

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski Fakultet

Jelena D. Munjas

**Određivanje nivoa genske ekspresije
rezistina i receptora za rezistin i
koncentracije rezistina u krvi pacijenata sa
ishemijskom bolešću srca**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Jelena D. Munjas

**Measurement of gene expression levels of
resistin, resistin receptor and circulating
resistin concentrations in blood of patients
with ischemic heart disease**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor
redovni profesor
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Zorana Jelić-Ivanović,
profesor emeritus
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Dimitra Kalimanovska-Oštrić,
redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Beograd, 2018.

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

Mentoru prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj na ukazanom poverenju i velikoj podršci, znanju i motivaciji koje mi je pružila ne samo u izradi i pisanju ove doktorske disertacije, već u mom celokupnom dosadašnjem profesionalnom usavršavanju, a posebno na velikom strpljenju za sve moje nedoumice i pitanja;

Prof. dr Zorani Jelić-Ivanović na ukazanom poverenju, znanju, podršci i razumevanju koje mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije i na usmeravanju ka pozitivnom i kreativnom rešenju za sve probleme;

Prof. dr Dimitri Kalimanovskoj-Oštrić na ostvarenoj saradnji i velikom zalaganju za pronicljiv odabir ispitivanih pacijenata kao i na stručnim savetima, ljubaznosti i razumevanju pri izradi ove doktorske disertacije;

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

Prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević i prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević najpre na pruženom znanju iz oblasti genske ekspresije koja su olakšala moj naučno-istraživački rad kao i na velikoj pomoći i strpljenju pri statističkoj obradi podataka; a prof. Jeleni Kotur-Stevuljević i na tome što me je još kao studenta zainteresovala i uputila u naučno-istraživački rad;

Doc. dr Ani Ninić na divnoj saradnji, koja me je temeljno i sa puno strpljenja i podrške uvela u metodologiju naučnog ispitivanja genske ekspresije i motivisala i zainteresovala za ovu oblast naučnog istraživanja;

Doc. dr Jeleni Vekić i prof. dr Aleksandri Zeljković na kreativnim idejama u rešavanju problema i na saradnji i podršci koje su mi pružile u naučnom radu, posebno u statističkoj obradi podataka i pisanju radova;

Prof. dr Aleksandri Stefanović na podršci, razumevanju i svim korisnim savetima koje mi je pružila;

Svim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju, a posebno kolegama Tamari Gojković, Milici Miljković, Sandri Vladimirov i Jasmini Ivanišević koje su mi svojim bezrezervnim razumevanjem i podrškom pomogle da prevaziđem sve prepreke i izazove sa kojima sam se susretala;

Mom dragom kolegi Mironu Sopiću na prijateljstvu, inspiraciji, ogromnoj podršci, kreativnoj razmeni ideja i znanja i timskom radu koji je učinio istraživanje posebnim;

Svojoj porodici na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju, podršci i inspiraciji!

Izvod

Ishemijska bolest srca (IBS) danas predstavlja jedan od glavnih uzroka smrtnosti u svetu. U osnovi ove bolesti se nalazi ateroskleroza koja predstavlja multifaktorsko, hronično inflamatorno oboljenje indukovano ćelijskim i imunološkim odgovorom vaskularnog zida na metaboličku povredu. Humani rezistin je proinflamatorni protein, koji može imati značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze i IBS. Ipak, kliničke studije izvedene do sada došle su do oprečnih zaključaka vezane za ulogu ovog proteina u IBS.

Kako bi se doprinelo boljem razumevanju uloge rezistina u ishemijskoj bolesti srca, ciljevi ovog istraživanja su bili određivanje nivoa iRNK rezistina i njegovog receptora CAP1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija rezistina u krvi pacijenata sa IBS i zdravih ispitanika, koji su činili kontrolnu grupu (KG), ispitivanje njihove međusobne povezanosti, povezanosti sa genskom ekspresijom IL-6 i CD36 i povezanosti sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze.

U ovu studiju uključeno je 95 pacijenata sa indikacijama za koronarnu angiografiju i 33 ZI. Nivoi iRNK ispitivanih parametara su određeni metodom *qPCR*-a, koncentracije rezistina ELISA metodom, a subklase lipoproteinskih čestica elektroforezom na gradijentu nenedenaturišućeg poliakrilamidnog gela.

Koncentracije rezistina, nivoi iRNK CAP1 i CD36 su bili značajno viši kod svih grupa pacijenata sa IBS u odnosu na KG ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$, redom). Pacijenti sa akutnim koronarnim sindromom su imali značajno više koncentracije rezistina u odnosu na druge grupe pacijenata ($p_{\text{stabilna angina pectoris}} = 0,028$; $p_{\text{bez anginoznih tegoba i značajne stenoze}} = 0,003$). Nivoi iRNK rezistina se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa. Pacijenti sa sadržajem malih gustih LDL (mgLDL) čestica $\geq 50\%$ su imali značajno više koncentracije rezistina ($p = 0,031$) i nivoe iRNK rezistina ($p = 0,004$) u odnosu na pacijente sa sadržajem mgLDL čestica $< 50\%$. Nezavisni prediktori koncentracija rezistina su bili kreatinin i ukupni holesterol, $\text{adj}R^2 = 0,298$; nivoa iRNK rezistina dijametar LDL čestica i nivoi iRNK CD36, $\text{adj}R^2 = 0,192$; nivoa iRNK CAP1 trigliceridi i nivoi iRNK CD36, $\text{adj}R^2 = 0,352$; nivoa iRNK CD36 hsCRP, kreatinin i nivoi iRNK CAP1, $\text{adj}R^2 = 0,505$.

U ovoj studiji uočena je značajna povezanost rezistina i IBS, posebno sa kliničkim manifestacijama ove bolesti. Takođe, nivoi genske ekspresije CAP1 su bili povišeni kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na moguću ulogu CAP1 proteina u razvoju ove bolesti, posebno u ranim fazama, pri čemu rezistin može snažnije delovati na ćelije sa prekomernom ekspresijom CAP1 i doprineti razvoju bolesti.

Povišene vrednosti rezistina i nivoa iRNK rezistina su udružene sa proaterogenim lipidnim statusom, koji se ogleda kroz niže vrednosti HDL-H i kroz veću zastupljenost malih gustih LDL čestica. Takođe, ovakav lipidni status može uticati na ekspresiju ovog proinflamatornog molekula, obzirom da je pokazano da lipidi kao i CD36 receptor pokazuju nezavisni uticaj na nivo iRNK rezistina i CAP1 receptora u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

CD36 molekul bi, obzirom na uočene razlike, mogao doprineti u evaluaciji stepena progresije IBS. Najsnažniji prediktor nivoa iRNK CD36 je upravo CAP1, što znači da rezistin delujući na ćelije sa prekomernom ekspresijom CAP1 može dovesti do ushodne regulacije iRNK CD36, na taj način doprineti daljem razvoju ateroskleroze.

Ključne reči: rezistin, CAP1; CD36; ishemijska bolest srca; male guste LDL čestice

Naučna oblast: Medicinske nauke- Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 616.12-005.4-036.88:[577(043.3)]

Abstract

Ischemic heart disease (IHD) is one of the major causes of morbidity and loss of quality of life across the globe. The pathogenesis of IHD lays in the development of dyslipidemia, increased proinflammatory processes and consequently atherosclerosis evolution and progression. Human resistin is a proinflammatory cytokine, with a potential role in atherosclerosis and IHD development. However, clinical studies conducted so far have been inconsistent regarding resistin's role in IHD.

The aims of this study were to determine resistin mRNA levels and mRNA levels of resistin receptor, CAP1, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and circulating resistin concentrations in IHD patients and healthy subjects (HS), to evaluate their interconnection and association with gene expression levels of IL-6 and CD36, as well as their association with lipid and non-lipid atherosclerosis risk factors.

This study included 95 patients requiring coronary angiography and 33 HS. Circulating resistin was measured by ELISA; PBMC resistin mRNA was determined by qPCR. LDL and HDL subclasses were determined by gradient gel electrophoresis.

Plasma resistin, CAP1 and CD36 mRNA were significantly higher in all groups of IHD patients compared to HS ($P<0.001$; $P<0.001$; $P<0.001$, respectively). Acute coronary syndrome patients had significantly higher plasma resistin compared to other groups of patients ($P=0.028$; $P=0.003$). Resistin mRNA levels were not significantly different between any of the investigated groups. Plasma resistin ($P=0.031$) and resistin mRNA ($P=0.004$) were significantly higher in patients with the proportion of sdLDL particles $\geq 50\%$, compared to the group with the relative proportion of sdLDL particles $< 50\%$. Multiple linear regression analysis identified creatinine and total cholesterol as independent predictors of plasma resistin ($\text{adjR}^2=0.289$); LDL particle diameter and CD36 mRNA levels of resistin mRNA ($\text{adjR}^2=0.192$); TG and CD36 mRNA of CAP1 mRNA ($\text{adjR}^2=0.376$); hsCRP, creatinine and CAP1 mRNA levels of CD36 mRNA, ($\text{adjR}^2=0.505$).

A significant association was found between resistin and IHD, especially with clinical severity of the disease. Gene expression levels of CAP1 have been elevated in all groups of IHD patients compared to HS, highlighting the possible role of this molecule in the disease development, especially in its early stages. Resistin could actually exert its effect stronger on cells with upregulated CAP1 mRNA and contribute to atherosclerosis development.

Elevated circulating resistin and resistin mRNA were associated with proatherogenic lipid status, reflecting lower HDL-C and higher relative proportion of small, dense LDL particles. On the other hand, lipids and CD36 scavenger receptor have shown an independent influence on resistin mRNA levels, which implies that the presence of proatherogenic lipid status could induce resistin gene expression.

CD36 mRNA could serve as a stratification tool for IHD. The most powerful statistical predictor of CD36 mRNA levels was CAP1, indicating that resistin acting upon cell with up-regulated CAP1 gene could lead to upregulation of CD36 mRNA, and in that way contribute to atherosclerosis development.

Key words: resistin, CAP1, CD36, ischemic heart disease; sdLDL particles

Scientific field: Medical sciences- Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC N°: 616.12-005.4-036.88:[577(043.3)]

Skraćenice u tekstu

KVB-kardiovaskularne bolesti

IBS-Ishemijska bolest srca

LDL-lipoproteini niske gustine

LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine

HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine

NO- azot-monoksid

VCAM-1-adhezioni molekul vakularnih ćelija 1 (*eng. vascular cell adhesion molecule 1*)

ICAM-1- intercelularni adhezioni molekul 1 (*eng. intercellular adhesion molecule 1*)

MCP-1- monocitni hemoatraktantni protein 1 (*eng. monocyte chemoattractant protein 1*)

CCR2 -monocitni hemokinski receptor 2 (*eng. CC chemokine receptor 2*)

M-CSF-faktor stimulacije kolonija makrofaga (*eng. macrophage colony-stimulating factor*)

SR-receptor čistač (*eng. scavenger receptor*)

CD36- klaster diferencijacije 36 (*eng. cluster of differentiation*)

oxLDL- oksidovani LDL

IL-6- interleukin 6

TNF α - faktor nekroze tumora α (*eng. tumor necrosis factor α*)

IL1- β - interleukin 1 β

TH ćelije- pomoćničke T-ćelije (*eng. T-helper cells*)

VEGF- faktor rasta vaskularnog endotela (*eng. vascular endothelial growth factor*)

TGF β - transformišući faktor rasta β (*eng. transforming growth factor β*)

MMP-matriks-metaloproteinaze

TF- tkivni faktor

LPL- lipoproteinska lipaza

VLDL- lipoproteini veoma male gustine

MIP1 α - makrofagni inflamatorni protein 1 α

ROS- reaktivne kiseonične vrste (*eng. reactive oxygen species*)

MPO- mijeloperoksidaza

SMase- sfingomijelinaza

sPLA2- sekretorna fosfolipaza A2

PDGF- faktor rasta poreklom iz trombocita (*eng. platelet derived growth factor*)

bFGF- osnovni faktor rasta fibroblasta (*eng. basic fibroblast growth factor*)

AHA- Američko udruženje za srce (*eng. American Heart Association*)

AKS- akutni koronarni sindrom

SAP-stabilna angina pektoris

AIM-akutni infarkt miokarda

STE-AKS- akutni koronarni sindrom sa ST elevacijom

STEMI-infarkt miokarda sa ST elevacijom

NSTE-AKS- akutni koronarni sindrom bez ST elevacije

NSTEMI-infarkt miokarda bez ST elevacije

hsTn- visoko osetljivi troponin

NAP- nestabilna angina pektoris

HRES- gen za humani rezistin

RELM- molekuli nalik rezistinu (*eng. resistin like molecules*)

FIZZ- nađen u zoni inflamacije (*eng. found in inflammatory zone*)

NF- κ B- nuklearni faktor κ B (*eng. nuclear factor κ B*)

LPS- lipopolisaharid

SP- protein specifičnosti (*eng. specificity protein*)

C/EBP2- protein koji se vezuje za pojačivač CCAAT 2 (*eng. CCAAT-enhancer-binding protein 2*)

PPAR- γ - receptori aktivatora proliferacije peroksizoma γ (*eng. peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

TAF- faktori vezani za TBP (protein koji se vezuje za TATA blok) , (*eng. TATA box binding protein associated factors*)

RNK- ribonukleinska kiselina

ZO-1- *zonula occludens-1*

VLA-4- vrlo kasni antigen 4 (*eng. very late antigen 4*)

VEGFR- receptor za faktor rasta vaskularnog endotela (*eng. vascular endothelial growth factor receptors*)

ABCA1- ATP-vezujući kasetni transporter A1 (*eng. ATP-binding cassette transporter A1*)

ROR1- orfanski receptor nalik tirozin kinazi 1(*eng. tyrosine kinase-like orphan receptor 1*)

TLR-4- receptor sličan Tollu 4 (*eng. Toll-like receptor 4*)

CAP1- protein udružen sa adenilat ciklazom 1 (*eng. adenylyl cyclase-associated protein 1*)

cAMP- ciklični adenzin monofosfat

iRNK- informaciona RNK

SH3 domen- domen Src homologije 3

KG- kontrolna grupa

UH- ukupni holesterol

TG- trigliceridi

ITM- indeks telesne mase

hsCRP -C- reaktivni protein visoke osetljivosti

HOMA IR -homeostazni model procene insulinske rezistencije

EDTA- etilendiaminotetrasirćetna kiselina

HDL- lipoprotein visoke gustine

ELISA- enzimski imunoesej (*eng. enzyme linked immunosorbent assay*)

BSA- goveđi serumski albumin

TMB-3,3',5,5'- tetrametilbenzidin

Kv- koeficijent varijacije

PCR- lančana reakcija polimeraze

qPCR (*real-time PCR*)- kvantitativni PCR

Real time PCR- PCR u realnom vremenu

rRNK- ribozomska RNK

cDNK- komplementarna DNK

RT- reverzna transkripcija

dNTP- deoksinukleotid trifosfat

TF kontrola- kontrola bez reverzne transkriptaze (*eng. transcriptase free*)

NTRT kontrola- kontrola reverzne transkripcije bez matrice (*eng. no template reverse transcription control*)

Ct- ciklus praga fluorescencije (*eng. cycle threshold*)

GAPDH- gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

gDNK- genomska DNK

NTC- negativna kontrola bez matrice (*eng. negative template control*)

ANOVA-univarijantna analiza varijanse

SP- sistolni krvni pritisak

DP- dijastolni krvni pritisak

ILD- ispod limita detekcije

adjR²- korigovani R² za model

VIF- faktor rasta varijanse

CETP-holesterol-estar transferni protein

apoB-apolipoprotein B

PCSK9- proprotein konvertaza subtilizin/keksin tip 9 (*eng. proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*)

Sadržaj

Izvod	4
Abstract.....	7
Skraćenice u tekstu	1
Sadržaj	1
1. Uvod.....	1
1.1. Nastanak i razvoj ateroskleroze.....	2
1.2. Kliničke manifestacije ishemijske bolesti srca.....	10
1.3. Rezistin	11
1.4. Rezistin i ateroskleroza.....	14
1.5. Protein udružen sa adenilat ciklazom 1- CAP1	16
1.6. Značaj ispitivanja rezistina u ishemijskoj bolesti srca.....	19
2. Cilj.....	20
3. Materijal i metode	21
3.1. Ispitanici	21
3.3. Metode	24
3.3.1. Određivanje biohemijskih parametara.....	24
3.3.2. Određivanje dijametara LDL i HDL čestica.....	25
3.3.3. Određivanje koncentracije rezistina i IL-6 u krvi.....	27
3.3.4. Kvantifikacija genske ekspresije rezistina, CAP1, CD36 i IL6 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi	32
3.4. Statistička obrada podataka	52
4. Rezultati	53
4.1. Analiza ispitivanih parametara u grupama pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenozе, sa SAP, AKS i zdravih ispitanika	53
4.1.1. Ispitivanje uticaja starosti, pola, pušačkog statusa i terapije na koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i na nivoe iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kod pacijenata sa IBS i zdravih ispitanika.....	61
4.1.2. Ispitivanje povezanosti rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa IBS.....	65

4.2. Analiza ispitivanih parametara u grupama pacijenata sa i bez značajne stenoze i zdravih ispitanika.....	71
4.2.1. Ispitivanje uticaja pola, pušačkog statusa i terapije na koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i na nivoe iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kod pacijenata bez AKS i zdravih ispitanika	79
4.2.2. Ispitivanje povezanosti rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata bez AKS i zdravih ispitanika	82
4.2.3. Otklanjanje uticaja pridruženih faktora na koncentracije rezistina, normalizovane nivoe iRNK CAP1 i CD36 kod pacijenata sa i bez značajne stenoze i zdravih ispitanika analizom kovarijanse	88
4.2.4. Određivanje sadržaja malih HDL i malih, gustih LDL čestica kod pacijenata bez AKS	92
4.2.5. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa normalizovanim nivoima iRNK rezistina, CAP1 i CD36 kod pacijenata bez AKS i zdravih ispitanika.....	97
5. Diskusija.....	100
6. Zaključci.....	111
7. Literatura	113

1. Uvod

Kardiovaskularne bolesti (KVB) danas predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu. Podaci ukazuju da je čak negde oko jedne trećine svih smrti širom sveta uzrokovano kardiovaskularnim bolestima. Ishemijska bolest srca (IBS), kao najčešći oblik kardiovaskularnih bolesti, u 2010. godini je bila uzrok preko 7 miliona smrti širom sveta, što predstavlja porast od čak 35% od 1990. godine (1). Ishemijska bolest srca je najčešće posledica stvaranja aterosklerotskih plakova koji ometaju normalan protok krvi kroz srce i dovode do smanjenog dopremanja kiseonika srčanim mišićnim ćelijama (2). Identifikovani su brojni faktori rizika koji dovode do nastanka ove bolesti, među kojima su visoke koncentracije holesterola u lipoproteinima male gustine (LDL-H) i niske koncentracije holesterola u lipoproteinima visoke gustine (HDL-H), gojaznost, pušenje, hipertenzija, sedatarni način života, pozitivna porodična anamneza za ishemijsku bolest srca u ranijem životnom dobu (pre 55. godine kod muškaraca; pre 65. godine kod žena), šećerna bolest, muškarci starosti preko 55 godina i žene posle menopauze i starosti preko 65 god, starije životno doba (3). Smatra se da bi se učestalost srčanih bolesti, moždanih udara i dijabetesa tip 2 smanjilo za čak 80% ukoliko bi se rešio problem gojaznosti, nezdrave ishrane i fizičke neaktivnosti (1).

U osnovi ishemijske bolesti srca nalazi se ateroskleroza. Ateroskleroza predstavlja multifaktorsko, hronično inflamatorno oboljenje indukovano ćelijskim i imunološkim odgovorom vaskularnog zida na metaboličku povredu (1, 4-7). Tokom poslednjih godina terapijski ciljevi više nisu oslonjeni samo na invazivnu revaskularizaciju miokarda smanjenjem ili premošćenjem stenoza koje ometaju protok kroz koronarne arterije, jer najveća opasnost aterosklerotskog plaka zapravo leži u njegovom trombogenom potencijalu, a ne samo u stepenu okluzije koju pravi u datom krvnom sudu (4-6). Pokazalo se da su upravo inflamatorni procesi ti koji determinišu sudbinu aterosklerotskog plaka, utičući na gotovo sve faze njegovog razvoja, od njegovog nastanka preko progresije do zapušanja koronarne arterije i posledičnih kliničkih manifestacija (4, 5).

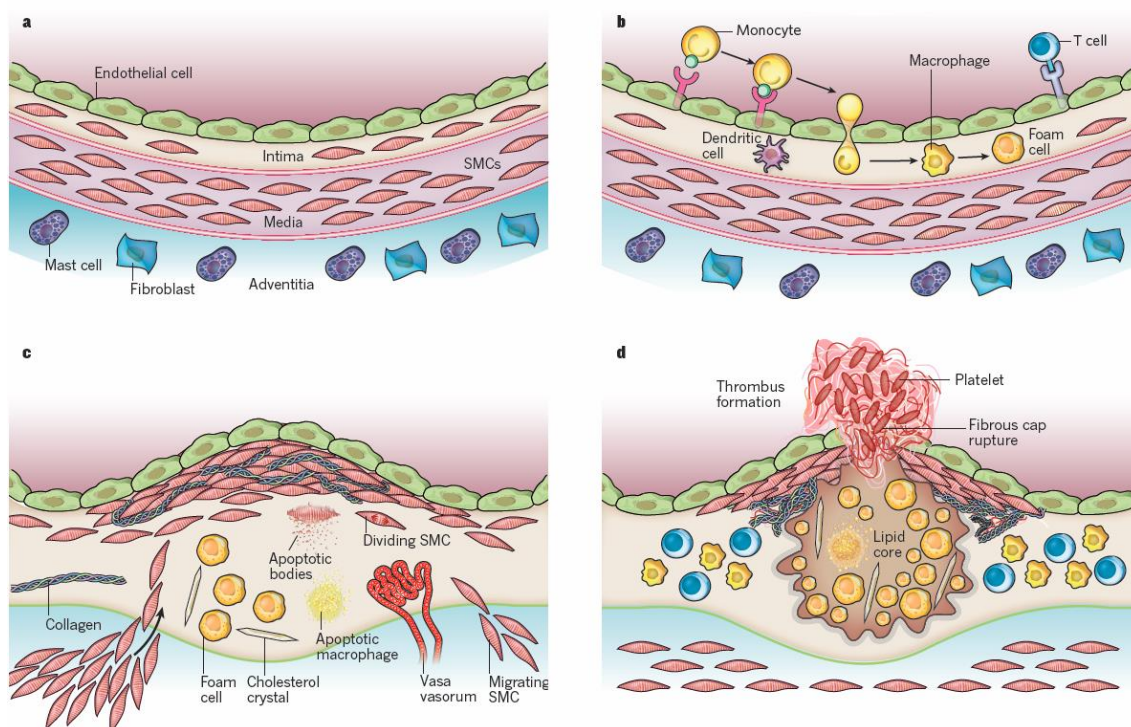
1.1. Nastanak i razvoj ateroskleroze

Ateroskleroza je patološki proces koji zahvata intimu arterija prouzrokujući kasnije promene u mediji i adventiciji, Slika 1 (8). *Primum movens* u nastanku ateroskleroze je zapravo disfunkcija endotela (9). Naime, histološki gledano, zidove arterija čine tri koncentrično postavljena sloja: unutrašnji omotač (*tunica intima*), srednji omotač (*tunica media*) i spoljašnji omotač (*tunica adventitia*), Slika 1a. Tunicu intimu čine tri sloja: endotel sastavljen od jednog sloja ćelija koje naležu na bazalnu membranu, subendotel i unutrašnja elastična lamina. Tunica media se sastoji od glatko-mišićnih ćelija, elastičnih i kolagenih vlakana koju od adventicije odvaja spoljašnja elastična lamina. Tunica adventitia se sastoji od rastresitog vezivnog tkiva sa kolagenim vlaknima, mrežom elastičnih vlakana, fibroblastima i makrofazima, krvnim sudovima (*vaza vazorum*) i nervima (8, 9).

Endotel intime predstavlja dinamički organ sa kompleksnim metaboličkim sposobnostima i izuzetno važnom ulogom u regulaciji hemostaze i vaskularnog tonusa, tj. vaskularne homeostaze (8, 9). Održavanje normalnog vaskularnog tonusa je omogućeno oslobađanjem nekoliko supstanci iz endotelnih ćelija koje deluju kao vazokonstriktori ili vazodilatatori (19). Glavni vazodilatator koga luče endotelne ćelije krvnih sudova je azot-monoksid (NO), a pored njega značajnu vazodilatatornu ulogu imaju i prostaciklin i bradikinin. NO ispoljava i anti-oksidaciona svojstva, inhibira agregaciju trombocita, adheziju i infiltraciju leukocita i proliferaciju glatko-mišićnih ćelija. Sa druge strane, endotelin-1 i angiotenzin II spadaju u vazokonstriktorne supstance koje se luče iz endotelnih ćelija krvnih sudova. Obe ove supstance stimulišu i proliferaciju glatko-mišićnih ćelija. Angiotenzin II je takođe i snažan prooksidans, deluje proinflamatorno i stimuliše produkciju endotelina-1 (9, 10). Takođe, u fiziološkim uslovima, endotelne ćelije zida krvnih sudova se odupiru adheziji i agregaciji leukocita i trombocita i promovišu fibrinolizu (8-10).

Vaskularna homeostaza se održava upravo uspostavljanjem ravnoteže između vazodilatatora i vazokonstriktora, ali i protrombotičkih i antitrombotičkih faktora koje luče endotelne ćelije zidova krvnih sudova (8). Međutim, pod uticajem određenih faktora rizika (hipertenzije, pušenja, nezdrave ishrane, gojaznosti, insulinske rezistencije ili inflamacije) može doći do oštećenja ili do takozvane rane zapaljenske reakcije

endotela (poznata i kao aktivacija endotela), što dovodi do promene funkcije endotelinih ćelija, a samim tim i do narušavanja vaskularne homeostaze (5, 8, 11). Time se inicira nekoliko procesa koji doprinose razvoju ateroskleroze. Ti procesi uključuju adheziju leukocita, povećanu permeabilnost endotela, produkciju brojnih citokina i agregaciju trombocita (8-10).



Slika 1. Histološka građa arterija i faze u razvoju ateroskleroze:

- a) normalna arterija
- b) inicijalne faze u razvoju ateroskleroze
- c) progresija lezije
- d) ruptura plaka i tromboza¹

¹ preuzeto iz Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature 2011;473:317-25.

Endotelne ćelije arterija, koje se u normalnim uslovima odupiru adheziji cirkulišućih leukocita, kada su izložene iritativnim stimulusima (kao što su dislipidemija, hipertenzija ili inflamacija), ekspimiraju adhezione molekule koji omogućavaju prianjanje leukocita za površinu endotela (8). Monociti, najbrojnije inflamatorne ćelije koje su prisutne u aterosklerotskim plakovima, prianjaju na disfunkcionalne endotelne ćelije vezivanjem za adhezioni molekul vaskularnih ćelija 1 (VCAM-1, *eng. vascular cell adhesion molecule 1*), intercelularni adhezioni molekul 1 (ICAM-1, *eng. intercellular adhesion molecule 1*), endotelni adhezioni molekul leukocita i selektine (4, 5, 8, 11, 12-14), Slika 2. Ekspresija ovih molekula se indukuje proinflamatornim citokinima, angiotenzinom II ili oksidovanim lipoproteinima (5). Disfunkcionalne endotelne ćelije luče manje NO, što zbog smanjene sinteze, što zbog povećanog utroška NO usled reakcije sa slobodnim radikalima (9).

