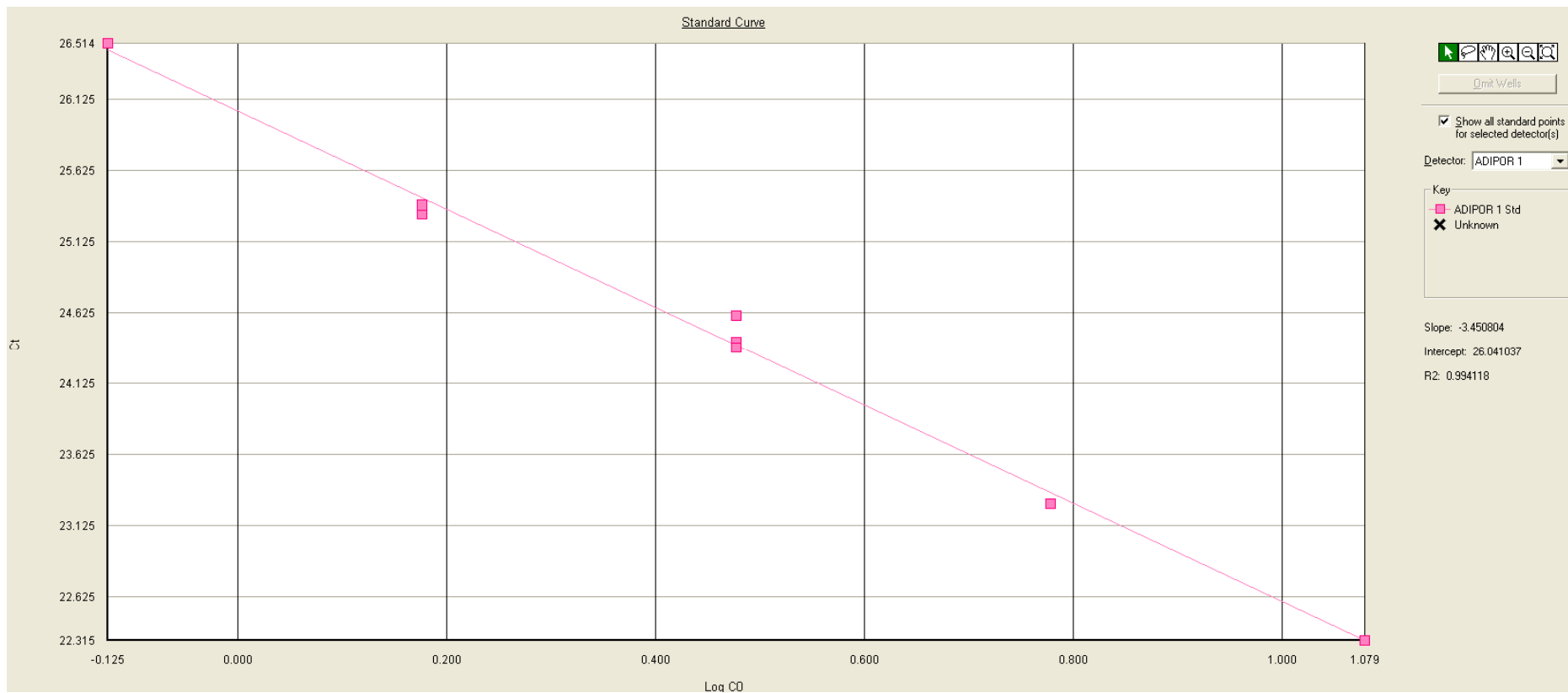
Slika 21. Standardna kriva AdipoR2 koja je korišćena za metodu relativne kvantifikacije kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB.

Nagib standardne krive iznosi -3,33, a koeficijent korelacije 0,9923.



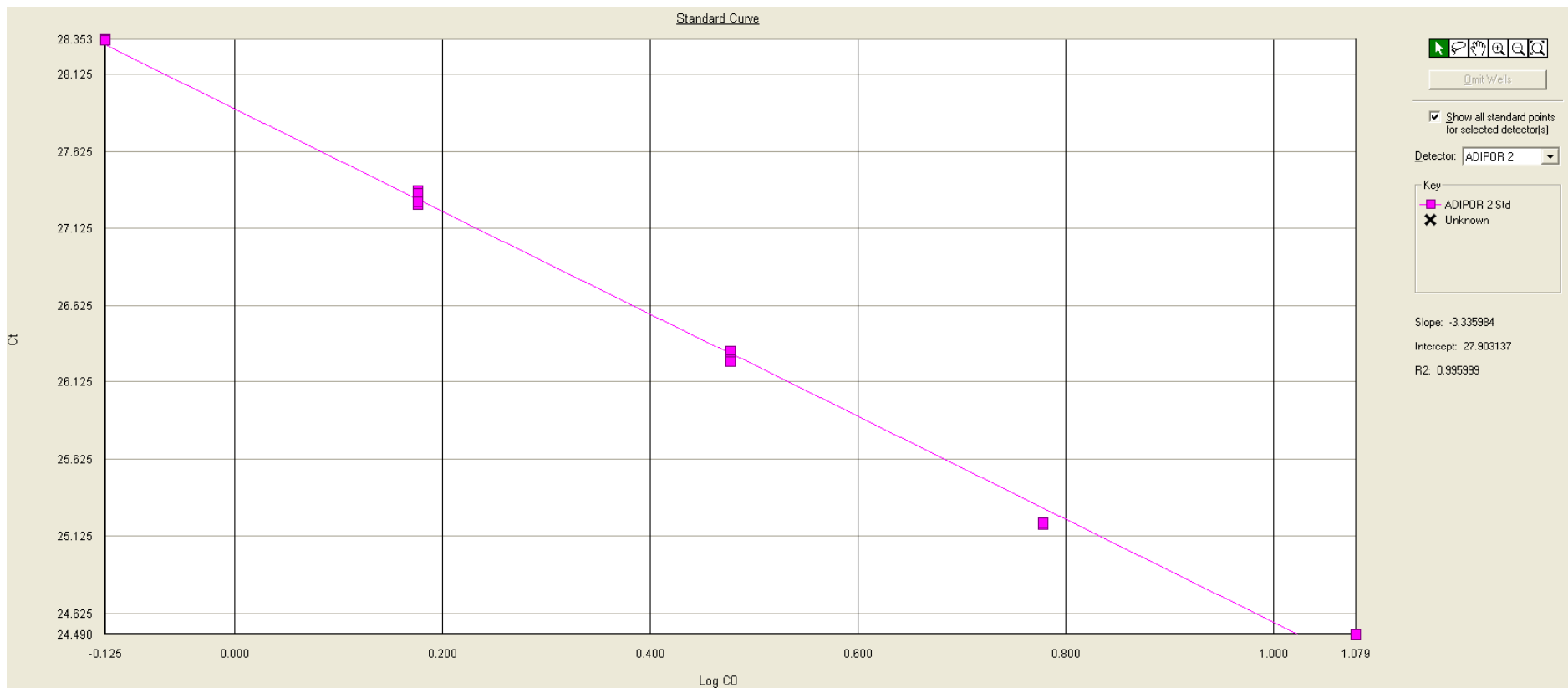
Slika 22. Standardna kriva za  $\beta$ -aktin koja je korišćena pri relativnoj kvantifikaciji kod zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB.

Nagib standardne krive iznosi -3,34, a koeficijent korelacije 0,9959.



Slika 23. Standardna kriva za AdipoR1 koja je korišćena pri relativnoj kvantifikaciji kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi.

Nagib standardne krive iznosi -3,45, a koeficijent korelacije 0,9941.



Slika 24. Standardna kriva za AdipoR2 koja je korišćena pri relativnoj kvantifikaciji kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi.

Nagib standardne krive iznosi -3,33, a koeficijent korelacije 0,9996.



### 3.2. Metode za određivanje ostalih biohemijskih parametara

Koncentracija ukupnog holesterola, triglicerida, LDL-holesterola, HDL-holesterola, glukoze i kreatinina određeni su na biohemijskom analizatoru ILAB 300 (Instrumentation Laboratory, SAD).

- Koncentracija ukupnog holesterola je određena enzimskom CHOD-PAP metodom, korišćenjem testa čiji je proizvođač Biosystems (Biosystems, Španija).
- Koncentracija triglicerida je određena enzimskom GPO-PAP metodom, korišćenjem testa čiji je proizvođač Biosystems (Biosystems, Španija).
- Koncentracija HDL-holesterola je određena enzimskom metodom za određivanje koncentracije holesterola (Biosystems, Španija), nakon precipitacije lipoproteina koji sadrže apoB fosfovolframovom kiselinom i jonima  $Mg^{2+}$ .
- Koncentracija LDL-holesterola je određena direktnim testom proizvođača Biosystems (Biosystems, Španija).
- Koncentracija glukoze određena je enzimskom GOD-PAP metodom, korišćenjem testa čiji je proizvođač Biosystems (Biosystems, Španija).
- Koncentracija kreatinina određena je enzimskom metodom, korišćenjem testa čiji je proizvođač Biosystems (Biosystems, Španija).

Koncentracija hsCRP određena je na biohemijskom analizatoru COBAS® c6000-Roche Diagnostics imuno-turbidimetrijskom metodom korišćenjem testa proizvođača Rosche (Rosche, Nemačka).

Koncentracija insulina određena je na biohemijskom analizatoru COBAS®INTEGRA 400 plus- Roche Diagnostics ECLIA metodom korišćenjem testa proizvođača Rosche (Rosche, Nemačka).

Nivo insulinske rezistencije je kvantifikovan preko vrednosti HOMA IR indeksa (*homeostatic model assessment*) koji je izračunat prema sledećem obrascu:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\text{koncentracija insulina našte } \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}}\right) \times \text{koncentracija glukoze našte } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right)}{22,5}$$

### 3.3. Statistička analiza

Provera tipa raspodele za kontinuirane podatke vršena je upotrebom Shapiro-Wilk testa. Svi kontinuirani podaci koji prema Shapiro-Wilk testu nisu značajno odstupali od idealne, pretpostavljene normalne raspodele ( $P > 0,05$ ) smatrani su normalno distribuiranim i predstavljeni kao aritmetičke srednje vrednosti i standardne devijacije ( $\bar{X} \pm Sd$ ). Podaci koji su prema Shapiro-Wilk testu pokazali značajno odstupanje od idealne, pretpostavljene normalne raspodele ( $P < 0,05$ ) logaritamski su transformisani. Svi parametri čije logaritmovane vrednosti prate normalnu distribuciju predstavljeni su kao geometrijske srednje vrednosti sa intervalima pouzdanosti od 95% (CI). Kod ovakvih varijabli, u daljoj statističkoj analizi korišćene su logaritmovane vrednosti. Parametri čija distribucija nakon logaritamske transformacije nije pratila normalnu raspodelu predstavljeni su kao medijane (Me) sa interkvartilnim rasponom. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence.

Poređenje normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli izvođeno je upotrebom Studentovog t-testa ili testa analize varijanse (ANOVA) sa Tukey's post hoc testom, u zavisnosti koliko grupa podataka se poredi. Analiza kovarijanse (ANCOVA) je upotrebljena za utvrđivanje razlika u koncentraciji adiponektina između grupa nakon korekcije za godine starosti, BMI ili koncentraciju kreatinina.

Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovima. Razlike između kategoričkih varijabli utvrđene su upotrebom  $\chi^2$  testa (tablice kontigencije).

Stepen korelacije između kontinuiranih varijabli koje prate normalnu raspodelu ispitivan je Pearson parametarskom korelacionom analizom. Za varijable koje ne prate normalnu raspodelu stepen korelacije je ispitivan Spearman neparametarskom korelacionom analizom.

Statistička obrada podatak izvedena je korišćenjem računarskih programa Microsoft Excel (verzija 2010; Microsoft, SAD), Medcalc (verzija 11.4; MedCalc software, Belgium) i IBM SPSS Statistics (verzija 22; IBM, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike kontrolne grupe, pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na hemodijalizi

Osnovne demografske i kliničke karakteristike zdravih ispitanika i pacijenta koji pate od KSB sa i bez značajne stenozе prikazane su u tabeli 2.

Kontrolna grupa je po polu bila podudarna sa pacijentima. S druge strane, zdravi ispitanici su bili značajno mlađi u odnosu na pacijente bez i sa značajnom stenozom ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ; redom). Vrednosti BMI su bile značajno niže u grupi zdravih ispitanika u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom ( $P = 0,003$ ). Vrednosti SP i DP nisu se značajno razlikovali između ispitanika.

Kada je reč o lipidnim parametrima, uočene su značajno više koncentracije HDL-H kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente bez značajne stenozе ( $P < 0,001$ ) i pacijente sa značajnom stenozom ( $P < 0,001$ ), dok se koncentracije UH i LDL-H nisu značajno razlikovale među ispitanicima. Koncentracije TG bile su značajno niže u kontrolnoj grupi u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom ( $P = 0,013$ ). Koncentracije glukoze, insulina i vrednosti HOMA IR indeksa bile su značajno niže u zdravih ispitanika samo u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom ( $P = 0,011$ ;  $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ; redom). Koncentracija hsCRP je bila značajno niža kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente bez i sa značajnom stenozom ( $P = 0,009$ ;  $P < 0,001$ ; redom).

Međusobnim poređenjem pacijenta uočeno je da su pacijenti sa značajnom stenozom imali značajno više vrednosti BMI i koncentracije insulina u odnosu na pacijente bez značajne stenozе ( $P = 0,027$ ;  $P < 0,001$ ; redom). Veliki broj ispitivanih pacijenata je bio na terapiji jednim ili više lekova, iz grupe: statina, ACE inhibitora,  $\beta$ -blokatora i diuretika. Uzimajući u obzir moguće efekte navedenih grupa lekova na ispitivane parametre bilo je značajno utvrditi da ne postoji razlika u zastupljenosti pojedinih grupa lekova među ispitivanim pacijentima.

Tabela 2. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa KSB i zdravih ispitanika

Parametar	KG	Pacijenti sa KSB		
		Svi	Bez značajne stenozе	Sa značajnom stenozom
<i>Muškarci/Žene</i>	15/18	35/34	15/28	20/6
<i>Starost (godine)</i>	45,3±9,0	60.2±11.4 <sup>†,***</sup>	61.1±11.6 <sup>†,***</sup>	58.1±9.9 <sup>†,***</sup>
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	25,0±3,6	26.7±3.9 <sup>†,*</sup>	26.2±3.6	28.6±4.2 <sup>†,*</sup>
<i>SP (mm Hg)</i>	126±15	120±14	122±15	121±13
<i>DP (mm Hg)</i>	85±12	78±10	80±10	73±9
<i>UH (mmol/L)</i>	5,07±0,92	4.88±1.11	4.97±1.12	4.60±1.06
<i>HDL-H (mmol/L)</i>	1,60 (1,47-1,75)	1,16 (1,09-1,25) <sup>†,***</sup>	1,20(1,11-1,29) <sup>†,***</sup>	1,08(0,92-1,26) <sup>†,***</sup>
<i>LDL-H (mmol/L)</i>	2,90 (2,61-3,24)	2,84 (2,58-3,13)	2,83 (2,53-3,15)	2,87 (2,31-3,58)
<i>TG(mmol/L)</i>	1,24 (1,06-1,47)	1,51 (1,34-1,70)	1,41(1,23-1,61)	1,81 (1,42-2,31) <sup>†,*</sup>
<i>Glukoza (mmol/L)</i>	5,11±0,43	5,35±0,66 <sup>†,*</sup>	5,33±0,66	5,54±0,86 <sup>†,*</sup>
<i>Insulin (μU/L)</i>	8,27 (7,11-9,62)	9,99 (8,58-11,65)	9,03 (7,64-10,67) <sup>†,*</sup>	13,08 (9,34-18,31) <sup>†,*</sup>
<i>HOMA IR indeks</i>	1,88 (1,60-2,21)	2,46 (2,07-2,91) <sup>†,*</sup>	2,22 (1,85-2,67)	3,20 (2,16-4,73) <sup>†,***</sup>
<i>hsCRP (mg/L)</i>	1,16 (0,71-1,45)	2,80 (1,12-9,70) <sup>†,***</sup>	2,42 (1,25-5,62) <sup>†,***</sup>	7,67 (1,06-20,05) <sup>†,***</sup>
<b>TERAPIJA</b>				
<b>Statini</b>	/	36 %	35 %	38%
<b>ACE inhibitori</b>	/	65 %	53 %	77 %
<b>β-blokatori</b>	/	70 %	70 %	70%
<b>Diuretici</b>	/	25 %	35 %	15 %

Vrednosti HDL-H, LDL-H, TG, insulina, HOMA IR indeksa, kreatinina i hsCRP su logaritamski transformisane kako bi podaci bili normalno distribuirani i prikazani kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%. Starost, BMI, SP, DP, UH i glukoza su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. †-značajno različito u odnosu na zdrave ispitanike; ‡-značajno različito u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom;

\*-P<0.05 ;\*\*-P<0.01; \*\*\*-P<0.001;

Osnovne demografske i kliničke karakteristike zdravih ispitanika i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi (HD) su prikazane u tabeli 3. Zdravi ispitanici su bili značajno mlađi i imali značajno više vrednosti BMI u odnosu na pacijente (P=0,003; P=0,002; redom), dok su ove dve grupe ispitanika bile podudarne po zatupljenosti muškog i ženskog pola. Očekivano, koncentracije ureje i kreatinina bile su višestruko povećane u grupi pacijenata (P<0,001; P<0,001; redom), kao i vrednosti TG (P<0,001), insulina (P<0,001), hsCRP (P<0,001) i IMT (P<0,001), dok su vrednosti HDL-H bile značajno snižene (P<0,001). Zdravi ispitanici imali su nešto više vrednosti UH u odnosu na pacijente (P=0,047), a koncentracije LDL-H nisu se značajno razlikovale.

Tabela 3. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi (HD) i zdravih ispitanika

	<b>KG</b>	<b>HD</b>	<b>P</b>
<i>Muškarci/Žene</i>	15/18	19/12	0.132***
<i>Starost (godine)</i>	45±9	55±15	0,003*
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	24,9±3,6	22,2±3,0	0,002*
<i>Urea (mmol/L)</i>	5,76 (5,33-6,23)	21,16 (19,60-22,84)	<0,001*
<i>Kreatinin (μmol/L)</i>	86,5 (82,7-90,4)	982,4 (929,4-1038,4)	<0,001*
<i>UH (mmol/L)</i>	5,07±0,92	4,60±0,94	0,047*
<i>HDL-H (mmol/L)</i>	1,60 (1,47-1,75)	0,85 (0,76-0,95)	<0,001*
<i>LDL-H (mmol/L)</i>	3,09±0,76	2,73±0,83	0,084*
<i>TG (mmol/L)</i>	1,24 (1,06-1,47)	1,75 (1,46-2,11)	0,006*
<i>Insulin (mU/L)</i>	8,27 (7,11-9,62)	42.29±39,91	<0,001*
<i>hsCRP (mg/L)</i>	1,16 (0,71-1,45)	5,20 (2,62-11,17)	<0,001**
<i>IMT (mm)</i>	0,45 (0,00-0,50)	0,65 (0,55-0,70)	<0,001**

Urea, kreatinin, HDL-H, TG i IMT su su logaritamski transformisane kako bi podaci bili normalno distribuisani i prikazani kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%; Starost, BMI, UH i LDL-H su prezentovani kao srednja vrednost ± standardna devijacija;

\*- Varijable su poređene Studentovim t testom.

\*\* - Varijable su poređene Mann-Whitney U testom.

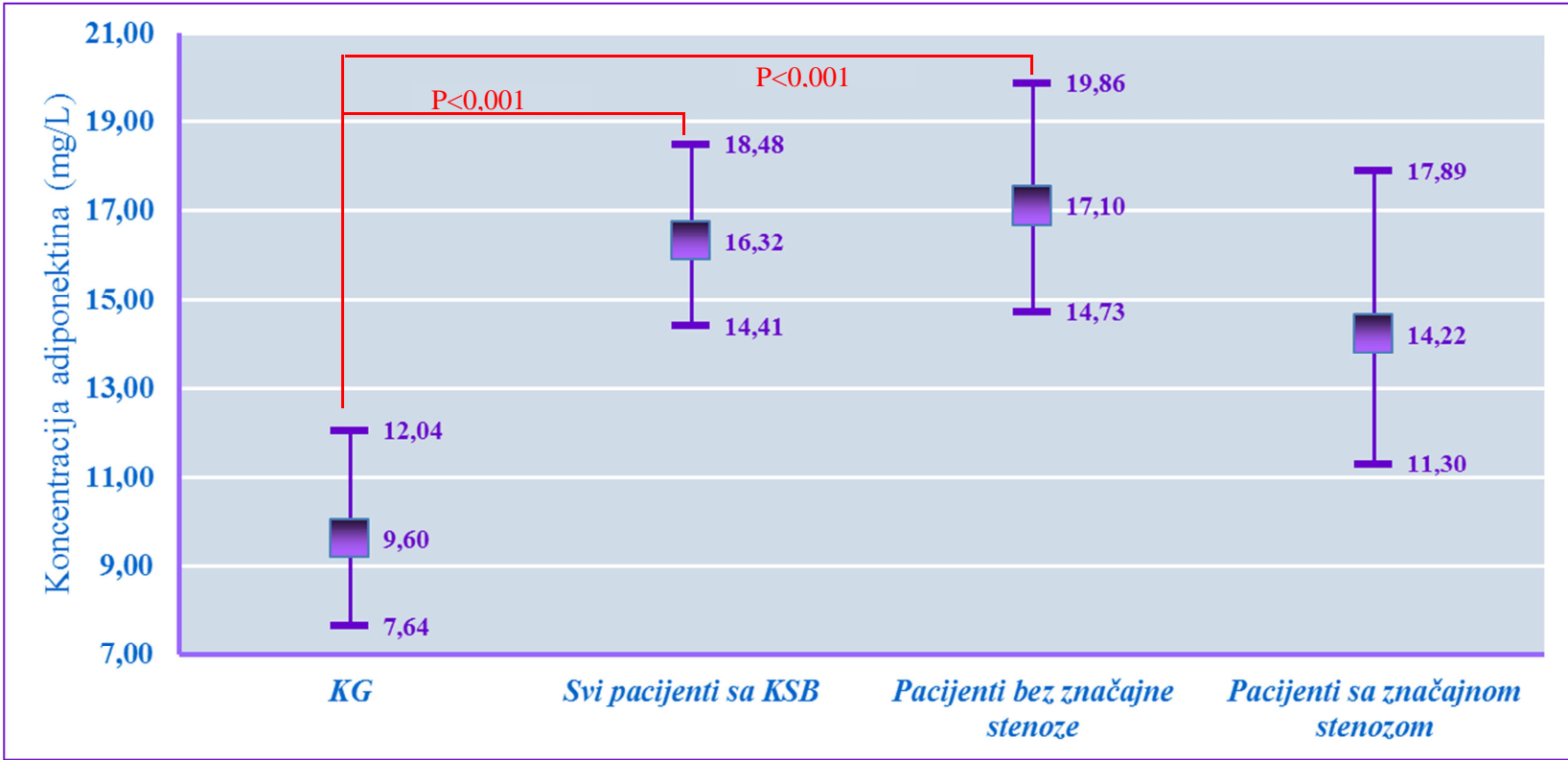
\*\*\*- Varijable su poređene Chi-kvadrat testom.

## **4.2. Analiza koncentracije adiponektina u posmatranim grupama**

Shapiro-Wilk analiza pokazala je da koncentracija adiponektina ni u jednoj od ispitivanih grupa ne prati normalnu raspodelu. Međutim, nakon logaritamske transformacije, podaci su zadovoljili kriterijume Shapiro-Wilk testa za normalnu raspodelu. Koncentracije adiponektina prikazane su kao geometrijske sredine i interval pouzdanosti za 95%.

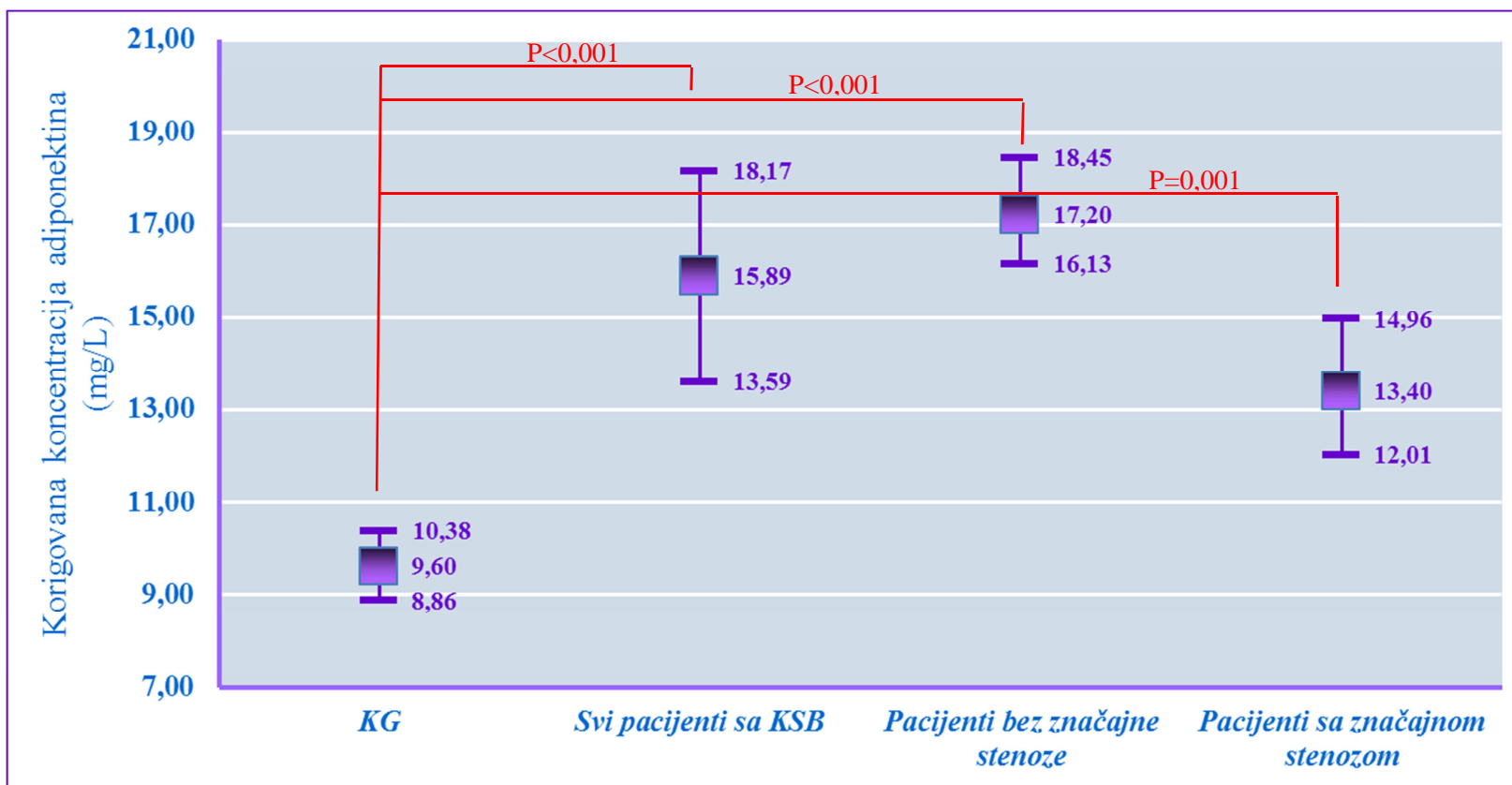
### **4.2.1. Analiza koncentracije adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB**

Zdravi ispitanici imali su značajno niže koncentracije adiponektina u odnosu na sve pacijente sa KSB ( $P < 0,001$ ), kao i u odnosu na pacijente bez značajne stenozе ( $P < 0,001$ ), ali ne i u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom ( $P = 0,065$ ) (Slika 25). Nakon korekcije koncentracije adiponektina za vrednosti BMI i starost primenom ANCOVA statističke metode dobijeno je da zdravi ispitanici imaju značajno niže vrednosti kako kod pacijenta bez tako i kod pacijenata sa značajnom stenozom ( $P < 0,001$ ;  $P = 0,001$ ; redom). Koncentracije adiponektina nisu se značajno razlikovale između dve ispitivane grupe pacijenata ni nakon korekcije za vrednosti BMI ( $P = 0,287$ ) (Slika 26).



Slika 25. Koncentracija adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB bez i sa značajnom stenozom.

Koncentracije adiponektina su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

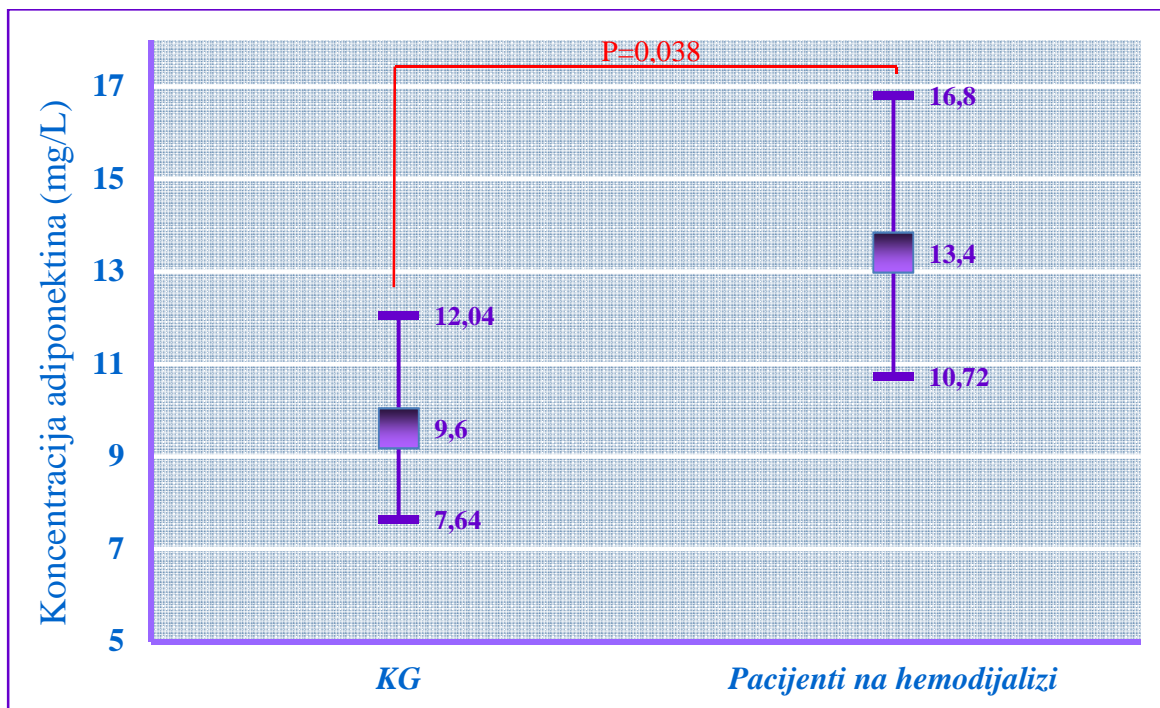


Slika 26. Koncentracija adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB bez i sa značajnom stenozom nakon korekcije za vrednost BMI i starost. Koncentracije adiponektina su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

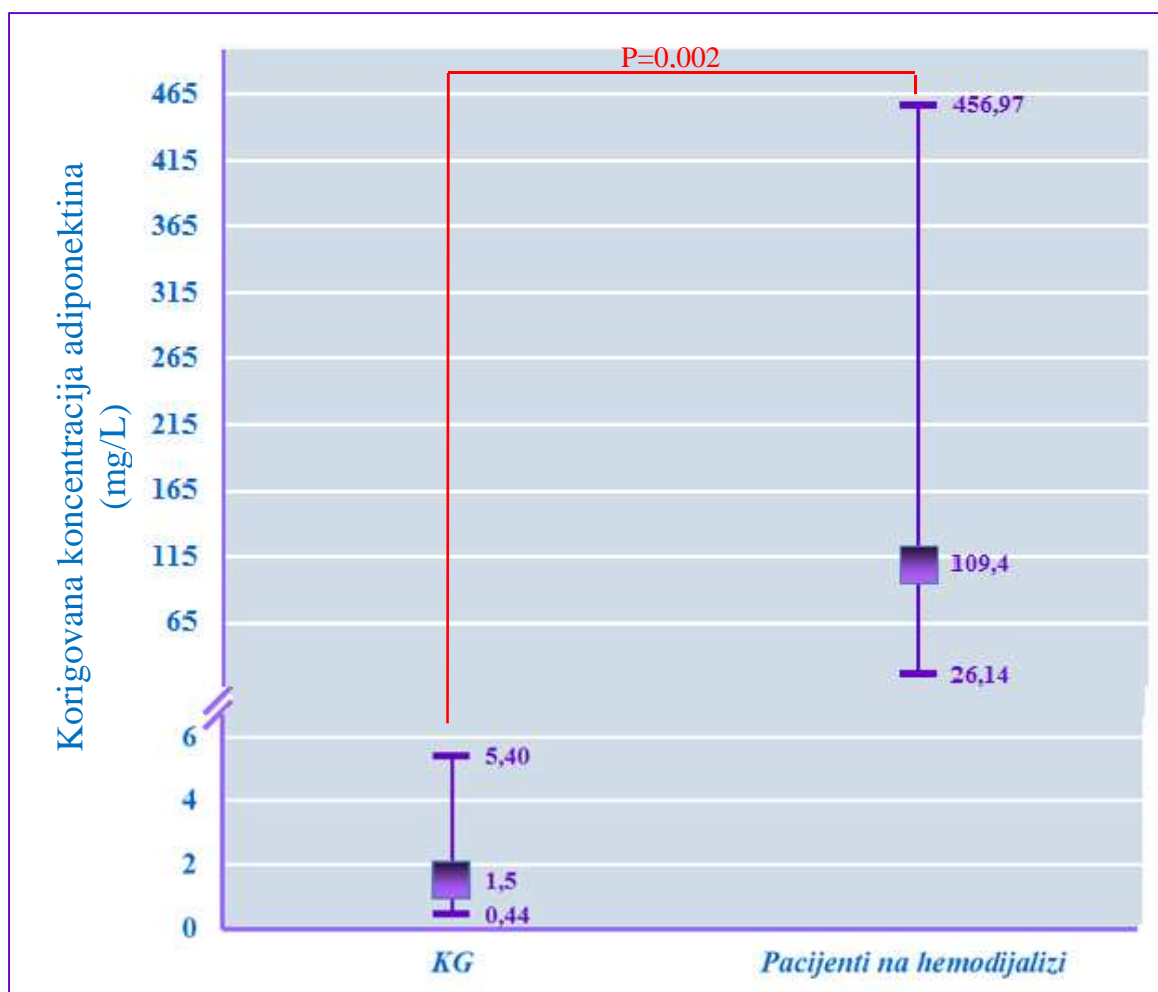


#### 4.2.2. Analiza koncentracije adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi

Uporedni prikaz nivoa adiponektina kod zdravih ispitanika i pacijenata na hemodijalizi prikazan je na slici 5. Uočavaju se značajno više vrednosti koncentracije adiponektina kod pacijenata na hemodijalizi ( $P=0,038$ ) (Slika 27). Uzimajući u obzir značajnu razliku u BMI i koncentraciji kreatinina između ove dve grupe ispitanika, kao i zavisnost adiponektina od ova dva parametra, primenom ANCOVA statističke analize izvršili smo korekciju vrednosti koncentracije adiponektina za navedene parametre, nakon čega smo dobili još značajniju razliku u koncentraciji adiponektina ( $P=0,002$ ) (Slika 28).



Slika 27. Koncentracija adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi. Koncentracije adiponektina su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Slika 28. Koncentracija adiponektina u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi nakon korekcije za vrednost BMI, starosti i koncentraciju kreatinina. Koncentracije adiponektina su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

### **4.3. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama**

U cilju provere normalnosti raspodele nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 korištena Shapiro-Wilk analiza je pokazala da navedeni parametri ne prate normalnu raspodelu ni u jednoj od ispitivanih grupa. Za razliku od koncentracije adiponektina, u slučaju nivoa iRNK adiponektinskih receptora logaritamska transformacija nije uspela da podatke prilagodi normalnoj raspodeli, te su podaci prikazani su kao medijane i interkvartilni raspon

#### **4.3.1. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB**

Poređenjem nivoa iRNK adiponektinskih receptora između zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB utvrđeno je da su nivoi iRNK AdipoR1 bili značajno niži kod pacijenata sa KSB u odnosu na zdrave ispitanike ( $P < 0,001$ ), dok se nivoi iRNK AdipoR2 nisu značajno razlikovali ( $P = 0,872$ ). Kako bi detaljnije sagledali vezu između razvoja KSB i nivoa iRNK adiponektinskih receptora pacijente sa KSB podelili smo prema nalazu koronarografije na pacijente bez i sa značajnom stenozom. Značajno niži nivoi iRNK AdipoR1 uočeni su kod pacijenata bez i sa značajnom stenozom u odnosu na zdrave ispitanike ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ; redom), dok razlika u nivoima iRNK AdipoR2 nije bilo ( $P = 0,376$ ;  $P = 0,102$ ; redom). S druge strane, između pacijenata bez i sa značajnom stenozom nije uočena značajna razlika u nivoima iRNK AdipoR1 ( $P = 0,256$ ) i AdipoR2 ( $P = 0,055$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Poređenje nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 između KG i pacijenata sa KSB.

Parametar	KG	Pacijenti sa KSB		
		Svi	Bez značajne stenozе	Sa značajnom stenozom
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,920 (0,836-1,052)	0,668 (0,504-0,774) <sup>a,***</sup>	0,630 (0,494-0,745) <sup>a,***</sup>	0,702 (0,575-0,797) <sup>a,***</sup>
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,950 (0,822-1,106)	0,946 (0,801-1,201)	0,900 (0,790-1,062)	1,003 (0,859-1,256)

Nivoi iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazani kao medijane sa interkvartilnim rasponom.  
a-statistički značajno različito u odnosu na KG; \*\*\* - P<0,001;

#### 4.3.2. Analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi

Poređenjem nivoa iRNK adiponektinskih receptora između zdravih ispitanika i pacijenata na hemodijalizi uočeno je da su nivoi iRNK AdipoR1 značajno niži kod pacijenata na hemodijalizi ( $P=0,034$ ), dok se nivoi iRNK za AdipoR2 nisu značajno razlikovali ( $P=0,783$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Poređenje nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 između KG i pacijenata sa HBI na hemodijalizi.

	KG	Pacijenti sa HBI na hemodijalizi	P
Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK	0,920 (0,836-1,052)	0,714 (0,569-0,896)	0,034
Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK	0,950 (0,822-1,106)	0,917 (0,878-1,038)	0,783

Nivoi iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazani kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### **4.4. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije u posmatranim grupama**

Korelaciona analiza je sprovedena sa ciljem provere postojanja veze između koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora i različitih lipidnih i nelipidnih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u svim posmatranim grupama što je značajno uzimajući u obzir višefaktorski karakter razvoja aterosklerotskog procesa. Korelacija između normalno distribuiranih parametara ispitivana je Pearson korelacionom analizom, dok je za ispitivanje korelacije između podataka koji nisu normalno distribuirani korišćena Spearman korelaciona analiza. U cilju detaljnije analize povezanosti koncentracije adiponektina sa nivoima genske ekspresije adiponektinskih receptora, parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije, u svim ispitivanim grupama ponaosob (kontrolna grupa, pacijenti sa KSB i pacijenti sa HBI na hemodijalizi) izvršena je podela ispitanika prema koncentraciji adiponektina. Kako još uvek ne postoje adekvatno procenjeni referentni opsezi, niti kritične vrednosti koncentracije adiponektina, mi smo iz raspodele vrednosti za svaku posmatranu grupu odredili onu vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu, te nju koristili kao graničnu. Kako bi se ispitala povezanost koncentracije adiponektina sa nivoima iRNK adiponektinskih receptora, parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije posmatrane su vrednosti sledećih parametara u odnosu na koncentraciju adiponektina:

- Nivo iRNK AdipoR1
- Nivo iRNK AdipoR2
- UH
- HDL-H
- LDL-H
- TG
- Insulin
- HOMA IR indeks
- hsCRP

#### **4.4.1. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u kontrolnoj grupi**

U grupi zdravih ispitanika uočena je značajna negativna korelacija koncentracije adiponektina sa BMI i sistolnim krvnim pritiskom, dok starost nije pokazala značajnu vezu sa ovim parametrom. Kada je reč o lipidnim parametrima, nivoi HDL-H i su pokazali pozitivnu, a nivoi TG negativnu vezu sa koncentracijom adiponektina. Oba pokazatelja homeostaze glukoze, insulin i HOMA IR indeks, kao i koncentracije hsCRP i kreatinina pokazale su negativnu korelaciju sa nivoima adiponektina (Tabela 6).

Nivoi iRNK AdipoR1 značajno su negativno korelirali sa starošću i pozitivno sa nivoima iRNK AdipoR2 (Tabela 7 i 8).

Tabela 6. Korelacije koncentracije adiponektina sa nivoom iRNK AdipoR1, AdipoR2, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB u kontrolnoj grupi

	Adiponektin (mg/L)	
	$\rho$	P
<i>Starost (godine)</i>	0,59	0,743
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	-0,613	<0,001
<i>SP (mm Hg)</i>	-0,410	0,022
<i>DP (mm Hg)</i>	-0,157	0,400
<i>UH (mmol/L)</i>	0,120	0,505
<i>HDL-H (mmol/L)</i>	0,672	<0,001
<i>LDL-H (mmol/L)</i>	0,184	0,314
<i>TG (mmol/L)</i>	-0,490	0,004
<i>Glukoza (mmol/L)</i>	-0,310	0,080
<i>Insulin (<math>\mu</math>U/L)</i>	-0,386	0,038
<i>HOMA IR indeks</i>	-0,416	0,025
<i>hsCRP (mg/L)</i>	-0,379	0,030
<i>Kreatinin (<math>\mu</math>mol/L)</i>	-0,470	0,006
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1<sup>\$</sup></i>	-0,041	0,822
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2<sup>\$</sup></i>	-0,131	0,468

\$- Spearman korelaciona analiza



Tabela 7. Korelacije nivoa iRNK AdipoR1 sa nivoom iRNK AdipoR2, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB u kontrolnoj grupi

<b><u>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</u></b>		
	<b>ρ</b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>§</sup>	-0,374	0,032
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>§</sup>	-0,098	0,588
<i>SP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,246	0,182
<i>DP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,245	0,183
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,329	0,062
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	0,038	0,833
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,328	0,067
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,016	0,929
<i>Glukoza (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,197	0,271
<i>Insulin (μU/L)</i> <sup>§</sup>	0,209	0,276
<i>HOMA IR indeks</i> <sup>§</sup>	0,135	0,484
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,329	0,062
<i>Kreatinin (μmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,050	0,782
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,410	0,887
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</i> <sup>§</sup>	0,666	<0,001

§- Spearman korelaciona analiza

Tabela 8. Korelacije nivoa iRNK AdipoR2 sa nivoom iRNK AdipoR1, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB u kontrolnoj grupi

<b>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</b>		
	<b>ρ</b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>§</sup>	-0,035	0,845
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>§</sup>	0,052	0,773
<i>SP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,266	0,149
<i>DP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,120	0,519
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,290	0,101
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	0,170	0,344
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,327	0,068
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,018	0,922
<i>Glukoza (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,247	0,167
<i>Insulin (μU/L)</i> <sup>§</sup>	0,035	0,855
<i>HOMA IR indeks</i> <sup>§</sup>	-0,019	0,921
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,143	0,427
<i>Kreatinin (μmol/L)</i> <sup>§</sup>	0,040	0,826
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,131	0,468
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</i> <sup>§</sup>	0,666	<0,001

§- Spearman korelaciona analiza

#### **4.4.2. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa KSB**

U grupi pacijenata sa KSB koncentracija adiponektina negativno je korelirala sa BMI. Ni u ovoj grupi ispitanika starost nije pokazala značajnu vezu sa koncentracijama adiponektina. Kada je reč o parametrima lipidnog statusa i homeostaze glukoze, koncentracija adiponektina je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom TG, glukoze, insulina i vrednostima HOMA IR indeksa (Tabela 9).

Nivoi iRNK AdipoR1 pokazali su značajnu negativnu korelaciju sa starošću, i jaku pozitivnu korelaciju sa nivoima iRNK AdipoR2 (Tabela 10 i 11).

Tabela 9. Korelacije koncentracije adiponektina sa nivoom iRNK AdipoR1, AdipoR2, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa KSB

	<b><u>Adiponektin (mg/L)</u></b>	
	<b>ρ</b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i>	0,196	0,121
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	-0,318	0,012
<i>SP (mm Hg)</i>	-0,110	0,386
<i>DP (mm Hg)</i>	0,183	0,156
<i>UH (mmol/L)</i>	0,051	0,696
<i>HDL-H (mmol/L)</i>	0,060	0,637
<i>LDL-H (mmol/L)</i>	0,040	0,756
<i>TG (mmol/L)</i>	-0,271	0,031
<i>Glukoza (mmol/L)</i>	-0,372	0,003
<i>Insulin (μU/L)</i>	-0,323	0,016
<i>HOMA IR indeks</i>	-0,341	0,011
<i>hsCRP (mg/L)</i>	0,067	0,604
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1<sup>§</sup></i>	-0,198	0,117
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2<sup>§</sup></i>	-0,220	0,081

§- Spearman korelaciona analiza

Tabela 10. Korelacije nivoa iRNK AdipoR1 sa nivoom iRNK AdipoR2, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa KSB

<b>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</b>		
	<b><math>\rho</math></b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>\$</sup>	-0,253	0,036
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>\$</sup>	-0,119	0,337
<i>SP (mm Hg)</i> <sup>\$</sup>	-0,080	0,512
<i>DP (mm Hg)</i> <sup>\$</sup>	-0,032	0,798
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,182	0,140
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,167	0,169
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,074	0,553
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,100	0,413
<i>Glukoza (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,154	0,221
<i>Insulin (<math>\mu</math>U/L)</i> <sup>\$</sup>	0,003	0,982
<i>HOMA IR indeks</i> <sup>\$</sup>	-0,061	0,657
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,155	0,211
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,198	0,117
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</i> <sup>\$</sup>	0,601	<0,001

<sup>\$</sup>- Spearman korelaciona analiza

Tabela 11. Korelacije nivoa iRNK AdipoR2 sa nivoom iRNK AdipoR1, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa KSB

<b>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</b>		
	<b><math>\rho</math></b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>§</sup>	-0,213	0,079
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>§</sup>	-0,083	0,502
<i>SP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,129	0,290
<i>DP (mm Hg)</i> <sup>§</sup>	-0,211	0,086
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,121	0,330
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,155	0,202
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,003	0,979
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	0,031	0,801
<i>Glukoza (mmol/L)</i> <sup>§</sup>	-0,030	0,815
<i>Insulin (<math>\mu</math>U/L)</i> <sup>§</sup>	0,061	0,656
<i>HOMA IR indeks</i> <sup>§</sup>	-0,013	0,925
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,182	0,141
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>§</sup>	-0,220	0,081
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</i> <sup>§</sup>	0,606	<0,001

§- Spearman korelaciona analiza

#### **4.4.3. Korelacije koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi**

Koncentracija adiponektina u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi nije pokazala značajnu korelaciju sa BMI. Sa druge strane, značajna pozitivna korelacija uočena je između koncentracije adiponektina i HDL-H, a značajna negativna korelacija između koncentracije adiponektina i koncentracije TG, insulina, hsCRP i kreatinina (Tabela 12).

Kada je reč o nivoima iRNK adiponektinskih receptora, uočena je značajna negativna korelacija između nivoa iRNK AdipoR1 i koncentracije insulina kao i pozitivna korelacija bila je između nivoa iRNK AdipoR2 i koncentracije TG (Tabela 13 i 14) .

Tabela 12. Korelacije koncentracije adiponektina sa nivoom iRNK AdipoR1, AdipoR2, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB u kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

<b>Adiponektin (mg/L)</b>		
	<b><math>\rho</math></b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i>	0,123	0,509
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	-0,193	0,317
<i>Vreme od kada je pacijent počeo sa hemodijalizom (dani)</i>	-0,031	0,867
<i>IMT (mm)</i>	0,026	0,891
<i>UH (mmol/L)</i>	0,070	0,707
<i>HDL-H (mmol/L)</i>	0,584	0,001
<i>LDL-H (mmol/L)</i>	0,157	0,415
<i>TG (mmol/L)</i>	-0,488	0,005
<i>Insulin (mU/L)<sup>§</sup></i>	-0,678	<0,001
<i>hsCRP (mg/L)</i>	-0,434	0,027
<i>Kreatinin (μmol/L)</i>	-0,380	0,035
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1<sup>§</sup></i>	0,131	0,481
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2<sup>§</sup></i>	-0,177	0,368

§- Spearman korelaciona analiza



Tabela 13. Korelacije nivoa iRNK AdipoR1 sa nivoom iRNK AdipoR2, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

<b>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</b>		
	<b><math>\rho</math></b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>\$</sup>	0,065	0,728
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>\$</sup>	-0,208	0,279
<i>Vreme od kada je pacijent počeo sa hemodijalizom (dani)</i> <sup>\$</sup>	0,010	0,957
<i>IMT (mm)</i> <sup>\$</sup>	-0,159	0,353
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,309	0,090
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,244	0,202
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,244	0,202
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,009	0,960
<i>Insulin (mU/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,469	0,021
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	0,035	0,866
<i>Kreatinin (μmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,035	0,853
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	0,131	0,481
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</i> <sup>\$</sup>	-0,061	0,757

<sup>\$</sup>- Spearman korelaciona analiza

Tabela 14. Korelacije nivoa iRNK AdipoR2 sa nivoom iRNK AdipoR1, koncentracijom adiponektina, lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

<b>Normalizovan nivo iRNK AdipoR2</b>		
	<b>ρ</b>	<b>P</b>
<i>Starost (godine)</i> <sup>\$</sup>	-0,061	0,758
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>\$</sup>	0,296	0,142
<i>Vreme od kada je pacijent počeo sa hemodijalizom (dani)</i> <sup>\$</sup>	0,115	0,560
<i>IMT (mm)</i> <sup>\$</sup>	0,221	0,259
<i>UH (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,196	0,319
<i>HDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,236	0,247
<i>LDL-H (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,028	0,893
<i>TG (mmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,461	0,014
<i>Insulin (mU/L)</i> <sup>\$</sup>	0,033	0,896
<i>hsCRP (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	0,005	0,980
<i>Kreatinin (μmol/L)</i> <sup>\$</sup>	0,265	0,173
<i>Adiponektin (mg/L)</i> <sup>\$</sup>	-0,177	0,368
<i>Normalizovan nivo iRNK AdipoR1</i> <sup>\$</sup>	-0,061	0,757

<sup>\$</sup>- Spearman korelaciona analiza

#### 4.4.4. Ispitivanje povezanosti adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije u kontrolnoj grupi

Na osnovu vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu (16,2 mg/L) zdravi ispitanici su podeljeni u dve grupe. Nivoi iRNK AdipoR1 i AdipoR2 nisu se značajno razlikovali između zdravih ispitanika podeljenih prema koncentraciji adiponektina (P=0,110; P=0,06; redom) (Tabela 15).