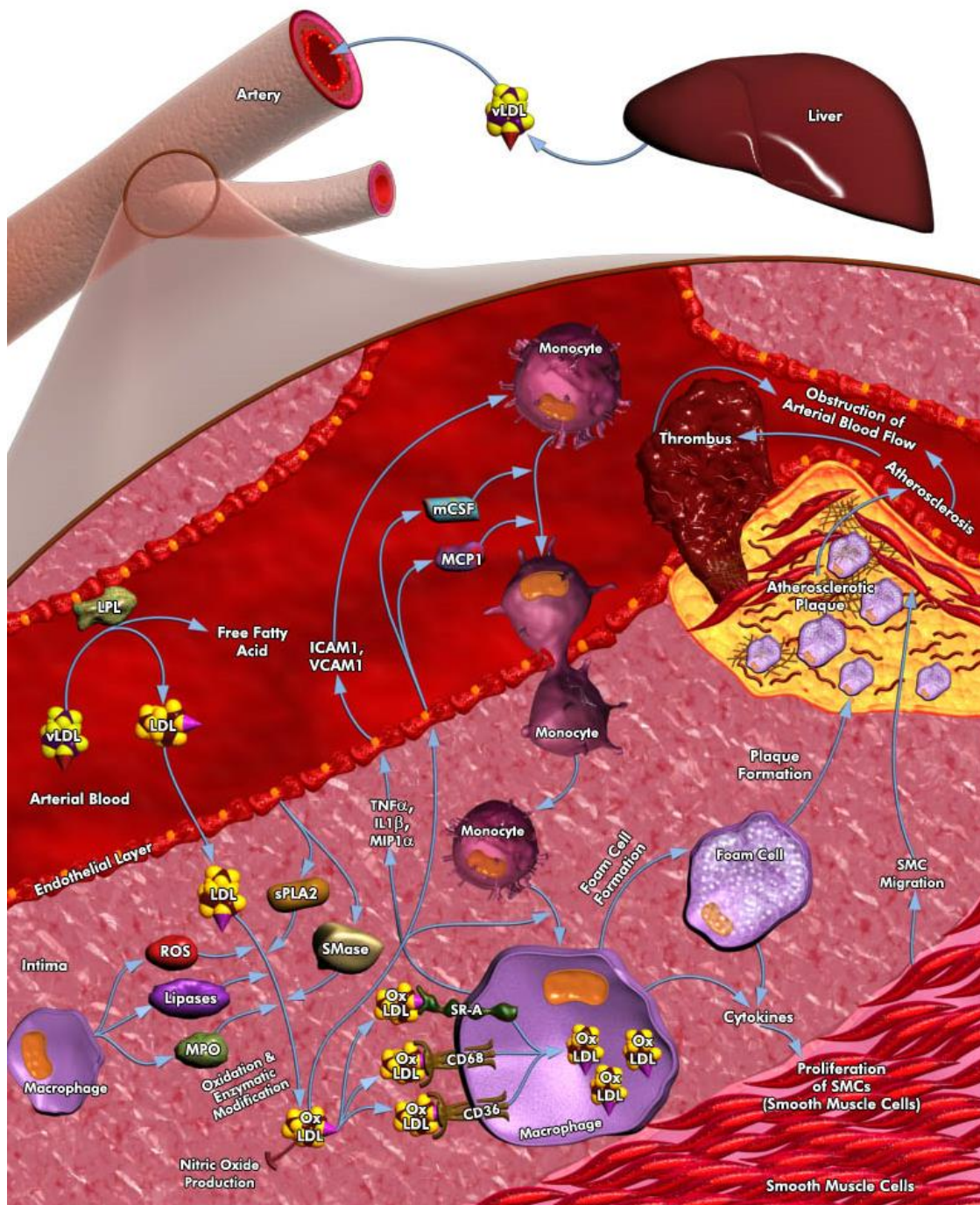
Paralelne promene koje nastaju u permeabilnosti endotela i u sastavu ekstracelularnog matriksa u subendotelnom prostoru intime omogućavaju ulazak i zadržavanje lipoproteinskih čestica u zidu arterija (8). Oštećene ili aktivirane endotelne ćelije postaju propustljivije na prvom mestu za LDL čestice, koji prolaze iz lumena krvnog suda u subendotelni prostor intime (4, 8, 9). U slučaju dislipidemije, visoke koncentracije LDL holesterola u krvi omogućavaju povećano zadržavanje LDL čestica u subintimi, koje bi u normalnim uslovima bile transportovane kroz intimu i mediju do *vaza vazorum* adventicije i limfnih struktura (9). Vezujući se za proteoglikane subendotelnog prostora intime, LDL čestice postaju podložne različitim tipovima hemijske modifikacije: oksidaciji posredovanoj slobodnim radikalima i enzimskoj modifikaciji posredovanoj različitim enzimima poreklom iz makrofaga ili iz aktiviranih endotelnih ćelija, Slika 2 (11, 15, 16). Ovako modifikovani lipoproteini su snažni hemoatraktanti za leukocite iz krvi, stimulišu ekspresiju monocitnog hemoatraktantog proteina 1 (MCP-1, *eng. monocyte chemoattractant protein 1*) koji se vezuje za monocitni hemokinski receptor 2 (CCR2, *eng. CC chemokine receptor 2*), omogućavajući dodatnu regrutaciju monocita u leziju, dovode do smanjene produkcije NO, imaju sposobnost da u ovim ćelijama indukuju ekspresiju različitih gena i da stimulišu dodatnu inflamaciju endotela i subintime (7, 9, 11, 15, 16).

Adherirani monociti pod dejstvom hemoatraktanata prelaze u subendotelni prostor intime, nakon čega dolazi do njihovog sazrevanja u makrofage pod dejstvom

faktora stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF, *eng. macrophage colony-stimulating factor*), Slika 2 (5, 9, 11, 12, 18, 19). Tokom sazrevanja makrofage na svojoj membrani ekspimiraju različite receptore čistače (*eng. scavenger receptors* (SR): SR A, B1, CD36 (klaster diferencijacije 36, *eng. cluster of differentiation 36*), CD68 i receptor čistač za fosfatidilserin) koji omogućavaju vezivanje i internalizuju brojnih liganada, uključujući i modifikovane lipoproteinske čestice, native lipoproteine i anjonske fosfolipide (4, 20). Ulazak oksidovanog LDL-a (oxLDL) dovodi do ushodne regulacije brojnih proinflammatoryh citokina, interleukina 6 (IL-6), faktora nekroze tumora α (TNF α), interleukina 1 β (IL1- β), ali i receptora čistača u makrofagama, čime se dalje stimulišu pomenuti procesi (7, 11, 17). Na ovaj način dolazi do masivne akumulacije intracelularnog holesterola i stvaranja tzv. penastih ćelija. Iako penaste ćelije poseduju manje proinflammatory fenotip od makrofaga, lučenjem citokina stimulišu procese koji doprinose daljem razvoju plaka (21). Važno je napomenuti da pored makrofaga, klasičnih ćelija urođenog imuniteta, aterosklerotski plak sadrži i manju populaciju T-limfocita. Ove ćelije stečenog imuniteta imaju odlučujuću “dirigentsku” ulogu u regulaciji funkcije brojnijih makrofaga (4, 5, 21, 23-26). Smatra se da podtipovi pomoćničkih T-ćelija (TH ćelije, *eng. T-helper cells*), TH-1 i TH-17 imaju proaterogena dejstva, dok TH-2 i regulatorne TH ćelije imaju antiaterogena dejstva. TH-1 ćelije lučeći interferon γ i TNF α aktiviraju makrofage i doprinose inflamaciji, a lučenjem faktora rasta vaskularnog endotela (*eng. vascular endothelial growth factor, VEGF*) i u angiogenezi (9, 21). Regulatorne TH ćelije lučeći transformišući faktor rasta β (TGF β , *eng. transforming growth factor β*) ispoljavaju antiinflammatory svojstva (21).

Makrofage dalje proliferišu u subendotelnoj intimi, i doprinose održavanju i povećanju inflamacije i endotelnoj disfunkciji, tako što luče nekoliko faktora rasta i citokina, Slika 2 (4, 5, 22). Progresija lezije uključuje migraciju i proliferaciju glatko-mišićnih ćelija medije i intime, stimulisane inflamacijom endotela i subintime, i povećanu sintezu molekula kolagena, elastina i proteoglikana koji čine ekstracelularni matriks (9). Makrofage luče i enzime koji razlažu ekstracelularni matriks arterija, matriks-metaloproteinaze (MMP). Ovi enzimi razgrađuju unutrašnju i spoljašnju elastičnu laminu, što omogućava migraciju glatko-mišićnih ćelija, uz istovremenu stimulaciju proliferacije i angiogeneze medije i adventicije. Ovi procesi su potpomognuti brojnim citokinima i faktorima rasta, uključujući i faktor rasta poreklom

iz trombocita (*eng. platelet derived growth factor, PDGF*), osnovni faktor rasta fibroblasta (*eng. basic fibroblast growth factor, bFGF*) i TGF β (9). Aktivirane makrofage luče i tkivni faktor (TF) i direktno stimulišu trombozu (4, 5, 22). Penaste ćelije i glatko-mišićne ćelije će se zadržavati u subintimi kao depoi holesterola sve dok ne dođe do njihove apoptoze i oslobađanja lipida u ekstracelularni prostor subintime, čime se omogućava formiranje acelularnih naslaga lipida i ostataka ćelija, koje se nagomilavaju u centralnom regionu plaka i čine njegovo lipidno, tj. nekrotično jezgro. U kasnijim stadijumima razvoja plaka, može se uočiti i prisustvo kristala holesterola i proliferacija vaza vazoruma od adventicije ka plaku, Slika 1c i 1d, (8, 9). Na mestima gde novonastala cirkulacija ulazi u plak dolazi do nagomilavanja makrofaga, T-limfocita i eritrocita. Kako lezija napreduje, može doći i do gubitka endotela, pri čemu dolazi do taloženja i aktivacije trombocita na mestima oštećenja, čime se inicira stvaranje tromba (9).



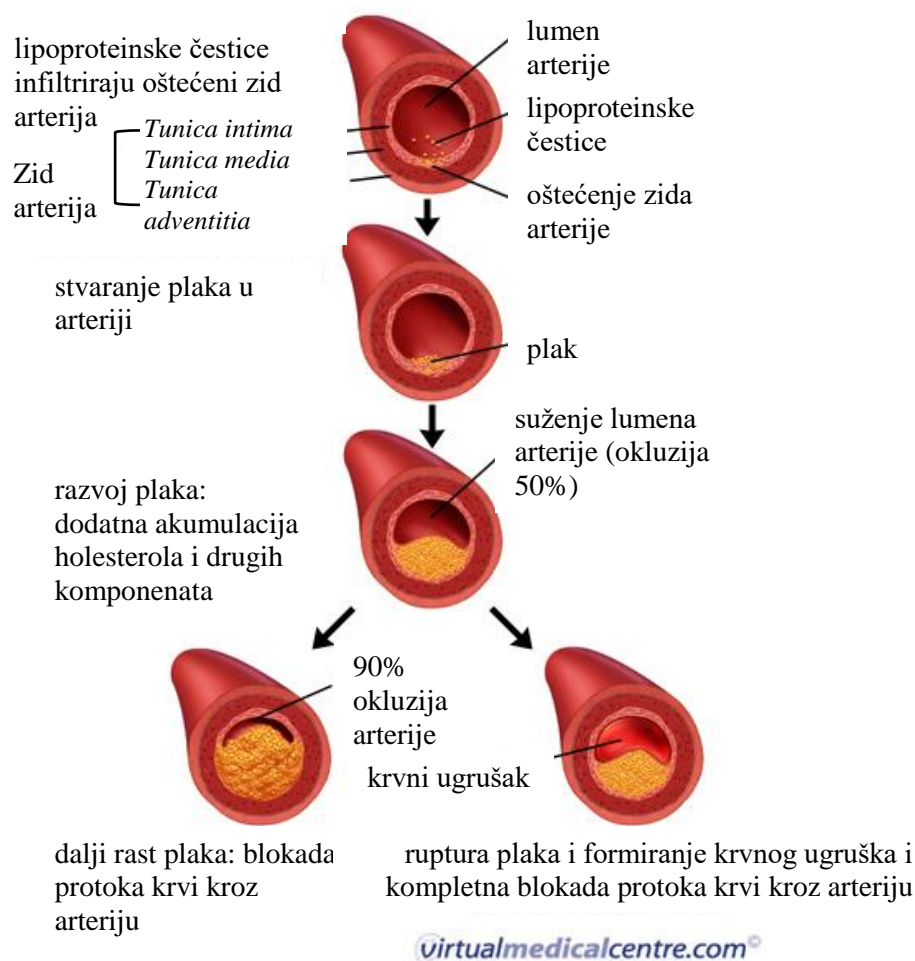
Slika 2. Molekularni mehanizmi nastanka ateroskleroze²

² Preuzeto sa sajta <https://www.qiagen.com/tw/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=267>; 29.9.2017.

LPL- lipoproteinska lipaza; vLDL lipoproteini veoma male gustine; LDL-lipoproteini niske gustine; MIP1 α -makrofagni inflamatorni protein 1 α ; ROS-reaktivne kiseonične vrste; MPO-mijeloperoksidaza; SMase-sfingomijelinaza; sPLA2-sekretorna fosfolipaza A2; VCAM-1-adhezioni molekul vakularnih ćelija 1; MCP-1 monocitni hemoatraktantni proteina 1; ICAM-1-intracelularni adhezioni molekul 1; m-CSF-faktor stimulacije kolonija makrofaga; SR-receptor čistač; CD- klaster diferencijacije; TNF α -faktor nekroze tumora α ; IL1- β -interleukin 1 β

Histopatološki, lezije koje nastaju u vaskularnom zidu se mogu svrstati u nekoliko stadijuma. Najranija vaskularna promena je zadebljanje subendotela intime [lezija tip I prema Američkom udruženju za srce (AHA, eng. *American Heart Association*)], koje se sastoji od slojeva fiziološki nagomilanih glatko-mišićnih ćelija i ekstracelularnog matriksa (4, 27, 28). Najranijom aterosklerotskom lezijom se smatra AHA lezija tip II, takozvane masne pruge, koju čine nagomilane penaste ćelije prožete glatko-mišićnim ćelijama i proteoglikanima intime krvnog suda (4, 29, 30). Važno je istaći da je na ovom nivou proces ateroskleroze reverzibilan (4, 31, 32). Ukoliko se ne uklone faktori rizika koji su doprineli stvaranju AHA lezije tip II, dolazi do daljeg razvoja plaka, što vodi nastanku progresivnih aterosklerotskih lezija (33). Prelaz iz ranih lezija u kompleksni plak zavisi od začaranog inflamatornog kruga aktivacije T ćelija i makrofaga, što za posledicu ima i aktivaciju migracije glatko-mišićnih ćelija, dodatno formiranje penastih ćelija i produkciju ekstracelularnog matriksa koji kasnije formira fibroznu kapu preko plaka. Na taj način nastaje patološko zadebljanje intime-medije krvnog suda (AHA lezija tip III). Ova lezija se primarno sastoji od sloja glatko-mišićnih ćelija, matriksa sačinjenog od proteoglikana i kolagena, oivičenog slojem lipida. Dodatna karakteristika ovih lezija je i nagomilavanje makrofaga sa luminalne strane lezije (4, 17). Fibroateromi predstavljaju AHA leziju tip IV. Ovu leziju karakteriše prisustvo nekrotičnog jezgra, sačinjenog od ostataka penastih ćelija poreklom od makrofaga i glatko-mišićnih ćelija. Jezgro je oivičeno debelom fibroznom kapom koju čine glatko-mišićne ćelije, proteoglikani i kolagen. Fibrozna kapa je izuzetno važna jer održava leziju stabilnom (4, 34). Napredovanjem lezije nastaje ili progresivno suženje lumena koronarne arterije, ili mnogo opasnije vunerabilne, nestabilne aterosklerotske pločice (veliko lipidno jezgro odvojeno od lumena arterije tankom destabilizovanom fibroznom kapom). Naime, fibrozna kapa može preći u kalcifikovanu kapu ili od fibroateroma može nastati fibrosklerotična ploča. Ovakve lezije su stabilne i mogu sužavati lumen krvnog suda preko 75%, što se klinički može manifestovati kao stabilna angina pectoris (9). Sa druge strane, pod uticajem proinflamatornih faktora i matriks metaloproteinaza može doći do degradacije fibrozne kape, i do stvaranja fibroateroma sa tankom fibroznom kapom, koju čine samo molekuli kolagena sa pokojom glatko-mišićnom ćelijom (4, 33, 34). Ovakva aterosklerotska lezija predstavlja nestabilan aterosklerotski plak, koji je posebno opasan jer je podložan eroziji, fisuri ili rupturi.

Ruptura plaka, fisure i površne erozije plaka su direktni trombogeni stimuli. Ove promene izazivaju adheziju i agregaciju trombocita što vodi nastanku luminalne tromboze, odnosno do kliničke manifestacije akutnog koronarnog sindroma (AKS) (4, 6, 9, 35). Ukoliko su defekti fibrozne kape udruženi sa neopstruktivnom i nestabilnom trombozom, nastaje klinička manifestacija nestabilne angine pektoris ili akutni infarkt miokarda bez ST-elevacije. Ukoliko su udruženi sa opstruktivnom i stabilnom trombozom, nastaje klinička manifestacija akutnog infarkta miokarda sa ST elevacijom (9). Takođe u različitim tipovima AKS i sastav tromba se razlikuje: dok je u AKS sa ST elevacijom bogat fibrinom i najčešće potpuno okluzivan, u AKS bez ST elevacije je delimično ili intermitentno okluzivan i čine ga uglavnom trombociti (3). Na Slici 3. prikazana je šema nastanka i razvoja aterosklerotskog plaka.



Slika 3. Nastanak i razvoj aterosklerotskog plaka³

³ Preuzeto sa sajta www.myvmc.com

1.2. Kliničke manifestacije ishemijske bolesti srca

U zavisnosti od stadijuma razvoja i stabilnosti aterosklerotskog plaka i kliničke manifestacije ishemijske bolesti srca se razlikuju, i kreću se od stabilne angine pektoris (SAP) do AKS, koji obuhvata nestabilnu anginu pektoris (NSP), akutni infarkt miokarda (AIM) sa i bez ST elevacije i iznenadnu srčanu smrt (1).

Stabilna angina pektoris je klinički sindrom koji se karakteriše bolom ili nelagodnošću u grudima, izazvan fizičkim naporom ili emocionalnim stresom, koji prolazi posle nekoliko minuta odmora ili posle sublingvalno datog nitroglicerina. Simptomi su prouzrokovani ishemijom miokarda bez prateće nekroze kardiomiocita, koja najčešće nastaje kao posledica aterosklerotskih promena na srčanim krvnim sudovima (36).

Akutni infarkt miokarda je univerzalno definisan kao nekroza kardiomiocita praćena kliničkom slikom koja odgovara akutnoj ishemiji miokarda. Da bi se postavila dijagnoza akutnog IM, neophodno je da bude zadovoljeno nekoliko kriterijuma, koji podrazumevaju povećanje ili smanjenje odgovarajućeg srčanog biomarkera, na prvom mestu troponina visoke osetljivosti (hsT), pri čemu se bar jedna vrednost merenja hsT nalazi iznad vrednosti 99-og percentila zdrave populacije i jedan od sledećih kriterijuma:

1. Prisutni simptomi ishemije.
2. Novonastala značajna promena u ST-T segmentu ili blok leve grane na 12-kanalnom nalazu EKG-u.
3. Prisustvo patoloških Q talasa na nalazu EKG-u.
4. Dokaz na osnovu imidžing tehnika o gubitku vijabilnog miokarda ili segmentna abnormalnost u pokretima srčanog zida.
5. Intrakoronarni tromb detektovan angiografijom ili autopsijom.

AKS je manifestacija ateroskleroze kojoj obično prethodi akutna tromboza izazvana rupturom ili erozijom aterosklerotskog plaka, sa ili bez prateće vazokonstrikcije, uzrokujući iznenadno i kritično smanjenje u koronarnom protoku. Glavni simptom koji ukazuje na dijagnozu AKS je bol u grudima. Na osnovu nalaza EKG-a, razlikuju se dve kategorije pacijenata (3, 37, 38).

U prvu kategoriju spadaju pacijenti sa tipičnim akutnim bolom u grudima i perzistentnom (> 20 minuta) elevacijom ST segmenta- AKS sa ST elevacijom (STE-AKS), koja nastaje kao posledica akutne totalne okluzije koronarne arterije. Kada dođe do nekroze kardiomiocita, razvija se infarkt miokarda sa ST elevacijom (STEMI) (3, 38).

U drugu kategoriju spadaju bolesnici sa akutnim bolom u grudima, ali bez perzistentne elevacije ST segmenta (NSTE-AKS). Na nalazima EKG može se videti depresija ST segmenta ili inverzija T talasa, aplatirani T talasi, ili EKG nalaz može biti normalan. Klinička slika ovih pacijenata varira od asimptomatske prezentacije do ishemije, električne ili hemodinamske nestabilnosti ili srčanog zastoja. Diferencijalna dijagnoza AKS bez ST elevacije (NSTE-AKS) bazira se na merenju hsTn-I. Ukoliko vrednost hsTn-I prelazi vrednost 99 percentila zdrave populacije, što ukazuje da je došlo do nekroze kardiomiocita, to stanje se kvalifikuje kao infarkt miokarda bez ST elevacije (NSTEMI). Ukoliko vrednosti hsTn-I ne prelaze vrednost 99 percentila zdrave populacije, postavlja se dijagnoza nestabilne angine pektoris (NAP), koju odlikuje ishemija miokarda ali bez ćelijske nekroze koja se javlja u mirovanju ili pri minimalnom fizičkom naporu (3, 37).

I pored identifikovanih brojnih faktora rizika za razvoj IBS i napretka koji je ostvaren u dijagnostičkim metodama, porast smrtnosti od 35% koju uzrokuje ISB u novijem dobu ukazuju na veliku potrebu za boljim razumevanjem patofizioloških mehanizama koji doprinose razvoju ove bolesti. Stoga, javlja se i potreba za identifikovanjem i evaluacijom novih biomarkera koji bi omogućili pouzdaniju i dijagnozu i prognozu bolesti, ali i poslužili kao potencijalni terapijski cilj. Zbog toga što je generalno mišljenje stručne javnosti da je jedan od najbitnijih faktora koji doprinosi razvoju IBS i koji određuje klinički ishod bolesti upravo njena proinflamatorna komponenta, ovo istraživanje je bilo usmereno ka evaluaciji uloge proinflamatornog citokina, rezistina, u razvoju ISB.

1.3. Rezistin

Rezistin je protein prvobitno otkriven 2001. godine, korišćenjem skrininga za gene koji su nishodno regulisani u mišijim adipocitima kao odgovor na primenu

antidijabetičnih lekova, tiazolidindiona. Naziv je dobio upravo prema svojoj sposobnosti da se 'odupire' dejstvu insulina (*eng. resistance to insulin*) (39). Naime, rezistin je izdvojen kao jedan do najznačajnijih adipokina koji regulišu funkciju insulina, doprinoseći razvoju insulinske rezistencije i dijabetesa tip 2 kod miševa i koji predstavlja vezu između gojaznosti i razvoja ovih patoloških stanja (39, 40). Iako se smatralo da je humani rezistin uključen u iste patofiziološke procese, istraživanja kod ljudi su pokazala da zapravo ne postoji direktna veza između humanog rezistina i razvoja insulinske rezistencije (41-45), i da se i po mestu lučenja i po funkcijama značajno razlikuje od mišijeg proteina (46-49). Humani rezistin je peptid relativne molekulske mase 12.500, čija je sekvenca, koja se sastoji od 108 amino-kiselina, kodirana genom za humani rezistin (*HRES*) lociranim na hromozomu 19. On pripada familiji sekretornih proteina bogatih cisteinom, takozvanoj RELM (molekuli nalik rezistinu, *eng. resistin like molekul*) ili FIZZ (nađen u zoni inflamacije, *eng. found in inflammatory zone*) familiji, koji imaju značajnu ulogu u inflamatornim procesima (46, 47). U humanom serumu, rezistin cirkuliše u formi multimernih kompleksa, trimera i heksamera, prosečne koncentracije između 7 i 22 µg/L. Iako pokazuje 55% homologije sa mišijim proteinom (39), važno je napomenuti da se promotorski regioni ova dva gena značajno razlikuju, što ukazuje na postojanje drugačijih mehanizama kako transkripcione regulacije tako i tkivne distribucije i funkcije (46, 50). Za razliku od miševa, gde se rezistin sintetise i sekretuje iz adipocita (39), humani rezistin se sintetise i sekretuje iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, makrofaga i ćelija koštane srži (47). Shodno tome, ispitivanja funkcije humanog rezistina su pokazala da je humani rezistin zapravo proinflamatorni citokin. Humani rezistin dovodi do povećanog lučenja drugih proinflamatornih citokina kao što su IL-6, TNF- α i IL-1 β putem nuklearnog faktora κ B (NF- κ B, *eng. nuclear factor κ B*), stimulišući translokaciju obe subjedinice NF- κ B, p50 i p65, u nukleus u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i u ćelijama sinovijalne tečnosti bolesnika sa reumatoidnim artritismom (48, 49). Takođe uočeno je da rezistin povećava i sopstvenu sintezu efektom pozitivne povratne sprege. Proinflamatorni efekti rezistina su potvrđeni *in vivo* intratekalnom administracijom humanog rezistina u zglobove miševa što je indukovalo artritis kod životinja. Sa druge strane, pokazano je da davanje IL-6, TNF- α i IL-1 β kao i lipopolisaharida (LPS-a) dovodi do povećane transkripcije *HRES*-a u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (49), što ukazuje na

kompleksni međusobni odnos pomenutih proinflamatornih citokina koji omogućava ne samo nastanak već i progresiju inflamacije.

Kliničke studije su pokazale da je humani rezistin u vezi sa hroničnom, supkliničkom inflamacijom koja prati gojaznost. Ono što predstavlja izvor rezistina u adipoznom tkivu gojaznih osoba zapravo jeste stromalna vaskularna frakcija adipoznog tkiva, tj. makrofage koje se infiltriraju u adipozno tkivo, a ne sami adipociti. Značaj humanog rezistina u nastanku insulinske rezistencije i dijabetesa tip 2 se može ogledati ne u direktnoj modulaciji dejstva insulina već u proinflamatornoj komponenti kojoj doprinosi ovaj protein (51).

Transkripciona regulacija *HRES-a* nije do kraja razjašnjena. Genska ekspresija mišijeg rezistina je ushodno regulisana direktnim vezivanjem C/EBP2 (protein koji se vezuje za pojačivač CCAAT 2, eng. *CCAAT-enhancer-binding protein 2*) dok je nishodna regulacija posredovana vezivanjem PPAR- γ (receptori aktivatora proliferacije peroksizoma γ , eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) za promotorski region (46). Međutim, drugi transkripcioni faktori učestvuju u kontroli ekspresije *HRES-a*. Ono što je specifično za promotorski deo *HRES-a* jeste odsustvo TATA bloka, što ukazuje na mogućnost da se regulacija ekspresije ovog gena sprovodi preko tzv. "promotora inicijatora" (52). "Promotori inicijatori" pripadaju tzv. faktorima sličnim proteinima specifičnosti (eng. *specificity protein (SP) like factors*), koji omogućavaju regrutaciju ostale transkripcione mašinerije, tako što se vezuju za GC-bogate domene sekvenci DNK, olakšavajući vezivanje transkripcionog faktora IID preko TAF-a [faktori vezani za TBP (protein koji se vezuje za element TATA), eng. *TATA box binding protein associated factors*)] za promotor, koji dalje regrutuju transkripcioni aparat RNK polimeraze II. Naime, pokazano je da pored postojanja brojnih vezujućih sekvenci za različite transkripcione faktore u promotorskom regionu *HRES-a*, SP1 transkripcioni faktor ima glavnu ulogu u regulaciji njegove transkripcije: direktnim vezivanjem SP1 za promotor *HRES-a* dolazi do povećane transkripcije gena u U937 ćelijskoj liniji humanih monocita. Takođe, iako ne postoji direktna interakcija između promotora *HRES-a* i PPAR- γ , pokazano je da PPAR- γ vezivanjem za SP1 transkripcioni faktor u dimerski kompleks, može onemogućiti njegovo vezivanje za promotorski region i tako dovesti do nishodne regulacije *HRES-a* (52), što ukazuje na kompleksnu regulaciju ekspresije ovog gena uz učestvovanje različitih transkripcionih faktora.

1.4. Rezistin i ateroskleroza

Brojna istraživanja su se bavila ispitivanjem efekata rezistina na *in vitro* modelima humanih endotelnih ćelija vaskularnog zida, vaskularnih glatko-mišićnih ćelija i monocita ili makrofaga kao glavnih predstavnika ćelija imunskog sistema koje čine aterosklerotski plak. Ako bi se rezultati ovih studija sumirali, moglo bi se reći da humani rezistin doprinosi svim fazama razvoja aterosklerotske lezije, od inicijalne promene permeabilnosti endotela krvnih sudova do destabilizacije plaka, Slika 4 (53-63). Naime, pokazano je da rezistin dovodi do smanjene i genske i proteinske ekspresije proteina ZO-1 (*zonula occludens-1*) i okcludina koji čine čvrste spojnice endotelnih ćelija, povećavajući time njihovu permeabilnost (53). Ekspresija i funkcija azot-oksida sintaze, koja predstavlja bitan faktor u kontroli vaskularnog tonusa i procesa revaskularizacije se takođe smanjuje pod dejstvom rezistina na ove ćelije (54). Rezistin dovodi do povećane ekspresije endotelina-1, VCAM-1, ICAM-1 i MCP-1 u vaskularnim endotelnim ćelijama (55, 56) i vrlo kasnog antigena 4 (VLA-4, eng. *very late antigen*) na monocitima (57), stimulišući time procese adhezije i infiltracije monocita. Takođe na istom ćelijskom modelu je uočeno povećanje ekspresije receptora za faktor rasta vaskularnog endotela (VEGFR-1 i VEGFR-2, eng. *vascular endothelial growth factor receptors*) i MMP-1 i MMP-2 pod dejstvom rezistina, čime se stimulise proces angiogeneze (58).

Delujući na humane makrofage, rezistin dovodi do povećane akumulacije lipida u ovim ćelijama (59, 60), tako što stimulise i gensku i proteinsku ekspresiju CD36 (60, 61) i SR-A receptora čistača, a smanjuje proteinsku ekspresiju ABCA1 (ATP-vezujući kasetni transporter A1, eng. *ATP-binding cassette transporter A1*) transportera, doprinoseći tako stvaranju penastih ćelija (61).

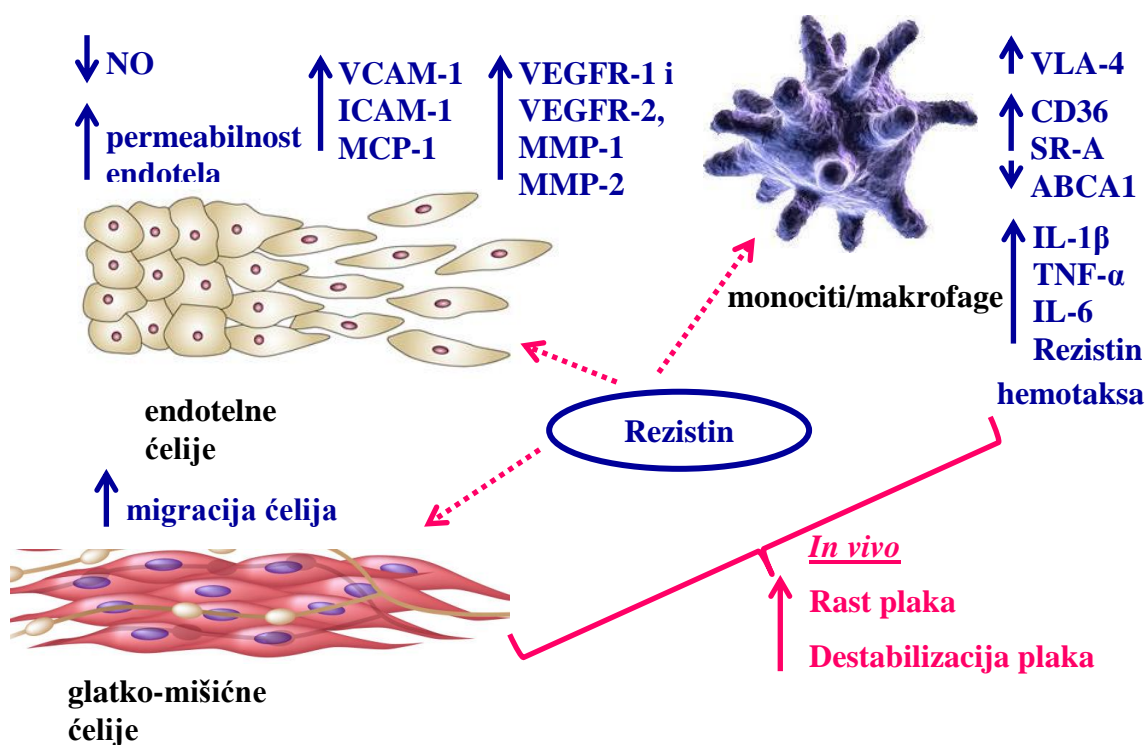
Rezistin poseduje i hemoatraktivna svojstva prema CD4+ limfocitima (62), čija migracija u aterosklerotski plak predstavlja važan korak u razvoju aterosklerotske lezije, jer se one u subendotelnom prostoru diferenciraju u TH-1 ćelije, i lučeći proinflamatorne citokine diriguju aktivacijom ostalih ćelija prisutnih u leziji (23, 62).