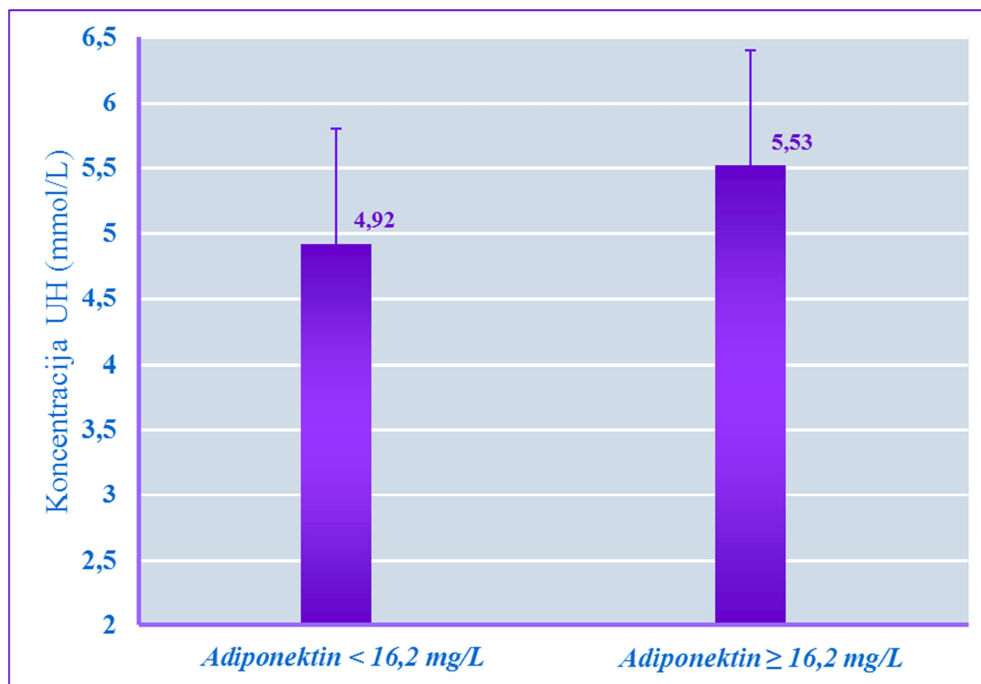
Tabela 15. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele

	Adiponektin<16,2 mg/L	Adiponektin≥16,2 mg/L	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,921 (0,881-1,055)	0,863 (0,702-0,937)	0,110
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	1,061 (0,822--1,136)	0,877 (0,790-0,915)	0,06

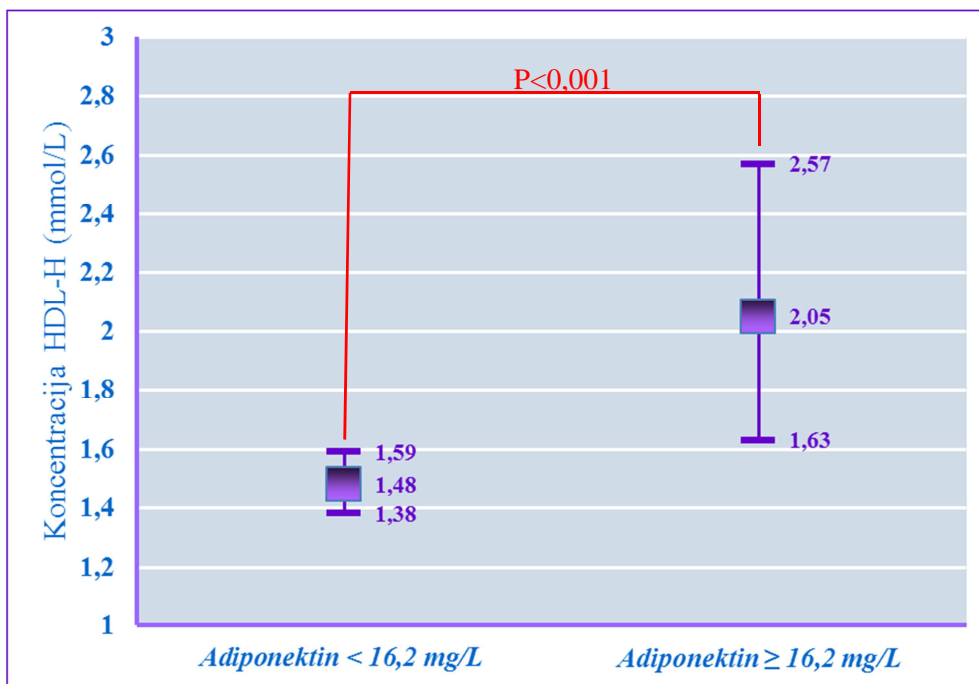
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 prikazanu se kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.4.4.1. Ispitivanje povezanosti adiponektina sa parametrima lipidnog statusa u kontrolnoj grupi

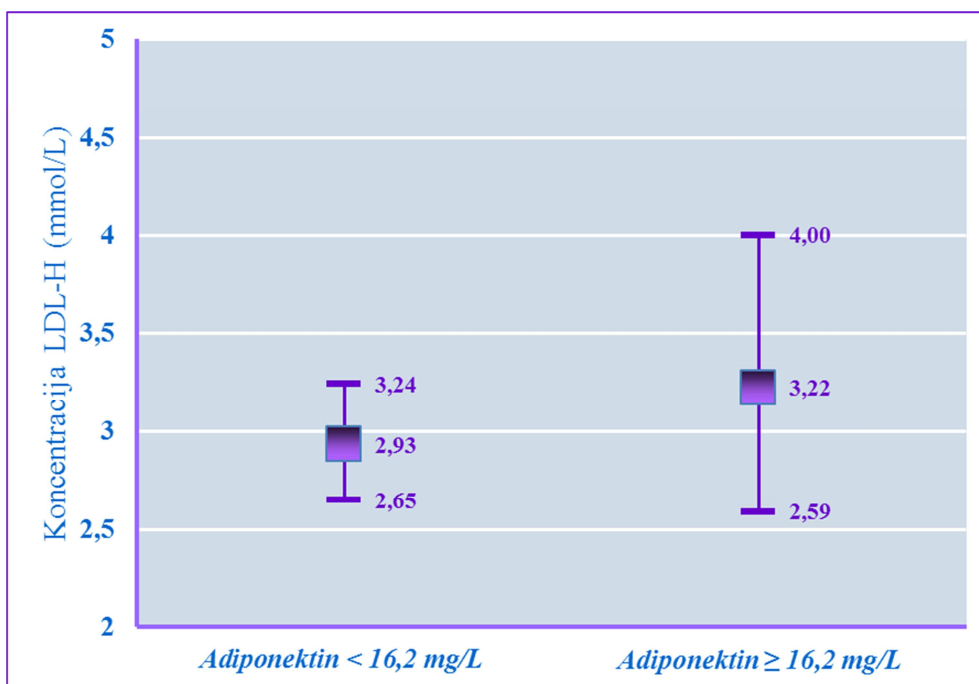
Koncentracije UH nisu se značajno razlikovale između dve grupe zdravih ispitanika ( $P=0,106$ ) (Slika 29). Sa druge strane, uočava se da su ispitanici sa višim vrednostima koncentracije adiponektina imali značajno više vrednosti HDL-H u odnosu na ispitanike sa nižim koncentracijama adiponektina ( $P<0,001$ ) (Slika 30), dok se u koncentracijama LDL-H (Slika 31) i TG (Slika 32) nije mogla uočiti značajna razlika ( $P=0,357$ ;  $P=0,087$ ; redom).



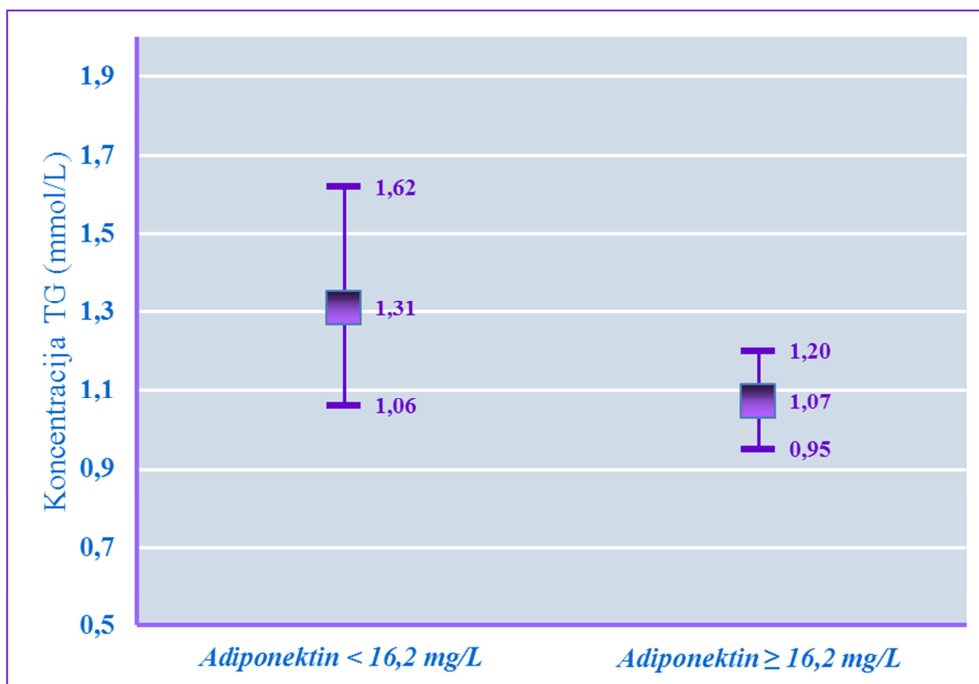
Slika 29. Koncentracije ukupnog holesterola kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije ukupnog holesterola su predstavljene kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.



Slika 30. Koncentracije HDL-holesterola kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije HDL-H su predstavljene kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



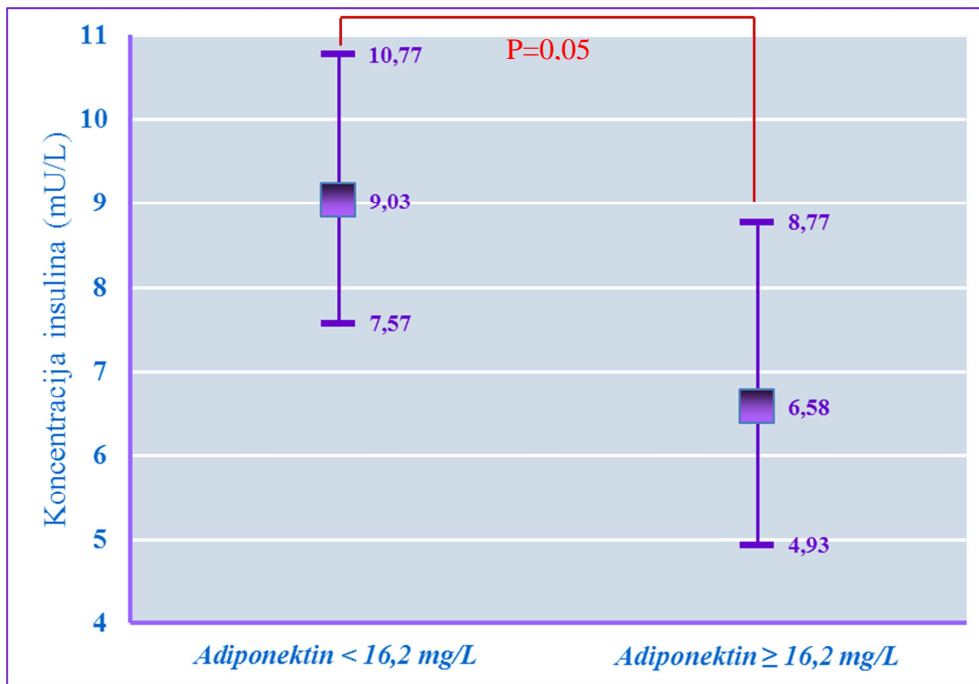
Slika 31. Koncentracije LDL-holesterola kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije LDL-H su prikazane kao kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



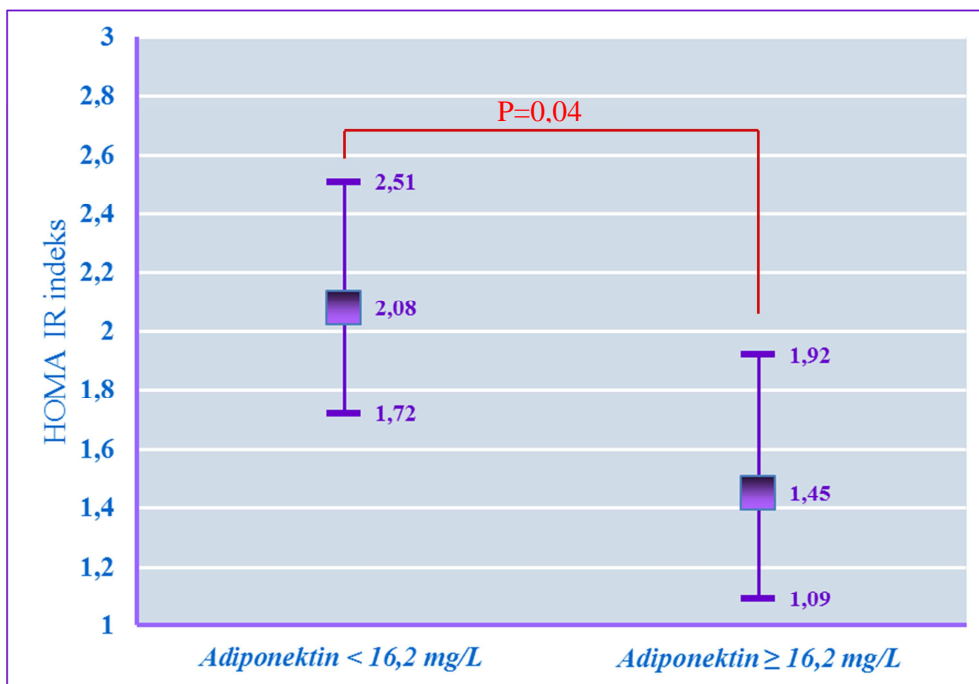
Slika 32. Koncentracije triglicerida kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije TG su predstavljene kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### 4.4.4.2. Ispitivanje povezanosti adiponektina sa parametrima homeostaze glukoze u kontrolnoj grupi

Na slici 33 i 34 su prikazane koncentracije insulina i HOMA IR indeksa kod zdravih ispitanika podeljenih prema koncentraciji adiponektina. Uočava se da ispitanici sa višim koncentracijama adiponektina imaju niže vrednosti insulina ( $P=0,05$ ) i HOMA IR indeksa ( $P=0,04$ ).



Slika 33. Koncentracije insulina kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije insulina su predstavljene kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

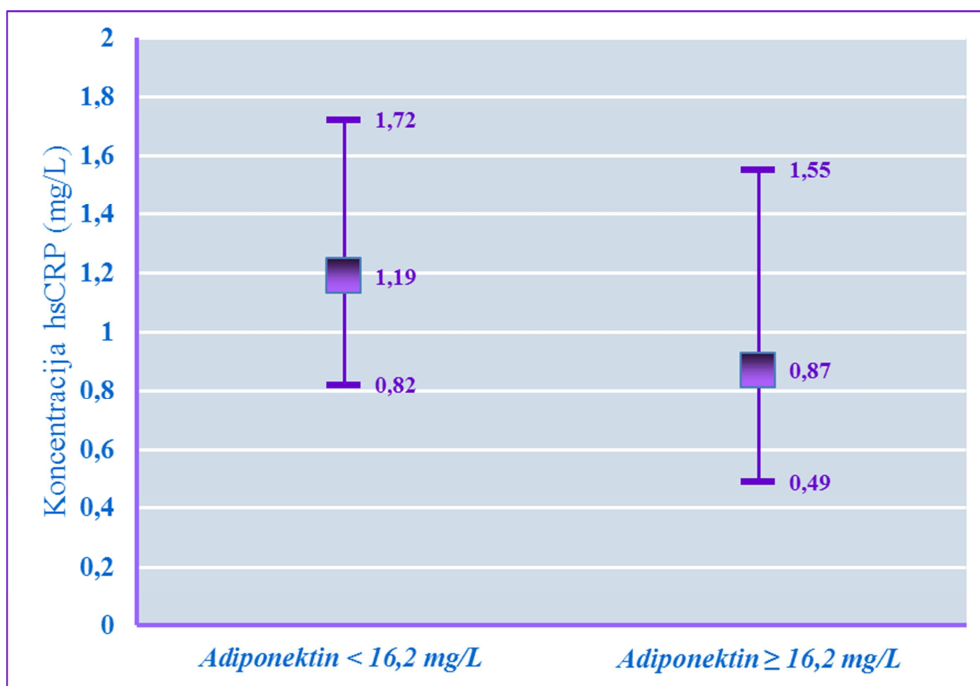


Slika 34. Vrednosti HOMA IR indeksa kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Vrednosti HOMA IR indeksa su predstavljene kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



#### 4.4.4.3. Ispitivanje povezanosti adiponektina sa hsCRP u kontrolnoj grupi

Kada je reč o povezanosti adiponektina i hsCRP kod zdravih ispitanika, uočava se blagi trend sniženja koncentracije hsCRP sa rastom koncentracije adiponektina, međutim statistička analiza nije pokazala značajnost ovog trenda ( $P=0,324$ ) (Slika 35).



Slika 35. Koncentracije hsCRP kod zdravih ispitanika podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije hsCRP su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### 4.4.5. Ispitivanje povezanosti adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije kod pacijenata sa KSB

Pacijenti sa KSB su podeljeni na osnovu koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu (23,2 mg/L) u dve grupe. Kao i u slučaju zdravih ispitanika, nivoi iRNK AdipoR1 i AdipoR2 nisu se razlikovali u dve posmatrane grupe pacijenta ( $P=0,816$ ;  $P=0,215$ ). Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u ove dve grupe pacijenata sa KSB prikazani su u tabeli 16.

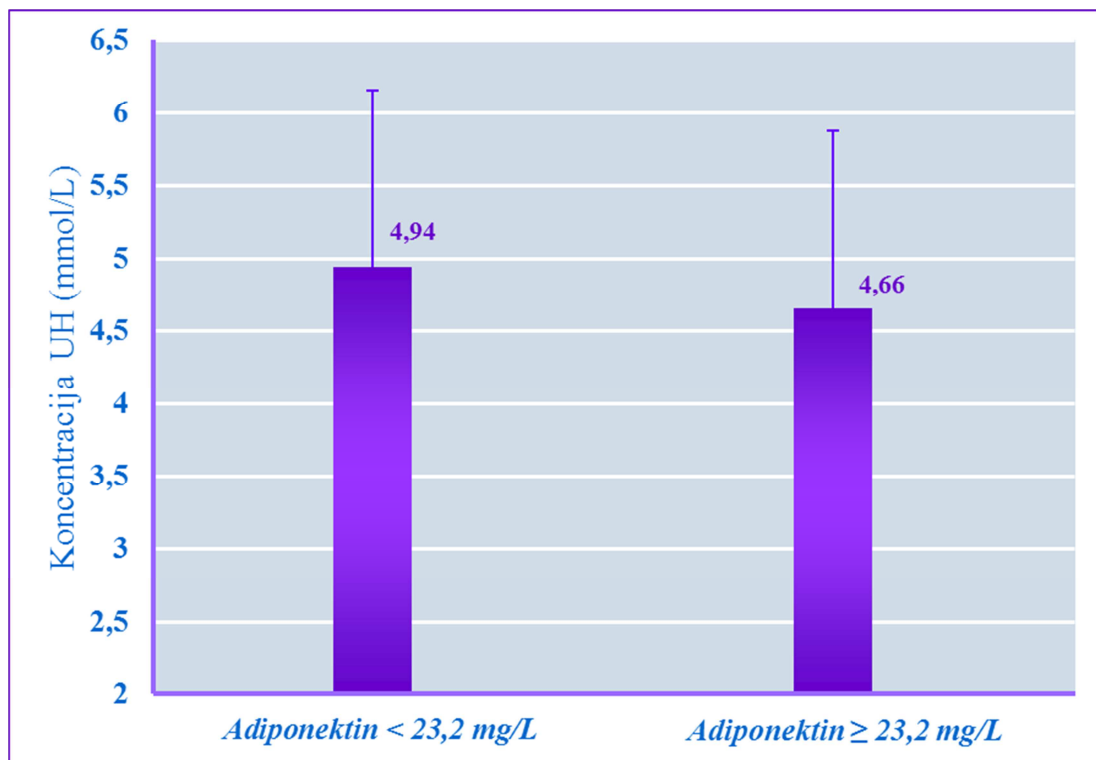
Tabela 16. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele

	Adiponektin < 23,2 mg/L	Adiponektin > 23,2 mg/L	P
Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK	0,668 (0,544-0,794)	0,651 (0,499-0,786)	0,816
Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK	0,964 (0,816-1,234)	0,923 (0,728-1,023)	0,215

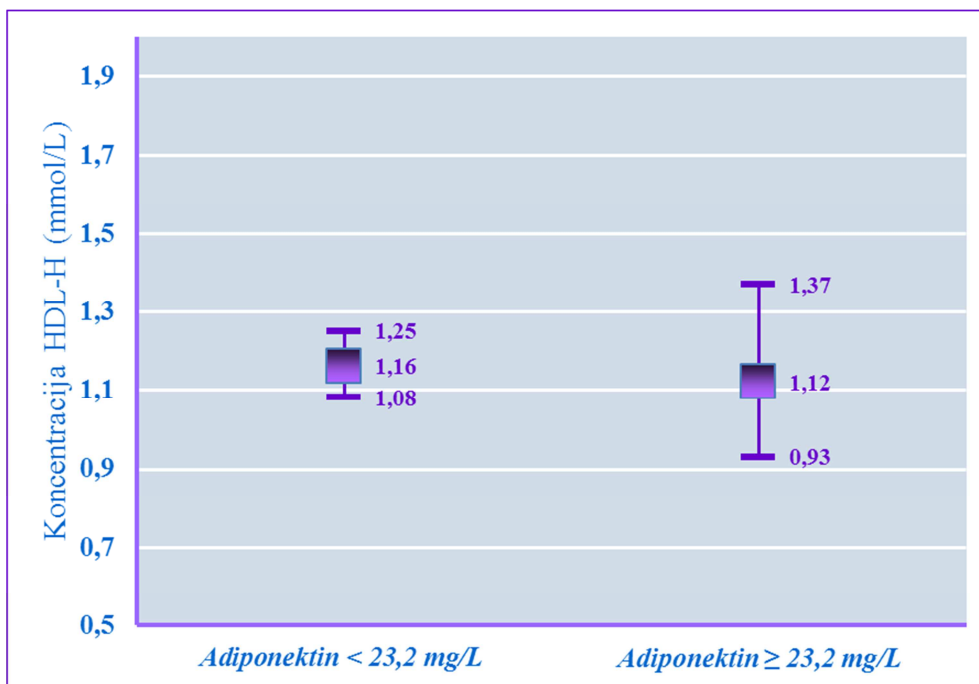
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.4.5.1. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina sa parametrima lipidnog statusa kod pacijenata sa KSB

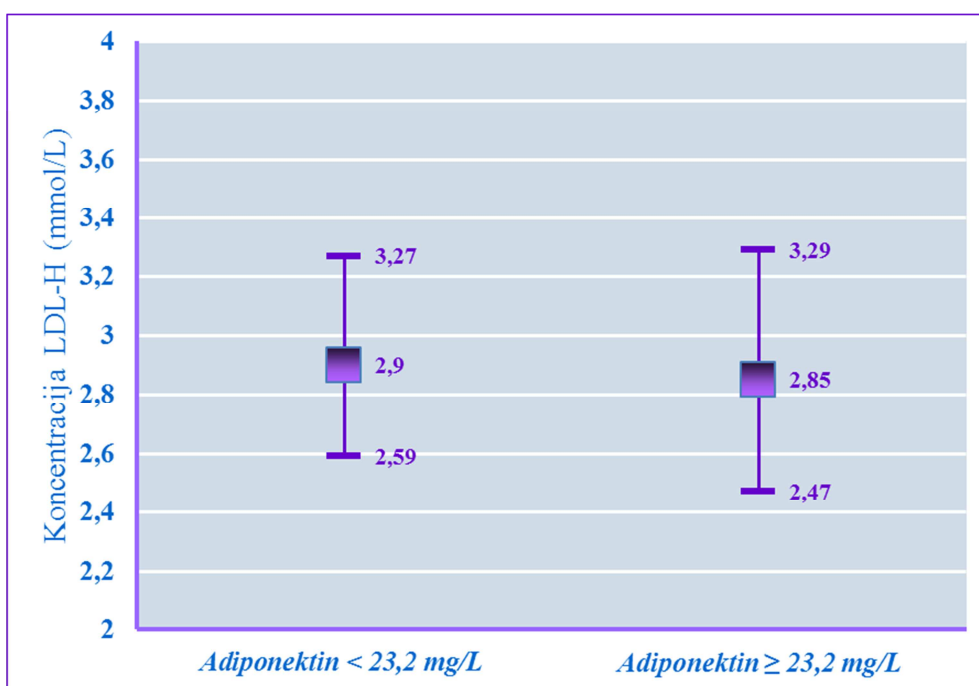
Pacijenti sa višim koncentracijama adiponektina nisu imali značajno različite koncentracije UH (Slika 36), HDL-H (Slika 37) i LDL-H (Slika 38) u odnosu na pacijente sa nižim koncentracijama adiponektina ( $P=0,423$ ;  $P=0,719$ ;  $0,852$ ; redom). Međutim, koncentracije TG bile značajno niže kod pacijenata sa višim koncentracijama adiponektina ( $P=0,001$ ) (Slika 37).



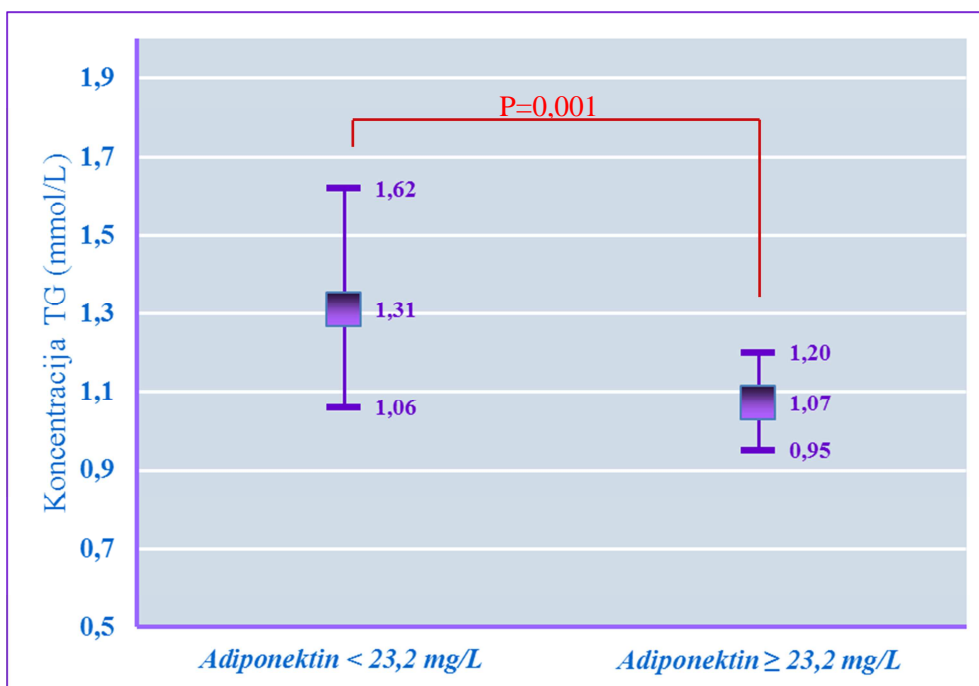
Slika 36. Koncentracije ukupnog holesterola kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije ukupnog holesterola su prikazane kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.