Proinflamatorni i proaterogeni efekti rezistina su potvrđeni *in vivo* studijom gde je uočeno da humani rezistin povećava vaskularnu inflamaciju i akumulaciju makrofaga

u zidu krvnih sudova zečeva, i da deluje kao hemoatraktant na monocite, doprinoseći ne samo rastu plaka već i njegovoj destabilizaciji (57).

I konačno, imunohistohemijska ispitivanja humanih krvnih sudova su pokazala da je rezistin prisutan u krvnim sudovima sa patološkim aterosklerotskim promenama, a da ga u zdravim krvnim sudovima nema. Utvrđeno je da su upravo makrofage koje infiltriraju aterosklerotske lezije najveći izvor rezistina u ateromima, i da on utiče ne samo na funkciju endotelnih ćelija već i na migraciju glatko-mišićnih ćelija (63).

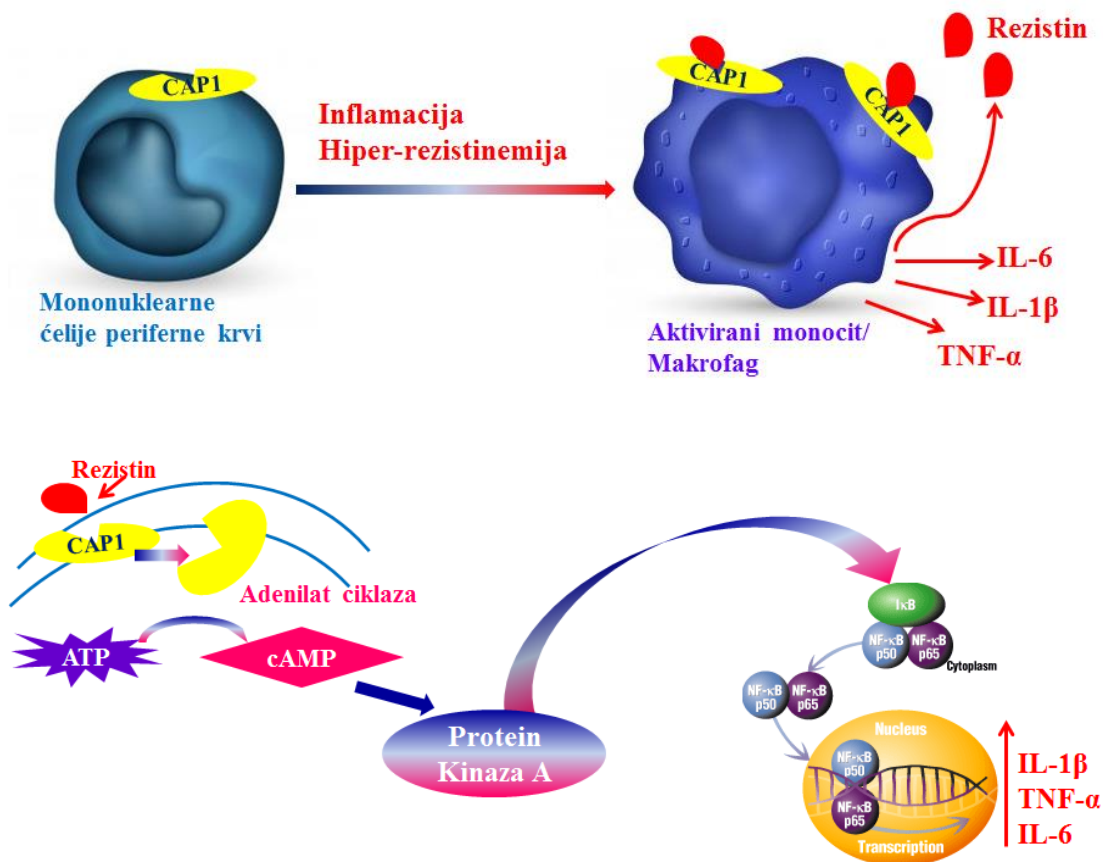
Takođe, pored ovih dejstava, utvrđeno je da humani rezistin stimuliše i sintezu i sekreciju većeg broja lipoproteinskih čestica i da ometa njihovo preuzimanje iz cirkulacije i metabolizam u humanim hepatocitima (64, 65), doprinoseći na taj način razvoju dislipidemije, kao jednog od glavnih predisponirajućih faktora za razvoj ateroskleroze (1, 4-7).



Slika 4. Proaterogeni efekti rezistina

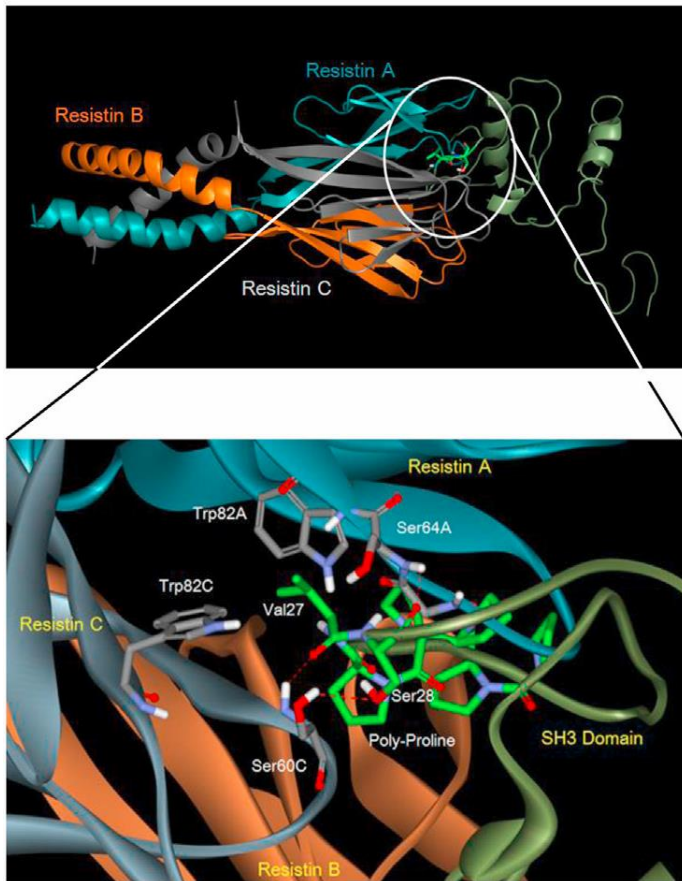
1.5. Protein udružen sa adenilat ciklazom 1- CAP1

Pored svih nabrojanih efekata rezistina na *in-vitro* i *in-vivo* modelima, donedavno nije dat odgovor na pitanje koji receptor bi mogao da sprovodi signale ovog proteina. Iako su predlagani brojni kandidati za ovu funkciju kao što su mišiji dekorin, mišiji receptor ROR1 (ofranski receptor nalik tirozim kinazi 1, *eng. tyrosine kinase-like orphan receptor 1*), i TLR-4 (receptor sličan Tollu 4, *eng. Toll like receptor 4*), dokazi da su ovo pravi receptori za humani rezistin su izostali. Najadekvatniji kandidat za ovu funkciju, TLR-4, koji vezivanjem za ligande aktivira NF- κ B put, je ostao u senci jer do danas ne postoji dokaz o direktnoj interakciji rezistina i ovog proteina, niti potvrda u vidu biohemijskog testa vezivanja ova dva proteina (51, 66). Lee i saradnici su 2014. godine objavili rezultate svojih eksperimenata u cilju identifikovanja receptora za humani rezistin i predložili protein udružen sa adenilat ciklazom 1 (*eng. adenylyl cyclase-associated protein 1, CAP1*) kao pravi (*eng. bona fide*) receptor za humani rezistin (66). Familija CAP proteina obuhvata multifunkcionalne proteine koji učestvuju u povezivanju ćelijske signalizacije sa polimerizacijom aktina, i imaju fundamentalnu ulogu u organizaciji ćelijskog citoskeleta i ćelijskom rastu. CAP1 je evolutivno visoko očuvani protein koji ima sposobnost da vezuje aktin (67), i ubikvitarno je eksprimiran u humanim ćelijama (67-69). Najveća ekspresija se uočava u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i ćelijama koštane srži, gde se ovaj protein nalazi lociran uz plazma membranu (69). Iako je pokazano da povećanjem koncentracija rezistina u medijumu dolazi do povećane translokacije CAP1 proteina iz citoplazme uz plazma membranu (66), i dalje nije utvrđeno kojim mehanizmima rezistin ulazi u ćeliju gde se može vezati za CAP1, obzirom da je CAP1 intracelularni protein. Smatra se da CAP proteini mogu imati ključnu ulogu u procesima endocitoze, jer je uočeno da su ovi proteini prisutni upravo na mestima gde se dešava značajan rearanžman aktinskih filamenata tokom ovog procesa (67), tako da jedan od mogućih načina ulaska rezistina u ćelije može takođe biti vezan za CAP proteine. Vezivanje rezistina za CAP1 dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i povećane produkcije cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) koji aktivira signalni put protein kinaze A i NF- κ B-a dovodeći do povećane produkcije iRNK i proteina IL-6, TNF- α and IL-1 β (Slika 5).



Slika 5. Mehanizam dejstva rezistina preko CAP1 receptora

CAP1 se sastoji od tri funkcionalno i strukturno različita domena (67). Visoko očuvani karboksi-terminalni domen se vezuje za monomer aktina i neophodan je za održavanje normalne ćelijske morfologije. Centralno locirani domen bogat prolinom intereaguje sa domenima Src homologije 3 (SH3 domeni) specifičnih proteina (70, 71). Amino-terminalni domen intereaguje sa adenilat ciklazom (66). Pokazano je da se humani resistin vezuje za CAP1 preko centralnog domena bogatog prolinom (Slika 6), dok je amino-terminalni domen neophodan za sprovođenje signala (66). Takođe, još jednom je potvrđeno da resistin poseduje hemoatraktantna svojstva prema monocitima, a ključnu ulogu u ovom procesu ima karboksi-terminalni domen CAP1 proteina (66).



Slika 6. Vezivanje rezistina trimera (sive, plave i narandžaste trake) za SH3 vezujući domen CAP1 receptora (tamno zelene trake)⁴

⁴ Preuzeto iz Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim JY, Lee J, Yang HM, Mook-Jung I, Nam KY, Chung J, Lazar MA, Kim HS. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab*, 2014;19:484–97.

1.6. Značaj ispitivanja rezistina u ishemijskoj bolesti srca

Na osnovu opisanih in vitro i in vivo eksperimenata, koji su pokazali da humani rezistin poseduje značajna proinflamatorna i proaterogena svojstva (53-63), može se zaključiti da ovaj protein ima veliki potencijal da u humanom organizmu svojim efektima doprinese razvoju ateroskleroze. Kako u osnovi patogeneze ishemijske bolesti srca leže dislipidemija, povećana inflamacija i posledično progresija ateroskleroze (1-11), brojne kliničke studije su se bavile ispitivanjem veze humanog rezistina i ishemijske bolesti srca. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja nisu u potpunosti konzistentni. Jedan broj studija ukazuje na postojanje veze između koncentracije rezistina u plazmi kako sa prisustvom, tako i sa stadijumima ishemijske bolesti srca (58, 72, 73), dok je u drugim studijama ova veza izgubljena nakon korigovanja za tradicionalne faktore rizika (74). Sa druge strane, pokazano je da je koncentracija rezistina u krvi povećana kod pacijenata sa nestabilnom anginom pektoris u odnosu na pacijente sa stabilnom anginom pektoris. Takođe, utvrđeno je da u AKS dolazi do povećanja cirkulišućeg rezistina, što može predstavljati marker srčane ishemije (75-78). Međutim, do sada nije pokazano koje ćelije mogu predstavljati izvor rezistina u klinički stabilnoj ishemijskoj bolesti srca i u akutnom koronarnom sindromu. Najnovija meta-analiza je pružila dovoljno dokaza za povezanost visoke koncentracije rezistina u plazmi i povećanog rizika za kardiovaskularni mortalitet, ali tačna uloga rezistina u patofiziologiji ishemijske bolesti srca i dalje nije u potpunosti jasna (79).

Iako je pokazano da su koncentracije rezistina u plazmi u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom rezistina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, u kojima se primarno sintetise (80), ekspresija rezistina u ovim ćelijama još uvek nije ispitana kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca. Nivoi novootkrivenog receptora za rezistin, CAP1, nisu do sada opisani kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca, niti je CAP1 ikada ispitivan u kliničkim studijama u kontekstu receptora za rezistin.

Obzirom da rezultati kliničkih studija nisu do kraja konzistentni, i da ni genska ekspresija rezistina ni njegovog receptora do sada nisu opisani kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca, određivanje nivoa njihove iRNA bi doprinelo boljem razumevanju uloge rezistina u aterosklerozi i ishemijskoj bolesti srca.

2. Cilj

Kako bi se doprinelo boljem razumevanju uloge rezistina i njegovog receptora u ishemijskoj bolesti srca, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Odrediti nivoe iRNK rezistina i CAP1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kao i koncentraciju rezistina u krvi pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i utvrditi razlike u odnosu na zdrave ispitanike
- Ispitati povezanost nivoa iRNK rezistina i CAP1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i rezistina u krvi sa stepenom ozbiljnosti ishemijske bolesti srca, kako prema angiografski utvrđenom kriterijumu prisustva ili odsustva značajne stenoze, tako i prema kliničkoj manifestaciji bolesti
- Ispitati povezanost nivoa iRNK CAP1, iRNK rezistina i rezistina u plazmi kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika
- Ispitati povezanost nivoa iRNK CAP1, iRNK rezistina i rezistina u plazmi sa tradicionalnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kao i sa novijim faktorima rizika, markerima inflamacije i procentom zastupljenosti malih, gustih LDL čestica, kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika
- Ispitati povezanost nivoa iRNK CAP1, iRNK rezistina i rezistina u plazmi sa nivoima iRNK CD36 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje, koje je dizajnirano kao opservaciona studija, odnosno studija slučajeva i kontrola, obuhvatilo je 95 pacijenata (49 muškarca i 46 žene) sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju koji su primljeni na lečenje na "Institut za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije" u periodu od 2011-2012. godine. Indikacije za selektivnu koronarnu angiografiju su bile: stabilna angina pectoris, nestabilna angina pectoris, sumnja na ishemiju posle revaskularizacije miokarda, procena rizika nakon AIM, atipičan bol u grudima sa pozitivnom anamnezom za KVB u porodici, srčana insuficijencija, valvulopatija, nespecifični simptomi (astenija, sinkopa i dispnea) (3, 36-38). Postupkom selektivne koronarne angiografije utvrđeno je prisustvo, stepen ili odsustvo značajne stenozе koronarnih arterija na osnovu maksimalnog suženja lumena krvnog suda procenjenog vizuelnom analizom, pri čemu je klinički značajnom stenozom smatrano suženje lumena više od 50% u bar jednoj glavnoj koronarnoj arteriji (desnoj koronarnoj arteriji, levoj prednjoj descendentnoj arteriji ili cirkumfleksnoj arteriji) (81). Na osnovu nalaza koronarografije, utvrđeno je da 42 pacijenta nisu imali značajnu stenozu, dok su 53 pacijenta imali značajnu stenozu (41% pacijenata sa jednosudovnom, 17% sa dvosudovnom i 42% pacijenata sa trosudovnom bolešću). Među pacijentima bez značajne stenozе, 12 pacijenata je imalo stabilnu anginu pectoris dok 30 nije imalo dijagnozu ishemijske bolesti srca. Među pacijentima sa značajnom stenozom 18 pacijenata je imalo dijagnozu stabilne angine pectoris, 29 pacijenata je imalo dijagnozu AKS (uključujući NAP i AIM sa ili bez ST-elevacije), dok 6 pacijenata nije imalo dijagnozu. Kriterijumi za dijagnozu SAP su bili: prisustvo hronične stabilne angine u trajanju od tri meseca indukovane fizičkim naporom, koja prolazi posle sublingvalno primenjenog nitroglicerina (tokom testa opterećenja- osećaj ograničavajuće angine i depresija ST-segmenta od 0.1 mV u poređenju sa stanjem u mirovanju) (36). Bol u grudima praćen povišenim koncentracijama hsTn-T u krvi, sa ili bez elevacije ST segmenta je posmatran kao AIM. Dijagnoza NAP je postavljena ukoliko su pacijenti primljeni sa anginom koja se pogoršava, sa akutnom anginom posle vežbanja koja se javljala u toku tri nedelje ili sa ponovljenim napadima angine u

mirovanju u toku tri nedelje, bez dokaza o akutnom infarktu miokarda potvrđenom sa nalazima EKG-a i srčanim biomarkerima (37, 38). Dijagnoza AKS je postavljena u periodu od dve nedelje pre vađenja krvi. Pacijenti sa *diabetes mellitus*-om i hroničnom bubrežnom insuficijencijom su isključeni iz ove studije. Demografski podaci pacijenata koji obuhvataju starost, telesnu težinu, visinu, pušački status, krvni pritisak kao i podaci o terapiji prikupljeni su anketiranjem ispitanika.

U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti IBS određenoj prema kliničkim manifestacijama bolesti, pacijenti sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju su podeljeni u tri grupe: na pacijente sa AKS, na pacijente sa SAP i na pacijente bez anginoznih tegoba koji nisu imali značajnu stenozu. Takođe, iz grupe pacijenata sa indikacijama za koronarnu angiografiju, posebno je izdvojena grupa pacijenata koji nisu obuhvatali pacijente sa AKS. U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti IBS određene prema angiografski utvrđenom kriterijumu prisustva ili odsustva značajne stenozе, ovi pacijenti su podeljeni u dve grupe: na pacijente bez značajne stenozе i na pacijente sa značajnom stenozom.

Kontrolnu grupu (KG) u ovoj studiji su činila 33 zdrava ispitanika (15 muškaraca i 18 žena) koji su odabrani nakon detaljnog ispitivanja njihovog zdravstvenog stanja, merenja debljine kompleksa intime i medije obe karotidne arterije i ispitivanja porodične anamneze za postojanje kardiovaskularnih bolesti kod srodnika prvog stepena. Demografski podaci pacijenata koji obuhvataju starost, telesnu težinu, visinu, pušački status, krvni pritisak kao i podaci o terapiji i porodičnoj anamnezi za KVB prikupljeni su anketiranjem ispitanika. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili prisustvo pozitivne porodične anamneze za kardiovaskularne bolesti, prisustvo KVB ili bilo koje druge sistemske inflamatorne ili metaboličke bolesti, bolesti jetre ili bubrega, debljina kompleksa intime i medije $>1\text{mm}$ na najmanje jednoj karotidnoj arteriji, hipertenzija (dijastolni krvni pritisak $\geq 90\text{mm Hg}$ i/ili sistolni krvni pritisak $\geq 140\text{mm Hg}$) ili upotreba antihipertenzivnih lekova, nepovoljan lipidni profil definisan prema *Adult Treatment Panel III* preporukama (82): ukupni holesterol (UH) $> 5,16\text{ mmol/L}$, LDL-H $> 3,35\text{ mmol/L}$, HDL-H $< 1,03\text{ mmol/L}$, trigliceridi (TG) $> 1,70\text{ mmol/L}$ ili upotreba lekova iz grupe hipolipidemika, prisustvo dijabetesa i koncentracija glukoze u

plazmi natašte $>6,1$ mmol/L, prisustvo gojaznosti (indeks telesne mase (ITM) >30 kg/m²).

Kod svih ispitanika su određeni standardni biohemijski parametri, uključujući UH, LDL-H, HDL-H, TG, kreatinin i C-reaktivni protein visoke osetljivosti (hsCRP), u svrhu procene lipidnog statusa, funkcije bubrega i prisustva inflamacije niskog stepena. Nivo insulinske rezistencije je kvantifikovan merenjem glukoze i insulina natašte i računanjem HOMA-IR (homeostazni model procene insulinske rezistencije) indeksa. Za dodatnu evaluaciju lipidnog statusa, određeni su i dijometri LDL i HDL čestica kao i procenat zastupljenosti malih, gustih LDL čestica i malih, gustih HDL čestica. Izmerene su koncentracije rezistina i IL-6 u plazmi kao i nivoi genske ekspresije rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

Ova studija je sprovedena prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom Deklaracijom, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja: 797/2) i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja: 29/11-15). Svi ispitanici su dali pisani pristanak za učestvovanje u istraživanju.

3.3. Metode

Puna krv je uzorkovana iz antekubitalne vene svih ispitanika ujutru, nakon dvanaestočasovnog gladovanja. Krv je sakupljena u po jedan serumski i jedan vakutajner sa EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina) antikoagulansom (*BD Vacutainer®*, *New Jersey, USA*), iz kojih su nakon petnaestominutnog odnosno desetominutnog centrifugiranja na 1000xg izolovani redom serum i EDTA plazma. Serum je analiziran neposredno nakon izolacije, dok je plazma zamrznuta i čuvana do analiziranja na -80°C najduže godinu dana od datuma uzorkovanja krvi. Odmah nakon odvajanja plazme, sakupljene su i ćelije sa površinskog dela sedimenta, tzv. *buffy coat* iz koga se vrši izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (monociti, T i B limfociti i *natural killer* ćelije) sa *Ficoll-Paque™ PLUS* (*GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA*) reagensom prema modifikovanom protokolu proizvođača. Sakupljene ćelije (oko 1 mL) su razblažene sa istom količinom sterilnog PBS pufera, i nanošene na 2 mL *Ficoll-Paque Plus* gustinskog gradijenta. Nakon 20 minutnog centrifugiranja na 1000xg u centrifugi sa swing-out rotorom, mononuklearne ćelije se izdvajaju na granici faza fikola i pufera, dok polimorfonukleari i eritrociti prolaze gustinski gradijent i izdvajaju se na dnu epruvete. Sakupljene mononuklearne ćelije se ispiraju 2 puta sa PBS puferom i talože centrifugiranjem prvo na 750xg a zatim na 500xg. Talozi ćelija su resuspendovani u *TRIzol™* reagensu (*Ambion, Life technologies, Grand Island, New York*) i čuvani do izolacije ukupne RNK na -80°C najduže 6 meseci od datuma uzorkovanja krvi.

3.3.1. Određivanje biohemijskih parametara

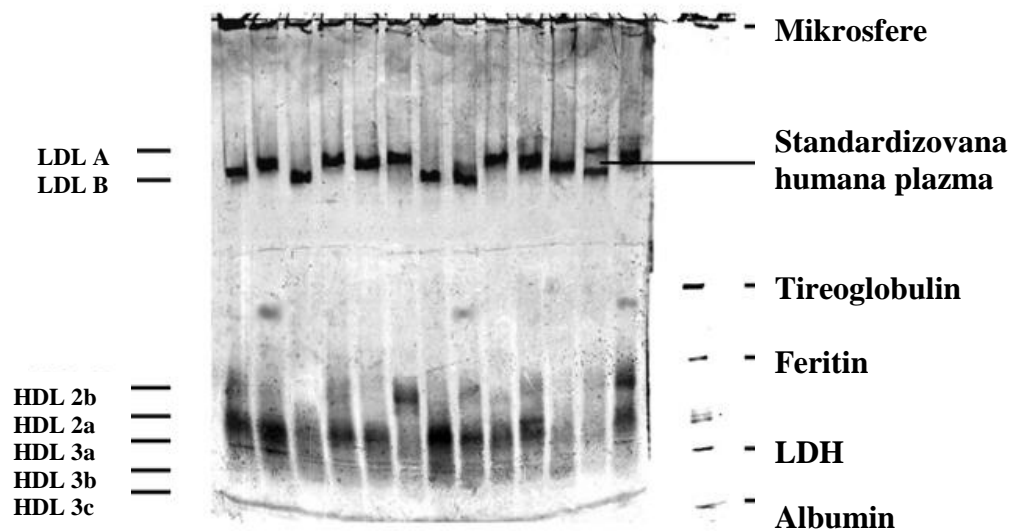
Određivanje biohemijskih parametara vršeno je iz svežih uzoraka seruma svih ispitanika. Koncentracije glukoze, kreatinina i lipidnih parametara (UH, LDL-H, HDL-H i TG) određene su enzimskim metodama (*Biosystems*, Španija) na ILab 300+ automatskom analizatoru (*Instrumentation Laboratory, Milan, Italy*). Koncentracije hsCRP-a određene su imuno-turbidimetrijskom metodom na biohemijskom analizatoru COBAS® c6000-*Roche Diagnostics* (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*). Koncentracije insulina određene su metodom elektro-hemiluminiscentnog imunoeseja na COBAS®INTEGRA 400 plus- *Roche Diagnostics* analizatoru (*Roche Diagnostics*,

Mannheim, Germany). Na osnovu podataka o koncentracijama glukoze i insulina kod svih ispitanika izračunata je vrednost HOMA-IR indeksa prema sledećoj formuli: $HOMA-IR = [(koncentracija\ insulina\ natašte\ (\mu U/mL) \times koncentracija\ glukoze\ natašte\ (mmol/L))/22,5]$.

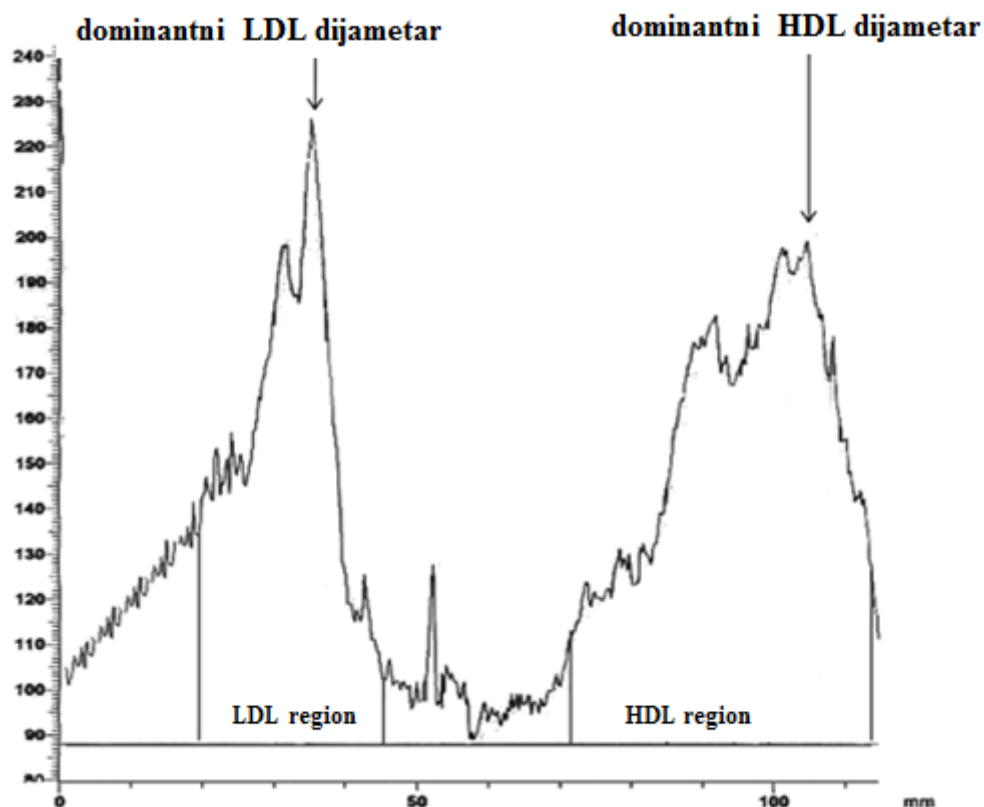
3.3.2. Određivanje dijametara LDL i HDL čestica

LDL i HDL čestice su razdvojene metodom elektroforeze na gradijentu nedenaturišućeg poliakrilamidnog gela, koja se zasniva na različitoj migraciji lipoproteinskih čestica kroz gel do postizanja konačnog položaja koji zavisi od njihove veličine i oblika. Određivanje veličine pojedinih subfrakcija vrši se na osnovu elektroforetske pokretljivosti proteinskih standarda poznatih dijametara (visokomolekularni proteinski standardi za kalibraciju (*Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria*), karboksilovane polistirenske mikrosfere dijametara 40 nm (*Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA*), standardizovana humana plazma sa dve klase LDL čestica, određene u Laboratoriji za genetiku lipoproteina, (*Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX, USA*) (Slika 7). Elektroforeza se izvodi 20 sati na 8°C u *Hofer SE 600 Ruby* elektroforetskoj jedinici (*Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria*) u Tris (90 mmol/L)-borna kiselina (80 mmol/L)-Na₂EDTA (2.7 mmol/L) puferu, pH=8,35. Po završenoj elektroforezi, gelovi su bojani bojama za lipide (*Sudan black*) i proteine (*Coomassie brilliant blue G-250*), nakon čega je vršeno skeniranje i denzitometrijska analiza razdvojenih subfrakcija lipoproteina sa *Image Scanner*-om (*Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria*) i *Image Quant* softverom (*version 5.2; 1999; Molecular Dynamics*). Za svaki pik apsorbancije je određena migraciona daljina dok je dijametar čestica koji odgovara datom piku izračunat korišćenjem kalibracione krive, zasnovane na inverznom odnosu relativne migracione daljine i prirodnog logaritma dijametara odgovarajućih standarda. Dijametar glavnog pika u regionima HDL i LDL čestica je označen kao dominantni dijametar čestica. Merenjem površine ispod pika na denzitogramu je određen relativni sastav svake LDL i HDL subfrakcije (Slika 8). Relativni udeo malih, gustih LDL čestica je određena merenjem površine pika u oblasti $\leq 25,5$ nm dok je relativni udeo malih HDL čestica određena merenjem površine pika u oblasti $\leq 8,8$ nm. Povećan sadržaj malih, gustih LDL čestica je definisan, ako je više od 50% signala apsorbancije koja potiče od

LDL-a detektovano u oblasti $\leq 25,5$ nm. Povećan sadržaj malih HDL čestica je definisan ako je više od 50% signala apsorbancije koja potiče od HDL-a detektovano u oblasti $\leq 8,8$ nm (83).



Slika 7. Razdvajanje subfrakcija LDL i HDL čestica na gradijentu nedenaturišućeg poliakrilamidnog gela. LDL A (LDL dijametar $>25,5$ nm), LDL B fenotip (LDL dijametar $\leq 25,5$ nm); HDL 2b (9,7-12,0 nm), HDL 2a (8,8-9,7 nm), HDL 3a (8,2-8,8 nm), HDL 3b (7,8-8,2 nm) i HDL 3c (7,2-7,8 nm).

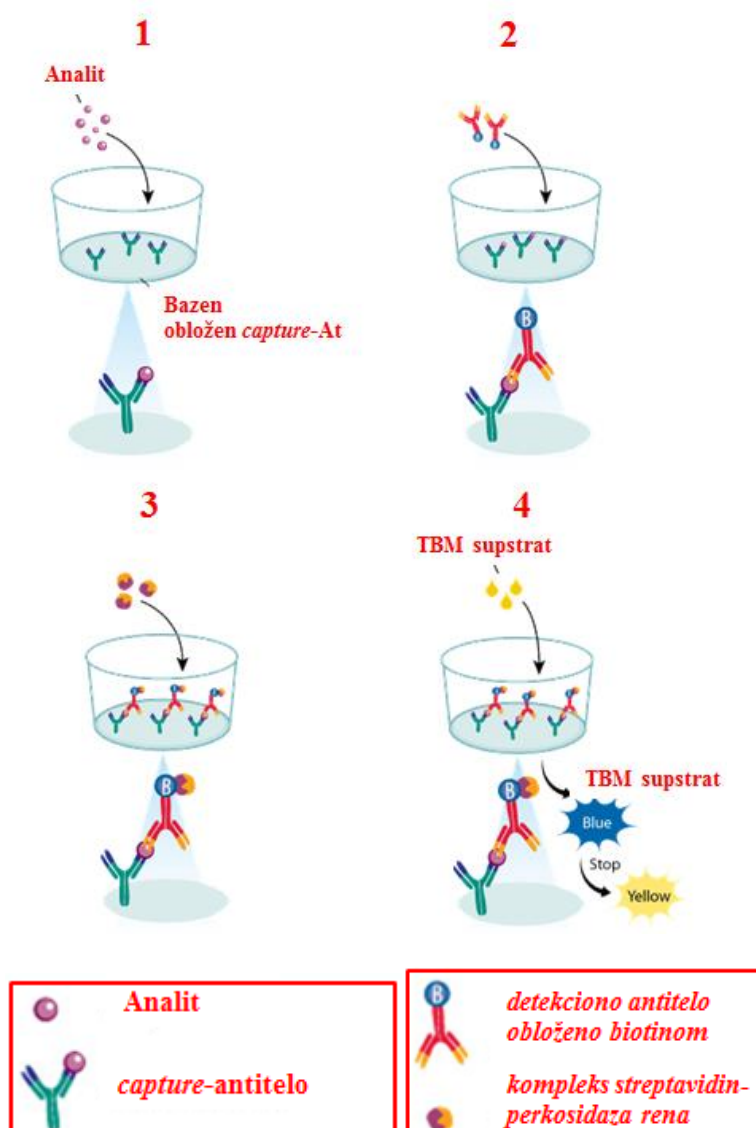


Slika 8. Densitometrijsko određivanje dominantnog dijametara LDL i HDL čestica i relativnog sastava svake LDL i HDL subfrakcije

3.3.3. Određivanje koncentracije rezistina i IL-6 u krvi

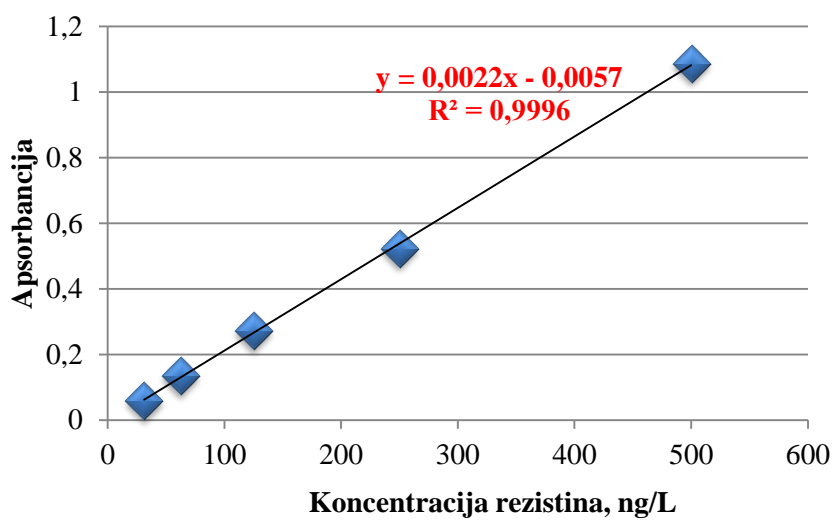
Merenje koncentracije rezistina i IL-6 u uzorcima plazme svih ispitanika vršeno je ELISA sendvič testom (enzimski imunoesej, *eng. enzyme linked immunosorbent assay, R&D systems, Wiesbaden, Germany*) (Slika 9) prema protokolu proizvođača. Najpre, početna faza testa podrazumeva oblaganje ELISA ploče sa specifičnim anti-rezistin (anti-IL-6) antitelima tokom noći. Nakon toga, višak nevezanih antitela se ispire, blokira 1% rastvorom goveđeg serumskog albumina (BSA) i u bazene se dodaju redom standardi rezistina (IL-6), slepa proba (reagens diluent, 1% BSA) i uzorci plazme odgovarajućeg razblaženja, koji se vezuju za imobilisana antitela na ploči. Nakon dvočasovne inkubacije, smatra se da su vezani svi proteini u uzorku i standardu, te se ploča ispire, i u bazene se dodaje novo monoklonsko detekciono anti-rezistin (anti-IL-6)

antitelo, obloženo biotinom. Nakon još jedne dvočasovne inkubacije, ispiraju se nevezana detekciona antitela sa ploče, i dodaje kompleks streptavidin-peroksidaza rena koji se vezuje za detekciono antitelo interakcijom biotin-streptavidin, pri čemu inkubacija traje 20 minuta. Nakon ispiranja, dodaje se supstrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) sa vodonik-peroksidom, koji peroksidaza rena uz pomoć vodonik-peroksida oksiduje do plavo obojenog 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin diimina. Reakcija se zaustavlja nakon 20 minuta dodatkom 2N sumporne kiseline što dovodi do promene boje rastvora iz plave u žutu. Intenzitet boje koji se meri na 450 nm je proporcionalan koncentraciji vezanog rezistina (IL-6).

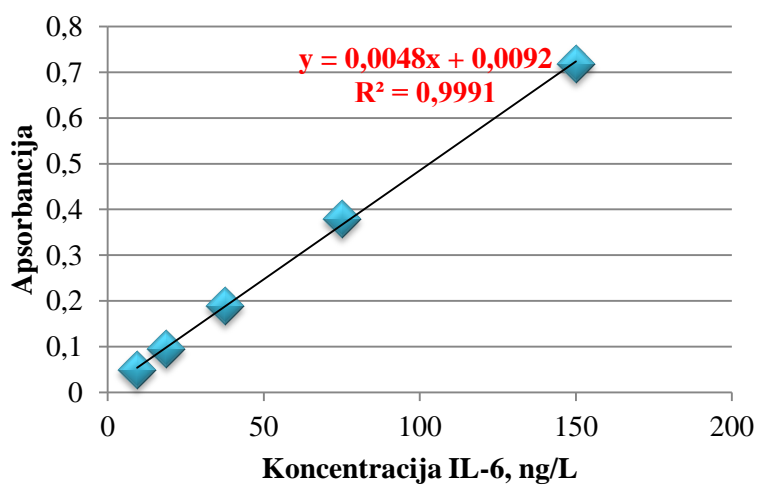


Slika 9. Princip ELISA testa

Koncentracija rezistina (IL-6) je izračunata metodom standardne krive. Za izradu standardne krive za merenje koncentracije rezistina (IL-6) u plazmi korišćeni su liofilizovani standardi proizvođača, koji su rekonstituisani u 1% BSA reagensu i razblaženi do radnih koncentracija prema uputstvu proizvođača. Radne koncentracije standarda za rezistin su bile: 500 ng/L, 250 ng/L, 125 ng/L, 62,5 ng/L, 31,25 ng/L. Radne koncentracije standarda za IL-6 su bile: 150 ng/L, 75 ng/L, 37,5 ng/L, 18,75 ng/L, 9,375 ng/L. Kao slepa proba korišćen je 1% rastvor BSA. Svi standardi su nanošeni u duplikatu. Primer standardnih kriva koje su korišćene za izračunavanje koncentracija rezistina (Slika 10) i IL-6 (Slika 11) prikazan je na slici.



Slika 10: Standardna kriva za rezistin



Slika 11: Standardna kriva za IL-6

Analizi uzoraka je prethodilo ispitivanje nepreciznosti metode unutar i između serija. Koeficijent varijacije (Kv) unutar serije za rezistin (IL-6) je određen tako što je u pulu humane plazme 20 puta izmerena koncentracija rezistina (IL-6) u seriji na jednoj ploči, dok je Kv između serija određen tako što je u pulu humane plazme određena koncentracija rezistina (IL-6) 10 puta na tri različite ploče u toku tri dana (Tabele 1 i 2). Za određivanje koncentracije rezistina, uzorci plazme su razblaženi 80 puta sa reagens diluentom, dok uzorci za određivanje koncentracije IL-6 nisu razblaživani. Svi uzorci su nanošeni u duplikatu.

Tabela 1. Nepreciznost testa za rezistin

Rezistin	Nepreciznost unutar serije (N=20)	Nepreciznost između serija (N=30)
\bar{x} , µg/L	10,23	10,23
Sd, µg/L	0,48	0,86
Kv, %	4,7	8,4

Tabela 2. Nepreciznost testa za IL-6

IL-6	Nepreciznost unutar serije (N=20)	Nepreciznost između serija (N=30)
\bar{x} , ng/L	4,07	4,07
Sd, ng/L	0,11	0,18
Kv, %	2,6	4,5

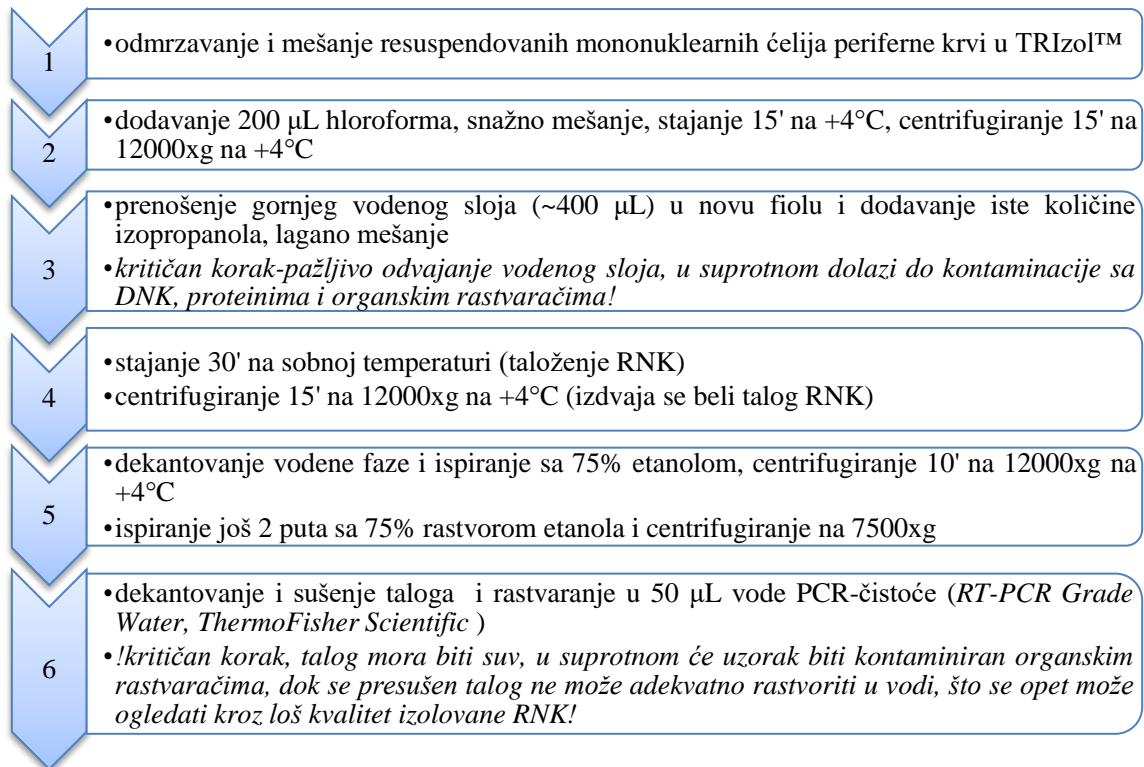
3.3.4. Kvantifikacija genske ekspresije rezistina, CAP1, CD36 i IL6 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi

Za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije rezistina, CAP1, CD36 i IL-6 metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) korišćena je ukupna RNK izolovana iz mononuklearnih ćelija periferne krvi.

3.3.4.1. Izolacija ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK se vršila iz izolovanih mononuklearnih ćelija periferne krvi, metodom sa *TRIzol*TM reagensom prema uputstvu proizvođača.⁵ *TRIzol*TM reagens je zapravo monofazni rastvor fenola i gvanidin-izotiocijanata, koji u postupku izolacije RNK omogućava očuvanje integriteta RNK, dok razlaže i rastvara ćelijske komponente i deluje kao inhibitor RNazne aktivnosti. Dodatak hloroforma, nakon kojeg sledi centrifugiranje, omogućava razdvajanje rastvora u 3 faze: gornja vodena faza u kojoj se nalaze RNK molekule, interfaza u kojoj se nalazi DNK i donja fenol-hloroformska faza u kojoj se nalaze proteini. Nakon odvajanja vodene faze, RNK se dobija precipitiranjem sa izopropil alkoholom. Izolovana RNK je čuvana na -80°C najduže godinu dana. Šema protokola izolacije data je na Slici 12.

⁵ Rad sa RNK, cDNK molekulima i PCR-produktima zahteva rad u sterilnim laminarnim komorama, redovno čišćenje pipeta i radnih površina 70% rastvorom etanola i 1% rastvorom hipohlorita, redovnim sterilizacijama komore UV lampom, korišćenje sterilnog potrošnog materijala za jednokratnu upotrebu, nošenje rukavica za jednokratnu upotrebu, sve u cilju sprečavanja unakrsne kontaminacije i očuvanja integriteta RNK molekula koje su vrlo nestabilne i podložne degradaciji od strane RNaza, prisutnim kako u ćelijama iz kojih se vrši izolacija RNK, tako i u spoljašnjoj sredini.



Slika 12: Protokol izolacije RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi metodom sa *TRIzol*™ reagensom

3.3.4.2. Merenje koncentracije i ispitivanje kvaliteta izolovane RNK

Nakon rastvaranja RNK, izmerena je koncentracija RNK u rastvoru, i proverena je čistoća i integritet svakog uzorka. Čistoća uzorka se proverava zato što prisustvo kontaminanata poput proteina, organskih rastvarača i soli mogu inhibirati PCR reakciju i smanjiti njenu efikasnost. Pošto je RNK jako nestabilna molekula, podložna degradaciji od strane RNaza, neophodno je proveriti i njen integritet, jer korišćenje uzorka sa degradiranom RNK ne daje pouzdane rezultate u PCR reakciji.

Koncentracija RNK je određivana merenjem apsorbancije rastvora na 260 nm (maksimum apsorbancije nukleinskih kiselina), preko sledeće formule:

$$[\text{RNK}], \mu\text{g/mL} = A_{260} \times 40 \times F$$

A_{260} = apsorbancija na 260 nm

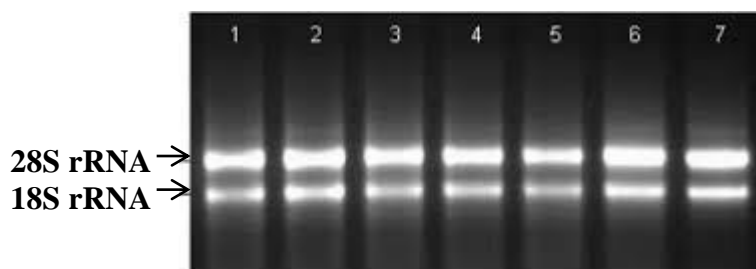
40-molarna apsorbancija RNK na 260 nm

F-faktor razblaženja

U svrhu procene čistoće uzorka, svakom uzorku je izmerena apsorbancija na 280, 230 i 320 nm. Poznato je da na 280 nm apsorbuju proteini, na 230 nm organski rastvarači, a na 320 nm soli. Naime, ukoliko je odnos $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$ smatra se da je uzorak kontaminiran proteinima. Ukoliko je odnos $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} < 1,8$ smatra se da je uzorak kontaminiran organskim rastvaračima (optimalan odnos $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ je između 2,0-2,4). Ukoliko je odnos $A_{260\text{nm}}/A_{320\text{nm}} < 1,4$ smatra se da se u uzorku nalazi veća količina soli. Svi uzorci su zadovoljavali navedene kriterijume čistoće.

Integritet izolovanih RNK je proveravan u svakom uzorku metodom *submarine* elektroforeze na agaroznom gelu. RNK molekule su negativno naelektrisane, što uzrokuje da se u električnom polju kreću od katode ka anodi, pri čemu je migracija RNK molekula proporcionalna logaritmovanoj vrednosti molekulske mase. Najveći broj iRNK po svojoj veličini nalazi se između 18S i 28S rRNK (ribozomska RNK). 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.

Elektroforetsko razdvajanje molekula RNK je vršeno u kadi za horizontalnu *submarine* elektroforezu sa hlađenjem *Hoefler Super Sub* (*Amersham Pharmacia Biotech*) na 1% agaroznom gelu, u TAE puferu pH=8,3 (40mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina i 1 mM EDTA, razblažen 50 puta), 30 minuta, na 4°C, pri naponu od 140V, jačini struje od 170mA. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem 0,75 g agaroze (*Normal melting agarose for DNA electrophoresis, Serva*) u 100 mL destilovane vode uz zagrevanje, hlađenjem na 60°C i izlivanjem uz pomoć *HE 100 casting kit-a* (*Amersham Pharmacia Biotech*). Uzorci su mešani 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, pri čemu je 5µL ove smeše nanošeno na gel potopljen u TAE pufer. Nakon završene elektroforeze, razdvojene frakcije su vizualizovane bojenjem sa 2% rastvorom etidijum-bromida i posmatranjem pod UV lampom. 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 (Slika 13).



Slika 13. Elektroforeza RNK na 1% agaroznom gelu

3.3.4.3. Reverzna transkripcija

Sledeći korak u pripremi za qPCR predstavlja prevođenje izolovane ukupne RNK u jednolančanu komplementarnu DNK (cDNK) procesom reverzne transkripcije (RT). Sintetisana jednolančana cDNK zapravo predstavlja matricu za termostabilnu DNK polimerazu u qPCR reakciji. Za RT korišćen je *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*, a postupak je izveden prema protokolu proizvođača. Za potrebe RT-a svi uzorci RNK su razblaženi sa vodom PCR nivoa čistoće na istu koncentraciju (1,4ng/10µL) i kao takvi dodavani u reakcionu smešu, pri čemu se količina dobijene cDNK ne meri, već se računa kao duplo razblaženje RNK koja je uneta u reakciju (1,4ng/20 µL). Sastav reagensa i zapremina komponenata reakcije u smeši dati su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sastav reakcione smeše za RT reakciju

Komponente reakcione smeše	Zapremina (ukupna V=20 µL)
<i>*MultiScribeTM reverzna transkriptaza, 50U/µL- prepoznaje prajmere vezane za RNK iz uzorka i vrši sintezu cDNK</i>	1 µL
<i>*10xPuffer za RT</i>	2 µL
<i>*10xNasumični prajmeri za RT- sekvence od nekoliko nukleotida koje se vezuju za sebi komplementarne delove na RNK iz uzorka</i>	2 µL
<i>*25xSmeša dNTP</i>	0,8 µL
<i>*Inhibitor RNAza</i>	1 µL
<i>vode PCR nivoa čistoće</i>	3,2 µL
<i>Uzorak odgovarajuće koncentracije</i>	10 µL

**reagensi u sklopu High Capacity DNA Reverse Transcription Kit-a
dNTP-deoksinukleotid trifosfat*

RT reakcija je izvedena na uređaju 7500 *real-time PCR system* (Applied Biosystems) pri uslovima prikazanim u Tabeli 4. Kako enzim reverzna transkriptaza značajan nivo aktivnosti pokazuje već na 25°C, svi reagensi su u toku pripreme stavljeni na led.

Tabela 4. Termalni ciklusi za reakciju reverzne transkripcije

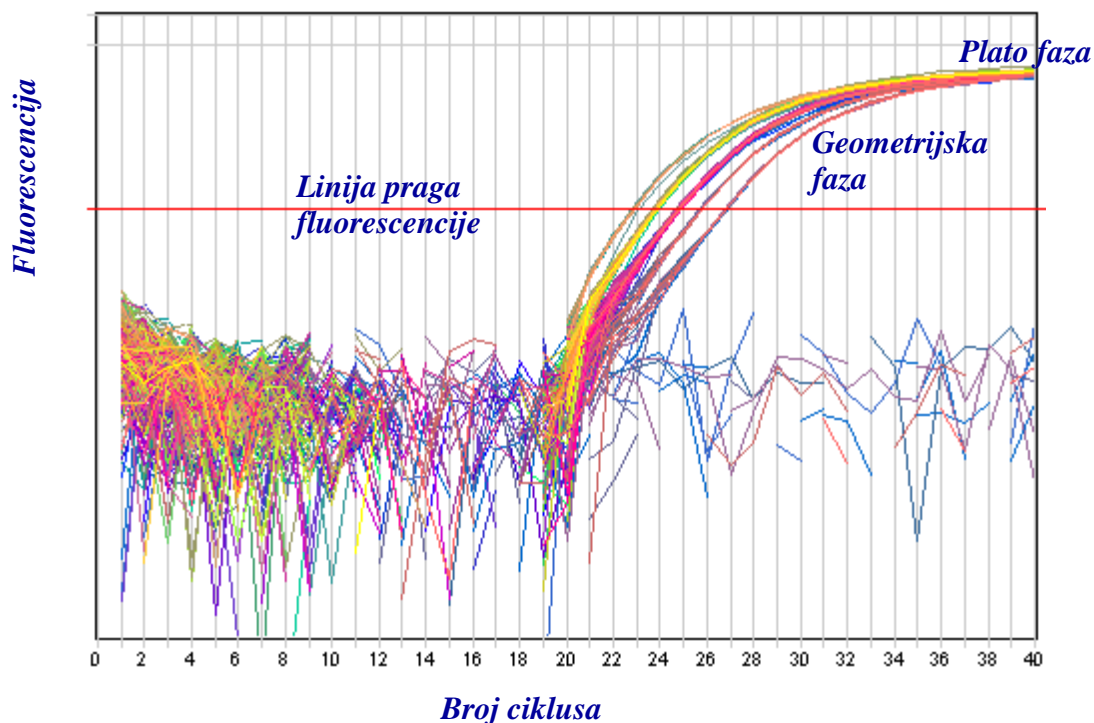
Uslovi	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus
<i>Temperatura, °C</i>	25	37	85	4
<i>Vreme, minuti</i>	10	120	5	∞

Takođe, u svakoj seriji reverzne transkripcije, pored uzoraka, pripremljene su i odgovarajuće kontrole koje su puštane u qPCR reakciji:

- TF kontrola [kontrola bez reverzne transkriptaze (*eng. transcriptase free control*)] – sadrži sve komponente reakcione smeše sem *MultiScribeTM* reverzne transkriptaze; služi za proveru postojanja kontaminacije genomskom DNK u uzorku koja bi mogla dati lažno pozitivni signal u toku qPCR-a
- NTRT kontrola [kontrola reverzne transkripcije bez matrice (*eng. no template reverse transcription control*)] – sadrži sve komponente reakcione smeše sem uzorka; služi za proveru kontaminacije reagenasa za reverznu transkripciju.

3.3.4.4. *Kvantitativni PCR*

Real time PCR (PCR u realnom vremenu) ili kvantitativni PCR je jedna od najmoćnijih i najosetljivijih tehnika za analizu genske ekspresije, a kvantifikacija genske ekspresije u kombinaciji sa procesom reverzne transkripcije je samo jedna od njenih mnogobrojnih primena. qPCR reakcija se odvija kroz određeni broj uzastopnih ciklusa, pri čemu svaki ciklus obuhvata korak denaturacije DNK koju prati korak sniženja temperature u okviru koga se odvija vezivanje odgovarajućih prajmera i proba i elongacija matrice pomoću termostabilne DNK polimeraze. Ono što upravo omogućava kvantifikaciju genske ekspresije korišćenjem qPCR-a, je to što se amplifikacija PCR produkata meri kontinuirano u toku reakcije, tj. podaci se sakupljaju u fazi eksponencijalnog rasta (log linear, geometrijska faza) PCR-a (Slika 14), kada je količina nastalog PCR produkta direktno proporcionalna količini nukleinske kiseline koja je služila kao matrica za PCR. Detekcija se vrši na osnovu merenja jačine fluorescentnog signala koji se oslobađa pri svakom PCR ciklusu.

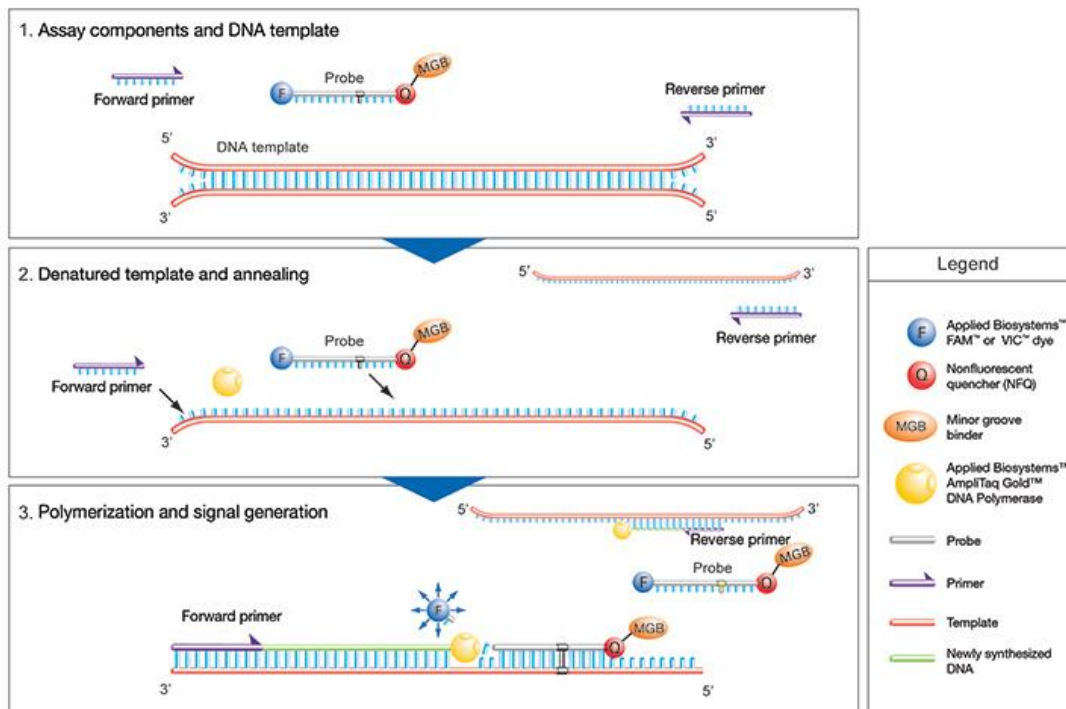


Slika 14. Dinamika qPCR reakcije

3.3.4.4.1. Princip qPCR metode bazirane na TaqMan® hemiji

Eseji koji su korišćeni u ovom eksperimentu su bazirani na TaqMan® hemiji (TaqMan® 5'-nuclease gene expression, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kojom se obezbeđuje specifičnost PCR reakcije na tri nivoa: korišćenjem 2 specifična prajmera i specifične fluorescentno obeležene oligonukleotidne probe. Naime, oligonukleotidna proba je dizajnirana tako da se na njenom 5' kraju nalazi vezana fluorescentna boja (FAM™), dok se na njenom 3' kraju nalazi gasilac (eng. quencher, TAMRA™ boja) koja ometa fluorescentni signal sa 5' kraja fluorescentno rezonantnim energetskim transferom. Ukoliko je u uzorku prisutna sekvenca od interesa, proba se specifično hibridizuje za nju, nizvodno od mesta vezivanja jednog od prajmera. Nizvodni (eng. forward) prajmer se specifično vezuje za 3' kraj matričnog (eng. antisense ili template) amplikona od interesa, dok se uzvodni (eng. reverse) prajmer vezuje za 3' kraj kodirajućeg (eng. sense) amplikona od interesa. Vezivanje prajmera omogućava specifičnoj, termostabilnoj DNK polimerazi⁶ da započne elongaciju lanca svojom 5'-3' polimeraznom aktivnošću. Kada DNK polimeraza naiđe na nizvodno vezanu probu, ona je svojom 5' egzonukleaznom aktivnošću iseca (Slika 15). Isecanje probe zapravo dovodi do odvajanje signalne boje od gasioca, što omogućava detektovanje fluorescentnog signala. Takođe, uklanjanje probe omogućava dalje elongaciju lanca do kraja matrice. U svakom sledećem ciklusu, dolazi do uklanjanja molekula signalne boje sa odgovarajućih proba, što omogućava povećanje fluorescentnog signala proporcionalno količini sintetisanih amplikona.