Slika 37. Koncentracije HDL-holesterola kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije HDL-H su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



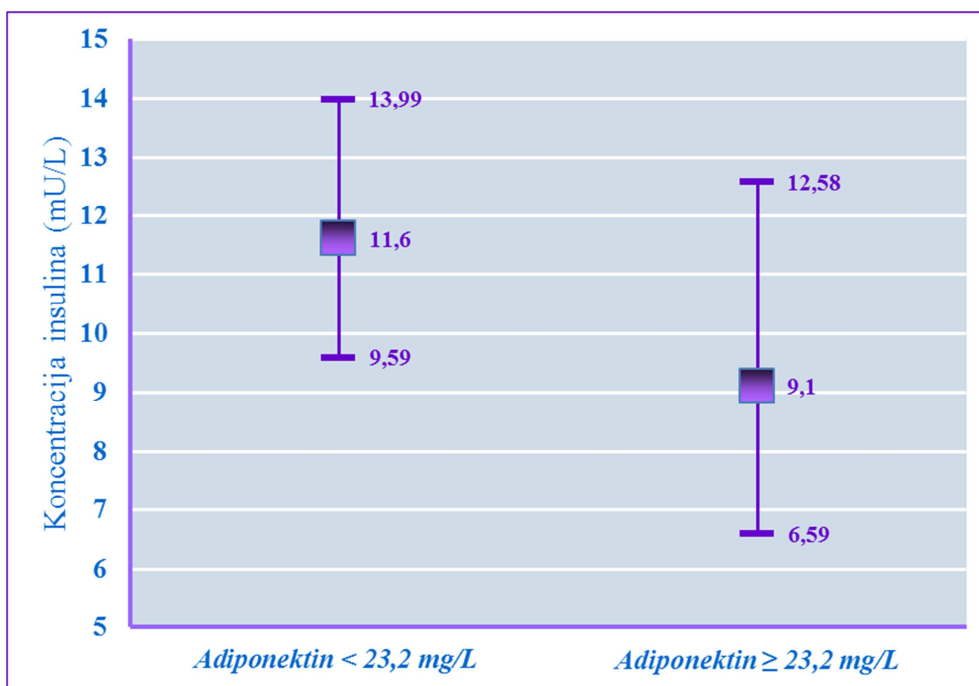
Slika 38. Koncentracije LDL-holesterola kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije LDL-H su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



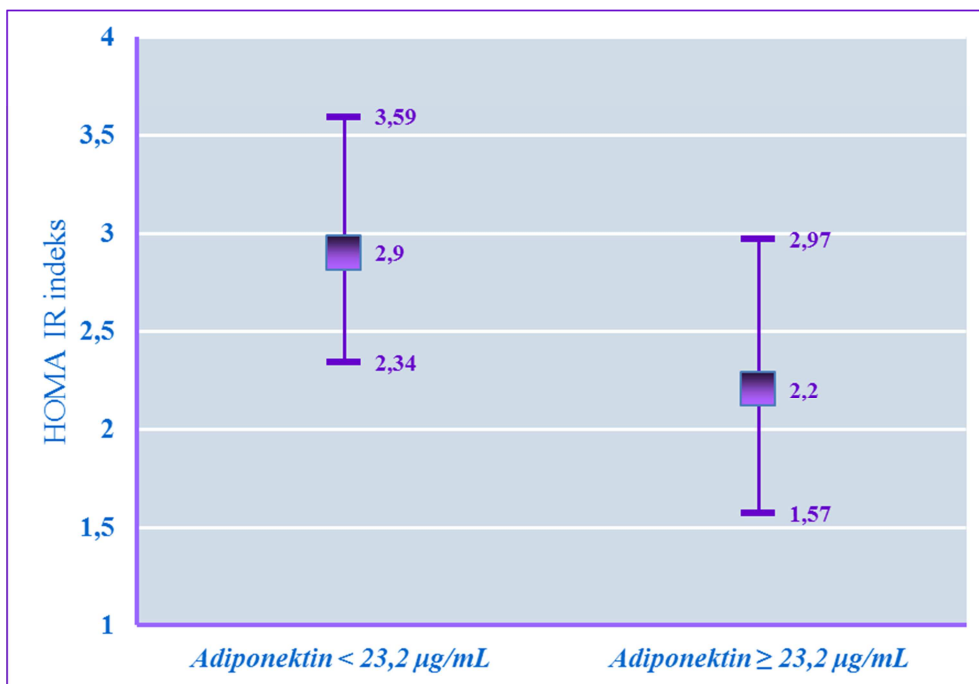
Slika 39. Koncentracije triglicerida kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije TG su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### 4.4.5.2. Ispitivanje povezanost koncentracije adiponektina sa parametrima homeostaze glukoze kod pacijenata sa KSB

Koncentracije insulina (Slika 40) i HOMA IR (Slika 41) indeksa kod pacijenata sa KSB podeljenih prema koncentraciji adiponektina nisu se značajno razlikovali u posmatranim grupama ( $P=0,193$ ;  $P=0,177$ ; redom).



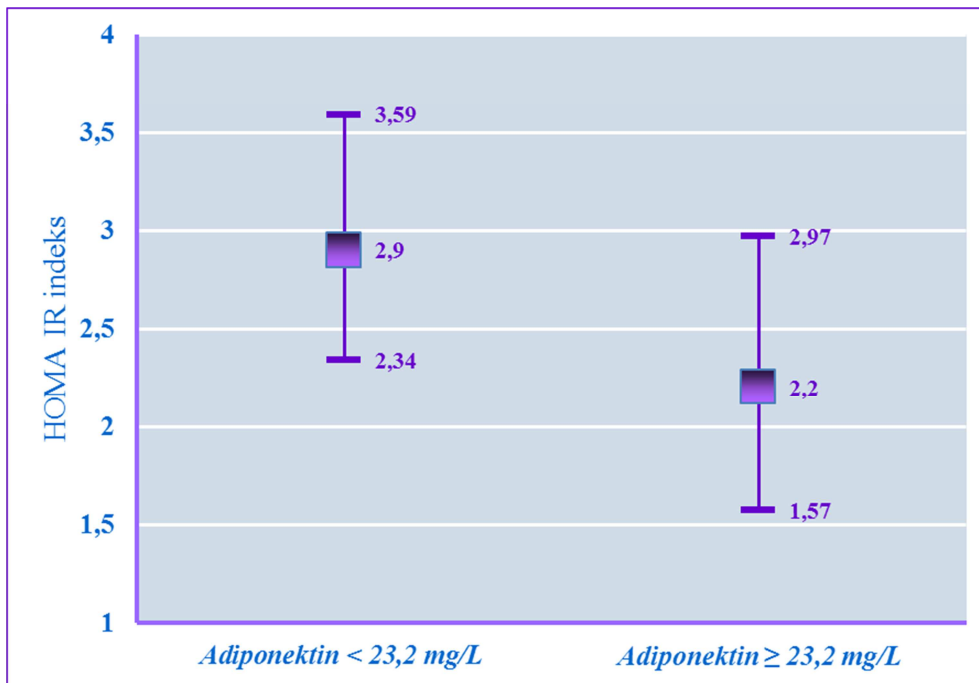
Slika 40. Koncentracije insulina kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije insulina su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Slika 41. Vrednosti HOMA IR indeksa kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Vrednosti HOMA IR indeksa su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### 4.4.5.3. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina sa koncentracijom hsCRP kod pacijenata sa KSB

Pacijenti sa KSB podeljeni prema koncentraciji adiponektina takođe nisu pokazivali značajne razlike u koncentracijama hsCRP ( $P=0,324$ ) (Slika 42).



Slika 42. Koncentracije hsCRP kod pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije hsCRP su prikazane kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



#### 4.4.6. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina i nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 sa parametrima lipidnog status, homeostaze glukoze i inflamacije kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi su podeljeni na osnovu granične koncentracije adiponektina (19,5 mg/L) u dve grupe.

Nije postojala statistički značajna razlika u nivoima iRNK AdipoR1 i AdipoR2 između posmatranih grupa pacijenata ( $P=0,557$ ;  $P=0,212$ ; redom) (Tabela 17).

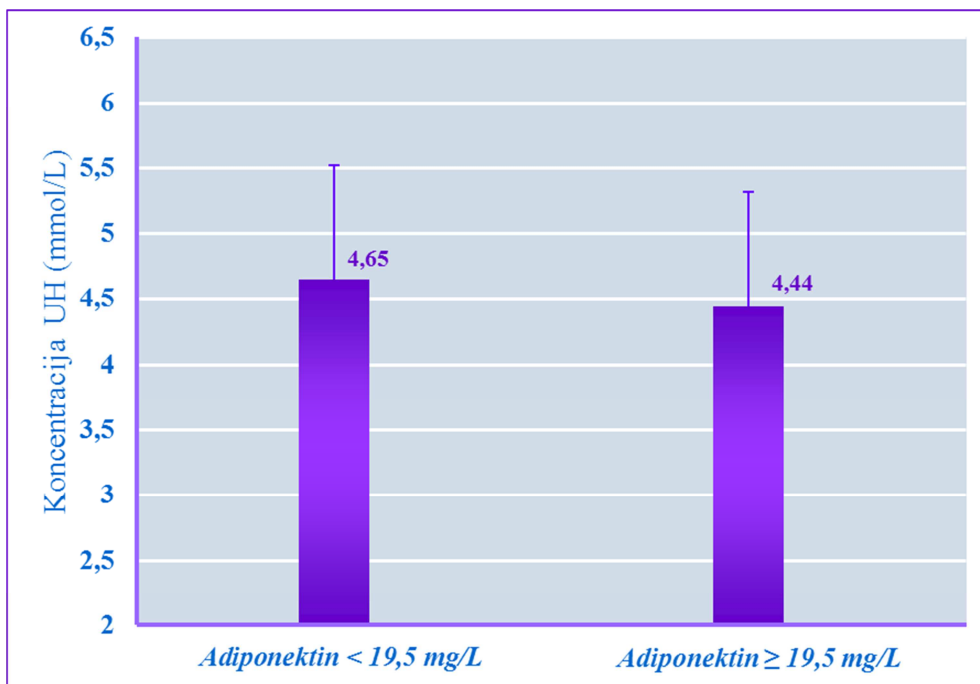
Tabela 17. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele

	Adiponektin<19,5 mg/L	Adiponektin>19,5 mg/L	P
Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK	0,714 (0,590-0,854)	0,818 (0,513-2,059)	0,557
Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK	0,919 (0,882-1,044)	0,857 (0,766-0,998)	0,212

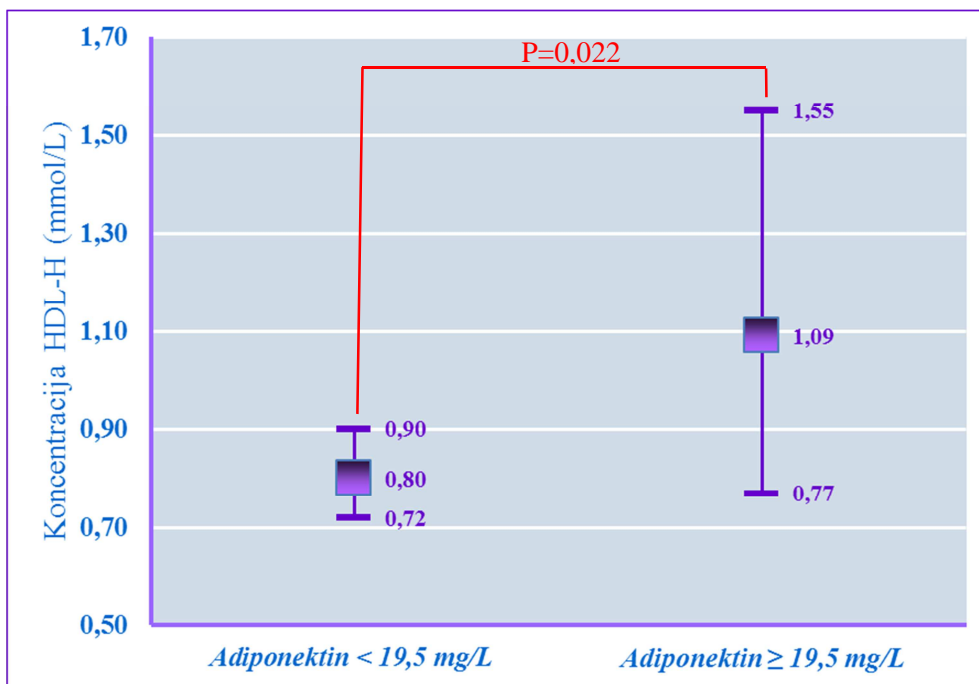
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.4.6.1. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina sa parametrima lipidnog statusa kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

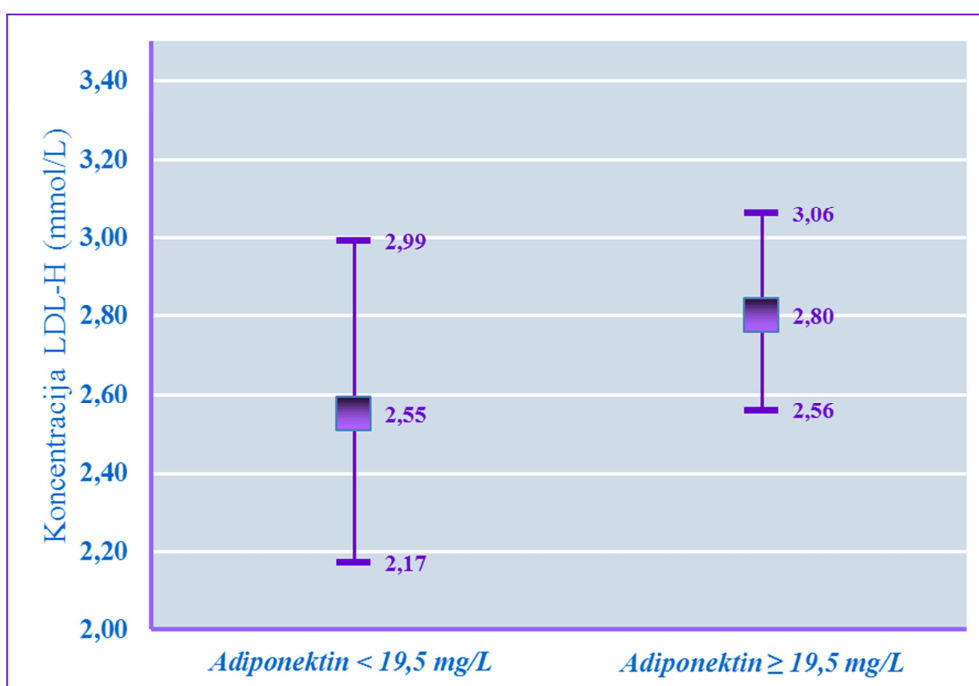
Pacijenti sa višim koncentracijama adiponektina nisu imali značajno različite koncentracije UH (Slika 43), LDL-H (Slika 45) i TG (Slika 46) u odnosu na pacijente sa nižim koncentracijama adiponektina ( $P=0,783$ ;  $P=0,656$ ;  $0,157$ ; redom). Međutim, koncentracije HDL-H bile su značajno više kod pacijenata sa višim koncentracijama adiponektina ( $P=0,022$ ) (Slika 44).



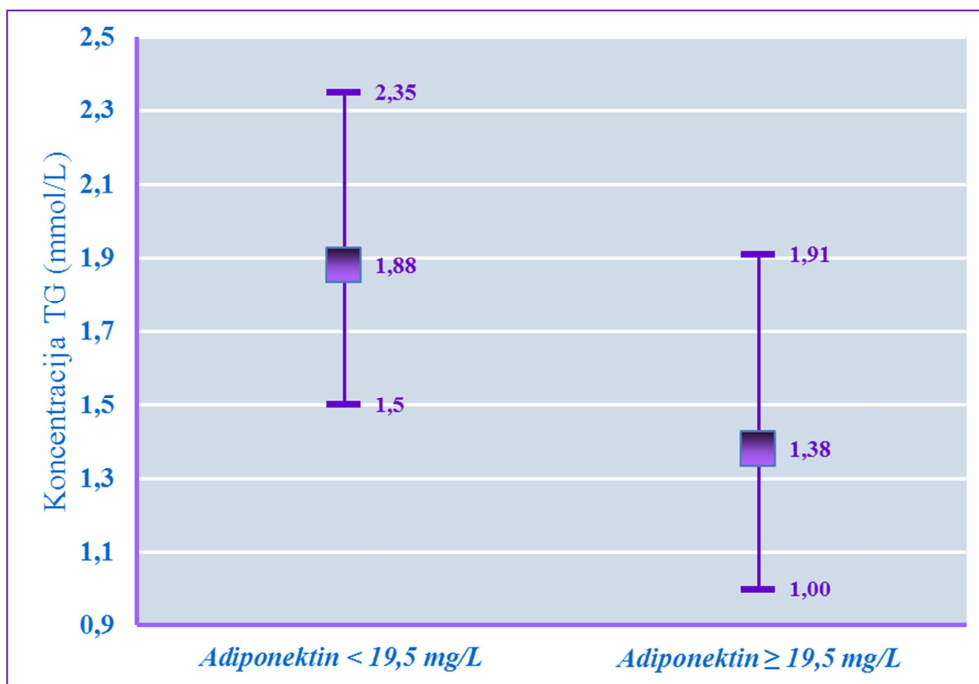
Slika 43. Koncentracije ukupnog holesterola kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije ukupnog holesterola su prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.



Slika 44. Koncentracije HDL-holesterola kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije HDL-H su prikazane kao geometrijske sredine sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Slika 45. Koncentracije LDL-holesterola kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije LDL-H su prikazane kao geometrijske sredine sa intervalom pouzdanosti od 95 %.



Slika 46. Koncentracije triglicerida kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele. Koncentracije TG su prikazane kao geometrijske sredine sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### **4.4.6.2. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina sa parametrima homeostaze glukoze kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi**

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi sa visokim vrednostima adiponektina imali su značajno nižu koncentraciju insulina u odnosu na pacijente sa nižim vrednostima adiponektina ( $P=0,005$ ) (Tabela 18).

Tabela 18. Koncentracije insulina kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele.

	<b>Adiponektin&lt;19,5 mg/L</b>	<b>Adiponektin&gt;19,5 mg/L</b>	<b>P</b>
<b>Insulin (mU/L)</b>	46,85 (12,38-74,27)	4,27 (3,41-5,14)	0,005

Koncentracija insulina je predstavljena kao medijana sa interkvartilnim rasponom.

#### **4.4.6.3. Ispitivanje povezanosti koncentracije adiponektina sa koncentracijom hsCRP kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi**

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi podeljeni prema koncentraciji adiponektina takođe nisu pokazivali značajne razlike u koncentracijama hsCRP ( $P=0,104$ ) (Tabela 19).

Tabela 19. Koncentracije hsCRP kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednosti koncentracije adiponektina koja odgovara 75 percentilu raspodele

	<b>Adiponektin&lt;19,5 mg/L</b>	<b>Adiponektin&gt;19,5 mg/L</b>	<b>P</b>
<b>hsCRP (mg/L)</b>	5,50 (2,60-17,55)	0,20 (0,10-13,60)	0,104

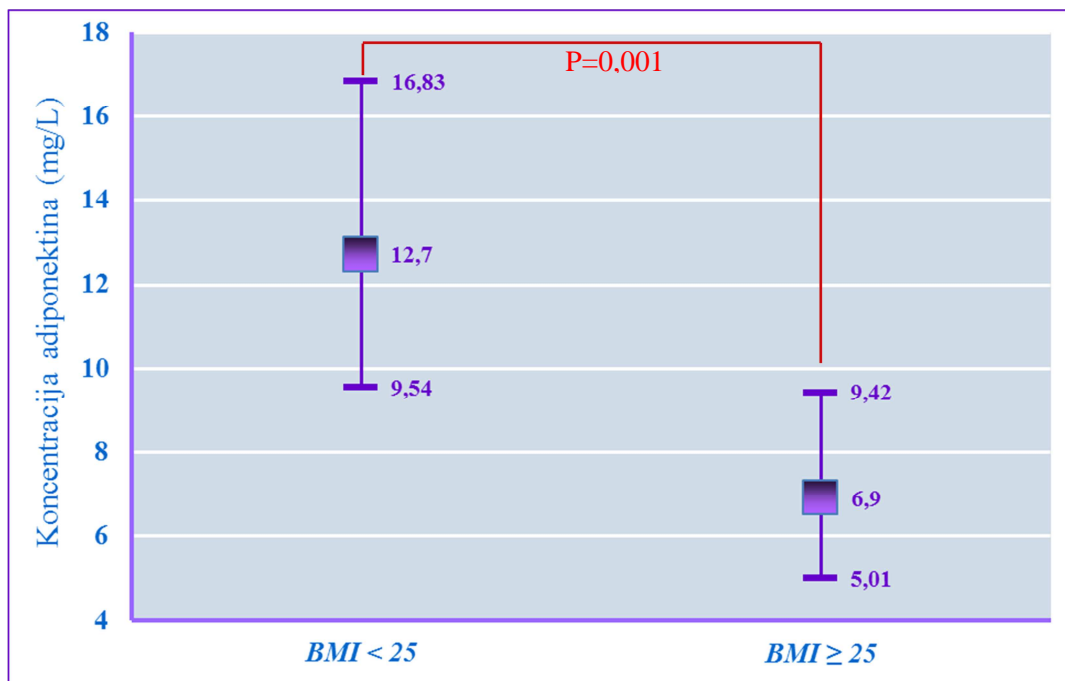
Koncentracija hsCRP je predstavljena kao medijana sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.5. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama

Kako bi detaljnije ispitali relaciju između koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora i telesne težine izražene preko BMI izvršili smo podelu posmatranih grupa (kontrolna grupa, pacijenti sa KSB i pacijenti sa HBI na hemodijalizi) prema odgovarajućim vrednostima BMI.

##### 4.5.4. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi

Zdrave ispitanike smo prema vrednostima BMI podelili u dve grupe: ispitanici koji imaju normalnu telesnu masu, odnosno koji su imali vrednosti BMI manje od  $25 \text{ kg/m}^2$  i ispitanici koji su imali prekomernu telesnu masu, odnosno koji su imali vrednosti BMI veće ili jednake  $25 \text{ kg/m}^2$ . Poređenje ove dve grupe zdravih ispitanika ukazalo je da pacijenti sa višim vrednostima BMI imaju značajno nižu koncentraciju adiponektina ( $P=0,004$ ), što je i očekivano s obzirom na visok stepen negativne korelacije između koncentracije adiponektina i BMI (Slika 47).



Slika 47. Koncentracije adiponektina u grupi zdravih ispitanika podeljenih prema vrednostima BMI. Koncentracija adiponektina je prikazana kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Analizom uticaja BMI na nivoe iRNK adiponektinskih receptora utvrdili smo da zdravi ispitanici imaju podjednake nivoe iRNK AdipoR1 i AdipoR2 bez obzira na vrednosti BMI (P=0,613; P=0,942; redom) (Tabela 20).

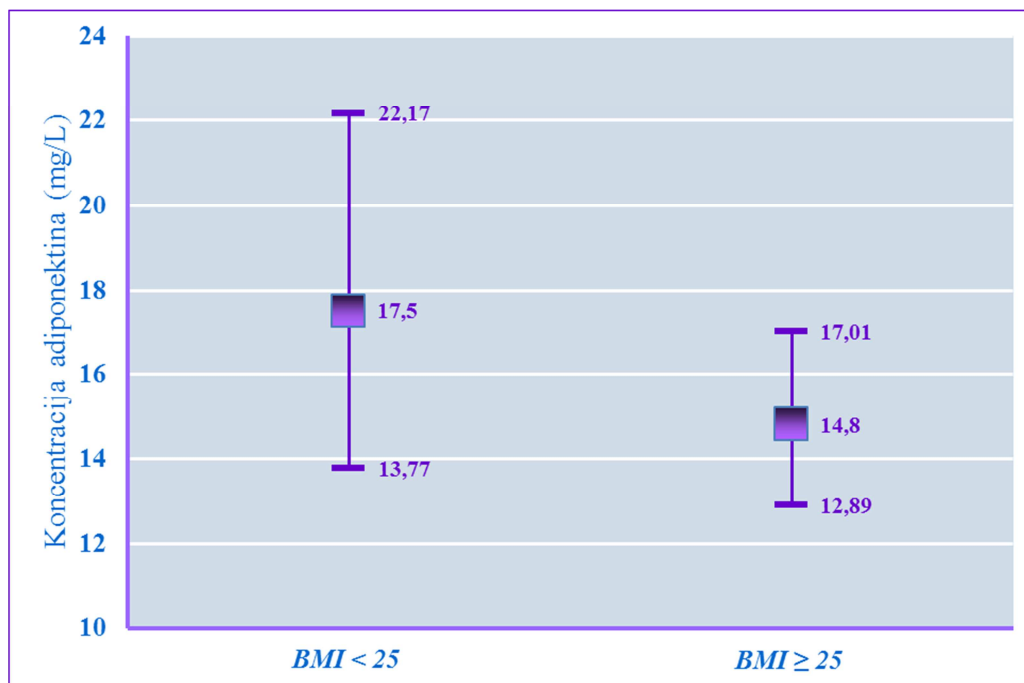
Tabela 20. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi zdravih ispitanika podeljenih prema vrednostima BMI

	BMI < 25 kg/m <sup>2</sup>	BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,928 (0,864-1,056)	0,915 (0,776-1,027)	0,613
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,961 (0,861-1,097)	0,943 (0,720-1,154)	0,942

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.5.5. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB

Na slici 48 je prikazana podela pacijenata koji pate od KSB prema vrednostima BMI. Pacijenti koji su imali više vrednosti BMI pokazuju jasnu težnju ka nižim vrednostima koncentracije adiponektina, iako ona nije statistički značajna ( $P=0,141$ ).