⁶ U ovim eksperimentima umesto Taq® DNK polimeraze, korišćen je analogni enzim, HOT FIREPol® DNA polimeraza (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). HOT FIREPol® DNA polimeraza je neaktivna na sobnoj temperaturi, ali se aktivira inkubacijom 15' na 95°C, što sprečava ekstenziju nespecifično vezanih prajmera i formiranje dimera prajmera na nižim temperaturama tokom postavljanja PCR reakcije. Enzim ima 5'-3' polimeraznu aktivnost i 5' flap endonukleaznu (5'-3' egzonukleaznu) aktivnost. Enzim je izolovan iz soja bakterije E.coli koji sadrži plazmid koji omogućava povećanu produkciju modifikovanog gena *Thermus aquaticus* DNA polimeraze.



Slika 15. Princip PCR reakcije za kvantifikaciju genske ekspresije (preuzeto iz uputstva proizvođača; *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)

Komponente reakcione smeše kao i uslovi pri kojima je izvedena qPCR reakcija, prikazani su redom u Tabeli 5. i 6. qPCR reakcija je izvedena na uređaju 7500 *real-time PCR system* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 5. Sastav reakcione smeše za qPCR reakciju

Komponente reakcione smeše	Zapremina (ukupna V=15 µL)
*5x <i>HOT FIREPol</i> ® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)	3 µL
# <i>TaqMan</i> ® Esej	0,75 µL
voda PCR nivoa čistoće	5,25 µL
Uzorak odgovarajuće koncentracije	6 µL

*Sastav matser mix smeše:

- *HOT FIREPol*® DNA polimeraza
- 5x Probe Universal qPCR pufer
- 15 mM MgCl₂, 1x PCR rastvor – 3 mM
- Mešavina dNTPs sa dUTP/dTTP
- Pasivna refrentna boja, ROX (služi za normalizaciju fluorescentnog signala reporter boje)

#U sastavu *TaqMan*® eseja se nalaze specifični forward i reverse prajmeri i odgovarajuća fluorescentno obeležena proba

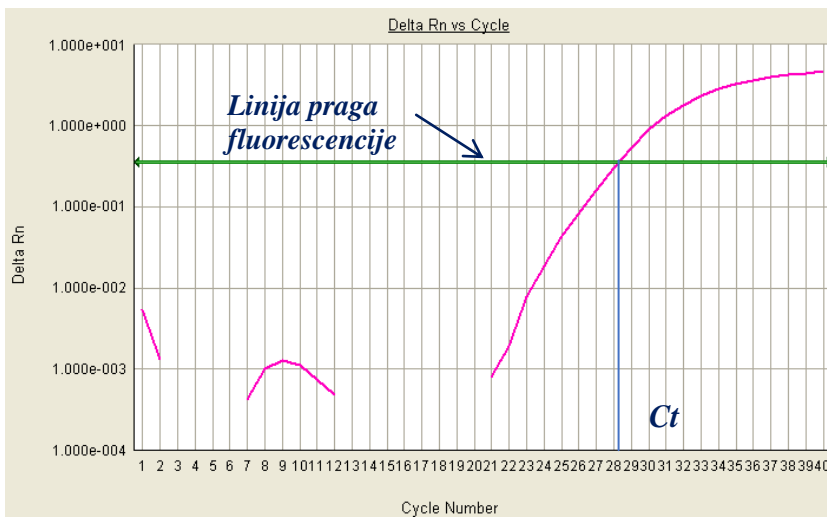
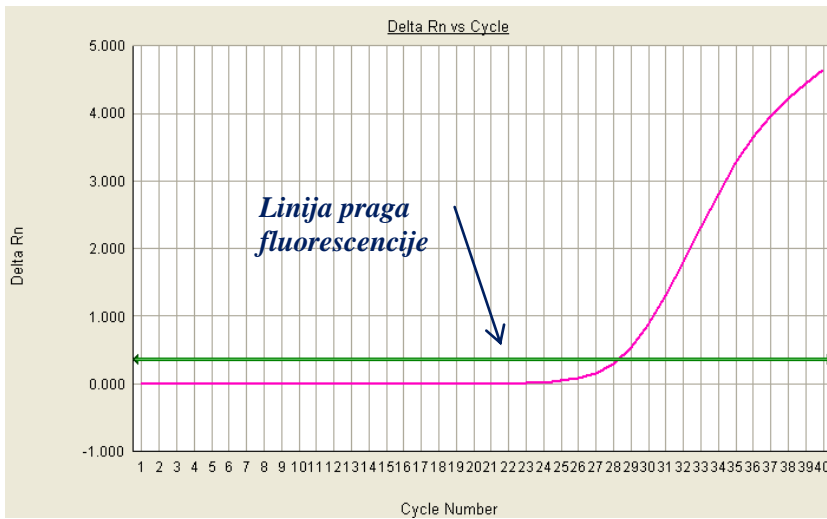
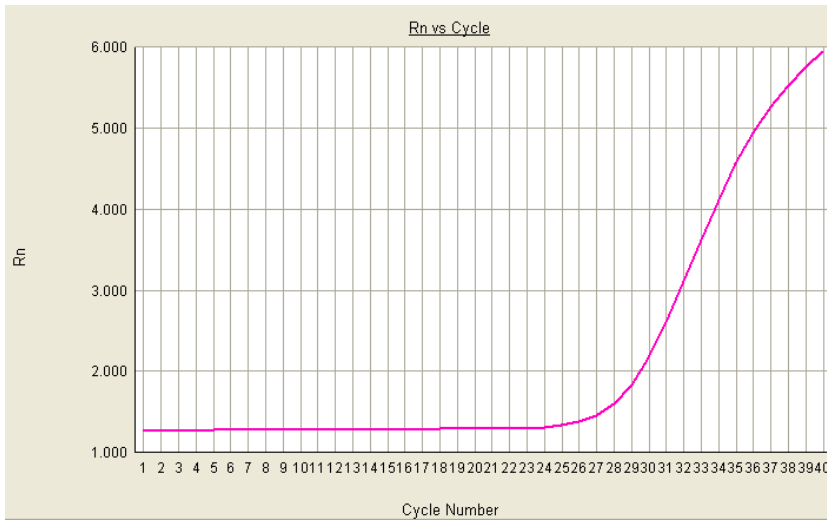
Tabela 6. Termalni ciklusi za PCR reakciju

Korak u ciklusu	Temperatura, °C	Vreme	Broj ciklusa
*Inicijalna denaturacija	95	15 minuta	1
Denaturacija	95	15 sekundi	40
Vezivanje prajmera i probe/Elongacija	60	60 sekundi	

Tokom qPCR reakcije, generalno govoreći, fluorescentni signal svakog polja odgovara prisutnoj količini molekula od interesa. Međutim, fluorescentni signal može značajno varirati zbog uslova reakcije koji se kontinuirano menjaju, stvarajući tako pozadinski signal. Pozadinski signal je najevidentniji tokom prvih ciklusa qPCR reakcije, pre nego što dođe do značajne akumulacije PCR produkata. Ovaj pozadinski signal u svim poljima tokom prvih ciklusa se koristi za određivanje baznog nivoa fluorescencije na reakcionoj ploči. Cilj je zapravo utvrditi u kom ciklusu umnožavanje ciljnog amplikona daje signal značajno iznad baznog nivoa fluorescencije, čime se postiže tačnije merenje signala koji odgovara datom uzorku. Takođe, da bi se izbegli uticaji variranja fluorescencije usled različitih volumena ili koncentracije reaktanata u reakciji, fluorescentni signal koji se meri u toku qPCR reakcije normalizuje se u odnosu na signal pasivne referentne ROX boje, pri čemu se vrednost dobijene fluorescencije naziva R_n vrednost. R_{n+} vrednost predstavlja normalizovanu vrednost fluorescentnog signala u uzorku, dok R_{n-} vrednost označava vrednost baznog nivoa fluorescentnog signala, pri čemu se razlika između ove dve vrednosti označava kao ΔR_n .

U toku eksponencijalne faze qPCR-a, *Real time* PCR uređaj računa dve vrednosti za svaki uzorak:

- Linija praga fluorescencije (*eng. threshold line*), što predstavlja nivo u kome fluorescentni signal statistički značajno nadjačava bazni nivo fluorescencije (najčešće je to $10 \times S_d$ iznad prosečne vrednosti fluorescentnog signala koji se generiše tokom prvih ciklusa), ali se mora nalaziti dovoljno nisko da potpada pod eksponencijalnu (geometrijsku) fazu rasta reakcije (Slika 16);
- Ciklus praga fluorescencije (*eng. cycle threshold, Ct*)- što predstavlja PCR ciklus u kome uzorak postiže ovaj nivo fluorescencije i grafički seče liniju praga fluorescencije (Slika 16). Ct zapravo oslikava trenutak u toku reakcije u kojoj se akumulirao značajno veliki broj amplikona u datom polju iznad baznog nivoa fluorescencije.



Slika 16. Zavisnost nivoa fluorescencije i broja ciklusa

3.3.4.4.2. Metoda relativne standardne krive

Za određivanje relativne količine iRNK od interesa prisutnih u uzorku, korišćena je metoda relativne standardne krive, a svi podaci su analizirani korišćenjem SDS softvera verzije 1.4.0.25. Naime, poređenjem Ct vrednosti uzoraka nepoznatih koncentracija sa serijom standarda, može se precizno odrediti količina matrice DNK sa kojom se započinje qPCR reakcija. U metodi relativne standardne krive sve relativne količine DNK, odnosno RNK, izračunate iz standardne krive se moraju normalizovati u odnosu na endogenu kontrolu. Kao endogene kontrole se koriste geni koji imaju konstitutivnu ekspresiju, koja se ne menja u datom model sistemu u različitim patološkim stanjima. Naime, normalizacija u odnosu na endogenu kontrolu omogućava da se otklone potencijalne greške koje mogu poticati od različitih količina cDNK sa kojom se ulazi u qPCR reakciju. Te varijacije mogu poticati od različitih uslova pod kojima se vrši izolacija i različite efikasnosti reverzne transkripcije (za koju se bez provere uzima da je 100%).

U svrhu našeg istraživanja, na osnovu literaturnih podataka, izabrali smo dva najčešća gena koja se koriste kao endogene kontrole na model sistemu mononuklearnih ćelija periferne krvi i pri ispitivanju ove patologije: β -aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), pri čemu su odabrana tri eseja za ova dva gena:

- β -aktin- Hs01060665_g1 (amplikon dužine 63 bazna para) i Hs99999903_m1 (amplikon dužine 171 baznih parova),
- GAPDH- Hs02758991_g1⁷ (amplikon dužine 157 baznih parova)

Puštanjem TF kontrola, utvrđeno je da se amplifikacija koja potiče od gDNK u uzorcima za esej za β -aktin (Hs01060665_g1) dešava na udaljenosti od više od 10 ciklusa, što ne predstavlja bilo kakvu interferenciju pri merenju u qPCR reakciji, dok to nije bio slučaj sa esejem za GAPDH (Hs02758991_g1) (amplifikacija od gDNK na

⁷ Eseji sa oznakom „m_1“ su dizajnirani kao „exon-spaninig“ eseji, što znači da amplikon obuhvata spoj dva egzona, što omogućava nesmetanu amplifikaciju i u slučaju prisustva kontaminacije genomskom DNK (gDNK). Eseji sa oznakom „g_1“ su dizajnirani tako da se amplikon nalazi na jednom egzonu, što znači da je ova reakcija osetljiva na prisustvo kontaminacije sa gDNK (g_1 eseji za ova dva gena su izabrani za ispitivanje zato što su preporučeni od strane proizvođača kao eseji koji imaju najbolje karakteristike za te gene).

manje od 10 ciklusa). Konačno, prednost je kao esej sa najboljim karakteristikama imao β - aktin- Hs01060665_g1 esej u odnosu na Hs99999903_m1.

Za ostale gene izabrani su sledeći eseji:

- humani rezistin (Hs00220767_m1), dužina amplikona 130 baznih parova
- humani CAP1 (Hs00255173_m1), dužina amplikona 74 bazna para
- humani IL-6 (Hs00985639_m1), dužina amplikona 95 baznih parova
- humani CD36 (Hs01567185_m1), dužina amplikona 83 bazna para

3.3.4.4.3. *Konstrukcija standardne krive*

U metodi relativne standardne krive, standardi se prave od *pool-a* sačinjenog od cDNK svih uzoraka, svedenih na određenu koncentraciju. Za svaki gen se optimizuje opseg koncentracija standardne krive u kome PCR reakcija pokazuje najveću efikasnost. Naime, za svaki gen je pravljen opseg od 8 razblaženja standarda (12 ng/ μ L, 6 ng/mL, 3 ng/ μ L, 1,5 ng/ μ L, 0,75 ng/ μ L, 0,375 ng/ μ L, 0,1875 ng/ μ L, 0,09375 ng/ μ L cDNK) nakon čega je odabran opseg od 5 razblaženja u kome qPCR reakcija pokazuje najbolju efikasnost⁸ i zadovoljava zahteve linearnosti ($R^2 \geq 0,99$) i preciznosti ($Sd_{(Ct)} < 0,2$ ili $Kv_{(Ct)} < 0,3$). Svi standardi su analizirani u četiri primerka. Primeri standardnih kriva korišćenih u ovim eksperimentima za svaki gen dati su na Slikama 17-21. Koncentracija cDNK uzoraka je bila vrednost drugog standarda iz serijskog razblaženja za dati gen. Svi uzorci su analizirani u triplikatu.

⁸ Efikasnost qPCR reakcije predstavlja stepen generisanja PCR amplikona, izražen u procentima. Ukoliko se količina odgovarajućeg amplikona udvostručuje tokom eksponencijalne faze reakcije, smatra se da je efikasnost te reakcije 100%. Za izračunavanje efikasnosti reakcije (E), koristi se nagib standardne krive preko sledeće formule:

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

Ukoliko je nagib krive -3,32, PCR reakcija ima 100% efikasnost, tj. na svaka 3,32 ciklusa, broj amplikona se povećava 10 puta ($\log_2 10 = 3,3219$). Prihvatljiva efikasnost za qPCR reakciju je od 90-110% (nagib krive od -3,6 do -3,1).

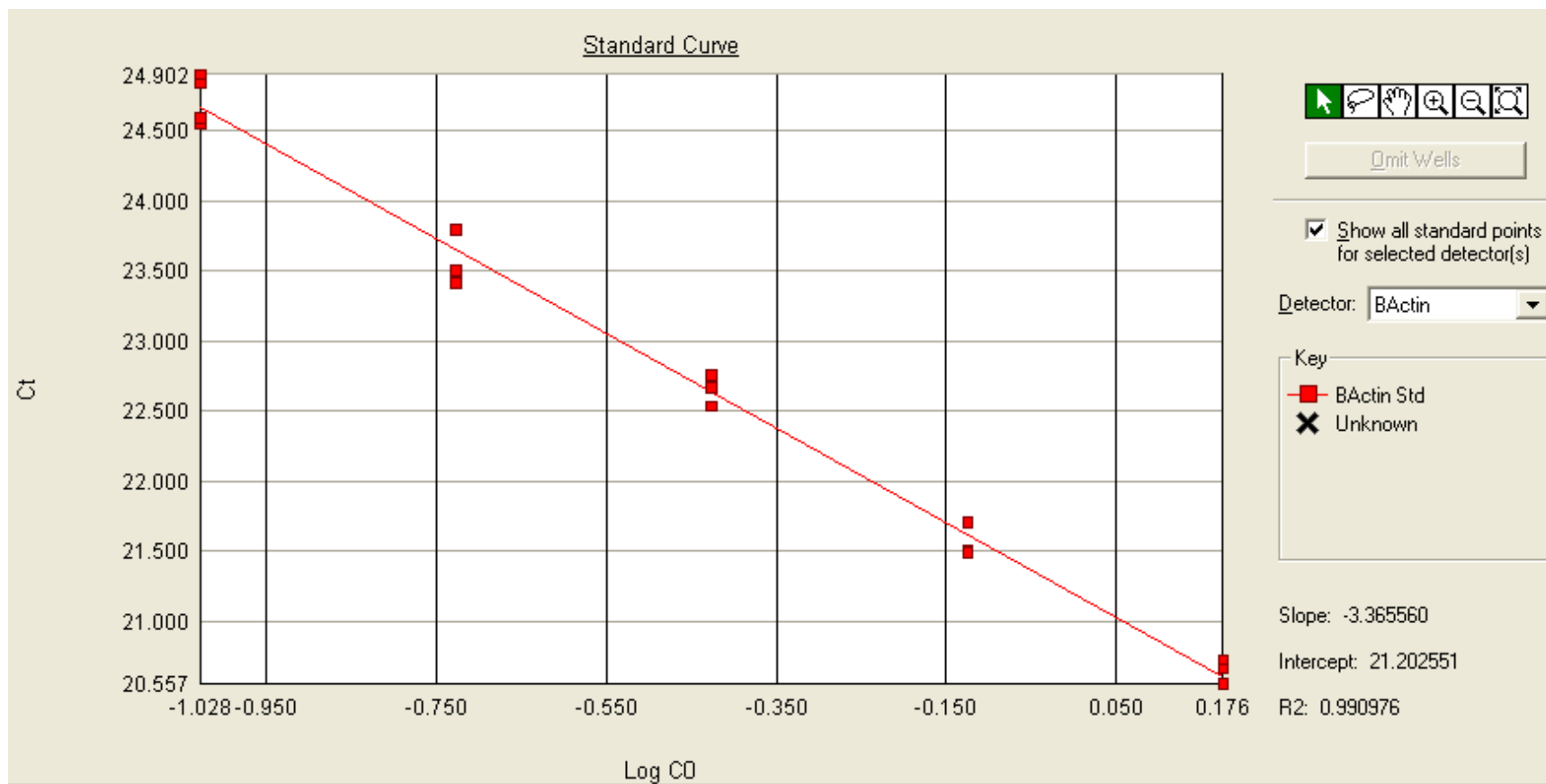
Na svakoj ploči postavljane i odgovarajuće TF i NTRT kontrole, kao i negativna kontrola bez matrice (NTC kontrola, *eng. negative template control*). U NTC kontroli se nalaze sve komponente za qPCR reakciju sem uzorka, pri čemu ona služi za:

- računanje 'baseline' vrednosti fluorescencije;
- i za proveru kontaminacije reagenasa za qPCR.

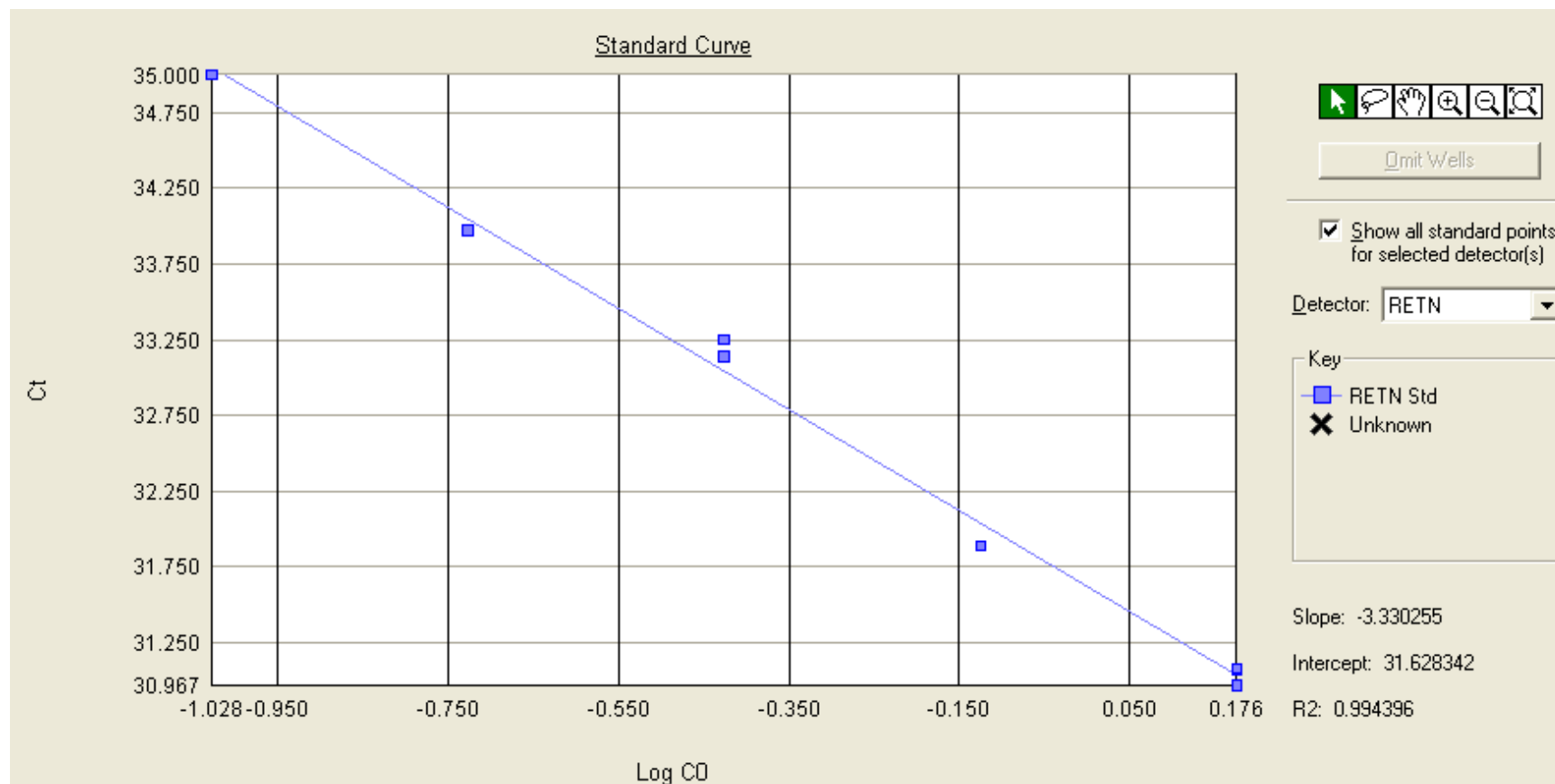
Za svaki gen izračunat je odgovarajući Kv ciklusa unutar serije i između serija.

Tabela 7. Ispitivanje preciznosti testa u seriji i između serija

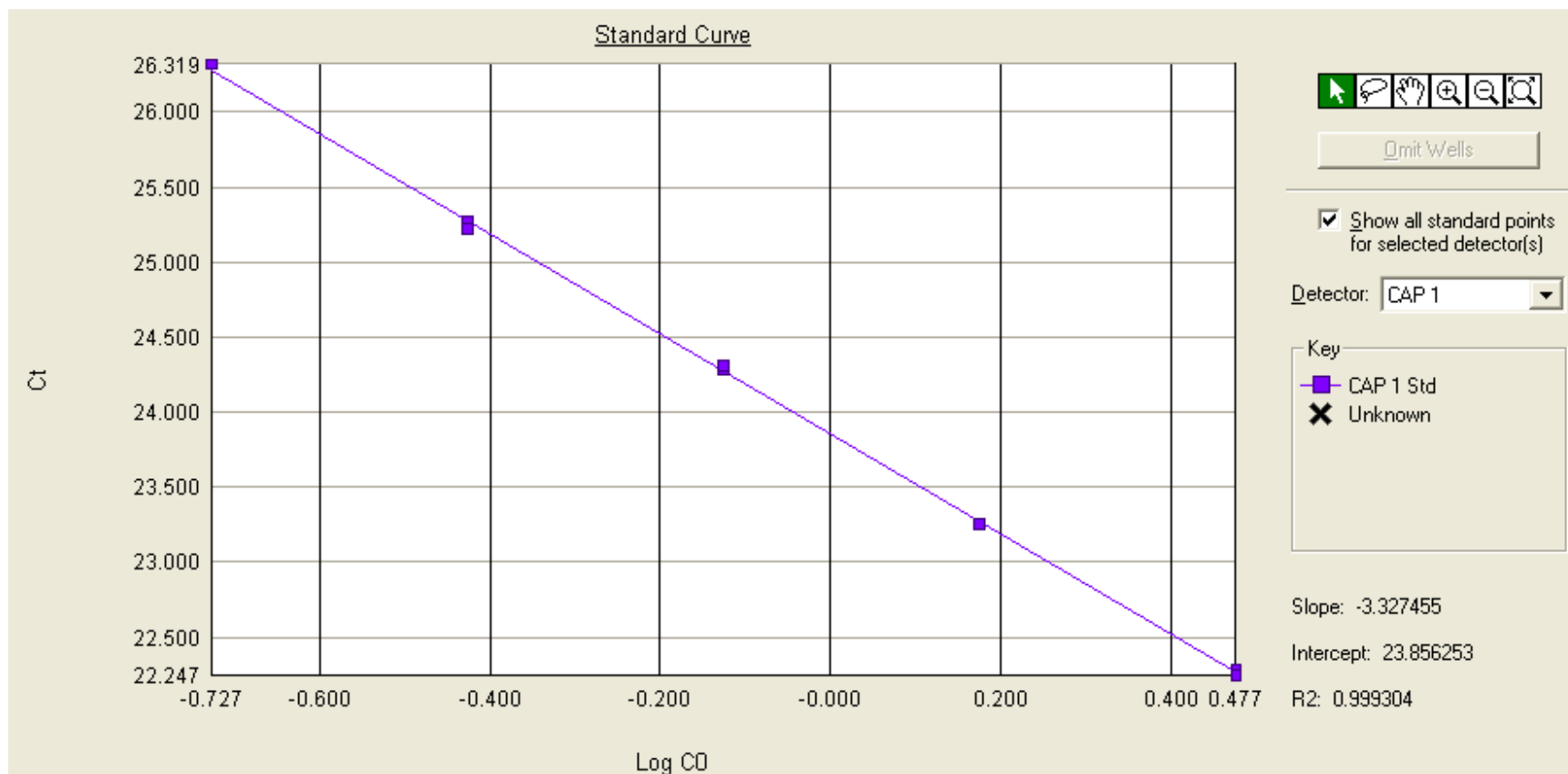
Gen	Kv unutar serije, %; N=15	Kv između serija, %; N=18
<i>humani rezistin</i>	0,19	0,32
<i>humani CAP1</i>	0,04	0,13
<i>humani IL-6</i>	0,08	0,18
<i>humani CD36</i>	0,02	0,14
<i>Humani β-aktin</i>	0,08	0,14



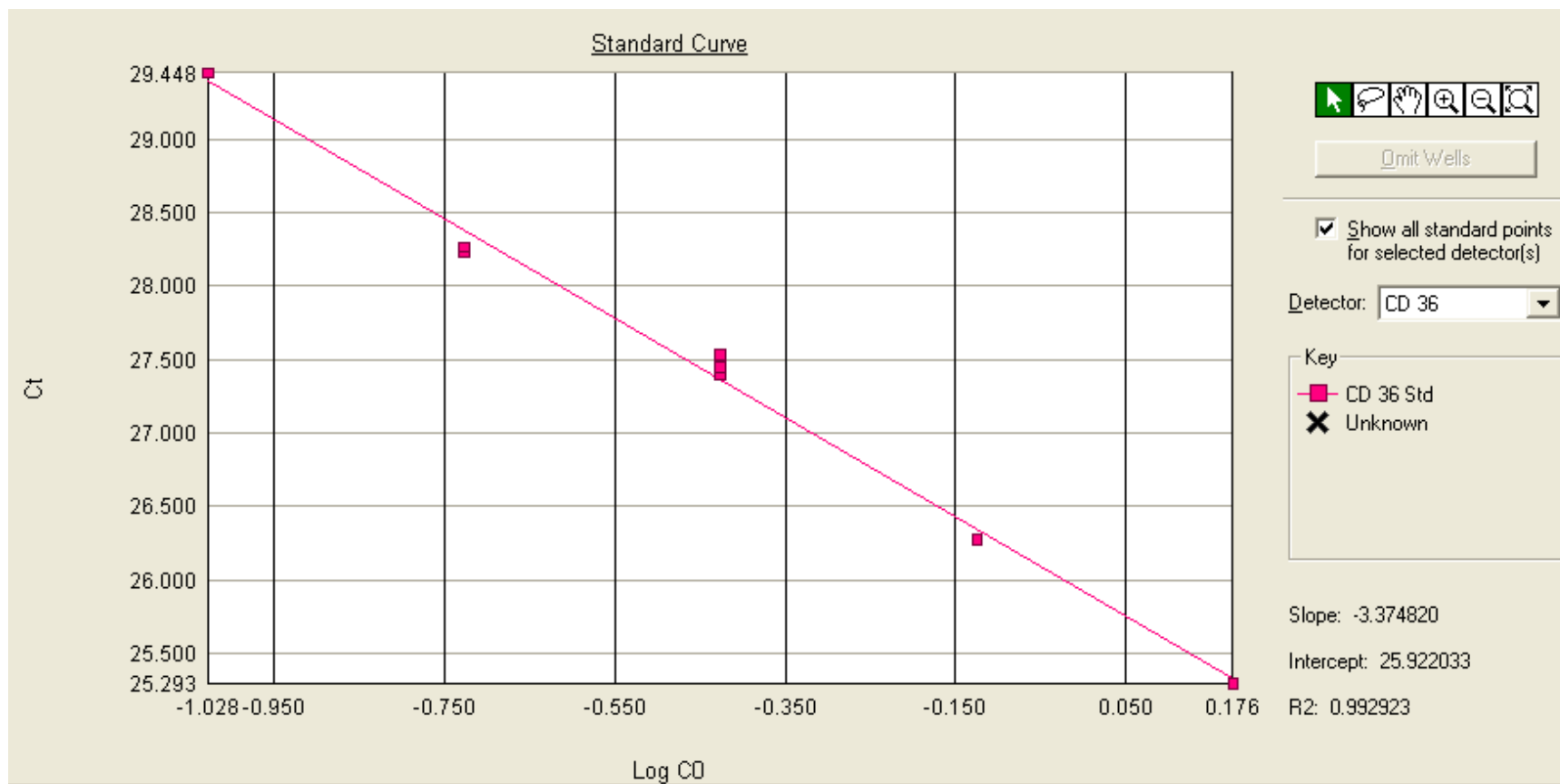
Slika 17. Standardna kriva za β -aktin



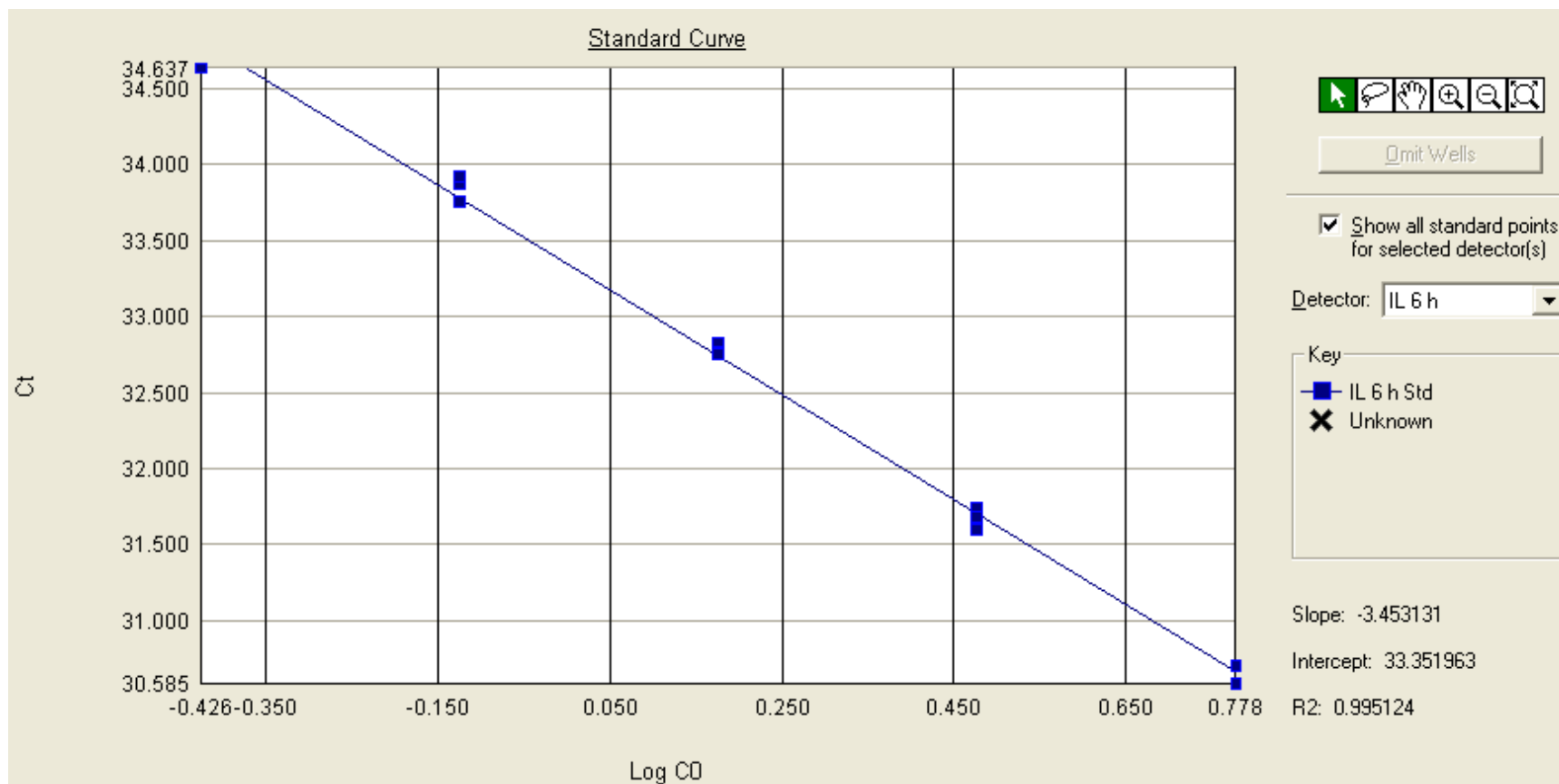
Slika 18. Standardna kriva za rezistin



Slika 19. Standardna kriva za CAP1



Slika 20. Standardna kriva za CD36



Slika 21. Standardna kriva za IL-6

3.4. Statistička obrada podataka

Distribucija podataka je testirana *Shapiro-Wilk* testom. Podaci koji su pratili normalnu distribuciju su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama, dok su podaci koji nisu pratili normalnu distribuciju log-transformisani i predstavljeni kao geometrijske sredine sa interkvartilnim rasponima. Grupe su poređene *Student*-ovim t-testom ili univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) i *Tukey post hoc* testom.

Za ocenjivanje asocijacije između parametara korišćena je *Pearson*-ova korelaciona analiza. Analizom kovarijanse izvršeno je i korigovanje vrednosti parametara za odgovarajuće pridružene faktore, tj. kovarijante.

U cilju ispitivanja doprinosa nezavisnih prediktora koncentracijama rezistina u krvi, nivoima iRNK rezistina, CAP1 i CD36 izvršena je višestruka linearna regresiona analiza. Modeli u multivarijantnoj analizi su pravljeni na osnovu toga kolika je bila značajnost *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije u univarijantnoj analizi. Za nezavisne varijable u modelu birane su one čija je značajnost za *Pearson*-ov koeficijent korelacije bila $\leq 0,1$.

Podaci koji zbog velikih varijansi ni nakon transformacije nisu pratili normalnu raspodelu, prikazani su kao medijane sa interkvartilnim rasponima i testirani neparametarskim *Kruskal-Wallis* testom i *post-hoc Mann-Whitney* testom sa *Bonferroni* korekcijom. Za ocenjivanje asocijacije između parametara korišćena je *Spearman*-ova korelaciona analiza. *Quade*-ovim testom izvršeno je korigovanje vrednosti parametara za odgovarajuće pridružene faktore, tj. kovarijante.

Kategoričke varijable su prikazane kao apsolutne frekvencije i analizirane *Chi*-kvadrat ili *Fisher*-ovim testom.

P vrednost manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

Svi podaci su analizirani pomoću *Excel* (verzija 2010; Microsoft, SAD) programa i statističkog softvera *IBM® SPSS® Statistics version 22*.

4. Rezultati

4.1. Analiza ispitivanih parametara u grupama pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenozе, sa SAP, AKS i zdravih ispitanika

U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti IBS određenoj prema kliničkim manifestacijama bolesti, pacijenti sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju su podeljeni u tri grupe: na pacijente sa AKS, na pacijente sa SAP i na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i kontrola su prikazane u Tabeli 8. Za ispitivanje razlike između svih grupa je primenjeno i dodatno *Bonferroni* korigovanje za sve p vrednosti i te vrednosti su dalje prikazane. Pacijenti su bili značajno stariji u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, grupe nisu bile homogene prema pušačkom statusu i prema polu. Koncentracije kreatinina su bile značajno više u KG u odnosu na grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p=0,006$), sa SAP ($p=0,012$) i u odnosu na grupu sa AKS ($p=0,024$). Koncentracije HDL-H su bile značajno više u KG grupi nego u grupi bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p<0,001$), u grupi sa SAP ($p<0,001$) i u grupi sa AKS ($p<0,001$). Koncentracije LDL-H su bile značajno niže u grupi sa SAP u odnosu na KG ($p=0,006$) i u odnosu na grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p=0,006$). Grupe pacijenata sa SAP i AKS su imale značajno više koncentracije TG nego u grupi bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p=0,006$; $p=0,018$, redom), dok su u grupi sa SAP koncentracije TG bile više i u odnosu na KG ($p=0,024$). Koncentracije hsCRP-a su bile značajno niže u KG nego u grupi sa AKS ($p=0,001$). Koncentracije insulina su bile značajno više u grupi sa AKS u odnosu na KG ($p=0,012$). Vrednosti HOMA-IR indeksa su bile značajno više u grupi sa AKS u odnosu na KG ($p=0,006$) i u odnosu na grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p=0,048$). Kod svih zdravih ispitanika koncentracije IL-6 su bile ispod limita detekcije testa ($<0,7$ pg/mL, Tabela 8). Nivoi genske ekspresije IL-6 se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa (Slika 25).

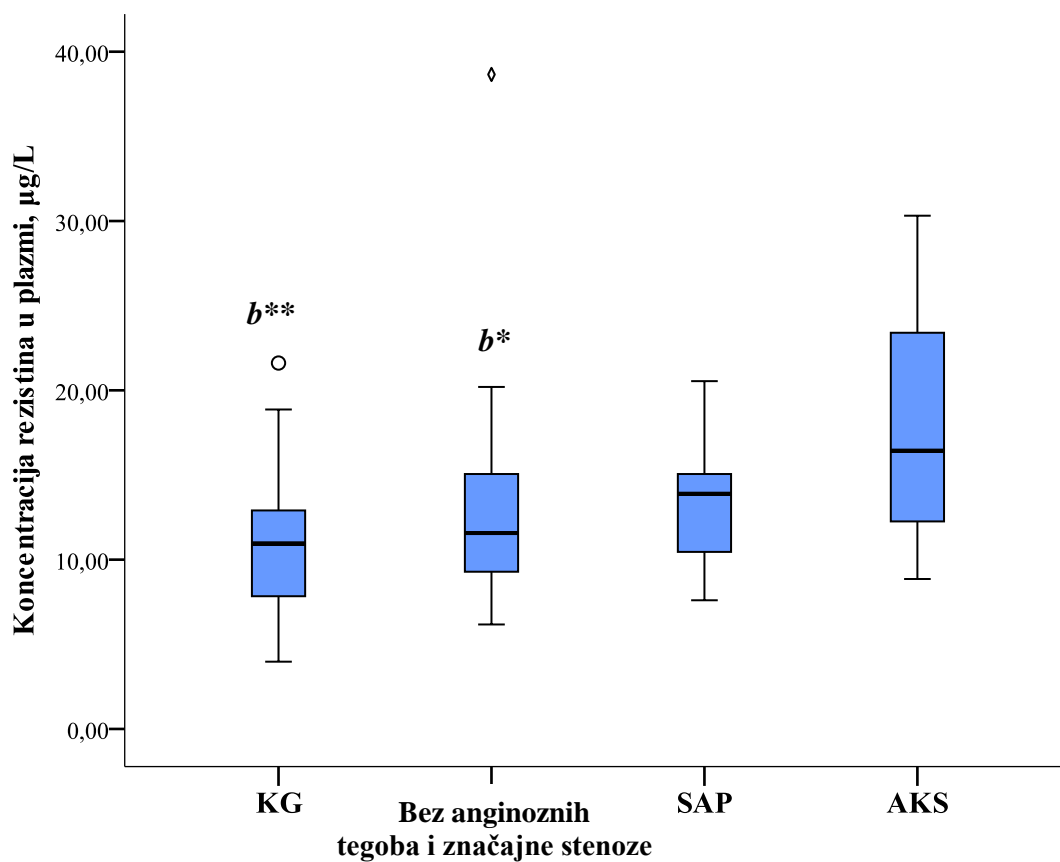
Koncentracije rezistina u plazmi su bile značajno više u grupi sa AKS u odnosu na KG i grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p=0,001$, $p=0,018$, redom,

Slika 22). Normalizovani nivoi iRNK rezistina se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa (Slika 23). Normalizovani nivoi iRNK CAP1 i CD36 su bili značajno veći kod sve tri grupe pacijenata u odnosu na KG (Slika 24, 26).

Tabela 8. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenoze, sa SAP, AKS i zdravih ispitanika

<i>Parametar</i>	Kontrolna grupa	Bez anginoznih tegoba i značajne stenoze	Stabilna angina pektoris	Akutni koronarni sindrom	P
<i>Broj ispitanika</i>	33	30	18	29	/
<i>Pol (m/ž)</i>	15/18	12/18	12/6	16/13	0,285 [§]
<i>Starost, (godine)</i>	45 (27-60)	62 (32-80) ^{a,***}	61 (52-74) ^{a,***}	58 (38-82) ^{a,***}	<0,001
<i>Pušački status (p/n)</i>	10/23	4/26	6/12	14/15	0,036^l
<i>ITM, kg/m²</i>	24,7 (22,6-27,2)	25,8 (24,4-28,0)	26,2 (25,7-28,5)	26,7 (23,5-28,3)	0,208
<i>SP (mm Hg)</i>	125 (115-134)	120 (120-130)	120 (114-140)	120 (110-120)	0,611
<i>DP (mm Hg)</i>	85 (75-90)	80 (70-80)	80 (77-80)	80 (70-80)	0,097
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	86 (78-94)	68 (59-84) ^{a,**}	60 (58-85) ^{a,*}	74 (63-88) ^{a,*}	0,001
<i>Glukoza, mmol/L</i>	5,1 (4,8-5,4)	5,2 (4,8-5,8)	5,1 (4,9-6,0)	5,5 (5,1-5,9)	0,102
<i>Insulin, μU/L</i>	8,37 (6,59-10,89) ^{b,*}	9,10 (6,21-13,65)	7,06 (6,82-13,44)	11,03 (9,15-19,68)	0,010
<i>HOMA IR[#]</i>	1,89 (1,58-2,63) ^{b,**}	2,28 (1,32-2,99) ^{b,*}	2,74 (1,41-3,58)	3,43 (2,63-4,82)	0,007
<i>UH, mmol/L</i>	4,80 (4,50-5,82)	4,72 (4,28-5,89)	4,61 (4,02-4,98)	4,53 (3,96-5,20)	0,256
<i>HDL-H, mmol/L</i>	1,54 (1,35-1,82)	1,12 (0,96-1,45) ^{a,***}	1,17 (1,07-1,38) ^{a,***}	1,05 (0,90-1,30) ^{a,***}	<0,001
<i>LDL-H, mmol/L</i>	2,91 (2,52-3,54) ^{c,**}	3,07 (2,62-3,92) ^{c,**}	2,28 (2,17-2,60)	2,67 (2,35-3,50)	0,003
<i>TG, mmol/L</i>	1,26 (0,99-1,64)	1,20 (1,02-1,52) ^{c,**,b*}	1,81 (1,39-2,26) ^{a,*}	1,66 (1,44-2,03)	0,001
<i>hsCRP, mg/L</i>	1,16 (0,61-1,87)	2,00 (1,2-5,6)	3,09 (0,87-5,35)	4,55 (2,09-8,95) ^{a,**}	<0,001
<i>IL-6, ng/L</i>	ILD	2,24 (0,79-3,29)	1,63 (1,00-5,58)	3,08 (1,21-8,82)	0,973
Lekovi					
(sa/bez terapije)					
<i>ACE-inhibitori</i>	/	20/10	16/2	18/11	0,143 ^l
<i>β-blokatori</i>	/	18/12	10/8	22/7	0,273 [§]
<i>Diuretici</i>	/	13/17	2/16	4/25 [#]	0,015^l
<i>Statini</i>	/	8/22	6/12	15/14	0,133 [§]

Vrednosti su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponima (medijana, minimalna-maksimalna vrednost za godine) i testirane Kruskal-Wallis testom; (p/n)-pušači/nepušači; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak;UH-ukupni kolesterol; HDL-H- kolesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- kolesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije; IL-6- interleukin 6; a- značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu; b- značajno različito u odnosu na grupu sa AKS; c- značajno različito u odnosu na grupu sa SAP; * p<0,05; **-p<0,01; ***-p<0,001 nakon Bonferroni korekcije; ILD- ispod limita detekcije testa (<0,7pg/ml) l- poređenje je vršeno Fisher 2x3 testom, §-poređenje je vršeno Chi-kvadrat testom; #-značajno različito u odnosu na grupu bez anginoznih tegoba i značajne stenoze, p=0,012

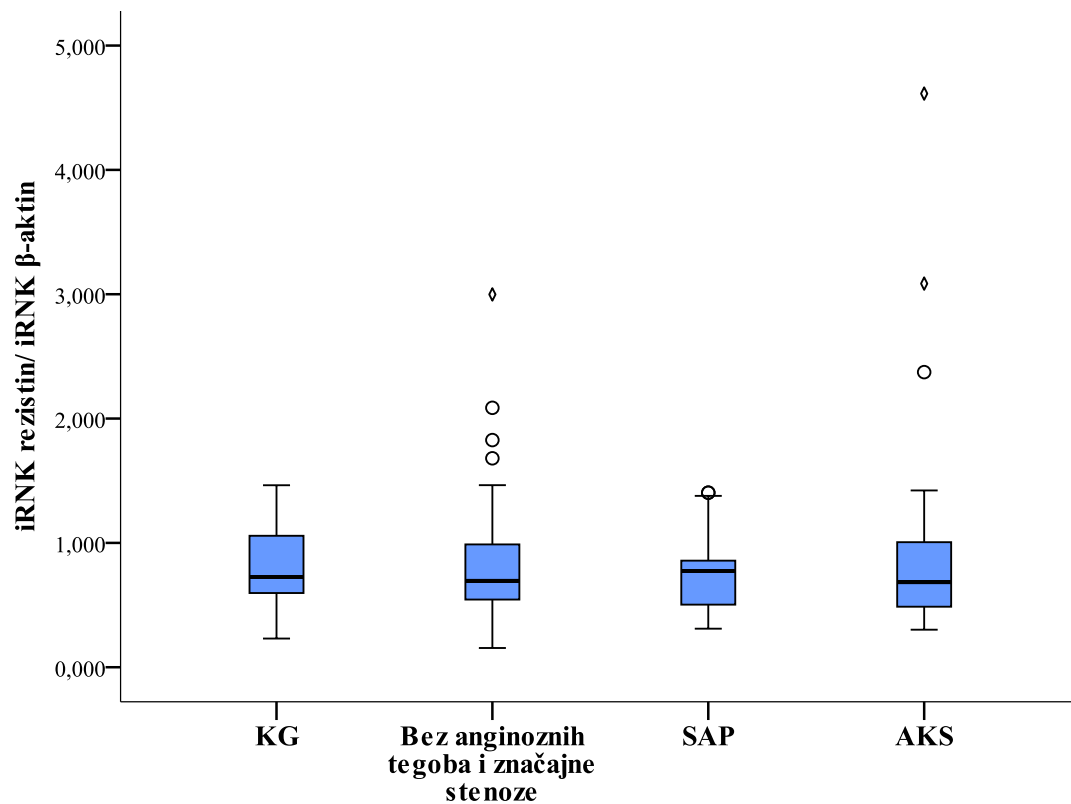


Slika 22. Koncentracija rezistina u plazmi kod pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenozе, sa SAP, sa AKS i zdravih ispitanika

Vrednosti su prikazane korišćenjem pravougaonih dijagrama kao medijane sa interkvartilnim rasponima i minimalnim i maksimalnim vrednostima; °-netipične tačke; ◊-ekstremne vrednosti; vrednosti su testirane Kruskal-Wallis testom, $p < 0,001$

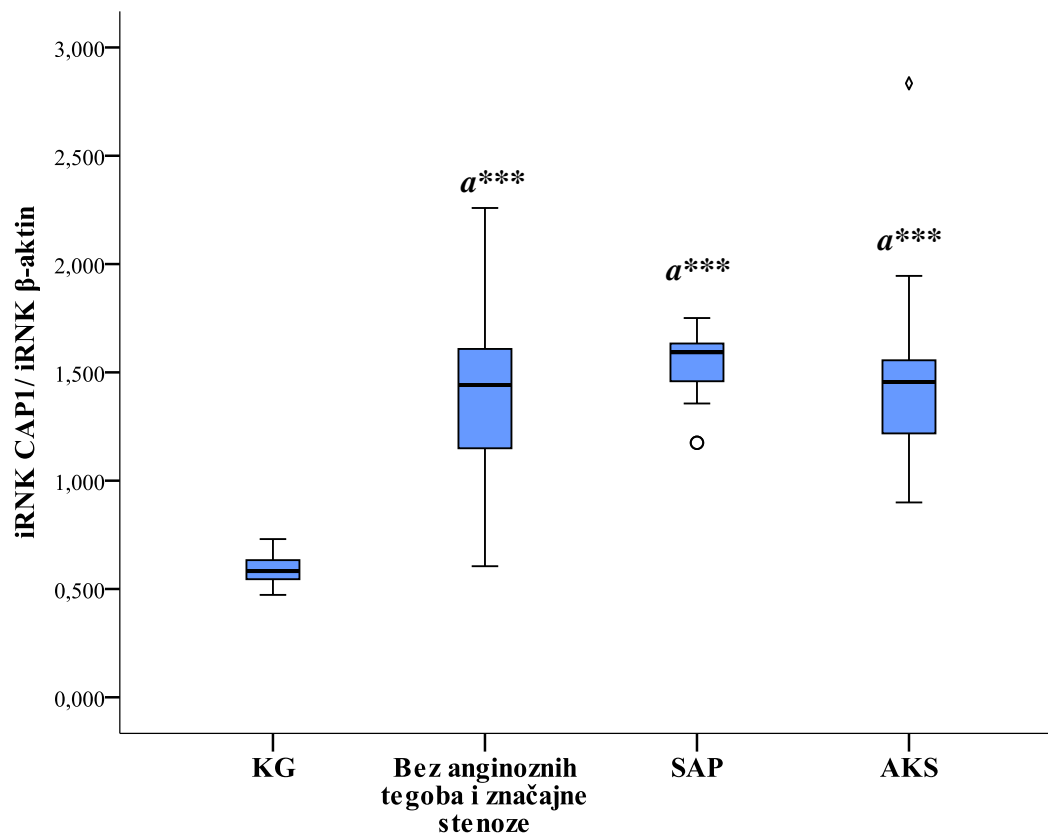
b- značajno različito u odnosu na grupu sa AKS; *- $p = 0,018$; **- $p = 0,001$ nakon Bonferroni korekcije

a, značajno različito u odnosu na KG



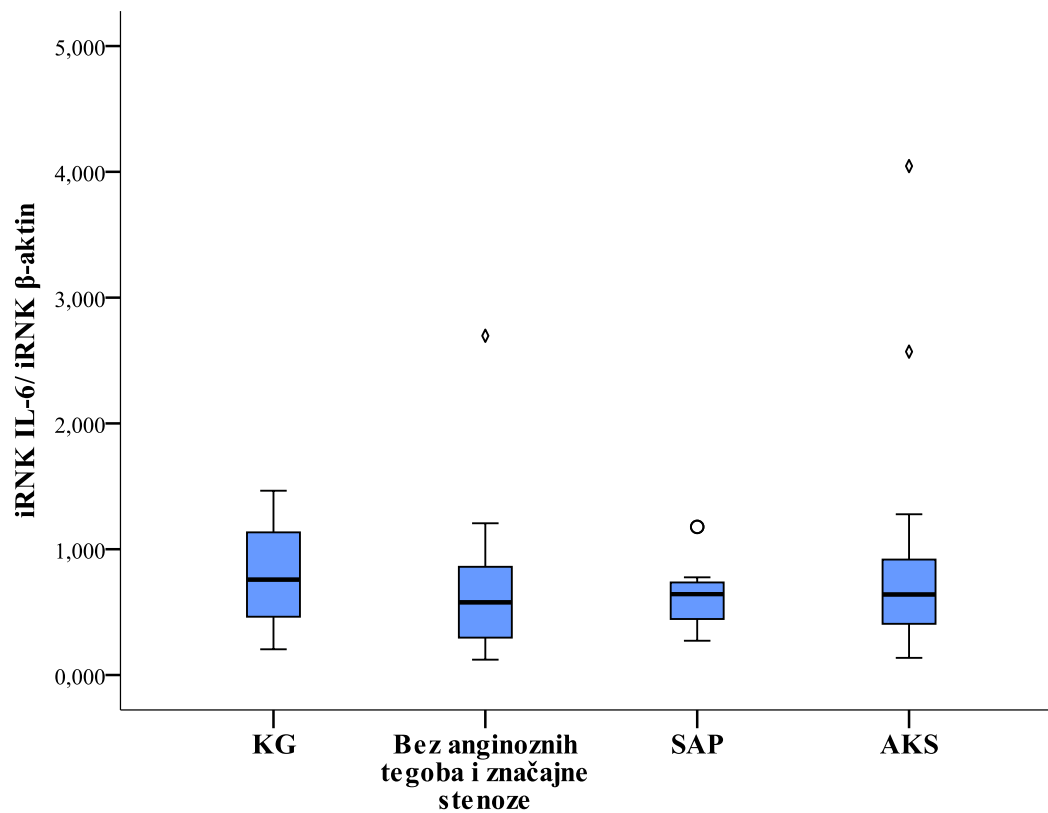
Slika 23. Normalizovane vrednosti nivoa iRNA rezistina kod pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenoze, sa SAP, sa AKS i zdravih ispitanika

Vrednosti su prikazane korišćenjem pravougaonih dijagrama kao medijane sa interkvartilnim rasponima i minimalnim i maksimalnim vrednostima; °-netipične tačke; ◊-ekstremne vrednosti; vrednosti su testirane Kruskal-Wallis testom, $p=0,988$



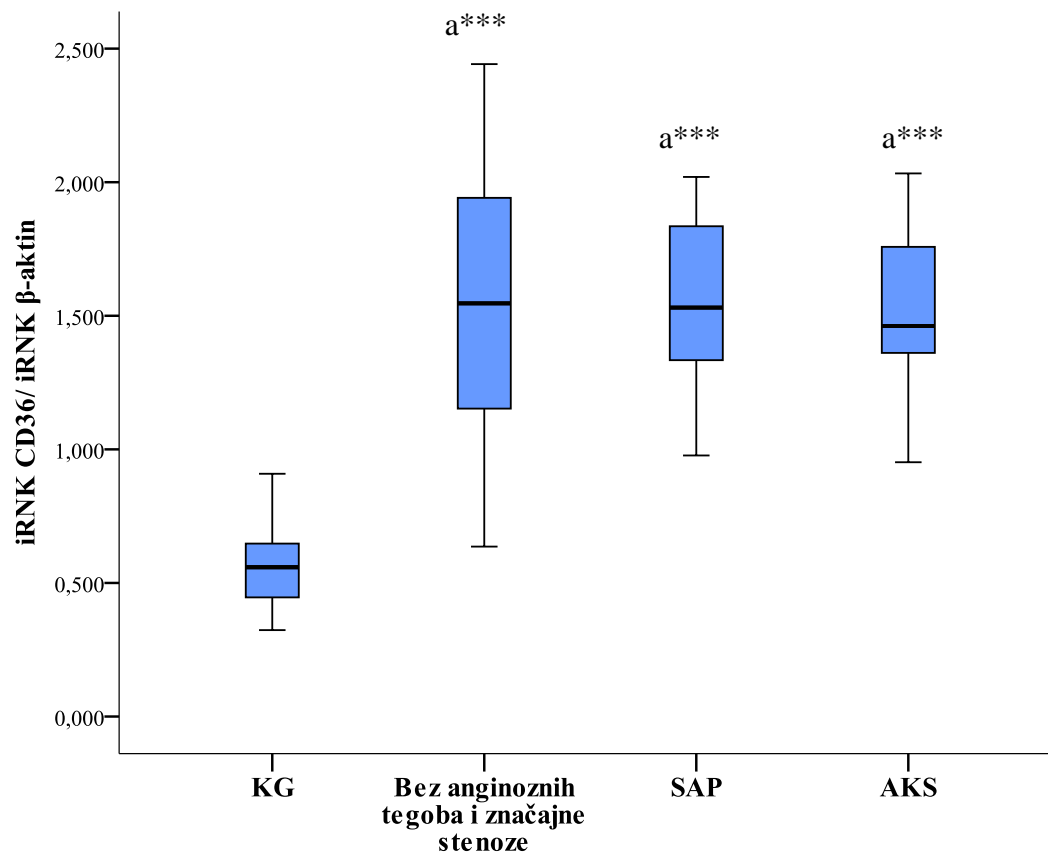
Slika 24. Normalizovane vrednosti nivoa iRNA CAP1 kod pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenoze, sa SAP, sa AKS i zdravih ispitanika

Vrednosti su prikazane korišćenjem pravougaonih dijagrama kao medijane sa interkvartilnim rasponima i minimalnim i maksimalnim vrednostima; °-netipične tačke; ◊-ekstremne vrednosti; vrednosti su testirane Kruskal-Wallis testom, $p < 0,001$ a-značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu; *** $p < 0,001$ nakon Bonferroni korekcije



Slika 25. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK IL-6 kod pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenoze, sa SAP, AKS i zdravih ispitanika

Vrednosti su prikazane korišćenjem pravougaonih dijagrama kao medijane sa interkvartilnim rasponima i minimalnim i maksimalnim vrednostima; °-netipične tačke; ◊-ekstremne vrednosti; vrednosti su testirane Kruskal-Wallis testom, $p=0,236$



Slika 26. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK CD36 kod pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenozе, sa SAP, AKS i zdravih ispitanika

Vrednosti su prikazane korišćenjem pravougaonih dijagrama kao medijane sa interkvartilnim rasponima i minimalnim i maksimalnim vrednostima; vrednosti su testirane Kruskal-Wallis testom, $p < 0,001$

*a-značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu; *** $p < 0,001$ nakon Bonferroni korekcije*

4.1.1. Ispitivanje uticaja starosti, pola, pušačkog statusa i terapije na koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i na nivoe iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kod pacijenata sa IBS i zdravih ispitanika

Zbog postojanja značajne razlike u godinama, KG i svi pacijenti su podeljeni prema tercilima godina u po tri grupe (Tabela 9). Koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 nisu pokazali značajne razlike između grupa (Tabela 9), te možemo zaključiti da razlika u godinama starosti između grupa nema uticaja na nivoe ispitivanih parametara.