Slika 48. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednostima BMI. Koncentracija adiponektina je prikazana kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Nivoi iRNK AdipoR1 su bili značajno niži kod gojaznih pacijenata sa KSB u poređenju sa pacijentima koji nisu bili gojazni (P=0,015), dok se dok se nivoi iRNK AdipoR2 nisu značajno razlikovali (P=0,515) (Tabela 21).

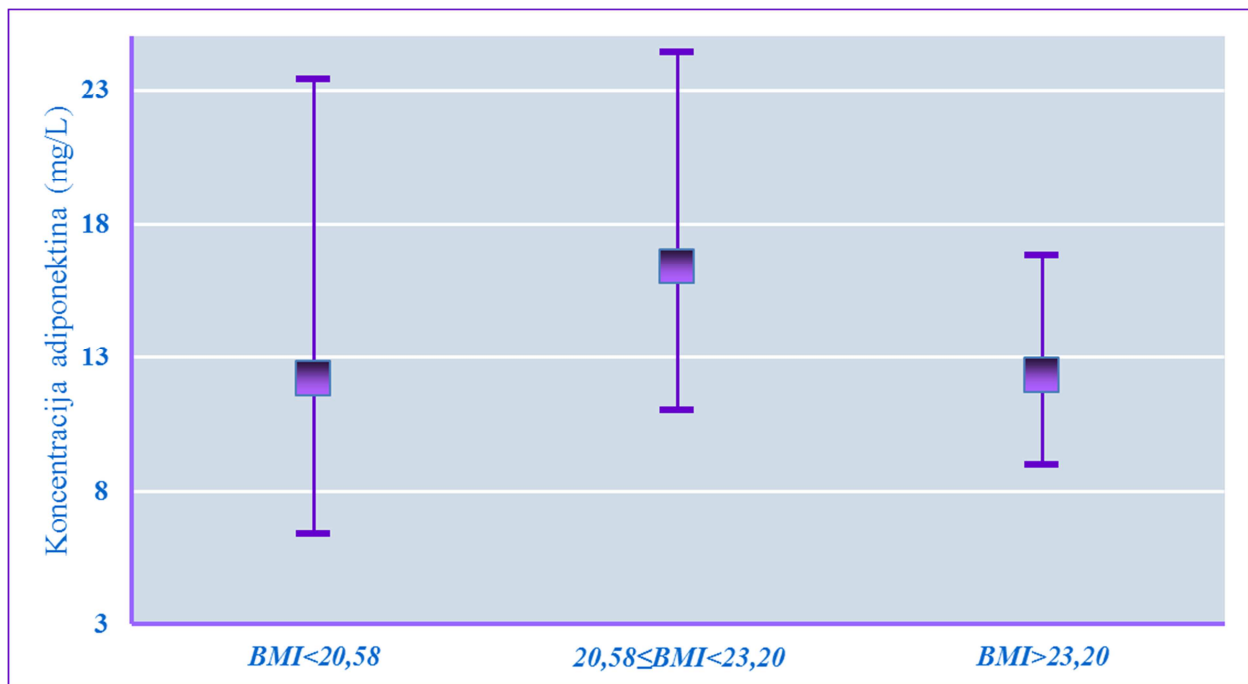
Tabela 21. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema vrednostima BMI

	BMI < 25 kg/m <sup>2</sup>	BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,712 (0,566-0,966)	0,597 (0,510-0,715)	0,015
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,953 (0,792-1,102)	0,892 (0,802-1,056)	0,515

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.5.6. Uticaj telesne mase na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

Uzimajući u obzir ukupan broj pacijenata sa HBI na hemodijalizi, kao i uzak raspon vrednosti BMI, uticaj telesne mase nije bilo moguće proceniti podelom pacijenata prema graničnoj vrednosti BMI od 25 kg/m<sup>2</sup>. Zbog toga su iz raspodele vrednosti BMI prethodno ustanovljene vrednosti koje odgovaraju 33 i 66 percentilu, a zatim su prema tim vrednostima pacijenti podeljeni u tri grupe: pacijenti sa BMI manjim od 20,58 kg/m<sup>2</sup> (I tercil), pacijenti sa BMI između 20,58 kg/m<sup>2</sup> i 23,20 kg/m<sup>2</sup> (II tercil) i pacijenti sa BMI većim ili jednakim 23,20 kg/m<sup>2</sup> (treći tercil). Analiza u navedene tri grupe pokazala je da telesna masa nema značajan uticaj na koncentraciju adiponektina (Slika 49) i nivoe iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi (P=0,499; P=0,412; P=0,350; redom) (Tabela 22).



Slika 49. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednostima BMI koje odgovaraju 33 i 66 percentilu raspodele. Koncentracija adiponektina je prikazana kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Tabela 22. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih prema vrednostima BMI koje odgovaraju 33 i 66 percentilu raspodele

	<b>BMI &lt; 20,58 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>20,58 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI &lt; 23,20 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>BMI &gt; 23,20 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,762 (0,568-1,505)	0,809 (0,587-1,020)	0,662 (0,573-0,839)	0,412
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,888 (0,872-0,921)	0,894 (0,791-1,035)	0,984 (0,898-1,053)	0,350

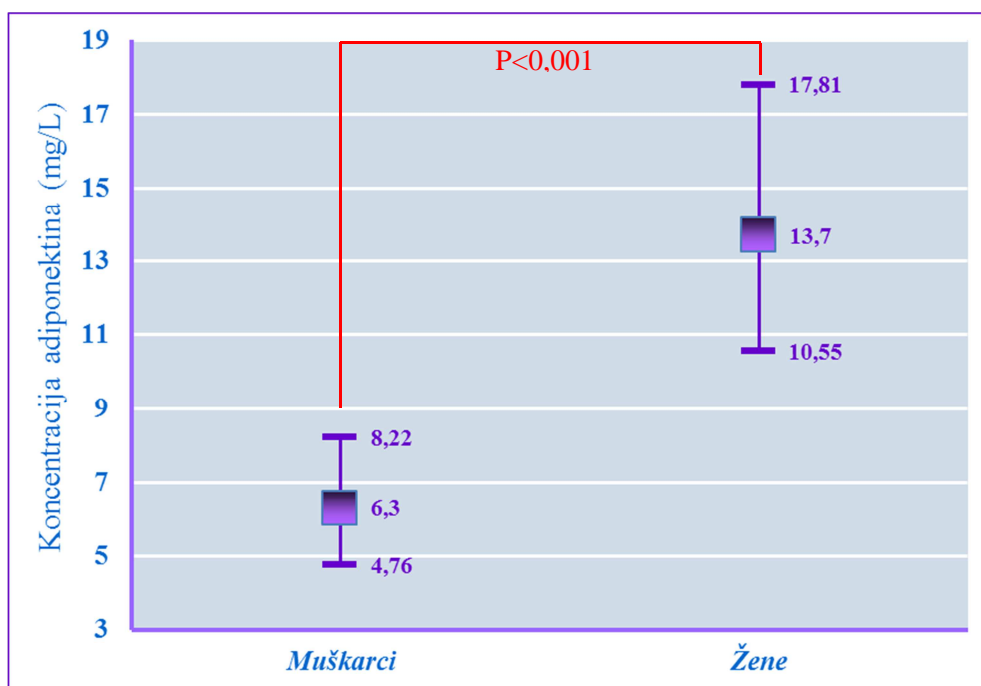
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.6. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u posmatranim grupama

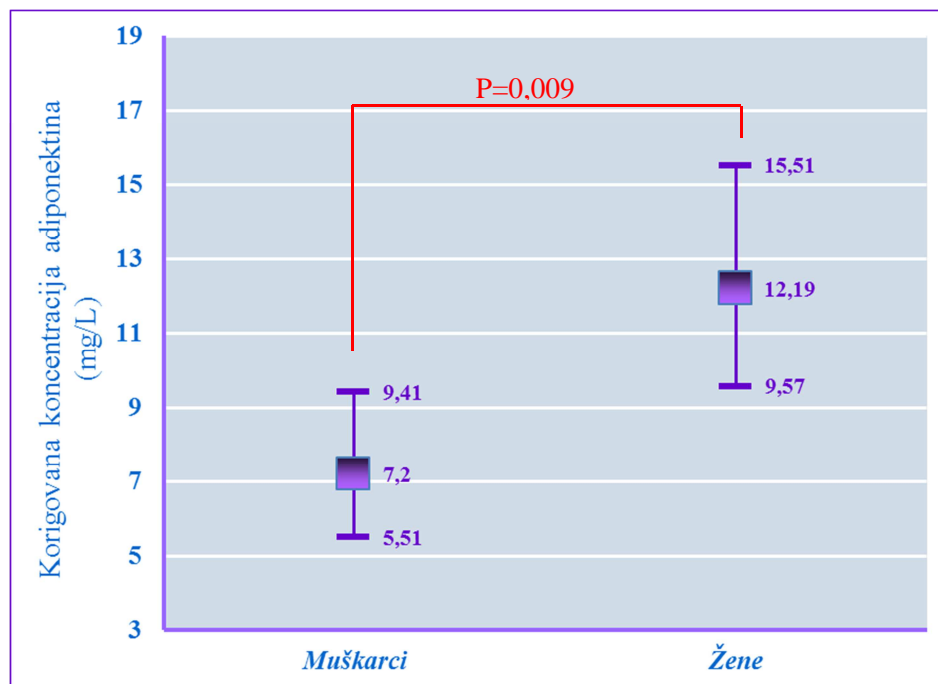
Kako bi se procenio uticaj pola na posmatrane parametre, svaka od ispitivanih grupa (kontrolna grupa, pacijenti sa KSB i pacijenti sa HBI na hemodijalizi) je podeljena po polu.

##### 4.6.4. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi

U grupi zdravih ispitanika žene su imale statistički značajno višu koncentraciju adiponektina u odnosu na muškarce ( $P < 0,001$ ) (Slika 50). Ova razlika je ostala značajna i nakon korekcije vrednosti adiponektina za BMI ANCOVA metodom ( $P = 0,009$ ) (Slika 51).



Slika 50. Koncentracije adiponektina u grupi zdravih ispitanika podeljenih po polu. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Slika 51. Koncentracije adiponektina u grupi zdravih ispitanika podeljenih po polu nakon korekcije za vrednosti BMI. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Pol je takođe pokazao značajan uticaj na nivo iRNK AdipoR2. Naime, uočen je niži nivo iRNK AdipoR2 kod osoba ženskih osoba ( $P=0,027$ ). S druge strane, pol nije imao značaj uticaj na nivo iRNK AdipoR1 ( $P=0,259$ ) (Tabela 23).

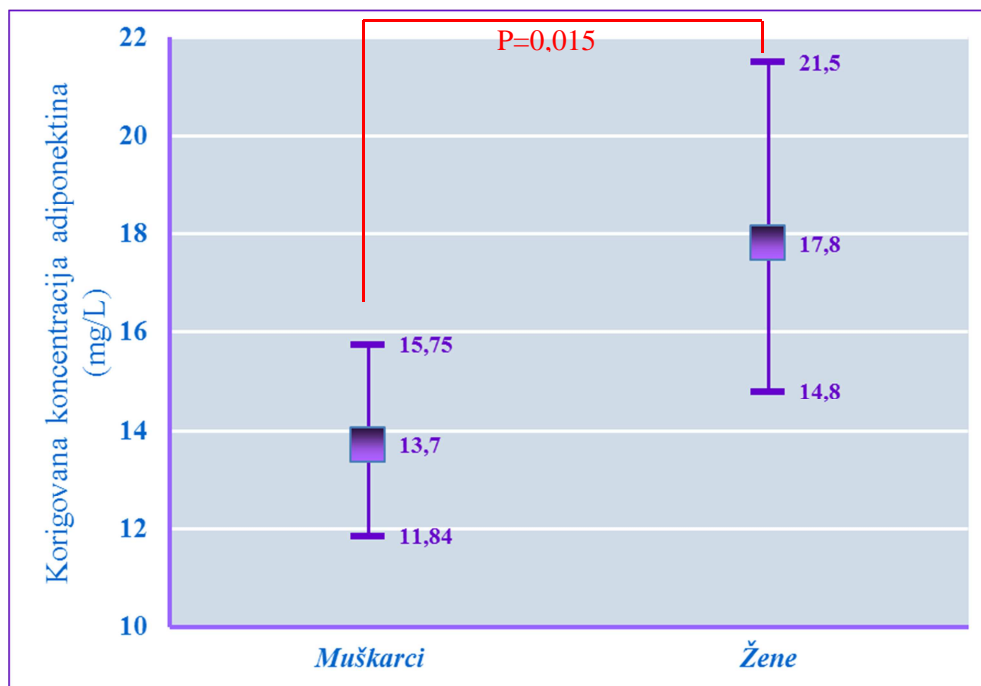
Tabela 23. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod zdravih ispitanika podeljenih prema polu

	Muškarci	Žene	P
Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK	0,934 (0,892-1,055)	0,898 (0,770-0,987)	0,259
Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK	1,061 (0,851-1,061)	0,891 (0,737-1,089)	0,027

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.6.5. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB

Kao i u slučaju zdravih ispitanika, koncentracija adiponektina je bila značajno viša kod žena koje pate od KSB u odnosu na muškarce ( $P=0,015$ ) (Slika 52). Kako između dve ispitivane grupe pacijenata nije postojala značajna razlika u BMI, korekcija koncentracije adiponektina nije bila neophodna. Sa druge strane, uticaj pola na nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB nije bio značajan ( $P=0,629$ ;  $P=0,501$ ; redom) (Tabela 24).



Slika 52. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih po polu. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

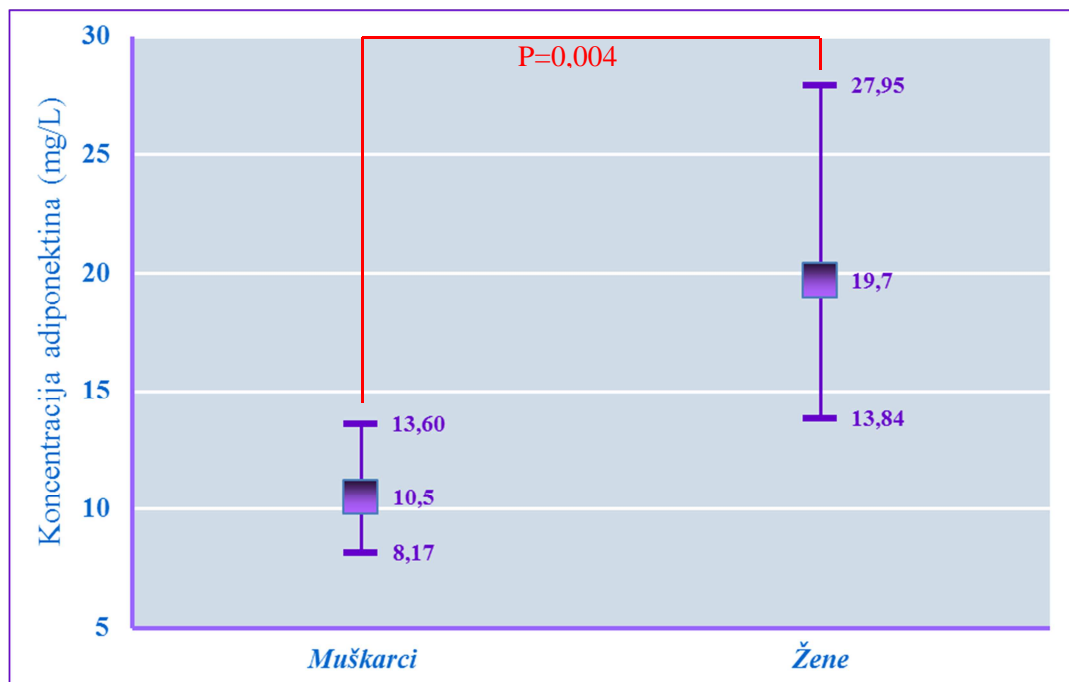
Tabela 24. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB podeljenih prema polu

	<b>Muškarci</b>	<b>Žene</b>	<b>P</b>
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,648 (0,485-0,801)	0,679 (0,546-0,745)	0,692
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,964 (0,812-1,241)	0,928 (0,794-1,088)	0,501

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.6.6. Uticaj pola na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi

Uticaj pola na koncentraciju adiponektina bio je značajan i u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi ( $P=0,004$ ) (Slika 53). S obzirom da između ove dve grupe pacijenata nije postojala razlika u BMI i koncentraciji kreatinina, korekcija koncentracije adiponektina nije bila potrebna. Ispitivanje uticaja pola na nivoe iRNK AdipoR1 i AdipoR2 pokazalo je da muškarci i žene koji pate od HBI na hemodijalizi imaju približno iste nivoe iRNK ovih receptora ( $P=0,194$ ;  $P=0,105$ ; redom) (Tabela 25).



Slika 53. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi podeljenih po polu. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Tabela 25. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB podeljenih prema polu

	Muškarci	Žene	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,674 (0,571-0,826)	0,848 (0,567-2,453)	0,194
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,922 (0,888-1,053)	0,883 (0,844-0,979)	0,105

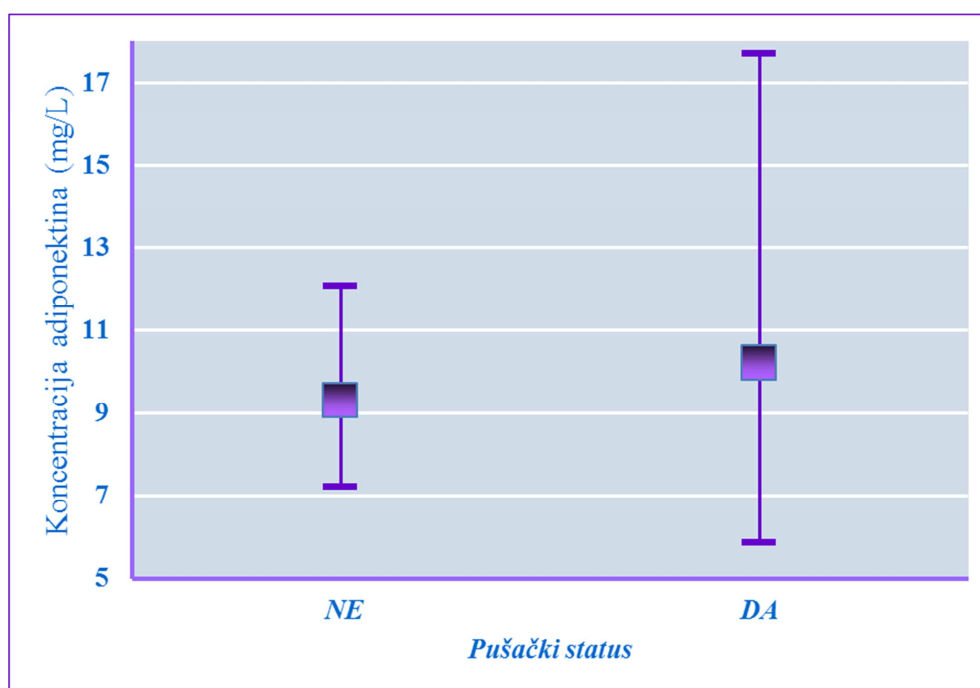
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.7. Uticaj pušenja na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa KSB

Kako bi se procenio uticaj pušenja na posmatrane parametre, zdravi ispitanici i pacijenti sa KSB su podeljeni prema pušačkom statusu (pušači i nepušači).

##### 4.7.4. Uticaj pušenja na koncentraciju cirkulišućeg adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u kontrolnoj grupi

Analizom pušačkog statusa zdravih ispitanika utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u koncentraciji adiponektina između zdravih osoba koji su se deklarirali kao nepušači i pušači ( $P=0,754$ ) (Slika 54). Takođe, pušenje nije pokazalo značajan uticaj ni na nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 ( $P=0,638$ ;  $P=0,538$ ; redom) (Tabela 26).



Slika 54. Koncentracije adiponektina u grupi zdravih ispitanika podeljenih prema pušačkom statusu. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

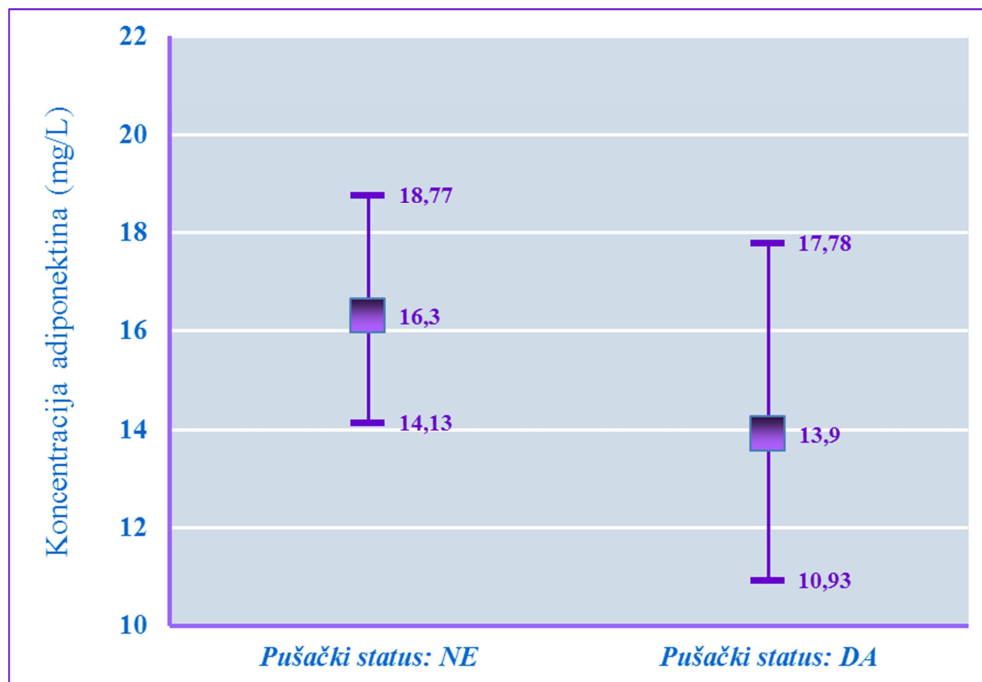
Tabela 26. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi zdravih ispitanika podeljenih prema polu

	<b>Pušački status: DA</b>	<b>Pušački status: NE</b>	<b>P</b>
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,920 (0,776-1,049)	0,918 (0,896-1,056)	0,635
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,999 (0,747-1,154)	0,907 (0,847-1,089)	0,538

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### 4.7.5. Uticaj pušenja na koncentraciju cirkulišućeg adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB

Pacijenti sa KSB bolesti koji su se izjasnili kao pušači imali su nižu koncentraciju adiponektina u odnosu na pacijente koji su se izjasnili kao nepušači. Iako ova razlika nije bila statistički značajna ( $P=0,290$ ), jasno se uočava trend nižih koncentracija adiponektina kod pušača koji pate od KSB (Slika 55). Nivoi iRNK AdipoR1 i AdipoR2 nisu bili pod značajnim uticajem pušačkog statusa pacijenata ( $P=0,692$ ;  $P=0,623$ ; redom) (Tabela 27).



Slika 55. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema pušačkom statusu. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Tabela 27. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema pušačkom statusu

	<b>Pušački status: DA</b>	<b>Pušački status: NE</b>	<b>P</b>
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,669 (0,494-0,775)	0,636 (0,515-0,826)	0,692
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,946 (0,826-1,169)	0,898 (0,794-1,252)	0,623

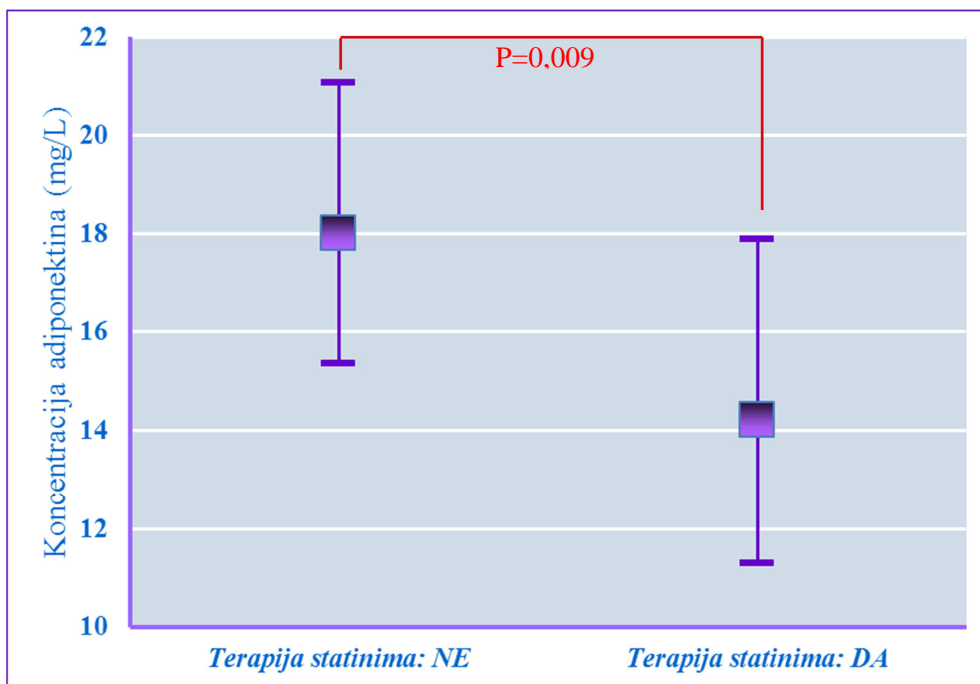
Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

#### **4.8. Uticaj lekova na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB**

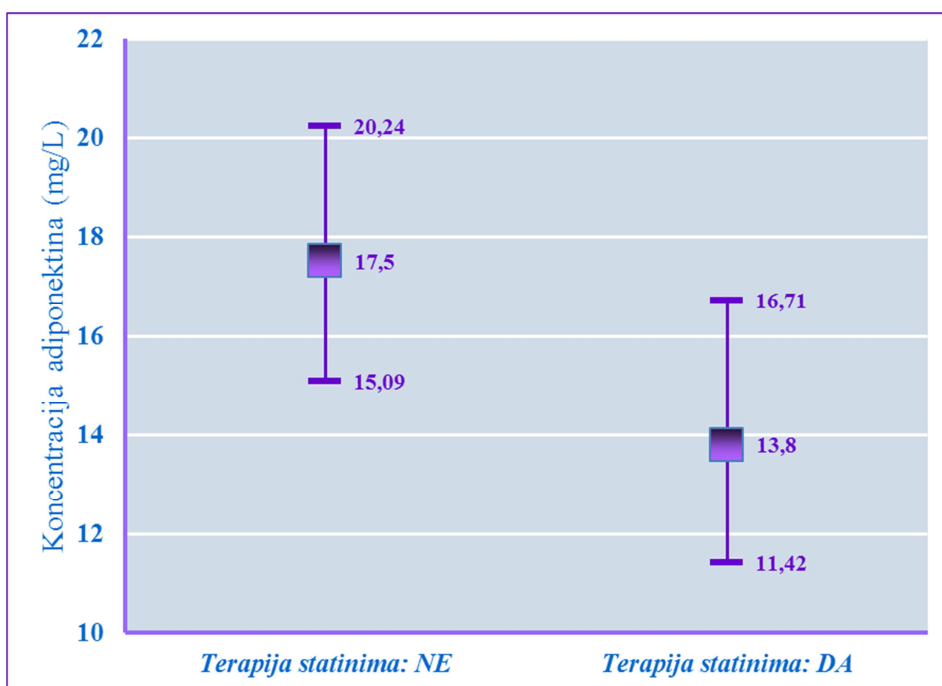
Prethodne studije su ukazale na mogućnost delovanja različitih lekova na koncentracije adiponektina. Da bi utvrdili postojanje uticaja pojedinih lekova na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora, izvršili smo podelu posmatranih pacijenata sa KSB prema tome da li njihova terapija obuhvata lekove iz grupe statina ili ACE inhibitora.

##### **4.8.4. Uticaj statina na koncentraciju adiponektina i nivoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB**

Pacijenti sa KSB čija terapija uključuje lekove iz grupe statina imali su značajno niže koncentracije adiponektina u odnosu na pacijente u čijoj terapiji nije bilo lekova iz grupe statina ( $P=0,009$ ) (Slika 56). Kako su se ovo dve grupe značajno razlikovale i u vrednostima BMI, primenom ANCOVA metode izvršeno je korigovanje vrednosti koncentracije adiponektina, nakon čega uočena razlika više nije bila značajna ( $P=0,058$ ) (Slika 57). Sa druge strane, terapija statinima nije imala značajan uticaj na nivoe iRNK AdipoR1 i AdipoR2 ( $P=0,427$ ;  $P=0,924$ ; redom) (Tabela 28).



Slika 56. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema tome da li njihova terapija uključuje lekove iz grupe statina. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.



Slika 57. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema tome da li njihova terapija uključuje lekove iz grupe statina korigovana za vrednosti BMI. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Tabela 28. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema tome da li njihova terapija uključuje lekove iz grupe statina

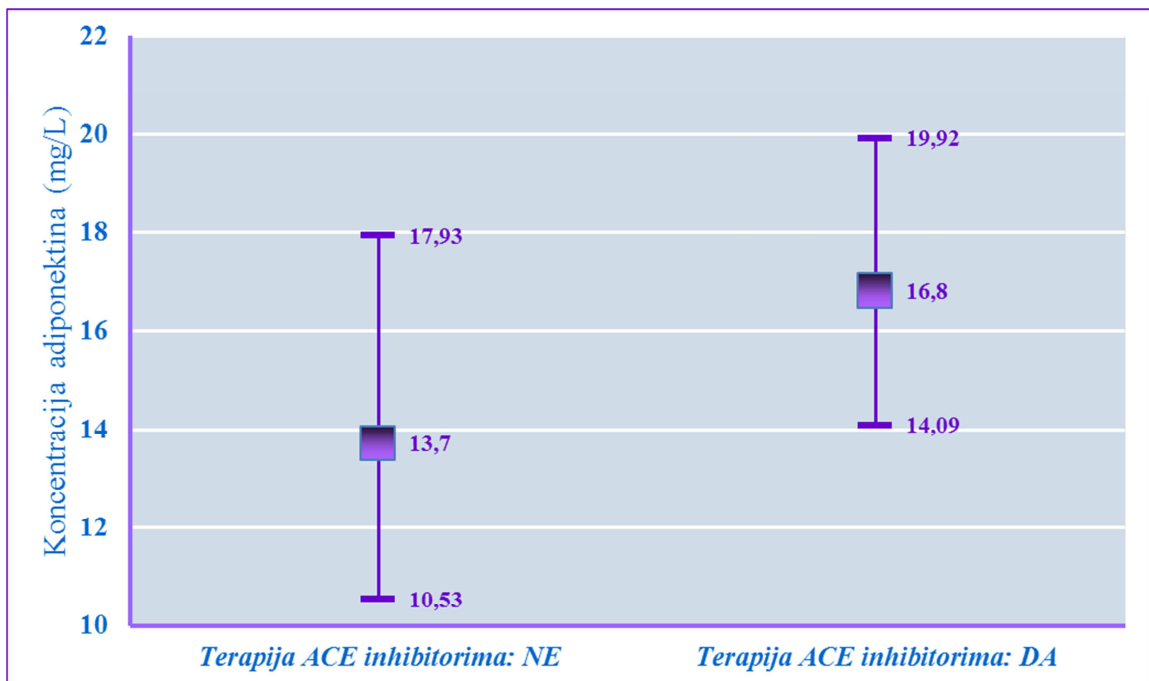
	Terapija statinima: DA	Terapija statinima: NE	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,669 (0,493-0,774)	0,656 (0,576-0,898)	0,427
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,946 (0,799-1,169)	0,941 (0,811-1,183)	0,924

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.



#### 4.8.5. Uticaj ACE inhibitora na koncentraciju na koncentraciju adiponektina i niveoe iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 kod pacijenata sa KSB

Nakon podele pacijenata prema prisustvu ACE inhibitora u terapiji uočene su više koncentracije adiponektina kod pacijenata koji su primali lekove iz ove grupe. Međutim, statistička analiza nije potvrdila značajnost ove razlike ( $P=0,102$ ) (Slika 58). Terapija ACE inhibitorima takođe nije ispoljila značajan uticaj na niveoe iRNK AdipoR1 i AdipoR2 ( $P=0,256$ ;  $P=0,067$ ; redom) (Tabela 29).



Slika 58. Koncentracije adiponektina u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema tome da li njihova terapija uključuje lekove iz grupe ACEI. Koncentracija adiponektina je predstavljena kao geometrijska sredina sa intervalom pouzdanosti od 95%.

Tabela 29. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa KSB podeljenih prema tome da li njihova terapija uključuje lekove iz grupe ACEI

	Terapija ACE inhibitori: DA	Terapija ACE inhibitori: NE	P
<b>Normalizovani nivoi AdipoR1 iRNK</b>	0,523 (0,473-0,712)	0,648 (0,514-0,723)	0,256
<b>Normalizovani nivoi AdipoR2 iRNK</b>	0,812 (0,732-0,960)	0,946 (0,799-1,234)	0,067

Normalizovane vrednosti nivoa iRNK AdipoR1 i AdipoR2 su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponom.

## 5.DISKUSIJA

Početak devedesetih godina dvadesetog veka u stručnoj javnosti vladalo je mišljenje da će uvođenje terapije lekovima protiv hiperholesterolemije i hipertenzije rešiti problem KVB i marginalizovati njihov značaj do kraja dekade (130). Međutim, dve decenije kasnije epidemiološke studije potvrđuju da su aterosklerozom izazvane bolesti srca i krvnih sudova i dalje vodeći uzrok smrtnosti u svetu (1, 2, 3). Ateroskleroza je hronična inflamatorna bolest čiji tok zavisi od sinergističkog sadejstva velikog broja faktora. Evidentno je da ispitivanje tradicionalnih faktora rizika ne daje dovoljno jasnu sliku o toku aterosklerotskog procesa, zbog čega se ulažu konstantni napor u potragu za novim parametrima koji bi dopunili saznanja o nastanku i razvoju aterosklerotskog procesa, te u kombinaciji sa tradicionalnim faktorima rizika omogućili efikasniju prevenciju i terapiju KVB.

KVB ne možemo posmatrati kao izolovan entitet jer se one često javljaju kao posledica drugih patoloških stanja kao što su gojaznost, dijabetes tipa 2, HBI itd. HBI nastaje kao posledica dejstva različitih etioloških faktora koja se manifestuje smanjenjem ili gubitkom bubrežne funkcije. HBI je udružena sa vrlo kompleksnim metaboličkim promenama koji omogućavaju progresivan tok ateroskleroze, pa su pacijenti sa HBI svrstani u grupu sa najvećim rizikom za razvoj KVB (4).

Otkrićem adipokina, molekula koje sintetišu i sekretuju ćelije masnog tkiva otvoreno je potpuno novo poglavlje u razumevanju funkcije masnog tkiva. Ono se više ne posmatra samo kao depo viška energije u obliku triglicerida, već i kao vrlo potentan endokrini organ koji preko adipokina deluje sistemski na regulisanje brojnih fizioloških funkcija (9, 10, 11). Prekomerna akumulacija masnog tkiva dovodi do promene u funkciji adipocita koji stvarajući pro-inflamatornu sredinu olakšavaju razvoj ateroskleroze (9, 10, 11).

Adiponektin je jedan od najznačajnijih predstavnika grupe adipokina koji pokazuje antiinflamatorno, antiapoptotsko, antiaterosklerotsko i kardioprotektivno dejstvo (88). Pozitivni efekti adiponektina demonstrirani su u brojnim studijama na pacijentima koji pate od gojaznosti i dijabetesa tipa 2 (94-98). Kada je reč o KSB i HBI uočeno je da pozitivni efekti adiponektina izostaju, kao i da su povišene vrednosti adiponektina kod ovih pacijenata udružene sa povećanim rizikom od smrtnosti (119). Kao jedan od mogućih uzroka ovog paradoksa navodi se adiponektinska rezistencije, stanje u kome bi se izostanak pozitivnih efekata adiponektina objasnio poremećajem na nivou ose adiponektinski receptor/adiponektin (34, 67).

Prvi deo našeg istraživanja sproveden je sa ciljem da se ispita da li je KSB udružena sa promenom u genskoj ekspresiji adiponektinskih receptora. Pored toga, od značaja je bilo utvrditi da li je progres KSB povezan sa promenom u ekspresiji adiponektinskih receptora i koncentracijom adiponektina, zbog čega smo pacijente sa KSB na osnovu nalaza koronarografije podelili u dve grupe: pacijenti bez značajne stenozе i pacijenti sa značajnom stenozom. Ispitivani parametri poređeni su između posmatranih grupa pacijenata i zdravih ispitanika, kao i između dve grupe pacijenata. Kako bi detaljnije sagledali smisao i pronašli moguća objašnjenja dobijenih rezultata, vezu između koncentracije cirkulišućeg adiponektina, nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora i lipidnih i nelipidnih faktora rizika ispitivali smo korelacionom analizom. Kako bi ispitali vezu između izuzetno visokih koncentracija adiponektina i genske ekspresije adiponektinskih receptora, lipidnih i nelipidnih faktora rizika, ispitanike smo podelili prema koncentraciji adiponektina koja odgovara 75 percentilu.

Poređenje opštih karakteristika između pacijenata sa KSB bez i sa stenozom u odnosu na zdrave ispitanike dalo je očekivane rezultate (Tabela 2). Zdravi ispitanici imali su više vrednosti HDL-H u odnosu na obe grupe pacijenata sa KSB, dok razlike u vrednostima UH i LDL-H nisu bile značajne, što je najverovatnije posledica činjenice da je određeni broj pacijenata pod terapijom lekovima iz grupe hipolipemika. Niže vrednosti TG, glukoze, insulina i HOMA IR indeksa zdravi ispitanici imali su samo u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom. Obe grupe pacijenata sa KSB imale su značajno više vrednosti hsCRP u odnosu na zdrave ispitanike. Dobijeni rezultati su očekivani i ukazuju na značajnu povezanost dislipidemije, insulinske rezistencije i inflamacije sa razvojem KSB.

Pacijenti sa KSB imali su značajno više koncentracije adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike, dok su koncentracije adiponektina između pacijenata bez i sa značajnom stenozom bile približno iste (Slika 25). Kako se smatra da adiponektin uglavnom ostvaruje zaštitne efekte na kardiovaskularni sistem moglo bi se očekivati da je KSB praćena sniženim koncentracijama adiponektina. Međutim, rezultati dosadašnjih studija na pacijentima sa KSB nisu usaglašeni po ovom pitanju. Italijanska studija koju su izveli Rizza i saradnici pokazala je da pacijenti koji su imali infarkt miokarda u svojoj istoriji imaju više koncentracije adiponektina u odnosu na ispitanike koji nisu imali infarkt miokarda (132). U ovoj studiji je takođe pokazano da se porast koncentracije adiponektina dešava na račun porasta LMW forme, dok koncentracije HMW i MMW ostaju nepromenjene. Kao moguće objašnjenje ovog fenomena autori su naveli kompenzatorno povećanje adiponektina. S obzirom da je HMW forma daleko najaktivniji oblik adiponektina u plazmi, može se zaključiti da potencijalno

kompenzatorno povećanje adiponektina nije dovoljno efikasno da se izbori sa nastalim proinflamatornim stanjem. Kako je ključno mesto koje kontroliše sastavljanje i sekreciju adiponektinskih oligomera endoplazmatski retikulum, promena u njegovoj funkciji bi mogla biti razlog ovakve promene u sastavu oligomera (40). Do sada je već pokazano da povećana akumulacija masti u visceralnom masnom tkivu stvara proinflamatornu sredinu koja endoplazmatski retikulum adipocita uvodi u stanje tkz. stresa endoplazmatskog retikuluma uzrokujući promenu njegove funkcije (45).

Kompenzatorno povećanje adiponektina takođe može biti posledica nedostatka njegovog efekta usled razvoja rezistencije ciljnih tkiva na adiponektin (34, 67). Kako bi proverili ovo stanovište ispitivali smo gensku ekspresiju adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 preko kojih adiponektin ostvaruje svoje efekte. S obzirom da su tkiva od interesa za razvoj KVB kao što su endotel krvnog suda, srčani mišić, adipociti i hepatociti teško dostupna, genska ekspresija je ispitana u mononuklearnim ćelijama periferne krvi koje su se u dosadašnjim studijama pokazale kao korisno surogat tkivo čiji transkriptom dobro korelira sveopštim stanjem organizma (130, 131). Naša studija je pokazala da pacijenti sa KSB imaju značajno niži nivo genske ekspresije AdipoR1 u odnosu na zdrave ispitanike, dok nije bilo značajne razlike u nivoima AdipoR2 (Tabela 4). Štaviše, nishodna regulacija AdipoR1 uočena je ne samo kod pacijenata sa značajnom stenozom, već i kod pacijenata bez značajne stenozе, što ukazuje da bi gubitak adiponektinskih efekata mogao biti prisutan već u ranim fazama aterosklerotskog procesa. S druge strane nije postojala značajna razlika u nivoima iRNK adiponektinskih receptora između pacijenata sa i bez značajne stenozе. Za sada ne postoji veliki broj studija sa kojima bi mogli uporediti dobijene rezultate. Do danas, samo su dve studije istraživale status adiponektinskih receptora na mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa KSB. Međutim, ove studije nisu obuhvatile potpuno zdrave ispitanike već samo pacijente sa i bez značajne stenozе. Saglasno sa rezultatima naše studije, Kollias i saradnici su pokazali da nema značajne razlike u nivoima iRNK adiponektinskih receptora između pacijenata sa i bez značajne stenozе, dok je proteinska ekspresija adiponektinskih receptora bila niža kod pacijenata sa značajnom stenozom (133). U studiji koji su sproveli Ikonidmids i saradnici pokazano je da pacijenti sa višesudovnom stenozom imaju viši nivo genske ekspresije adiponektinskih receptora u odnosu na pacijente sa jednosudovnom stenozom, dok razlike u proteinskoj ekspresiji nije bilo (133). Međutim, posmatrane grupe u ovoj studiji nisu bile homogenog sastava kada je u pitanju pol, a kao kriterijum značajne stenozе postavljeno je suženje lumena od 75%, pa se postavlja pitanje komparativnosti rezultata sa našom studijom.

Masno tkivo predstavlja daleko najveći izvor adiponektina u organizmu (88). Iako naizgled paradoksalno, gojaznost je praćena niskim koncentracijama cirkulišućeg adiponektina. Naime, hipertrofija adipocita usled prekomernog nagomilavanja masti rezultuje značajnim promenama u njihovom sekretornom profilu. S jedne strane, povećava se produkcija proinflammatory adipokina kao što su TNF- $\alpha$  i IL-6, a s druge strane smanjuje se produkcija antiinflammatory adiponektina (10). Takođe, gojaznost je praćena pojačanom infiltracijom makrofaga u adipozno tkivo, što pojačava proinflammatory karakter sredine u kojoj se adipociti nalaze. Za sada se smatra da je smanjena produkcija adiponektina posledica delovanja proinflammatory faktora, pre svega TNF- $\alpha$ , na promotorni region gena za adiponektin usled čega se inhibira njegova transkripcija (54). Takođe, hipertrofija adipocita praćena je intenzivnim razvojem stresa endoplazmatskog retikuluma. Kako je endoplazmatski retikulum ključna organela za pravilno sastavljanje funkcionalnih adiponektinskih oligomera i njihovu sekreciju, njegova disfunkcija bi mogla doprineti smanjenom oslobađanju adiponektina iz adipocita (45). U našoj studiji demonstrirana je negativna korelacija između koncentracije adiponektina i BMI kako kod zdravih ispitanika (Tabela 6), tako i kod pacijenata sa KSB (Tabela 9). Kako bi dublje ispitali značaj ove povezanosti, ispitanici su podeljeni prema graničnoj vrednosti BMI od 25. Zdravi ispitanici koji su imali BMI manji od 25 imali su značajno višu koncentraciju adiponektina u odnosu na ispitanike koji su imali više vrednosti BMI (Slika 47), dok se nivoi iRNK adiponektinskih receptora nisu razlikovali u posmatranim grupama (Tabela 20). Pacijenti sa KSB i vrednošću BMI ispod granične imali su više vrednosti adiponektina u odnosu na pacijente sa višim vrednostima BMI, ali ova razlika nije bila značajna (Slika 48). Navedeni rezultati potvrđuju značajnu ulogu koju masno tkivo igra u kontroli koncentracije cirkulišućeg adiponektina, ali takođe sugerišu da je u KSB ta kontrola narušena, odnosno da pored masnog tkiva postoje dodatni mehanizmi koji značajno utiču na promenu koncentracije cirkulišućeg adiponektina.

Studije na gojaznim *ob/ob* miševima ukazale su na mogućnost masnog tkiva da indukuje nishodnu regulaciju adiponektinskih receptora (52). U našoj studiji, pacijenti sa višim vrednostima BMI imali su značajno niži nivo iRNK AdipoR1 u odnosu na pacijente sa normalnim vrednostima BMI (Tabela 21), dok slična veza nije pronađena kod zdravih ispitanika. Dakle, nishodna regulacija AdipoR1 u KSB mogla bi delimično biti indukovana od strane masnog tkiva, ali samo u sredini koju karakteriše proinflammatory stanje.

Dosadašnje studije opisale su veliki broj efekata koje adiponektin ostvaruje na metabolizam lipida. Adiponektin preko AdipoR1 aktivira AMPK put koji dovodi do fosforilacije i inhibicije acetyl-CoA karboksilaze čime se metabolizam masnih kiselina

usmerava od produkcije ka potrošnji (59-61). Preko AdipoR2 adiponektin aktivira PPAR $\alpha$  put koji takođe povećava intenzitet oksidacije masnih kiselina i sveukupnu potrošnju energije u ćeliji (67). Na nivou skeletnih mišića adiponektin ubrzava katabolizam VLDL čestica i tako utiče na nivo TG u cirkulaciji (135). Takođe, adiponektin stimuliše ekspresiju ABCA1 u humanim makrofagama čime utiče na reverzni transport holesterola, a utvrđenao je i da negativno korelira sa intenzitetom razgradnje apoA-I koji predstavlja glavni apolipoprotein HDL čestica (136, 137). U našoj studiji koncentracija adiponektina je pozitivno korelirala sa koncentracijom HDL-H i negativno sa koncentracijom TG kod zdravih ispitanika (Tabela 6), dok je kod pacijenata sa KSB postojala samo negativna korelacija sa koncentracijom TG (Tabela 9). Zdravi ispitanici sa visokom koncentracijom adiponektina imali su značajno više koncentracije HDL-H u odnosu na ispitanike čije su koncentracije adiponektina bile ispod kritične vrednosti (Slika 30), dok ovakva veza nije pronađena kod pacijenata sa KSB (Slika 37). S druge strane, pacijenti sa KSB i visokim koncentracijama adiponektina imali su i značajno niže vrednosti TG (Slika 39), što nije važno za zdrave ispitanike (Slika 32). Uticaj adiponektina na koncentraciju TG zavisi pre svega od njegovog dejstva na skeletne mišiće. Naime, Qiao i saradnici su pokazali da adiponektin snižava koncentraciju TG tako što povećava aktivnost lipoproteinske lipaze i stimuliše ekspresiju VLDL receptora čime se povećava preuzimanje VLDL čestica od strane skeletnih mišića, dok je njegov uticaj na jetrenu sekreciju VLDL čestica zanemarljiv (135). Postavlja se pitanje zašto bi ovi efekti bili značajniji kod pacijenata nego kod zdravih ispitanika. Iako, nema pouzdanog objašnjenja za ovaj fenomen, možemo pretpostaviti da je bar delimično ovo posledica preraspodele u udelu pojedinih oligomera adiponektina. Naime, postoji objektivna sumnja da HMW adiponektin može ispoljiti značajan efekat na skeletne mišiće s obzirom da je transport ovako velikog proteinskog kompleksa kroz endotel krvnih sudova gotovo nemoguć (48). KSB je udružena sa povećanjem LMW adiponektina u cirkulaciji koji bi lakše mogao da dođe do ciljnog mesta delovanja i tako ostvari značajniji uticaj na skeletne mišiće. Ipak, važno je imati u vidu da na osnovu ove veze između adiponektina i TG ne možemo govoriti o očuvanom zaštitnom efektu adiponektina. Naime, Dekker i saradnici su u svojoj studiji pokazali da su povišene vrednosti adiponektina značajan prediktor mortaliteta uzrokovanog KVB, uprkos tome što su pacijenti sa najvišim vrednostima adiponektina imaju najpovoljniji lipidni profil (115).

Kada je reč o vezi između adiponektina i HDL-H, ispitivanje Linthout i saradnika dokazalo je da pored toga što adiponektin utiče na metaboilizam HDL-H, postoji i direktno dejstvo HDL-H na sintezu adiponektina (138). Naime, inkubacija parcijalno diferenciranih adipocita sa HDL značajno povećava ekspresiju adiponektina i umanjuje lipopolisaharidom

(LPS) indukovanu nishodnu regulaciju ovog gena. U skladu sa tim, gubitak veze između adiponektina i HDL-H koji smo uočili u grupi pacijenata sa KSB može biti posledica smanjenih efekata adiponektina na metabolizam HDL-H usled nishodne regulacije AdipoR1, ali i smanjenog pozitivnog uticaja HDL-H na sintezu adiponektina. Tokom razvoja KSB značajno se menja kvalitet HDL čestica. One postaju manje, gušće i bogatije TG što smanjuje njihove ateroprotektivne karakteristike (139), pa je moguće da ovako modifikovane HDL-čestice nisu potentni aktivatori gena za adiponektin u masnom tkivu.

Efekti adiponektina na metabolizam glukoze su demonstrirani u velikom broju studija. Adiponektin preko AdipoR1/AMPK puta smanjuje produkciju fosfoenolpiruvat karboksilaze i glukoza-6-fosfataze koji predstavljaju regulatorne enzime glukoneogeneze (59-61). Na ovaj način adiponektin drastično povećava osetljivost jetre na insulin i time omogućava da se produkcija glukoze u jetri smanji čak i pri niskim koncentracijama insulina (48). Aktiviranje istog signalnog puta u perifernim tkivima dovodi do povećane translokacije GLUT4 receptora na membranu i olakšava transport glukoze u ćelije. U našoj studiji koncentracija adiponektina je negativno korelirala sa koncentracijom insulina i HOMA IR indeksom kod zdravih ispitanika (Tabela 6) i kod pacijenata sa KSB (Tabela 9). Zdravi ispitanici sa visokim vrednostima adiponektina (iznad 75 percentila) imali su značajno niže vrednosti insulina (Slika 33) i HOMA IR indeksa (Slika 34) u poređenju sa zdravim ispitanicima koji su imali niže koncentracije adiponektina, dok kod pacijenata sa KSB ove razlike nisu bile značajne (Slika 40, 41). Uzimajući u obzir da je kod pacijenata uočena nishodna regulacija AdipoR1, možemo spekulirati da je nemogućnost adiponektina da se suprotstavi razvoju insulinske rezistencije u KSB upravo posledica smanjenog broja receptora. S druge, nekoliko studija je potvrdilo da insulin preko PI3K/FOXO puta smanjuje ekspresiju adiponektinskih receptora u skeletnim mišićima, srcu i adipocitima te da on može biti faktor koji doprinosi razvoju adiponektinske rezistencije (76, 140, 141). Ovakva saznanja navode na pitanje uzroka i posledice u krugu međusobnih uticaja adiponektina i insulina. U našoj studiji nishodna regulacija AdipoR1 uočena je kod pacijenata bez i sa značajnom stenozom, dok su vrednosti glukoze, insulina i HOMA IR indeksa bila značajno veća samo kod pacijenata sa značajnom stenozom u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, kod pacijenata sa KSB smo uočili značajnu vezu između BMI i ekspresije AdipoR1, koja nije bila prisutna kod zdravih ispitanika. Na osnovu navedenog možemo spekulirati da masno tkivo u proinflamatornom stanju doprinosi smanjenju adiponektinskih efekata, što dalje postepeno vodi ka insulinskoj rezistenciji koja dodatno utiče na status adiponektinskih receptora stvarajući tako začarani krug.



Monociti i makrofage eksprimiraju adiponektinske receptore, pa je antiinflamatorno dejstvo adiponektina pre svega posledica njegovog direktnog dejstva na ove ćelije. Diferencijacija makrofaga se pod uticajem adiponektina usmerava ka M2 tipu koji poseduje anti-inflamatorne karakteristike i u njima stimuliše produkciju IL-10 (90). Nekoliko studija je utvrdilo postojanje značajne negativne korelacije između koncentracije hsCRP i koncentracije adiponektina. U našoj studiji koncentracija adiponektina je značajno negativno korelirala sa koncentracijom hsCRP u grupi zdravih ispitanika (Tabela 6), dok ova korelacija nije postojala u grupi pacijenata sa KSB (Tabela 9). Međutim, ispitanici sa visokim vrednostima adiponektina (iznad 75 percentila) nisu imali značajno niže vrednosti hsCRP ni u jednoj grupi (Slika 35 i 42). Gubitak veze između adiponektina i hsCRP takođe može biti posledica nishodne regulacije adiponektinskog receptora i posledično smanjene sposobnosti adiponektina da promoviše diferencijaciju M2 tipa makrofaga. Ostaje nejasno zašto zdravi ispitanici sa vrlo visokim vrednostima adiponektina nisu imali značajno niže vrednosti hsCRP. Svi zdravi ispitanici su imali vrednosti hsCRP koje odgovaraju niskom ili umerenom riziku za razvoj KVB, te možemo pretpostaviti da u takvim uslovima gotovo nepostojeće inflamacije antiinflamatorni efekti adiponektina nisu ispoljeni u potpunosti.

Nekoliko studija bavilo se ispitivanjem kako određeni lekovi utiču na nivo adiponektina. S obzirom na povezanost KSB sa dislipidemijom i hipertenzijom, određeni broj učesnika naše studije koji pati od KSB je primao terapiju statinima i/ili ACE inhibitorima. Rezultati dosadašnjih studije ukazuju na to da ACEI i agonisti receptora za angiotenzina II povećavaju nivo cirkulišućeg adiponektina i tako poboljšavaju osetljivost na insulin (142, 143). Kada je reč o uticaju statina na nivo adiponektina, smatra se da hidrofилni statini deluju povoljno na koncentraciju adiponektina, dok lipofilni statini snižavaju koncentraciju adiponektina (144, 145). Terapija lipofilnim statinima je poslednjih godina povezana sa povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2, a neki autori ističu da bi to moglo biti posledica njihovog negativnog uticaja na koncentraciju adiponektina (145). U našoj studiji nije uočen značajan uticaj ACEI na koncentraciju adiponektina (Slika 58) i nivo ekspresije adiponektinskih receptora (Tabela 29). S druge strane, pacijenti koji su bili na terapiji statinima imali su značajno niže vrednosti adiponektina u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima (Slika 56), dok razlika u nivoima iRNK adiponektinskih receptora nije uočena (Tabela 28). Nakon korekcije za vrednost BMI razlika u koncentraciji adiponektina između pacijenata sa i bez terapije statinima nije bila značajna (Slika 57). Treba imati u vidu da naša studija nije kontrolisana interventna studija, te da ovi rezultati mogu biti posledica uticaja različitih kovarijanti.

Drugi deo našeg istraživanja sproveden je sa ciljem da se utvrdi da li je HBI udružena sa promenom u nivou genske ekspresije adiponektinskih receptora. U cilju sveobuhvatnijeg sagledavanja dobijenih rezultata vezu između koncentracije adiponektina, nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora i lipidnih i nelipidnih faktora rizika ispitivali smo korelacionom analizom. Kako bi ispitali vezu izuzetno visokih koncentracija adiponektina i genske ekspresije adiponektinskih receptora, lipidnih i nelipidnih faktora rizika pacijente smo podelili prema koncentraciji adiponektina koja dogovara 75 percentilu.

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi imali su višestruko povišene vrednosti kreatinina i ureje u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, vrednosti TG, insulina i hsCRP su bile značajno više kod pacijenata, dok su vrednosti HDL-H bile značajno snižene (Tabela 3). Navedeni rezultati su očekivani i mogu se smatrati posledicom bubrežne disfunkcije i metaboličkog rearanžmana koji je karakterističan za uremično stanje kod pacijenata u terminalnoj fazi HBI.

Pacijenti sa HBI na hemodijalizi su imali značajno više koncentracije adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 27), što je u skladu sa svim dosadašnjim studijama. Nakon korekcije za vrednosti BMI i koncentraciju kreatinina uočena razlika je postala višestruko značajnija (Slika 28). Mnoge studije pokazale su da je adiponektin u negativnoj korelaciji sa brzinom glomerularne filtracije sugerišući tako da koncentracija adiponektina značajno zavisi od bubrežne funkcije, pa se dugo vremena smatralo je bubreg jedini organ koji je zadužen za uklanjanje adiponektina iz cirkulacije. Međutim, u kompleksnom setu eksperimenata izvedenom na miševima Halberg i saradnici su pokazali da centralno mesto u uklanjanju adiponektina iz cirkulacije zauzima jetra i da su bubrezi odgovorni isključivo za izlučivanje razgradnih podataka nastalih u jetri (53). Chudek i saradnici su utvrdili da nakon transplantacije bubrega koncentracija adiponektina opada, ali i dalje ostaje povišena u odnosu na zdrave ispitanike (147), tako da se promena u koncentraciji adiponektina kod pacijenata sa HBI ne može pripisati isključivo smanjenoj funkciji bubrega. Treba imati u vidu da su studije na eksperimentalnim modelima pokazale da adiponektin zapravo ostvaruje zaštitne efekte na nivou bubrega pre svega štiteći podocyte od oksidativnog stresa i smanjujući njihovu permeabilnost za albumin (148). Povišene vrednosti adiponektina kod pacijenata sa HBI udružene su sa povećanim stepenom proteinurije što svedoči o definitivnom nedostatku njegovog efekta uprkos povišenim koncentracijama (124). U skladu sa tim, jedan od uzroka koji dovodi do kompenzatornog porasta koncentracije adiponektina mogao bi biti gubitak njegovih efekata usled nishodne regulacije adiponektinskih receptora (149). Prisustvo adiponektinske rezistencije prethodno je dokazano kod pacijenata sa kongestivnom srčanom insuficijencijom (KSI) (34), koja deli određene sličnosti sa HBI. Nishodna regulacija

receptora otežava sprovođenje pozitivnih efekata adiponektina što bi moglo biti jedno od objašnjenja zašto su visoke vrednosti adiponektina kod pacijenata sa HBI udružene sa povećanom rizikom od smrtnog ishoda.

U našoj studiji pacijenti sa HBI na hemodijalizi imali su niži nivo genske ekspresije AdipoR1 u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 5), a jedan od mogućih uzročnika nishodne regulacije svakako bi mogao biti insulin. Kao što je već pomenuto, insulin je jedan od faktora koji mogu ostvariti uticaj na gensku ekspresiju adiponektinskih receptora (76, 140, 141). Pored značajno viših koncentracija insulina kod pacijenata sa HBI uočena je i značajna negativna korelacija nivoa mRNA AdipoR1 i između koncentracije insulina (Tabela 13). Kako ovakva veza nije pronađena kod drugih ispitanika, možemo pretpostaviti da insulin igra značajniju ulogu u razvoju adiponektinske rezistencije kod pacijenata sa HBI negoli kod pacijenata sa KSB.

Dobijeni rezultati genske ekspresije adiponektinskih receptora nisu u skladu sa dve prethodno izvedene studije na pacijentima sa HBI u kojima je pokazano da pacijenti sa HBI imaju povišene nivoe genske ekspresije adiponektinskih receptora (150, 151). Međutim, treba naglasiti da diskrepance između dobijenih rezultata mogu biti posledica nekoliko faktora. Pre svega, pacijenti u prethodno izvedenim studijama su imali značajno više vrednosti BMI ( $26,0 \pm 5,0$  i  $27,3 \pm 4,4$   $\text{kg/m}^2$ ) nego pacijenti u našoj studiji ( $22,0 \pm 3,0$   $\text{kg/m}^2$ ) što nije beznačajan podatak kada je reč o pacijentima sa HBI. Naime, HBI zajedno sa KSI predstavlja skup bolesti koje karakteriše „obrnuta epidemiologija“, koncept koji podrazumeva da pacijenti sa višim vrednostima BMI imaju mnogo veću šansu za preživljavanje (149). U skladu sa tim, Tsigalou i saradnici su pokazali da su pozitivni efekti adiponektina prisutni samo kod pacijenata sa vrednostima BMI većim od  $24$   $\text{kg/m}^2$ , što bi moglo biti upravo posledica ushodne regulacije receptora (152). Takođe, pacijenti u prethodnim studijama su proveli mnogo duže vreme na hemodijalizi (u proseku 3,5 godina) u odnosu na pacijente obuhvaćene našom studijom (u proseku 90 dana).

Gubitak telesne mase i snižene vrednosti BMI udružene su sa povećanjem koncentracije cirkulišućeg adiponektina. HBI je najčešće praćena niskim vrednostima BMI, pa neki autori navode ovo kao mogući uzrok hiperadiponektinemije kod pacijenata sa HBI. Međutim, dve studije koje su ispitivale ekspresiju adiponektina u masnom tkivu osoba sa HBI dale su suprotne rezultate (151, 153). U našoj studiji, za razliku od zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB, kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi nije utvrđeno postojanje korelacije između koncentracije adiponektina i vrednosti BMI što nije u saglasnosti sa prethodnim studijama (Tabela 12). Kako bi detaljnije sagledali odnos između cirkulišućeg adiponektina,

nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora i BMI pacijenti su podeljeni prema vrednostima BMI koje odgovaraju 33 i 66 percentilu raspodele na tri grupe. Svi pacijenti sa HBI na hemodijalizi imali su vrednosti BMI u uskom rasponu pa tradicionalne granične vrednosti za BMI nisu bile primenjive. Koncentracija adiponektina (Slika 49) i genska ekspresija adiponektinskih receptora (Tabela 22) nisu se značajno razlikovali među ovako podeljenim pacijentima. Uzimajući u obzir evidentnu vezu između BMI i genske ekspresije AdipoR1 kod pacijenata sa KSB, kao i fenomen „obrnute epidemiologije“ karakterističan za HBI očekivali smo postojanje veze između BMI i genske ekspresije adiponektinskih receptora. Ipak, najveći broj pacijenata sa HBI je imao vrednosti BMI u uskom rasponu koji nije prelazio fiziološku granicu  $25 \text{ kg/m}^2$ . Istraživanje na većem i heterogenijem uzorku bi moglo dati konkretniji odgovor na pitanje veze između gojaznosti i genske ekspresije adiponektinskih receptora kod pacijenata sa HBI.

Koncentracija adiponektina značajno je pozitivno korelirala sa koncentracijom HDL-H, a negativno sa koncentracijom TG u grupi pacijenata sa HBI (Tabela 12). Pacijenti sa visokom koncentracijom adiponektina imali su značajno više vrednosti HDL-H (Slika 44), dok se nivoi UH, LDL-H i TG nisu razlikovali što sugeriše da veza između adiponektina i HDL-H nije ugrožena i da su zaštitni efekti adiponektina bar delimično očuvani. Međutim, rezultati MDRD studije pokazuju da bez obzira na najpovoljniji lipidni profil, pacijenti sa najvišim vrednostima adiponektina imaju povećan rizik od smrtnog ishoda (124). Ovakvi podaci definitivno idu u prilog tvrdnjama da kada je reč o lipidnom profilu pacijenata nije dovoljno samo posmatrati kvantitet lipidnih parametara već i njihov kvalitet. Vekić i saradnici su pokazali da pacijenti sa HBI imaju vrlo izmenjenu kompoziciju HDL čestica usled čega je njihov antiaterogeni potencijal značajno smanjen što je udruženo sa povećanim rizikom od smrtnosti povezane sa KVB (154).

Koncentracija hsCRP je negativno korelirala sa koncentracijom adiponektina (Tabela 12). Međutim, pacijenti sa najvišim vrednostima koncentracije adiponektina nisu imali značajno niže vrednosti koncentracije hsCRP (Tabela 19) što bi mogla biti još jedna posledica nishodne regulacije AdipoR1 i posledično nemogućnost adiponektina da usmeri diferencijaciju makrofaga ka anti-inflamatornom M2 tipu.

U našoj studiji koncentracija kreatinina je negativno korelirala sa koncentracijom adiponektina u grupi zdravih ispitanika (Tabela 6) i u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi (Tabela 12). Prethodne studije nisu pokazale konzistentne rezultate kada je u pitanju odnos dva navedena parametra. U studiji koju su sprovedeli Maahs i saradnici na 635 pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 1 i 758 zdravih ispitanika, pozitivna korelacija između

adiponektina i kreatinina je pokazana u grupi pacijenata, dok je u grupi zdravih ispitanika pokazana negativna korelacija (155). Studija na 95 adolescenata obolelih od dijabetesa tipa 1 pokazala je pak negativnu korelaciju između dva posmatrana parametra (156). Za sada nije poznato koji bi razlozi mogli biti uzrok ovih neusaglašenosti.

Pušenje je značajan faktor rizika za razvoj KVB i svrstano je u grupu tradicionalnih faktora rizika. Analizom više studija koje su ispitivale uticaj pušenja na nivoe adiponektina Kotani i saradnici su utvrdili da je pušenje udruženo sa sniženim koncentracijama adiponektina nezavisno od životnog navika (navika u ishrani, fizičke aktivnosti), BMI i starosti (146). Kao jedan od mogućih razloga ove povezanosti naveden je nikotin koji snižava ekspresiju adiponektina u masnom tkivu i dovodi do pojačane inflamacije koja sekundarno može doprineti sniženju produkcije adiponektina. U našoj studiji nije bilo značajne razlike u koncentraciji adiponektina i nivoima genske ekspresije adiponektinskih receptora između pušača i nepušača, kako u grupi zdravih ispitanika (Slika 54 i tabela 26), tako i u grupi pacijenata sa KSB (Slika 55 i tabela 27).

Koncentracija adiponektina je u potpunosti zavisna od pola (49, 50, 52). Brojne studije svedoče da žene imaju više vrednosti adiponektina u odnosu na muškarce. Iako nisu jasni mehanizmi kojima bi se objasnila ovakva razlika, smatra se da je pojačana osetljivost žena na insulin upravo posledica povišenih vrednosti adiponektina (52). U našoj studiji koncentracija adiponektina bila je viša kod žena u odnosu na muškarce kako kod zdravih ispitanika (Slika 50), tako i kod pacijenata sa KSB (Slika 52) i pacijenata sa HBI na hemodijalizi (Slika 53). Takođe, zdrave žene su imale značajno niži nivo genske ekspresije AdipoR2 u odnosu na zdrave muškarce (Tabela 24), dok uticaj pola na ekspresiju AdipoR1 i AdipoR2 nije bio značajan u drugim posmatranim grupama (Tabele 24 i 25). Kako uticaj pola na ekspresiju adiponektinskih receptora nije bio predmet prethodno sprovedenih istraživanja, značaj ovog rezultata ostaje nejasan i zahteva dalja istraživanja.

Istraživanja na polju epigenetike dala su izuzetno značajne rezultate koji ukazuju da su nivoi iRNK zavisni kako od intenziteta transkripcije određenog gena, tako i od posttranskripcione regulacije u kojoj glavnu ulogu igraju mikro RNK tkz. miRNA. Ovi molekuli specifično prepoznaju određenu iRNK, vezuju se za nju i izazivaju njenu razgradnju pre nego što ona uđe u proces translacije. Kada je reč o adiponektinskim receptorima, za sada su dve nezavisne studije pokazale da miRNA-221 deluje specifično na AdipoR1, dok AdipoR2 ne predstavlja ciljno mesto delovanja ove miRNA (157, 158). Gojaznost je praćena povećanom ekspresijom miRNA-221 u adipocitima i smatra se jednim od glavnih uzročnika sniženog nivoa iRNK AdipoR1 u ovim ćelijama (159). S druge strane, pokazano je da

smanjena ekspresija miRNA-221 udružena sa pojačanom kalcifikacijom krvnih sudova i proliferacijom glatkih mišićnih ćelija (160, 161). Evidentno je da iste miRNA imaju različite funkcije u različitim ćelijama. Shodno tome buduća istraživanja bi trebalo da ispituju nivo miRNA-221 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i njihovu povezanost sa nishodnom regulacijom AdipoR1.

Ukupno posmatrajući, rezultati naše studije potvrđuju značaj određivanja nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora zajedno sa koncentracijom cirkulišućeg adiponektina. Uočena nishodna regulacija AdipoR1 ukazuje na mogućí razvoj adiponektinske rezistencije kod pacijenata sa KSB i HBI. S obzirom da su povišene vrednosti adiponektina kod pacijenata sa KSB i HBI udružene sa povećanim rizikom od smrtnog ishoda (119, 124, 125), evidentno je da adiponektin nije u stanju da ostvari svoje zaštitne efekte pa možemo pretpostaviti da je povećanje koncentracije adiponektina, bar delimično, posledica kompenzatornog mehanizma kojim organizam pokušava da se izbori sa nedostatkom njegovih efekata. Smanjen nivo genske ekspresije uočen je i kod pacijenata sa KSB bez značajne stenoze što ukazuje da na mogućnost razvoja adiponektinske rezistencije već u ranim fazama bolesti. Ovaj podatak bi trebalo imati u vidu pri izradi novih smernica za prevenciju razvoja KSB, naročito u kontekstu primene sintetskih agonista adiponektina.

Povezanost nishodne regulacije AdipoR1 sa visokim vrednostima BMI kod pacijenata sa KSB i visokim vrednostima insulina kod pacijenata sa HBI potvrđuje da su gojaznost, insulinska i adiponektinska rezistencija deo jednog začaranog kruga, ali ne daje jasan odgovor na pitanje koji su primarni mehanizmi koji indukuju stanje adiponektinske rezistencije. Fokus budućih istraživanja bi trebalo staviti na utvrđivanje uzroka koji leže u osnovi adiponektinske rezistencije.

## 6.ZAKLJUČCI

1. Značajno više koncentracije adiponektina uočene su kod pacijenata koji pate od KSB sa i bez značajne stenoze u odnosu na zdrave ispitanike, dok nije bilo značajnih razlika u koncentraciji adiponektina između dve posmatrane grupe pacijenata sa KSB.
2. Nivoi iRNK AdipoR1 bili su značajno niži u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, kako kod pacijenata koji od KSB sa značajnom stenozom, tako i kod pacijenata koji pate od KSB bez značajne stenoze, u odnosu na zdrave ispitanike što ukazuje da se nishodna regulacija AdipoR1 javlja već u ranim fazama bolesti. Nivoi iRNK AdipoR2 nisu se značajno razlikovali među posmatranim grupama.
3. Značajno više koncentracije adiponektina kod pacijenata sa KSB udružene sa značajno nižim nivoima iRNK AdipoR1 ukazuju na moguću povezanost KSB sa adiponektinskom rezistencijom, stanjem u kome bi nedostatak efekata adiponektina mogao da izazove kompenzatorno povećanje koncentracije adiponektina.
4. Pacijenti sa HBI na hemodijalizi imali su značajno više koncentracije adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike.
5. Nivoi iRNK AdipoR1 bile su značajno niže u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa HBI na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike, dok nije bilo razlike u nivoima iRNK AdipoR2 što ukazuje na mogućnost razvoja adiponektinske rezistencije kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi.
6. Utvrđen je značajan uticaj BMI na koncentraciju adiponektina u grupi zdravih ispitanika, dok ovakav uticaj nije bio značajan kod pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na hemodijalizi što sugerije da masno tkivo gubi primarnu ulogu u kontroli koncentracije adiponektina u KSB i HBI.
7. Značajna veza BMI i AdipoR1 pronađena je kod pacijenata sa KSB što sugerije da bi nishodna regulacija AdipoR1 u KSB mogla biti delimično indukovana od strane masnog tkiva. Kako ovakva veza nije pronađena u grupi zdravih ispitanika možemo pretpostaviti da masno tkivo ima značajan uticaj na ekspresiju AdipoR1 samo u sredini koju karakteriše proinflamatorno stanje.
8. Zdravi ispitanici sa najvišim vrednostima koncentracije adiponektina imali su značajno više koncentracije HDL-H u odnosu na zdrave ispitanike sa nižim koncentracijama adiponektina. Ovakva veza je uočena i kod pacijenata sa HBI na hemodijalizi. Kod pacijenata sa KSB nije uočena povezanost između adiponektina i HDL-H.

9. Pacijenti sa KSB i najvišim vrednostima adiponektina imali su značajno niže koncentracije TG u odnosu na pacijente sa nižim vrednostima adiponektina. Ovakva veza nije pronađena u grupi zdravih ispitanika i grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi.
10. Zdravi ispitanici sa najvišim koncentracijama adiponektina imali su značajno niže vrednosti HOMA IR indeksa i insulina u odnosu na ispitanike sa nižim vrednostima adiponektina, dok ovakva veza nije pronađena kod pacijenata sa KSB što može biti posledica nishodne regulacije AdipoR1.
11. Uticaj visokih vrednosti adiponektina na koncentraciju hsCRP nije bio značajan ni u jednoj grupi ispitanika.
12. Žene su imale značajno više koncentracije adiponektina u svim ispitivanim grupama.
13. Značajno niži nivoi iRNK AdipoR2 uočeni su kod žena, ali samo u grupi zdravih ispitanika.
14. Terapija lekovima iz grupe ACEI ili statina nije značajno uticala na koncentraciju adiponektina ili nivoa iRNK adiponektinskih receptora.
15. Nije utvrđena povezanost koncentracije adiponektina, nivoa iRNK adiponektinskih receptora i pušenja.



# 7.LITERATURA

1. Mackay J, Mensah GA, Mendis S, Greenlund K. The atlas of heart disease and stroke. World Health Organization; 2004.
2. World Health Organization (2004) World Health Report 2004: Changing history. Geneva: WHO. Available: <http://www.who.int/whr/2004/en/>. Accessed 27 October 2006.
3. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2012.
4. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za prevenciju, dijagnostikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2012.
5. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9):1135-43.
6. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med*. 2005 352(16):1685-95.
7. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, de Sotomayor MA. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev*. 2010; 9(2):142-52.
8. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*. 2004;109(23 suppl 1):III-15.
9. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol-Heart C*. 2005; 288(5):2031-41.
10. Lovren F, Teoh H, Verma S. Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *Can J Cardiol*. 2015;31(2):177-83.
11. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie*. 2012;9(10):2137-42.
12. Boden G, Carnell LH. Nutritional effects of fat on carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Cl En*. 2003;17(3):399-410.

13. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S. Novel modulator for endothelial adhesion molecules adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*.1999;100(25):2473-6.
14. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscl Throm Vas*. 2003;23(1):85-9.
15. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*.2004;291(14):1730-7.
16. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(2):534-9.
17. Wang XY, Guo YH, Guo LJ. Association between plasma adiponectin levels and coronary lesion complexity. *Journal of Peking University. Health sciences*.2007;39(6):599-602.
18. Otsuka F, Sugiyama S, Kojima S, Maruyoshi H, Funahashi T, Matsui K, Sakamoto T, Yoshimura M, Kimura K, Umemura S, Ogawa H. Plasma adiponectin levels are associated with coronary lesion complexity in men with coronary artery disease. *J Amm Coll Cardiol*. 2006;48(6):1155-62.
19. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, White CC, Cupples LA, Nakajima K, Lamon-Fava S, Wilson PW, Matsuzawa Y, Schaefer EJ. Adiponectin: an independent risk factor for coronary heart disease in men in the Framingham offspring study. *Atherosclerosis*. 2011;217(2):543-8.
20. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26746-9.
21. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996;271(18):10697-703.

22. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPoseMost abundant Gene transcript 1). *Biochem bioph Res Co.* 1996;221(2):286-9.
23. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 1996;120(4):803-12.
24. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS letters.* 2005;579(23):5163-9.
25. Guo Z, Xia Z, Yuen VG, McNeill JH. Cardiac expression of adiponectin and its receptors in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism.* 2007;56(10):1363-71.
26. Ding G, Qin Q, He N, Francis-David SC, Hou J, Liu J, Ricks E, Yang Q. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(1):73-84.
27. Wang Y, Lau WB, Gao E, Tao L, Yuan Y, Li R, Wang X, Koch WJ, Ma XL. Cardiomyocyte-derived adiponectin is biologically active in protecting against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Endoc M.* 2010;29(3):E663-70.
28. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology.* 2004;145(12):5589-97.
29. Delaigle AM, Senou M, Guiot Y, Many MC, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: in vivo and in vitro studies. *Diabetologia.* 2006;49(6):1311-23.
30. Krause MP, Liu Y, Vu V, Chan L, Xu A, Riddell MC, Sweeney G, Hawke TJ. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol -Cell Ph.* 2008;295(1):C203-12.
31. Liu Y, Chewchuk S, Lavigne C, Brûlé S, Pilon G, Houde V, Xu A, Marette A, Sweeney G. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production,

- changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol-Endoc M.* 2009; 297(3):657-64.
32. Amin RH, Mathews ST, Camp HS, Ding L, Leff T. Selective activation of PPAR $\gamma$  in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol-Endoc M.* 2010;298(1):28-37.
  33. Jortay J, Senou M, Delaigle A, Noel L, Funahashi T, Maeda N, Many MC, Brichard SM. Local induction of adiponectin reduces lipopolysaccharide-triggered skeletal muscle damage. *Endocrinology.* 2010;151:4840-51.
  34. Van Berendoncks AM, Garnier A, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Fortin D, Martinet W, Van Hoof V, Vrints CJ, Ventura-Clapier R, Conraads VM. Functional adiponectin resistance at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. *Circ-Heart Fail.* 2010;3(2):185-94.
  35. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrin Met.* 2002;13(2): 84-9.
  36. Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol.* 1998;8(6): 335-40.
  37. Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J.* 2010;425(1):41-52.
  38. Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein  $\alpha$  transcriptional complex. *J Biol Chem.* 2006;281(52):39915-24.
  39. Fan W, Imamura T, Sonoda N, Sears DD, Patsouris D, Kim JJ, Olefsky JM. FOXO1 transrepresses peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12188-97.
  40. Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50810-7.
  41. Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ, Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within

- the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem.* 2006;281 (24):16391-400.
42. Anelli T, Alessio M, Bachi A, Bergamelli L, Bertoli G, Camerini S, Mezghrani A, Ruffato E, Simmen T, Sitia R. Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *EMBO J.* 2003;22(19):5015-22.
  43. Wang ZV, Schraw TD, Kim JY, Khan T, Rajala MW, Follenzi A, Scherer PE. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Mol Cell Biol.* 2007;27(10):3716-31.
  44. Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: Molecular Mechanisms for Regulation of Obesity and Insulin Resistance by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor GAMMA, CREB-Binding Protein, and Adiponectin. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(2):164-70.
  45. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457-61.
  46. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40352-63.
  47. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology.* 2005;146 (2):790-6.
  48. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia.* 2012;55(9):2319-26.
  49. Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, Lam KS. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18073-80.
  50. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie

- restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. 2003;52(2):268-76.
51. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002; 51(9):2734-41.
  52. Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab*. 2013;17(2):185-96.
  53. Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, Kim JY, Yi J, Hamilton MP, Luby-Phelps K, Scherer PE. Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes*. 2009;58(9):1961-70.
  54. Dadson K, Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:62.
  55. Richards AA, Colgrave ML, Zhang J, Webster J, Simpson F, Preston E, Wilks D, Hoehn KL, Stephenson M, Macdonald GA, Prins JB. Sialic acid modification of adiponectin is not required for multimerization or secretion but determines half-life in circulation. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):229-39.
  56. Gomez-Abellan P, Gomez-Santos C, Madrid JA, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, Ordovás JM, Garaulet M. Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue. *Endocrinology*. 2010;151(1):115-22.
  57. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;42 (6941):762-9.
  58. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Cl En*. 2014;28(1):15-23.
  59. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi YA, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-95.
  60. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY. A transgenic mouse with a deletion

in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2004;145(1):367-83.

61. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Cheng Zhang C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *PNatl Acad Sci Usa*. 2002;99(25):16309-13.
62. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 [agr] and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. *Nature*. 2010;464(7293):1313-9.
63. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):516-23.
64. Xu Y, Wang N, Ling F, Li P, Gao Y. Receptor for activated C-kinase 1, a novel binding partner of adiponectin receptor 1. *Biochem Bioph Res Co*. 2009;378(1):95-8.
65. Charlton HK, Webster J, Kruger S, Simpson F, Richards AA, Whitehead JP. ERp46 binds to AdipoR1, but not AdipoR2, and modulates adiponectin signalling. *Biochem Bioph Res Co*. 2010;392(2):234-9.
66. Heiker JT, Wottawah CM, Juhl C, Kosel D, Mörl K, Beck-Sickinger AG. Protein kinase CK2 interacts with adiponectin receptor 1 and participates in adiponectin signaling. *Cell Signal*. 2009;21(6):936-42.
67. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-9.
68. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007;13(3):332-9.
69. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rtkowski JM, Wade MR. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*. 2011;17(1):55-63.

70. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000;102(11):1296-301.
71. Chandrasekar B, Boylston WH, Venkatachalam K, Webster NJ, Prabhu SD, Valente AJ. Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF- $\kappa$ B/PTEN suppression. *J Biol Chem*. 2008;283(36):24889-98.
72. Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem*. 2002;277(33):29359-62.
73. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab*. 2011;13(4):401-12.
74. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *P Natl Acad Sci USA*. 2004;101(28):10308-13.
75. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4342-52.
76. Cui XB, Wang C, Li L, Fan D, Zhou Y, Wu D, Cui QH, Fu FY, Wu LL. Insulin decreases myocardial adiponectin receptor 1 expression via PI3K/Akt and FoxO1 pathway. *Cardiovasc Res*. 2012;93(1):69-78.
77. Shimano M, Ouchi N, Shibata R, Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T, Walsh K. Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(2):210-20.
78. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439-51.



79. Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, Wu X, Mahadev K, Hough K, Chan L, Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1718-26.
80. Wong WT, Tian XY, Xu A, Yu J, Lau CW, Hoo RL, Wang Y, Lee VW, Lam KS, Vanhoutte PM, Huang Y. Adiponectin is required for PPAR $\gamma$ -mediated improvement of endothelial function in diabetic mice. *Cell Metab.* 2011;14(1):104-15.
81. Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol-Heart C.* 2011;301(2):306-14.
82. Ohashi K, Ouchi N, Sato K, Higuchi A, Ishikawa TO, Herschman HR, Kihara S, Walsh K. Adiponectin promotes revascularization of ischemic muscle through a cyclooxygenase 2-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2009;29(13):3487-99.
83. Sharma K. The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction. *Kidney Int.* 2009;76(2):145-8.
84. Rutkowski JM, Wang ZV, Park AS, Zhang J, Zhang D, Hu MC, Moe OW, Susztak K, Scherer PE. Adiponectin promotes functional recovery after podocyte ablation. *J AM Soc Nephrol.* 2013;24(2):268-82.
85. Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G, Wheeler MB. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33623-31.
86. Brown JE, Conner AC, Digby JE, Ward KL, Ramanjaneya M, Randeve HS, Dunmore SJ. Regulation of beta-cell viability and gene expression by distinct agonist fragments of adiponectin. *Peptides.* 2010;31(5):944-9.
87. Rao JR, Keating DJ, Chen C, Parkington HC. Adiponectin increases insulin content and cell proliferation in MIN6 cells via PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent mechanisms. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(11):983-9.
88. Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? *Mol Metab.* 2013;2(3):133-41.

89. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2010;285:6153-60.
90. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R, Kadowaki T. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(1):51-6.
91. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001;103(8):1057-63.
92. Dietze-Schroeder D, Sell H, Uhlig M, Koenen M, Eckel J. Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes*. 2005;54(7):2003-11.
93. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*. 2005;46(7):1369-79.
94. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4145-50.
95. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221:286-9.
96. Matsuzawa Y. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *P Jpn Acad B-Phys*. 2010;86(2):131-41.
97. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *The Lancet*. 2002;360(9326):57-8.
98. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *The Lancet*. 2003;361(9353):226-8.

99. Matsuzawa Y. Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: the Japanese experience. *Diabetes-Metab Res.* 1997;13(1):3-13.
100. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009;302(2):179-88.
101. Lindsay RS, Resnick HE, Zhu J, Tun ML, Howard BV, Zhang Y, Yeh J, Best LG. Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscl Thromb Vas.* 2005;25(3):15-6.
102. Lawlor DA, Davey Smith G, Ebrahim S, Thompson C, Sattar N. Plasma adiponectin levels are associated with insulin resistance, but do not predict future risk of coronary heart disease in women. *J Clin Endocr Metab.* 2005;90(10):5677-83.
103. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, Danesh J, Whincup PH. Adiponectin and coronary heart disease a prospective study and meta-analysis. *Circulation.* 2006 Aug 15;114(7):623-9.
104. Pilz S, Maerz W, Weihrauch G, Sargsyan K, Almer G, Nauck M, Boehm BO, Winkelmann BR, Mangge H. Adiponectin serum concentrations in men with coronary artery disease: the LUDwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta.* 2006;364(1):251-5.
105. Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, Clark LT, Pinsky DJ, Marmur JD. Adiponectin is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction in patients presenting with chest pain. *Eur Heart J.* 2006;27(19):2300-9.
106. Iwashima Y, Horio T, Kumada M, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, Kawano Y, Funahashi T, Ogihara T. Adiponectin and renal function, and implication as a risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006;98(12):1603-8.
107. Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Meisinger C, Löwel H. Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(7):1369-77.
108. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S, Langenberg C. Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality the rancho bernardo study. *Am J Epidemiol.* 2007;165(2):164-74.

109. Frystyk J, Berne C, Berglund L, Jensevik K, Flyvbjerg A, Zethelius B. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocr Metab.* 2007;92(2):571-6.
110. Wannamethee SG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Circulating adiponectin levels and mortality in elderly men with and without cardiovascular disease and heart failure. *Arch Intern Med.* 2007;167(14):1510-7.
111. Hajer GR, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Edlinger M, Visseren FL. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. *Am Heart J.* 2007;54(4):750-1.
112. von Eynatten M, Humpert PM, Bluemm A, Lepper PM, Hamann A, Allolio B, Nawroth PP, Bierhaus A, Dugi KA. High-molecular weight adiponectin is independently associated with the extent of coronary artery disease in men. *Atherosclerosis.* 2008;199(1):123-8.
113. Kizer JR, Barzilay JI, Kuller LH, Gottdiener JS. Adiponectin and risk of coronary heart disease in older men and women. *J Clin Endocr Metab.* 2008;93(9):3357-64.
114. Schnabel R, Messow CM, Lubos E, Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Sinning C, Tzikas S, Keller T, Genth-Zotz S, Lackner KJ. Association of adiponectin with adverse outcome in coronary artery disease patients: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J.* 2008;29(5):649-57.
115. Dekker JM, Funahashi T, Nijpels G, Pilz S, Stehouwer CD, Snijder MB, Bouter LM, Matsuzawa Y, Shimomura I, Heine RJ. Prognostic value of adiponectin for cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocr Metab.* 2008;93(4):1489-96.
116. Dekker JM, Funahashi T, Nijpels G, Pilz S, Stehouwer CD, Snijder MB, Bouter LM, Matsuzawa Y, Shimomura I, Heine RJ. Prognostic value of adiponectin for cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocr Metab.* 2008;93(4):1489-96.
117. Hatano Y, Matsumoto M, Ishikawa S, Kajii E. Plasma adiponectin level and myocardial infarction: the JMS Cohort Study. *J Epidemiol.* 2009;19(2): 49.
118. Urbonaviciene G, Frystyk J, Flyvbjerg A, Henneberg EW, Lindholt JS. Association of serum adiponectin with risk for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 2010;210(2):619-24.

119. Lee ES, Park SS, Kim E, Yoon YS, Ahn HY, Park CY, Yun YH, Oh SW. Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2013;dyt087.
120. Phillips SA, Kung JT. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10 (6):676-83.
121. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):134-41.
122. Yu ZZ, Ni ZH, Gu LY, Lin AW, Fang W, Yao Q, Lindholm B, Qian JQ. Adiponectin is related to carotid artery plaque and a predictor of cardiovascular outcome in a cohort of non-diabetic peritoneal dialysis patients. *Blood purificat.* 2008;26(4):386-93.
123. Stenvinkel P. Adiponectin in chronic kidney disease: a complex and context sensitive clinical situation. *J Renal Nutr.* 2011;21(1):82-6.
124. Menon V, Li L, Wang X, Greene T, Balakrishnan V, Madero M, Pereira AA, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS. Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9): 2599-606.
125. Jorsal A, Tarnow L, Frystyk J, Lajer M, Flyvbjerg A, Parving HH, Vionnet N, Rossing P. Serum adiponectin predicts all-cause mortality and end stage renal disease in patients with type I diabetes and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2008; 74(5):649-54.
126. Shen Y, Peake PW, Kelly JJ. Should we quantify insulin resistance in patients with renal disease? *Nephrology.* 2005;10(6):599-605.
127. Isobe T, Saitoh S, Takagi S, Takeuchi H, Chiba Y, Katoh N, Shimamoto K. Influence of gender, age and renal function on plasma adiponectin level: the Tanno and Sobetsu study. *Eur J Endocr.* 2005;153(1):91-8.
128. Zoccali C, Mallamaci F, Panuccio V, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Catalano F, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T. Adiponectin is markedly increased in patients with nephrotic syndrome and is related to metabolic risk factors. *Kidney Int.* 2003;63:98-102.

129. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.
130. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147(3):126-32.
131. Ghosh S, Dent R, Harper ME, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. *BMC Med Genomics.* 2010;3(1):56.
132. Rizza S, Gigli F, Galli A, Micchelini B, Lauro D, Lauro R, Federici M. Adiponectin isoforms in elderly patients with or without coronary artery disease. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(4):702-6.
133. Kollias A, Tsiotra PC, Ikonomidis I, Maratou E, Mitrou P, Kyriazi E, Boutati E, Lekakis J, Economopoulos T, Kremastinos DT, Dimitriadis G. Adiponectin levels and expression of adiponectin receptors in isolated monocytes from overweight patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10(14):14-26.
134. Ikonomidis I, Kadoglou N, Tsiotra PC, Kollias A, Palios I, Fountoulaki K, Halvatsiotis I, Maratou E, Dimitriadis G, Kremastinos DT, Lekakis J. Arterial stiffness is associated with increased monocyte expression of adiponectin receptor mRNA and protein in patients with coronary artery disease. *Am J Hypertens.* 2012; 25 (7): 746-55.
135. Qiao L, Zou C, van der Westhuyzen DR, Shao J. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes.* 2008; 57 (7): 1824-33.
136. Vergès B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, Gambert P. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscl Throm Vas.* 2006; 26 (6): 1364-9.
137. Tsubakio-Yamamoto K, Matsuura F, Koseki M, Oku H, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Masuda D. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 375 (3): 390-4.

138. Van Linthout S, Foryst-Ludwig A, Spillmann F, Peng J, Feng Y, Meloni M, Van Craeyveld E, Kintscher U, Schultheiss HP, De Geest B, Tschöpe C. Impact of HDL on adipose tissue metabolism and adiponectin expression. *Atherosclerosis*. 2010; 210 (2): 438-44.
139. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Vujovic A, Kalimanovska-Ostic D. Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clin Exp Med*. 2008; 8 (2): 109-16.
140. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem*. 2004; 279 (29): 30817-22.
141. Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, Boirie Y, Vidal H. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2004; 47 (5): 917-25.
142. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Ahn JY, Seo YH, Kang MH, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation*. 2004; 110 (24): 3687-92.
143. Tomiyama H, Motobe K, Zaydun G, Koji Y, Yambe M, Arai T, Kushiro T, Yamashina A. Insulin sensitivity and endothelial function in hypertension A comparison of temocapril and candesartan. *Am J Hypertens*. 2005; 18 (2): 178-82.
144. Kai T, Arima S, Taniyama Y, Nakabou M, Kanamasa K. Comparison of the effect of lipophilic and hydrophilic statins on serum adiponectin levels in patients with mild hypertension and dyslipidemia: Kinki Adiponectin Interventional (KAI) Study. *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30 (7): 530-40.
145. Lim S, Quon MJ, Koh KK. Modulation of adiponectin as a potential therapeutic strategy. *Atherosclerosis*. 2014; 233 (2): 721-8.
146. Kai T, Arima S, Taniyama Y, Nakabou M, Kanamasa K. Comparison of the effect of lipophilic and hydrophilic statins on serum adiponectin levels in patients with mild

- hypertension and dyslipidemia: Kinki Adiponectin Interventional (KAI) Study. *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30 (7): 530-40.
147. Chudek JM, Adamczak M, Karkoszka H, Budziński G, Ignacy W, Funahashi T, Matsuzawa Y, Cierpka L, Kokot F, Więcek A. Plasma adiponectin concentration before and after successful kidney transplantation. *Transpl P* 2003; 35 (6): 2186-2189.
148. Rutkowski JM, Wang ZV, Park AS, Zhang J, Zhang D, Hu MC, Moe OW, Susztak K, Scherer PE. Adiponectin promotes functional recovery after podocyte ablation. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24(2):268-82.
149. Jia T, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. *Biochimie*. 2012; 94 (10): 2150-6.
150. Shen YY, Charlesworth JA, Kelly JJ, Loi KW, Peake PW. Up-regulation of adiponectin, its isoforms and receptors in end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transpl*. 2007; 22 (1): 171-8.
151. Cantarin MP, Waldman SA, Doria C, Frank AM, Maley WR, Ramirez CB, Keith SW, Falkner B. The adipose tissue production of adiponectin is increased in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2013; 83 (3): 487-94.
152. Tsigalou C, Chalikias G, Kantartzi K, Tziakas D, Kampouromiti G, Vargemezis V, Konstantinides S, Ktenidou-Kartali S, Simopoulos K, Passadakis P. Differential effect of baseline adiponectin on all-cause mortality in hemodialysis patients depending on initial body mass index. Long-term follow-up data of 4.5 years. *J Renal Nutr*. 2013; 23 (1): 45-56.
153. Marchlewska A, Stenvinkel P, Lindholm B, Danielsson A, Pecoits-Filho R, Lönnqvist F, Schalling M, Heimbürger O, Nordfors L. Reduced gene expression of adiponectin in fat tissue from patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2004; 66 (1): 46-50.
154. Vekic J, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Simic-Ogrizovic S, Dopsaj V, Spasic S. Cox proportional hazard model analysis of survival in end-stage renal disease patients with small-sized high-density lipoprotein particles. *Clin Biochem*. 2011; 44 (8): 635-41.



155. Maahs DM, Ogden LG, Snell-Bergeon JK, Kinney GL, Wadwa RP, Hokanson JE, Dabelea D, Kretowski A, Eckel RH, Rewers M. Determinants of serum adiponectin in persons with and without type 1 diabetes. *Am J Epidemiol.* 2007; 166 (6): 731-40.
156. Peczyńska J, Urban M, Głowińska B, Florys B. Evaluation of adiponectin level in children and adolescents with diabetes type 1. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2007; 14 (2): 77-81.
157. Lustig Y, Barhod E, Ashwal-Fluss R, Gordin R, Shomron N, Baruch-Umansky K, Hemi R, Karasik A, Kanety H. RNA-binding protein PTB and microRNA-221 coregulate AdipoR1 translation and adiponectin signaling. *Diabetes.* 2014; 63 (2): 433-45.
158. Hwang MS, Yu N, Stinson SY, Yue P, Newman RJ, Allan BB, Dornan D. miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PloS one.* 2013; 8 (6):66502.
159. Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- $\alpha$ . *Diabetologia.* 2013; 56 (9): 1971-9.
160. Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, Genever P, Macrae VE. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct.* 2014; 32 (2): 209-16.
161. Zampetaki A, Dudek K, Mayr M. Oxidative stress in atherosclerosis: the role of microRNAs in arterial remodeling. *Free Radcal Bio Med.* 2013; 64:69-77.

## OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI I LITERATURA

### Radovi koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Sopić M**, Joksić J, Spasojević-Kalimanovska V, Kalimanovska-Oštrić D, Anđelković K, Jelić-Ivanović Z. Are decreased AdipoR1 mRNA levels associated with adiponectin resistance in coronary artery disease patients? *Clin Exp Pharmacol P.* 2015 Apr 1;42(4):331-6. (IF 2,372; rang časopisa M22 (41/83) u kategoriji Physiology)
2. **Sopić M**, Joksić J, Spasojević-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojević N, Simić-Ogrizović S, Kravljajača M, Jelić-Ivanović Z. Downregulation of AdipoR1 is associated with increased circulating adiponectin in chronic kidney disease patients. *J Med Biochem*; Manuscript accepted 19.1.2016. (IF 1,045; rang časopisa M23 (277/290) u kategoriji Biochemistry and Molecular Biology)

### Ostali radovi:

1. Petrovic S, Bogavac-Stanojevic N, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Paripovic D, **Sopic M**, Jelic-Ivanovic Z. Clinical application neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 as indicators of inflammation persistence and acute kidney injury in children with urinary tract infection. *Biomed Res Int.* 2013 Jul 9;2013. (IF 1,579; rang časopisa 85/123 u kategoriji Medicine, Research and Experimental)
2. Vujovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, **Sopic M**, Stefanovic A, Baralic I, Djordjevic B, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S. Lymphocyte Cu/ZnSOD and MnSOD gene expression responses to intensive endurance soccer training. *Biotechnol Biotec Eq.* 2013 Jan 1;27(3):3843-7. (IF 0,379; rang časopisa 152/165 u kategoriji Biotechnology and applied Microbiology)
3. **Sopić M**, Bogavac-Stanojević N, Baralić I, Kotur-Stevuljević J, Đorđević B, Stefanović A, Jelić-Ivanović Z. Effects of short-and long-term physical activity on DNA stability and oxidative stress status in young soccer players. *J Sport Med Phys Fit.* 2014 Jun;54(3):354-61. (IF 0,972; rang časopisa 60/81 u kategoriji Sport Sciences)
4. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, **Sopic M**, Gulan B, Janac J, Milosevic S. Oxidative stress and paraoxonase

- 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2015 Jul 31;241(1):192-8. (IF 3,994; rang časopisa 11/60 u kategoriji Peripheral Vascular Disease)
5. Joksić J, **Sopic M**, Spasojevic-Kalimanovska V, Kalimanovska-Ostic D, Andjelkovic K, Jelic-Ivanovic Z. Circulating resistin protein and mRNA concentrations and clinical severity of coronary artery disease. *Biochem Medica*. 2015 Jun 15;25(2):242-51. (IF 2,667; rang časopisa 7/30 u kategoriji Medical Laboratory Technology)
6. Joksić J, **Sopić M**, Spasojević-Kalimanovska V, Gojković T, Zeljković A, Vekić J, Andjelkovic K, Kalimanovska-Oštrić D, Jelić-Ivanović Z. Higher circulating resistin protein and PBMCs resistin mRNA levels are associated with increased prevalence of small dense LDL particles in coronary artery disease patients. *Clin Exp Pharmacol P*. 2016 Jan 1;43(1):22-8. (IF 2,372; rang časopisa 41/83 u kategoriji Physiology)
7. Pavlović B, Milosavljević J, Zeljković A, Vekić J, Joksić J, Sopić M, Spasojević-Kalimanovska V, Paripović D, Peco-Antić A, Miloševski-Lomić G, Jelić-Ivanović Z. Resistin, inflamacija i dislipidemija kod gojazne dece i adolescenata. *Arhiv za farmaciju*. 2015 Jan;65(2):115-28. (IF 0; časopis od nacionalnog značaja)

# Biografija autora

Miron Sopić je rođen 07.08.1982. u Sarajevu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar upisao je 2001. godine, a završio 05.07.2007. sa srednjom ocenom 9.22. Dobitnik je nagrade prof. dr Ivan Berkeš kao najbolji student diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar u školskoj 2006/2007 godini.

Od 11.10.2007. godine zaposlen je na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta kao saradnik u praktičnoj nastavi. U oktobru 2007. godine upisao je doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Obavezan staž za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare obavio je na Katedri za Medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta i u biohemijskoj laboratoriji "Belladonna" u Zemunu. U oktobru 2009. godine položio je stručni ispit za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare. Školske 2014/2015 upisao je specijalističke akademske studije na modulu Biohemijska dijagnostika i specijalizaciju zdravstvenih radnika i zdravstvenih saradnika iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu.

Od 15.07.2009. godine Miron Sopić radi kao asistent za užu naučnu oblast Medicinska biohemija. Od početka rada u Institutu za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Miron Sopić učestvuje u izvođenju praktične nastave na predmetima Opšta biohemija, Primena informacionih tehnologija u akademskoj praksi, Klinička enzimologija, Medicinska biohemija i na studijskom programu magistar farmacije – medicinski biohemičar i predmetima Medicinska biohemija i Statistika u farmaciji na studijskom programu magistar farmacije. Takođe je bio član komisije za odbranu velikog broja diplomskih radova. Prema rezultatima anketa o vrednovanju pedagoškog rada saradnika njegov rad u nastavi ocenjen je vrlo visokim ocenama.

U periodu od septembra 2008. do decembra 2010. godine, bio je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj 145036B pod nazivom "Ispitivanje biohemijskih i genetičkih faktora rizika kao uzročnika i markera ateroskleroze i drugih oboljenja: analitički i klinički aspekti". Od januara 2011. godine, saradnik je na projektu 175035 pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“, čiji je rukovodilac Prof. dr Zorana Jelić – Ivanović, a koji finansira Ministarstvo prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Učesnik je i dva međunarodna projekata. Od 2010. do 2014. godine saradnik je na međunarodnom projektu u okviru programa COST (European research programme COST, European Cooperation in Science and Technology). Scientific Domain: Biomedicine and Molecular Biosciences; Ažtiti: HDL: From Biological Understanding to Clinical Exploitation" (BM0904), a od 2012. do 2014. godine saradnik je na međunarodnom projektu u bilateralne saradnje Republike Srbije i Republike Slovenije "Dijagnostička vrednost novih biomarkera u ranom otkrivanju ateroskleroze kod pacijenata sa terminalnim stadijumom renalne bolesti".

Dobitnik je stipendija za učešće na:

- letnjoj školi pod nazivom „1st ESPT Summer School on Pharmacogenomics and Theranostics” u organizaciji CEEPUS programa, Ljubljana, Slovenija, avgust 2012. godine
- letnja školi pod nazivom „2nd Training School of COST BM0904: HDL-Physiology, Regulation and Therapeutic Potential“ Bukurešt-Sinaia, Rumunija, avgust 2013. godine
- 83. EAS Kongresu u Glasgovu, Škotska, mart 2015.

Dobitnik je Godišnje nagrade Farmaceutskog fakultet (3. mesto) za naučno-istraživački rad tokom poslediplomskih studija.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Sopić (DRAVOYOV) MIRON  
број индекса 8/07

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Određivanje genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 i nivoa adiponektina u krvi kod pacijenata sa koronarnom bolešću i pacijenata sa kroničnom bubrežnom insuficijencijom

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

Потпис докторанда

У Београду, 5.5.2010.

Sopić Miron

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Miron Sopic'

Број индекса 8107

Студијски програм Medicinska biohemija - doktorske akademske studije

Наслов рада Određivanje genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2  
nivoa adiponektina u krvi kod pacijenata sa koronarnom bolešću i pacijenata sa hroničnom bolešću  
inzulinske rezistencije

Ментор prof. dr Zorana Jelić-Ivanović, prof. dr Vesna Spasogejić-Jalilović

Потписани/а Miron Sopic'

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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.

У Београду, 5.5.2016.

Потпис докторанда

Sopic' Miron

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Одређивање генске експресије адипонектинских рецептора AdipoR1 и AdipoR2 и нивоа адипонектина у крви код пацијената са коронарним болесци и пацијената са хроничном кибрезицом инсулинојенијом  
која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 5.5.2016.

Потпис докторанда

Lepric' Aliran