Pacijenti i KG su podeljeni prema polu zarad ispitivanja postojanja razlike u koncentracijama IL-6 i rezistina i u nivoima genske ekspresije rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 između muškaraca i žena. Takođe, zbog nehomogne raspodele pušača i nepušača, i KG i pacijenti su podeljeni prema pušačkom statusu. Koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i nisu pokazali značajne razlike između navedenih grupa (Tabela 10, 11), te možemo zaključiti da različita raspodela muškaraca i žena i pušača i nepušača nema značajnog uticaja na nivoe ispitivanih parametara. Nivoi iRNK CD36 su bili značajno veći kod pušača u odnosu na nepušače u KG, dok kod pacijenata ta razlika nije uočena (Tabela 11).

Nije uočena značajna razlika u nivoima ispitivanih parametara kod pacijenata koji su bili na određenoj terapiji (statinima, diureticima, β -blokatorima ili ACE-inhibitorima) u odnosu na pacijente koji nisu uzimali datu terapiju (rezultati nisu prikazani).

Tabela 9. Ispitivani parametri prema tercilima godina zdravih ispitanika i pacijenata sa IBS

<i>Parametar</i>	KG				Pacijenti			
	I tercil 27-40	II tercil 41-51	III tercil 52-60	p	I tercil 32-57	II tercil 58-65	III tercil 66-82	p
<i>IL-6, ng/L</i>	/	/	/	/	1,104 (0,877-3,292)	1,625 (1,000-5,375)	3,292 (1,006-8,500)	0,084
<i>Rezistin, µg/L</i>	11,66 (7,84-13,15)	11,53 (9,79-15,55)	9,13 (5,81-12,88)	0,196	12,89 (9,41-15,84)	13,89 (10,21-17,44)	16,40 (10,60-20,54)	0,140
<i>N. iRNK rezistina</i>	0,690 (0,606-1,108)	0,782 (0,681-1,182)	0,645 (0,482-0,988)	0,294	0,697 (0,498-1,118)	0,775 (0,503-1,030)	0,722 (0,495-1,093)	0,417
<i>N. iRNK CAP1</i>	0,571 (0,498-0,656)	0,615 (0,577-0,647)	0,576 (0,545-0,584)	0,227	1,505 (1,263-1,644)	1,546 (1,334-1,633)	1,338 (1,155-1,570)	0,182
<i>N. iRNK IL-6</i>	0,664 (0,424-0,814)	1,044 (0,526-1,427)	0,765 (0,472-1,170)	0,189	0,467 (0,387-0,822)	0,637 (0,444-0,864)	0,593 (0,347-0,842)	0,714
<i>N. iRNK CD36</i>	0,607 (0,434-0,744)	0,558 (0,481-0,639)	0,495 (0,427-0,645)	0,648	1,743 (1,267-1,892)	1,531 (1,289-1,870)	1,142 (1,317-1,686)	0,223

Vrednosti su testirane Mann Whitney testom i prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponima

N.-normalizovani nivoi

Tabela 10. Ispitivani parametri prema polu zdravih ispitanika i pacijenata sa IBS

<i>Parametar</i>	KG			Pacijenti		
	Muškarci 12	Žene 15	P	Muškarci 40	Žene 37	P
<i>IL-6, ng/L</i>	/	/	/	1,41 (0,98-5,58)	1,94 (1,06-4,85)	0,154
<i>Rezistin, μg/L</i>	10,60 (9,05-12,05)	11,44 (7,84-13,71)	0,592	14,47 (11,23-15,74)	10,80 (8,28-14,41)	0,208
<i>N. iRNK Rezistina</i>	0,919 (0,577-1,212)	0,703 (0,542-0,817)	0,638	0,774 (0,680-1,378)	0,647 (0,436-1,233)	0,816
<i>N. iRNK CASP1</i>	0,593 (0,550-0,646)	0,577 (0,514-0,629)	0,938	1,567 (1,459-1,649)	1,371 (1,187-1,546)	0,059
<i>N. iRNK IL-6</i>	0,927 (0,486-1,248)	1,004 (0,614-1,260)	0,236	0,584 (0,320-0,846)	0,689 (0,582-0,839)	0,077
<i>N. iRNK CD36</i>	0,504 (0,435-0,679)	0,559 (0,442-0,615)	0,884	1,819 (1,570-1,881)	1,396 (1,193-1,703)	0,155

Vrednosti su testirane Mann Whitney testom i prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponima

N.-normalizovani nivoi

Tabela 11. Ispitivani parametri prema pušačkom statusu zdravih ispitanika i pacijenata sa IBS

<i>Parametar</i>	KG			Pacijenti		
	Nepušači 23	Pušači 10	p	Nepušači 53	Pušači 24	p
<i>IL-6, ng/L</i>	/	/	/	1,63 (0,97-3,29)	5,58 (1,31-7,67)	0,685
<i>Rezistin, μg/L</i>	10,93 (8,45-12,46)	11,25 (6,83-13,64)	0,367	11,77 (9,46-15,74)	12,34 (11,13-15,06)	0,671
<i>N. iRNK Rezistina</i>	0,728 (0,605-1,170)	0,741 (0,452-1,194)	0,583	0,731 (0,503-1,378)	0,774 (0,726-1,982)	0,824
<i>N. iRNK CAP1</i>	0,608 (0,526-0,640)	0,573 (0,506-0,583)	0,470	1,496 (1,312-1,621)	1,459 (1,031-1,487)	0,959
<i>N. iRNK IL-6</i>	1,016 (0,614-1,261)	0,741 (0,449-1,193)	0,242	0,642 (0,430-0,860)	0,539 (0,198-0,849)	0,316
<i>N. iRNK CD36</i>	0,533 (0,424-0,584)	0,634 (0,557-0,650)	0,026	1,624 (1,200-1,847)	1,570 (1,123-1,736)	0,203

Vrednosti su testirane Mann Whitney testom i prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponima

N.-normalizovani nivoi

4.1.2. Ispitivanje povezanosti rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa IBS

U cilju ispitivanja međusobne povezanosti ispitivanih parametara kao i njihove povezanosti sa lipidnim i nelipidnim faktorima za razvoj ateroskleroze, sprovedena je *Spearman*-ova korelaciona analiza. U cilju detaljnije analize povezanosti koncentracije rezistina, kako sa nivoima iRNK ispitivanih parametara, tako i sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije i homeostaze glukoze, izvršena je podela pacijenata prema tercilima koncentracija rezistina u plazmi.

4.1.2.1. Korelacije rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa IBS

U grupi pacijenata, koncentracije rezistina su bile u pozitivnoj korelaciji sa nivoima iRNK rezistina i sa koncentracijama kreatinina. Nakon korigovanja za vrednosti kreatinina koncentracije rezistina su bile više kod svih grupa pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima (AKS vs. KG $p < 0,001$; SAP vs. KG $p = 0,014$; bez anginoznih tegoba i značajne stenozе vs. KG $p = 0,017$), i kod pacijenata sa AKS u odnosu na pacijente sa SAP ($p = 0,028$) i bez anginoznih tegoba i značajne stenozе ($p = 0,003$).

Iako nije postojala značajna korelacija između koncentracija rezistina u plazmi i koncentracija hsCRP-a, nakon selekcije samo pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, uočena je značajna pozitivna korelacija između ova dva parametra. Takođe, uočena je i značajna negativna korelacija između koncentracija rezistina u plazmi i vrednosti SP i DP. Nivoi iRNK rezistina su značajno pozitivno korelirali sa koncentracijama rezistina i IL-6 u plazmi (Tabela 12).

Nivoi iRNK CAP1 su pokazali pozitivnu korelaciju sa koncentracijama TG i sa nivoima iRNK CD36, a negativnu sa godinama starosti ispitanika. Nivoi iRNK CD36 su pozitivno korelirali sa vrednostima ITM i nivoima iRNK rezistina i CAP1 (Tabela 13).

Tabela 12. Korelacije rezistina u plazmi i normalizovanih vrednosti iRNK rezistina sa ostalim parametrima kod pacijenata sa IBS

<i>Parametar</i>	Rezistin, ng/mL		Normalizovane vrednosti iRNK rezistina	
	ρ	p	P	P
<i>Starost, (godine)</i>	0,214	0,062	0,026	0,827
<i>ITM, kg/m²</i>	-0,202	0,082	-0,098	0,410
<i>SP (mm Hg)</i>	-0,306	0,004	-0,023	0,830
<i>DP (mm Hg)</i>	-0,307	0,004	-0,133	0,223
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,353	0,002	0,166	0,156
<i>Glukoza, mmol/L</i>	-0,050	0,678	-0,086	0,482
<i>Insulin, μU/L</i>	0,014	0,911	0,052	0,693
<i>HOMA IR</i>	-0,118	0,359	-0,086	0,512
<i>UH, mmol/L</i>	-0,373	0,001	-0,111	0,356
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,404	<0,001	-0,257	0,032
<i>LDL-H, mmol/L</i>	-0,231	0,051	-0,093	0,442
<i>TG, mmol/L</i>	0,048	0,684	-0,032	0,791
<i>hsCRP, mg/L</i>	0,124	0,288*	0,164	0,165
<i>IL-6, ng/L</i>	0,206	0,197	0,297	0,048
<i>Rezistin, μg/L</i>	/	/	0,305	0,008
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,305	0,008	/	/
<i>Normalizovana iRNK CAP1</i>	0,032	0,789	0,074	0,541
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	-0,056	0,636	0,026	0,823
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,162	0,223	0,348	0,007

Podaci su analizirani Spearman-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak;UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije; *Značajno nakon isključenja pacijenata koji su na terapiji statinima: $p=0,047, r=0,295$

Tabela 13. Korelacije normalizovanih vrednosti iRNK CAP1 i CD36 sa ostalim parametrima kod pacijenata sa IBS

<i>Parametar</i>	Normalizovane vrednosti iRNK CAP1		Normalizovane vrednosti iRNK CD36	
	ρ	p	P	P
<i>Starost, (godine)</i>	-0,261	0,028	-0,238	0,072
<i>ITM, kg/m²</i>	0,113	0,354	0,279	0,037
<i>SP (mm Hg)</i>	0,162	0,173	0,170	0,201
<i>DP (mm Hg)</i>	0,025	0,836	0,055	0,682
<i>Kreatinin, $\mu\text{mol/L}$</i>	0,025	0,838	0,367	0,005
<i>Glukoza, mmol/L</i>	-0,012	0,922	0,068	0,631
<i>Insulin, $\mu\text{U/L}$</i>	-0,103	0,442	0,215	0,151
<i>HOMA IR</i>	-0,035	0,794	0,173	0,250
<i>UH, mmol/L</i>	-0,162	0,186	-0,144	0,286
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,089	0,465	-0,236	0,075
<i>LDL-H, mmol/L</i>	-0,236	0,055	-0,057	0,677
<i>TG, mmol/L</i>	0,256	0,033	0,135	0,312
<i>hsCRP, mg/L</i>	-0,110	0,368	0,118	0,386
<i>IL-6, ng/L</i>	-0,169	0,262	-0,107	0,535
<i>Rezistin, $\mu\text{g/L}$</i>	0,032	0,789	0,162	0,223
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,074	0,541	0,348	0,007
<i>Normalizovana iRNK CAP1</i>	/	/	0,525	<0,001
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	0,080	0,510	-0,057	0,671
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,525	<0,001	/	/

Podaci su analizirani Spearman-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije

4.1.2.2. Ispitivanje povezanosti koncentracija rezistina u plazmi sa ostalim parametrima

Svi pacijenti sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju su podeljeni u tri grupe prema tercilima koncentracija rezistina u plazmi, čije su granice utvrđene na osnovu distribucije koncentracija rezistina u celoj populaciji pacijenata. Uočeno je da je najveća učestalost pacijenata sa AKS bila u III tercilu, dok je najveća učestalost pacijenata bez anginoznih tegoba i značajne stenozе i sa SAP uočena u I i II tercilu. III tercil je bio udružen sa najnižim koncentracijama UH i HDL-C (Tabela 14).

Tabela 14. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata kao i vrednosti genske ekspresije analiziranih parametara prema tercilima koncentracija rezistina u plazmi

<i>Parametar</i>	Tercili rezistina u plazmi			P
	I tercil (6,17-10,90 ng/mL) N= 26	II tercil (10,91-16,16 ng/mL) N= 25	III tercil (16,17-38,66 ng/mL) N= 26	
<i>Podgrupa pacijenata</i> § (<i>SAP+BZS/AKS</i>)	19/7	19/6	9/17 ^{#,##}	0,003
<i>Starost, (godine)</i>	59 (37-80)	60 (32-75)	66 (38-82)	0,128
<i>ITM, kg/m²</i>	26,7 (25,1-28,7)	25,8 (24,5-28,1)	26,6 (23,5-27,5)	0,550
<i>SP (mm Hg)</i>	110 (110-120)	140 (120-140)	120 (120-130)	<0,001
<i>DP (mm Hg)</i>	70 (60-80)	80 (80-85)	80 (70-80)	<0,001
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	60 (54-78)	78 (60-87)	69 (64-97)	0,052
<i>Glukoza, mmol/L</i>	5,6 (4,9-6,0)	5,1 (4,7-5,5)	5,5 (5,1-5,9)	0,266
<i>Insulin, μU/L</i>	9,20 (7,04-11,06)	13,44 (6,82-16,57)	10,71 (6,05-16,50)	0,386
<i>HOMA IR</i>	2,51 (2,20-3,20)	2,98 (1,52-3,73)	2,65 (1,33-3,96)	0,826
<i>UH, mmol/L</i>	5,01 (4,53-5,97)	4,66 (4,14-5,73)	4,28 (3,68-4,81) [*]	0,033
<i>HDL-H, mmol/L</i>	1,32 (1,08-1,45)	1,15 (0,90-1,47)	0,97 (0,87-1,20) ^{**}	0,012
<i>LDL-H, mmol/L</i>	2,96 (2,44-4,07)	2,95 (2,40-3,70)	2,64 (2,21-3,01)	0,243
<i>TG, mmol/L</i>	1,39 (1,22-2,31)	1,46 (1,04-1,76)	1,64 (1,20-1,96)	0,501
<i>hsCRP, mg/L</i>	2,40 (1,56-5,35)	2,37 (0,82-6,40)	5,31 (2,05-9,75)	0,222
<i>IL-6, ng/L</i>	1,83 (1,42-4,75)	2,46 (1,16-3,81)	7,25 (1,36-9,59)	0,288
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,648 (0,481-0,786)	0,731 (0,578-0,949)	0,834 (0,534-1,351)	0,047
<i>Normalizovana iRNK CAPI</i>	1,509 (1,220-1,602)	1,496 (1,310-1,620)	1,385 (1,155-1,645)	0,705
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	0,642 (0,408-0,792)	0,538 (0,323-0,844)	0,543 (0,330-0,986)	0,642
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	1,355 (1,154-1,746)	1,716 (1,346-1,942)	1,546 (1,128-1,890)	0,194

Vrednosti su prikazane kao medijane sa interkvartilnim rasponima (medijana, minimalna-maksimalna vrednost za godine) i testirane Kruskal-Wallis testom; ^{*}značajno različito u odnosu na I tercil: $p=0,027$ nakon Bonferroni korekcije; ^{**} značajno različito u odnosu na I tercil: $p=0,006$ nakon Bonferroni korekcije; §- vrednosti su analizirane Chi-square testom; [#]-značajno različito u odnosu na I tercil, $p=0,003$; ^{##}-značajno različito u odnosu na II tercil, $p=0,005$; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije; IL-6- interleukin L; BZS-grupa bez anginoznih tegoba i značajne stenozе

4.2. Analiza ispitivanih parametara u grupama pacijenata sa i bez značajne stenozе i zdravih ispitanika

Takođe, iz ukupne grupe pacijenata sa indikacijama za selektivnu koronarnu angiografiju, posebno je izdvojena grupa pacijenata koji nisu obuhvatali pacijente sa AKS. U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa stepenom ozbiljnosti IBS određene prema angiografski utvrđenom kriterijumu prisustva ili odsustva značajne stenozе, ovi pacijenti su podjeljeni u dve grupe: na pacijente bez značajne stenozе i na pacijente sa značajnom stenozom. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa i bez značajne stenozе i kontrola su prikazane u Tabeli 15. Obe grupe pacijenata su bile značajno starije od zdravih ispitanika ($p < 0,001$; $p < 0,001$, redom). Pacijenti sa značajnom stenozom su imali značajno više vrednosti ITM u odnosu na pacijente bez značajne stenozе i u odnosu na KG ($p = 0,019$; $p < 0,001$, redom) i značajno više koncentracije glukoze u odnosu na KG ($p = 0,017$), dok su pacijenti bez značajne stenozе imali značajno više koncentracije kreatinina u odnosu na KG ($p = 0,007$). Koncentracije UH i LDL-H se nisu značajno razlikovali između grupa. Koncentracije HDL-H su bile značajno niže u grupama pacijenata sa i bez značajne stenozе u odnosu na KG ($p < 0,001$; $p < 0,001$, redom), dok je razlika između grupa pacijenata sa i bez značajne stenozе bila na granici statističke značajnosti ($p = 0,055$). Grupa pacijenata sa značajnom stenozom je imala značajno više koncentracije TG u poređenju sa grupama bez značajne stenozе i sa KG ($p = 0,045$; $p = 0,002$, redom). Koncentracije hsCRP-a su bile značajno više kod pacijenata sa i bez značajne stenozе u odnosu na KG ($p < 0,001$; $p = 0,007$, redom). Koncentracije insulina kao i vrednosti HOMA-IR indeksa su bile značajno više kod pacijenata sa značajnom stenozom u odnosu na one bez značajne stenozе ($p < 0,001$; $p < 0,001$, redom) i u odnosu na KG ($p < 0,001$; $p < 0,001$, redom).

Obe grupe pacijenata (sa i bez značajne stenozе) su imale više koncentracije rezistina u plazmi u odnosu na KG (Slika 27). Normalizovani nivoi iRNK rezistina i IL-6 se nisu značajno razlikovali između grupa (Slika 28 i 30).

Sa druge strane, normalizovane vrednosti iRNK i CAP1 i CD36 su bile ne samo značajno više kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG, već su bile značajno više i kod

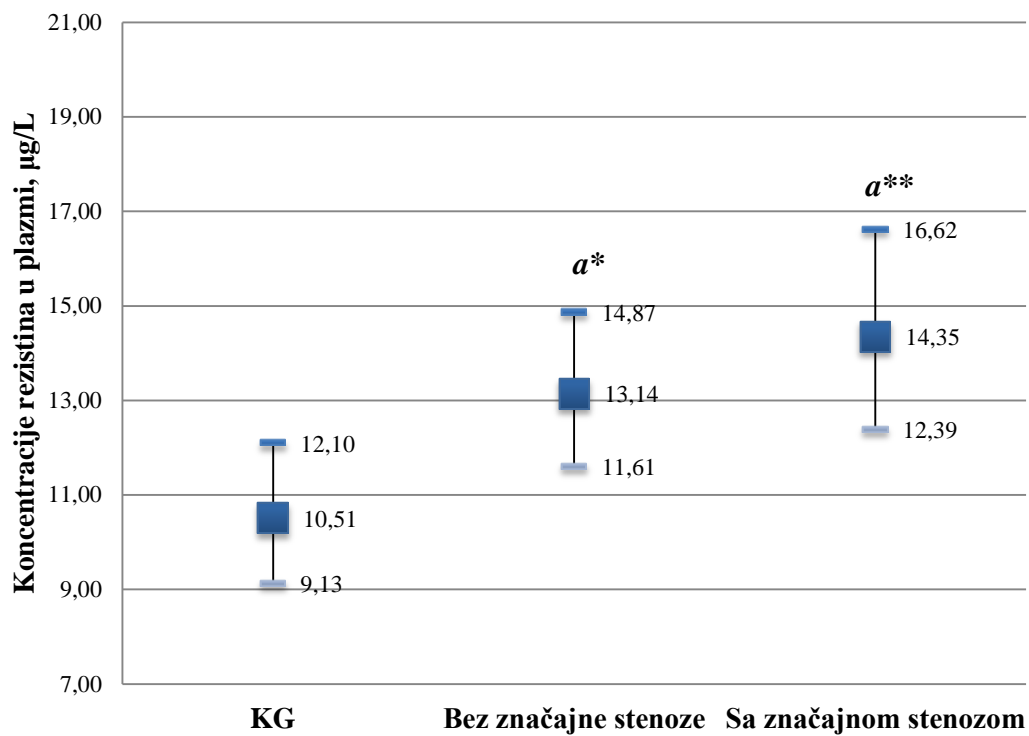
pacijenata sa značajnom stenozom u odnosu na one bez značajne stenoze (Slike 29 i 31).

Između pacijenata sa jednosudovnom, dvosudovnom i trosudovnom stenozom nije uočena značajna razlika u nivoima ispitivanih parametara (rezultati nisu prikazani).

Tabela 15. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa i bez značajne stenoze i kontrolne grupe

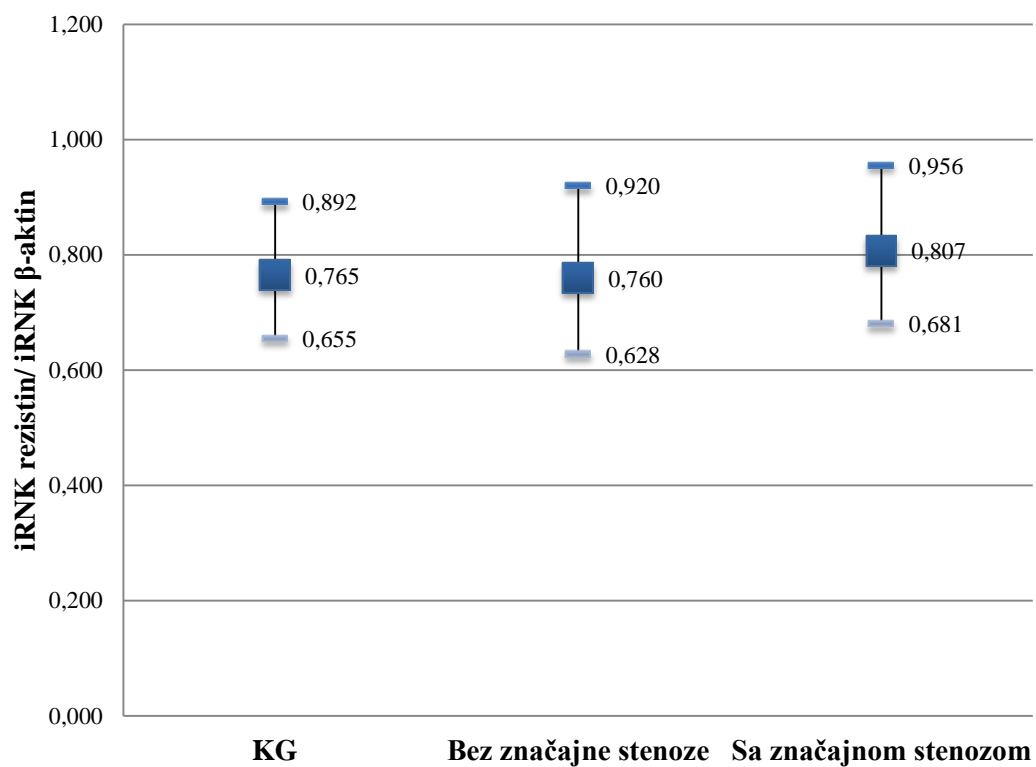
Parametar	Kontrolna grupa	Bez značajne stenoze	Sa značajnom stenozom	P
<i>Broj ispitanika</i>	27	42	24	/
<i>Pol (m/ž)</i>	12/15	15/27	18/6	0,008
<i>Starost, (godine)</i>	44 (27-56)	62 (32-80) ^{a***}	57 (45-74) ^{a***}	<0,001
<i>ITM, kg/m²</i>	24,8±3,9	26,0±3,3	28,6±4,1 ^{a**;} b*	0,002
<i>Pušački status (pušači/nepušači)</i>	8/19	6/36	12/12	0,008
<i>SP (mm Hg)</i>	120±11	121±15	123±14	0,864
<i>DP (mm Hg)</i>	78±8	79±10	75±8	0,160
<i>Kreatinin[#], μmol/L</i>	85 (81-89)	71 (65-78) ^{a**}	78 (71-85)	0,010
<i>Glukoza, mmol/L</i>	5,09±0,41	5,33±0,65	5,64±0,96 ^{a*}	0,024
<i>Insulin, μU/L#</i>	8,48 (7,26-9,91)	8,81 (7,41-10,47)	16,50 (12,38-22,01) ^{a***; b***}	<0,001
<i>HOMA-IR#</i>	1,91 (1,61-2,56)	2,16 (1,79-2,61)	4,12 (2,92-5,80) ^{a***; b***}	<0,001
<i>UH, mmol/L</i>	4,98±0,97	4,99±1,14	4,62±1,19	0,409
<i>HDL-H[#], mmol/L</i>	1,59 (1,44-1,75)	1,19 (1,10-1,29) ^{a***}	1,02 (0,89-1,15) ^{a***}	<0,001
<i>LDL-H[#], mmol/L</i>	2,95 (2,66-3,26)	2,98 (2,70-3,28)	2,76 (2,29- 3,34)	0,674
<i>TG[#], mmol/L</i>	1,20 (1,00-1,43)	1,43(1,24-1,65)	1,90 (1,56 2,32) ^{a**;} b*	0,002
<i>hsCRP, mg/L#</i>	1,07 (0,75-1,52)	2,66 (1,78-3,96) ^{a**}	4,39 (2,36-8,18) ^{a***}	<0,001
<i>IL-6, ng/L</i>	/	2,28 (1,48-3,64)	1,62 (1,29-5,56)	0,392
Lekovi (sa/bez terapije)				
<i>ACE-inhibitori</i>	/	27/15	18/6	0,532
<i>β-blokatori</i>	/	28/14	16/8	0,786
<i>Diuretici</i>	/	15/27	4/20	0,173
<i>Statini</i>	/	15/27	12/12	0,381

Vrednosti su testirane ANOVA i post-hock Tuckey testom; vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti±standardne devijacije; #- vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalima pouzdanosti; ||- poređenje je vršeno Chi-kvadrat testom; a-značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu; b- značajno različito u odnosu na grupu bez značajne stenoze; *-p<0.05; **-p<0.01; ***-p<0.001; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reactivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije;



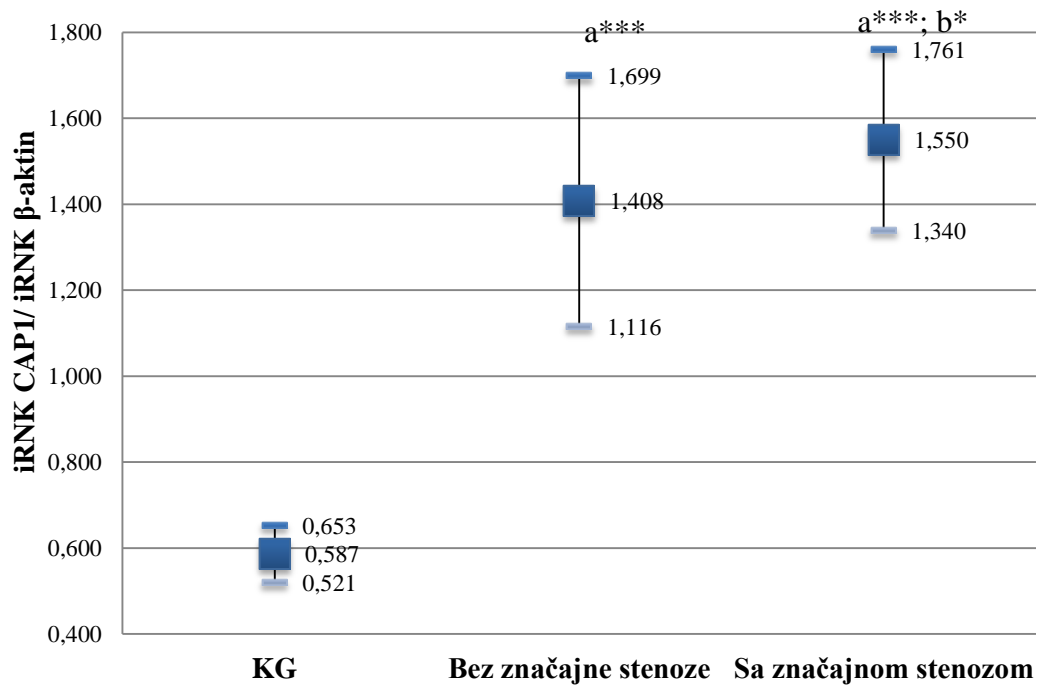
Slika 27. Koncentracija rezistina u plazmi kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG

Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti i testirane ANOVA testom, $p=0,011$
a-značajno različito u odnosu na KG; *- $p=0,047$; ** $p=0,013$



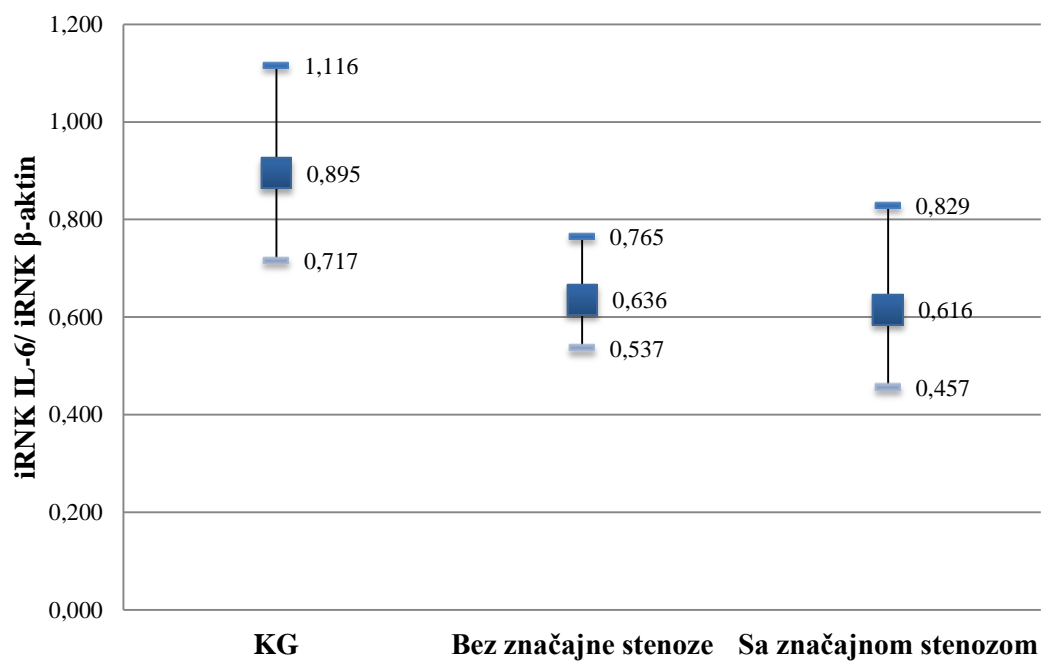
Slika 28. Normalizovane vrednosti nivoa iRNAK rezistina kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG

Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti i testirane ANOVA testom; $p=0,888$



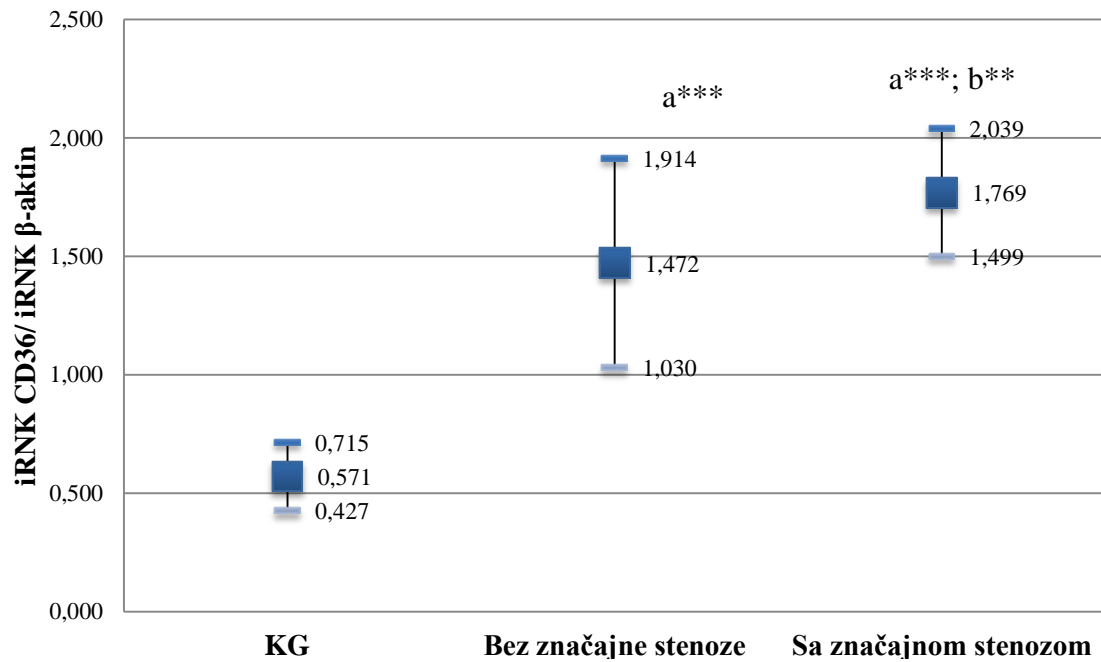
Slika 29. Normalizovane vrednosti nivoa iRNA CAP1 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG, $p < 0,001$

Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i testirane ANOVA testom; a-značajno različito u odnosu na KG; b-značajno različito u odnosu na grupu bez značajne stenozе; * $p = 0,043$; *** $p < 0,001$



Slika 30. Normalizovane vrednosti nivoa iRNA IL-6 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG

Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti i testirane ANOVA testom; $p=0,133$



Slika 31. Normalizovane vrednosti nivoa iRNA CD36 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG, $p < 0,001$

Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i testirane ANOVA testom; a-značajno različito u odnosu na KG; b-značajno različito u odnosu na grupu bez značajne stenozе; **- $p = 0,003$; ***- $p < 0,001$

4.2.1. Ispitivanje uticaja pola, pušačkog statusa i terapije na koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i na nivoe iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i CD36 kod pacijenata bez AKS i kontrolne grupe

Zbog nehomogene raspodele muškaraca i žena kao i pušača i nepušača, i KG i pacijenti su podeljeni prema polu i pušačkom statusu. Koncentracije IL-6 i rezistina u plazmi, kao i nivoi iRNK rezistina, CAP1, IL-6 i nisu pokazali značajne razlike između grupa (Tabela 16, 17), te možemo zaključiti da različita raspodela muškaraca i žena i pušača i nepušača nema značajnog uticaja na nivoe ispitivanih parametara. Nivoi iRNK CD36 su bili značajno veći kod pušača u odnosu na nepušače u KG, dok kod pacijenata ta razlika nije uočena (Tabela 17).

Nije uočena značajna razlika u nivoima ispitivanih parametara kod pacijenata koji su bili na određenoj terapiji (statinima, diureticima, β -blokatorima ili ACE-inhibitorima) u odnosu na pacijente koji nisu uzimali datu terapiju (rezultati nisu prikazani).

Tabela 16. Ispitivani parametri prema polu zdravih ispitanika i pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	KG			Pacijenti		
	Muškarci 12	Žene 15	p	Muškarci 33	Žene 33	p
<i>IL-6, ng/L#</i>	/	/	/	2,37 (1,35-4,05)	2,75 (1,15-5,01)	0,829
<i>Rezistin, μg/L #</i>	9,93 (8,36-11,84)	11,05 (8,62-14,08)	0,454	13,85 (12,19-15,75)	12,67 (10,30-15,70)	0,550
<i>N. iRNK Rezistina#</i>	0,784 (0,597-1,028)	0,744 (0,588-0,940)	0,571	0,893 (0,706-0,885)	0,767 (0,523-0,887)	0,759
<i>N. iRNK CASP1</i>	0,573±0,139	0,570±0,154	0,671	1,518±0,260	1,401±0,275	0,196
<i>N. iRNK IL-6#</i>	1,025 (0,638-1,644)	1,009 (0,709-1,435)	0,927	0,402 (0,262-0,619)	0,687 (0,531-0,888)	0,076
<i>N. iRNK CD36</i>	0,593±0,065	0,582±0,069	0,959	1,671±0,423	1,489±0,386	0,072

Vrednosti su testirane Student-ovim t-testom i prikazane kao srednje vrednosti±standardne devijacije; #- vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalima pouzdanosti

N.-normalizovani nivoi

Tabela 17. Ispitivani parametri prema pušačkom statusu zdravih ispitanika i pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	KG			Pacijenti		
	Nepušači 19	Pušači 8	p	Nepušači 48	Pušači 18	p
<i>IL-6, ng/L#</i>	/	/	/	2,18 (1,27-3,28)	2,62 (1,11-4,32)	0,897
<i>Rezistin, μg/L #</i>	10,37 (8,74-12,22)	11,08 (7,70-15,95)	0,673	13,53 (12,02-15,23)	13,59 (11,77-15,69)	0,968
<i>N. iRNK Rezistina#</i>	0,752 (0,622-0,911)	0,796 (0,499-1,270)	0,750	0,754 (0,645-0,881)	0,805 (0,588-1,102)	0,483
<i>N. iRNK CAP1</i>	0,594±0,072	0,569±0,052	0,392	1,476±0,267	1,415±0,387	0,432
<i>N. iRNK IL-6#</i>	0,958 (0,729-1,258)	1,070 (0,543-2,108)	0,688	0,594 (0,462-0,762)	0,342 (0,439-0,843)	0,440
<i>N. iRNK CD36</i>	0,531±0,137	0,677±0,119	0,023	1,571±0,411	1,604±0,425	0,772

*Vrednosti su testirane Student-ovim t-testom i prikazane kao srednje vrednosti±standardne devijacije; #- vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalima pouzdanosti
N.-normalizovani nivoi*

4.2.2. Ispitivanje povezanosti rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata bez AKS i zdravih ispitanika

U cilju ispitivanja međusobne povezanosti ispitivanih parametara kao i njihove povezanosti sa lipidnim i nelipidnim faktorima za razvoj ateroskleroze kod pacijenata i zdravih ispitanika, sprovedena je *Pearson*-ova korelaciona analiza.

4.2.2.1. Korelacije rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod zdravih ispitanika

U grupi zdravih ispitanika, koncentracije rezistina u plazmi su značajno pozitivno korelirale sa koncentracijama insulina, vrednostima HOMA-IR indeksa, koncentracijama TG i sa nivoima iRNK rezistina. Nivoi iRNK rezistina su značajno pozitivno korelirali sa koncentracijama TG i rezistina u plazmi (Tabela 18). Uočena je i pozitivna korelacija između nivoa iRNK CAP1 i CD36 (Tabela 19).

Tabela 18. Korelacije rezistina u plazmi i normalizovanih vrednosti iRNK rezistina sa ostalim parametrima kod zdravih ispitanika

<i>Parametar</i>	Rezistin, ng/mL		Normalizovane vrednosti iRNK rezistina	
	r	p	r	P
<i>Starost, (godine)</i>	-0,227	0,220	-0,153	0,396
<i>ITM, kg/m²</i>	0,112	0,549	0,193	0,281
<i>SP (mm Hg)</i>	0,190	0,324	0,183	0,324
<i>DP (mm Hg)</i>	0,152	0,432	0,355	0,050
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,053	0,777	0,076	0,676
<i>Glukoza, mmol/L</i>	0,183	0,325	0,332	0,059
<i>Insulin, μU/L</i>	0,499	0,018	0,326	0,120
<i>HOMA IR</i>	0,546	0,009	0,377	0,070
<i>UH, mmol/L</i>	0,133	0,475	0,137	0,448
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,292	0,111	0,014	0,939
<i>LDL-H, mmol/L</i>	0,198	0,287	0,024	0,898
<i>TG, mmol/L</i>	0,524	0,003	0,350	0,046
<i>hsCRP, mg/L</i>	0,185	0,320	0,032	0,860
<i>Rezistin, μg/L</i>	/	/	0,459	0,009
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,459	0,009	/	/
<i>Normalizovana iRNK CAPI</i>	0,058	0,788	0,068	0,743
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	0,260	0,190	-0,044	0,822
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,184	0,379	0,213	0,287

Podaci su analizirani Pearson-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak;UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije

Tabela 19. Korelacije normalizovanih vrednosti iRNK CAP1 i CD36 sa sa ostalim parametrima kod zdravih ispitanika

<i>Parametar</i>	Normalizovane vrednosti iRNK CAP1		Normalizovane vrednosti iRNK CD36	
	r	p	r	P
<i>Starost, (godine)</i>	-0,017	0,936	-0,296	0,134
<i>ITM, kg/m²</i>	-0,007	0,972	-0,041	0,840
<i>SP (mm Hg)</i>	0,275	0,193	-0,016	0,940
<i>DP (mm Hg)</i>	0,199	0,351	0,072	0,731
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,244	0,230	-0,053	0,792
<i>Glukoza, mmol/L</i>	0,367	0,065	0,112	0,578
<i>Insulin, μU/L</i>	-0,274	0,196	-0,111	0,605
<i>HOMA IR</i>	-0,174	0,417	-0,066	0,760
<i>UH, mmol/L</i>	0,145	0,481	0,110	0,584
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,096	0,643	-0,149	0,457
<i>LDL-H, mmol/L</i>	0,344	0,093	0,133	0,517
<i>TG, mmol/L</i>	0,196	0,337	0,131	0,516
<i>hsCRP, mg/L</i>	0,062	0,764	0,153	0,447
<i>Rezistin, μg/L</i>	0,058	0,788	0,184	0,379
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,068	0,743	0,213	0,287
<i>Normalizovana iRNK CAP1</i>	/	/	0,447	0,022
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	-0,091	0,687	-0,319	0,138
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,447	0,022	/	/

Podaci su analizirani Perason-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak;UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije

4.2.2.2. Korelacije rezistina u plazmi, normalizovanih vrednosti iRNK rezistina, CAP1 i CD36 sa lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata bez AKS

U grupi pacijenata, koncentracije rezistina su bile u pozitivnoj korelaciji sa nivoima iRNK rezistina i sa koncentracijama kreatinina. Uočena je i značajna negativna korelacija između koncentracija rezistina u plazmi i vrednosti ITM i UH. Nivoi iRNK rezistina su značajno pozitivno korelirali sa koncentracijama kreatinina, dok je korelacija na granici statističke značajnosti uočena sa normalizovanim nivoima iRNK CD36 i sa vrednostima ITM (Tabela 20).

Normalizovani nivoi iRNK CAP1 su pokazali pozitivnu korelaciju sa koncentracijama glukoze, TG, vrednostima ITM i HOMA-IR indeksa i sa normalizovanim nivoima iRNK CD36, a negativnu sa godinama starosti ispitanika. Normalizovani nivoi iRNK CD36 su pozitivno korelirali sa vrednostima ITM, koncentracijama kreatinina i hsCRP-a. Negativna korelacija je uočena između nivoa iRNK CD36 i godina starosti ispitanika, kao i koncentracija TG i HDL-H (Tabela 21).

Tabela 20. Korelacije rezistina u plazmi i normalizovanih vrednosti iRNK rezistina sa ostalim parametrima kod pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	Rezistin u plazmi		Normalizovane vrednosti iRNK rezistina	
	r	p	r	P
<i>Starost, (godine)</i>	0,123	0,320	0,004	0,976
<i>ITM, kg/m²</i>	-0,254	0,034	-0,238	0,053
<i>SP (mm Hg)</i>	-0,223	0,077	-0,004	0,974
<i>DP (mm Hg)</i>	-0,185	0,143	0,082	0,515
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,456	<0,001	0,364	0,002
<i>Glukoza, mmol/L</i>	0,006	0,964	-0,063	0,616
<i>Insulin, μU/L</i>	-0,062	0,651	0,017	0,902
<i>HOMA IR</i>	-0,123	0,373	-0,051	0,713
<i>UH, mmol/L</i>	-0,286	0,021	-0,050	0,688
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,169	0,171	-0,139	0,264
<i>LDL-H, mmol/L</i>	-0,109	0,389	-0,145	0,232
<i>TG, mmol/L</i>	0,009	0,944	-0,017	0,889
<i>hsCRP, mg/L</i>	0,024	0,848	0,027	0,831
<i>IL-6, ng/L</i>	0,038	0,833	0,069	0,702
<i>Rezistin, μg/L</i>	/	/	0,298	0,014
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,298	0,014	/	/
<i>Normalizovana iRNK CAP1</i>	0,068	0,596	-0,031	0,803
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	-0,089	0,486	0,039	0,759
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,112	0,376	0,237	0,055

Podaci su analizirani Pearson-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije

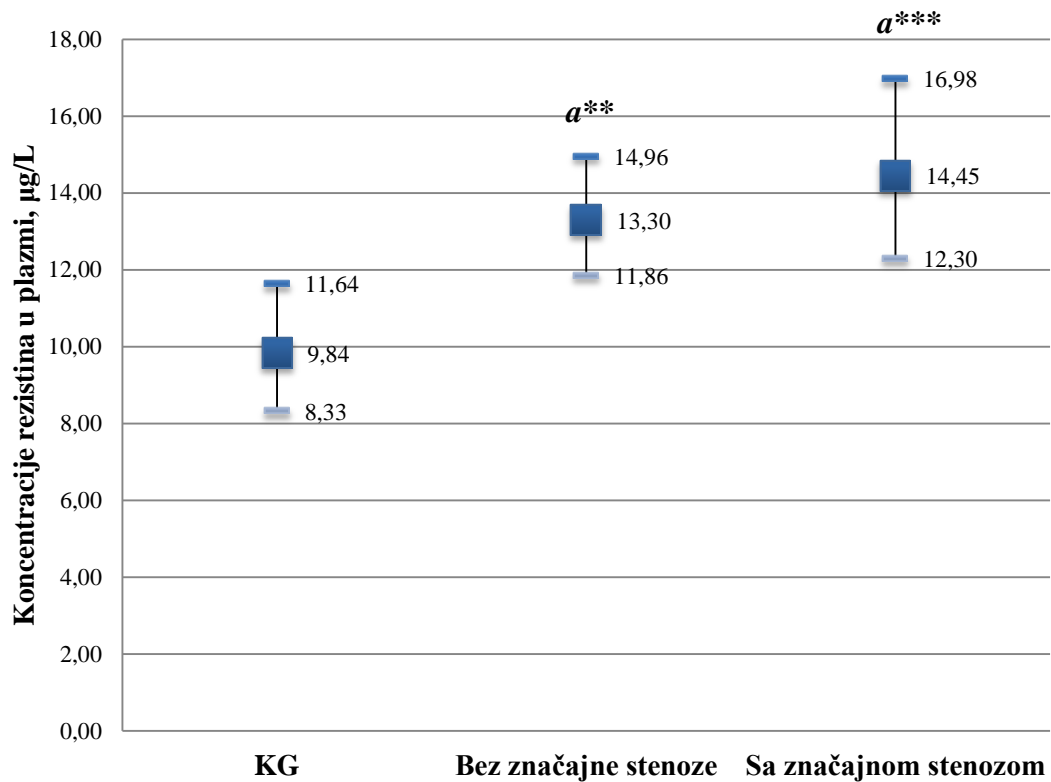
Tabela 21. Korelacije normalizovanih vrednosti iRNK CAP1 i CD36 sa ostalim parametrima kod pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	Normalizovane vrednosti iRNK CAP1		Normalizovane vrednosti iRNK CD36	
	r	p	r	P
<i>Starost, (godine)</i>	-0,206	0,096	-0,277	0,024
<i>ITM, kg/m2</i>	0,328	0,008	0,278	0,026
<i>SP (mm Hg)</i>	0,022	0,862	-0,002	0,985
<i>DP (mm Hg)</i>	-0,206	0,098	-0,135	0,281
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,173	0,165	0,396	0,001
<i>Glukoza, mmol/L</i>	0,338	0,007	0,014	0,912
<i>Insulin, μU/L</i>	0,235	0,090	0,263	0,057
<i>HOMA IR</i>	0,308	0,025	0,208	0,135
<i>UH, mmol/L</i>	-0,026	0,840	-0,255	0,042
<i>HDL-H, mmol/L</i>	-0,044	0,726	-0,354	0,004
<i>LDL-H, mmol/L</i>	0,011	0,934	-0,100	0,432
<i>TG, mmol/L</i>	0,440	<0,001	0,135	0,279
<i>hsCRP, mg/L</i>	-0,077	0,547	0,294	0,018
<i>IL-6, ng/L</i>	-0,264	0,138	-0,108	0,549
<i>Rezistin, μg/L</i>	0,068	0,596	0,113	0,372
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	-0,031	0,803	0,237	0,055
<i>Normalizovana iRNK CAP1</i>	/	/	0,483	<0,001
<i>Normalizovana iRNK IL-6</i>	0,109	0,386	-0,112	0,376
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,483	<0,001	/	/

Podaci su analizirani Pearson-ovom korelacionom analizom; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije

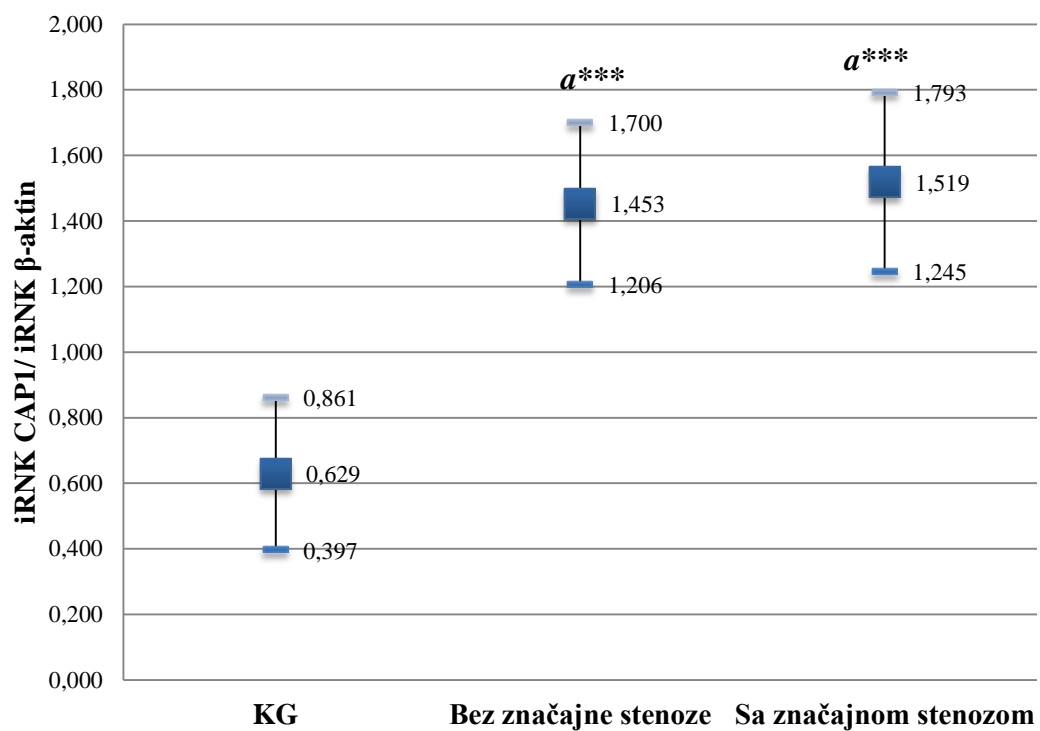
4.2.3. Otklanjanje uticaja pridruženih faktora na koncentracije rezistina, normalizovane nivoe iRNK CAP1 i CD36 kod pacijenata sa i bez značajne stenoze i zdravih ispitanika analizom kovarijanse

Analizom kovarijanse izvršeno je i korigovanje vrednosti parametara kod pacijenata sa i bez značajne stenoze i zdravih ispitanika za odgovarajuće pridružene faktore, tj. kovarijante. Nakon korekcije koncentracija rezistina za godine starosti ispitanika, ITM, kreatinin i UH, uočene razlike između ispitivanih grupa su bile veće (Slika 32). Takođe, nakon korekcije normalizovanih nivoa iRNK CAP1 za godine starosti ispitanika, ITM, glukozu, TG i HOMA IR indeks, razlike između obe grupe pacijenata i KG su ostale značajne, dok se uočena značajna razlika između pacijenata sa značajnom stenozom i bez značajne stenoze izgubila (Slika 33). Nakon korekcije normalizovanih nivoa iRNK CD36 za godine, ITM, HDL-H i hsCRP i za vrednost kreatinina razlika između pacijenata sa i bez značajne stenoze je bila na granici statističke značajnosti (slika 34).



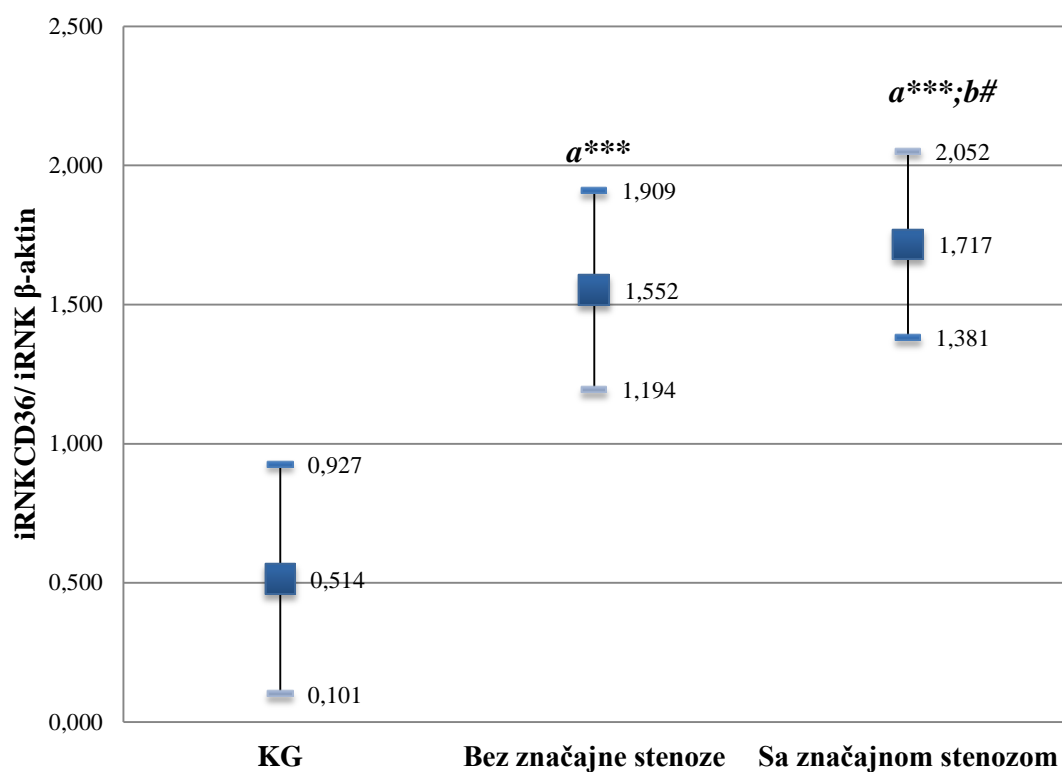
Slika 32. Koncentracija rezistina u plazmi kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG nakon korekcije za godine, ITM, kreatinin i UH

Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti analizom kovarijance (ANCOVA), $p=0,008$; a -značajno različito u odnosu na KG; **- $p=0.009$; *** $p=0,003$



Slika 33. Normalizovani nivoi iRNA CAP1 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG nakon korekcije za godine, ITM, glukozu, TG, i HOMA IR indeks

*Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i testirane analizom kovarijansa (ANCOVA); a-značajno različito u odnosu na KG; ***p<0,001*



Slika 34. Normalizovani nivoi iRNK CD36 kod pacijenata sa i bez značajne stenozе i KG nakon korekcije za godine, ITM, HDL-H, kreatinin i hsCRP

Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i testirane analizom kovarijanse (ANCOVA); a-značajno različito u odnosu na KG; b-značajno različito u odnosu na grupu bez značajne stenozе; #- $p=0.052$; ***- $p<0.001$

4.2.4. Određivanje sadržaja malih HDL i malih, gustih LDL čestica kod pacijenata bez AKS

U cilju ispitivanja povezanosti novih lipidnih faktora rizika za razvoj ateroskleroze sa ispitivanim parametrima, kod pacijenata bez AKS su dodatno određeni i dijametri HDL i LDL čestica, kao i relativni sadržaji malih HDL i malih, gustih LDL čestica u plazmi. Ovi pacijenti su podeljeni u dve grupe prema procentualnoj zastupljenosti malih, gustih LDL čestica (Tabela 22). Utvrđeno je da su pacijenti sa sadržajem malih, gustih LDL čestica <50% imali značajno niže vrednosti kreatinina i glukoze u odnosu na ispitanike sa sadržajem malih, gustih LDL čestica $\geq 50\%$ (Tabela 22). Takođe pacijenti sa većim sadržajem malih, gustih LDL čestica ($\geq 50\%$) su imali značajno više koncentracije rezistina u plazmi (Slika 35) kao i značajno više nivoe iRNK rezistina (Slika 36) u odnosu na pacijente sa manjim procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica (<50%).

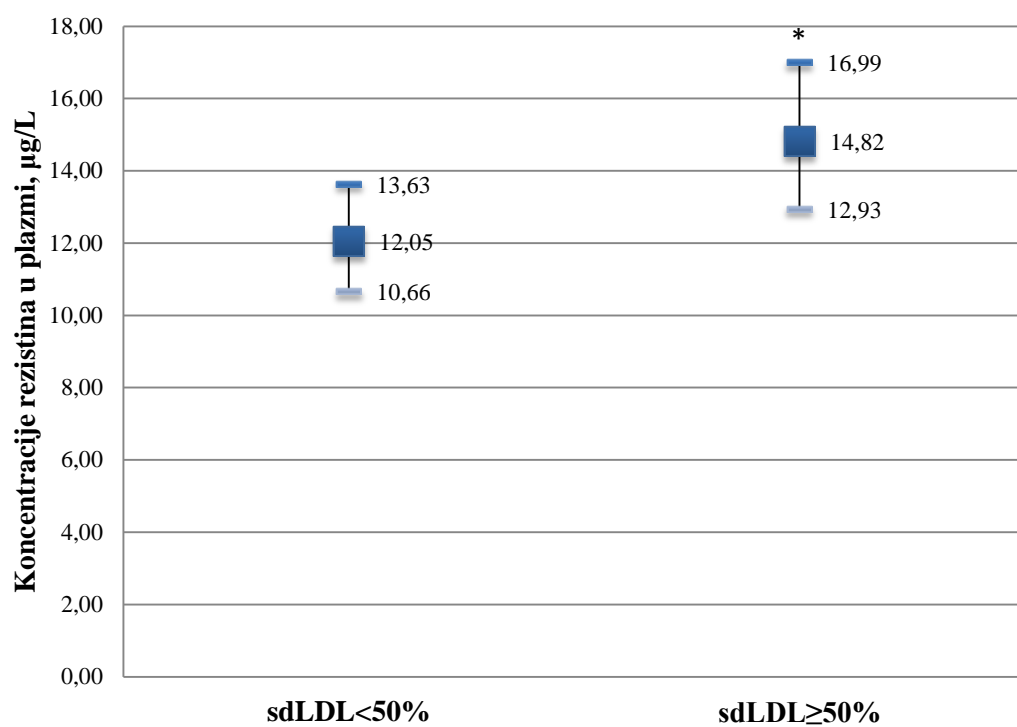
Rezultati Pearson-ove korelacione analize su prikazani u Tabelama 23 i 24. Utvrđeno je da su normalizovani nivoi iRNK rezistina negativno korelirali sa dijametrom LDL čestica i pozitivno sa procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica (Tabela 23).

Tabela 22. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata bez AKS podjeljenih prema relativnom sadržaju malih, gustih LDL čestica

<i>Parametar</i>	<i>sdLDL<50%</i>	<i>sdLDL≥50%</i>	P
<i>Broj ispitanika</i>	27	38	/
<i>Sa/bez značajne stenozе</i>	10/17	14/24	0,878
<i>Pol (m/%)</i>	13/14	19/19	0,917
<i>Starost, (godine)</i>	59(33-80)	61(32-82)	0,392
<i>ITM, kg/m²</i>	26,2±3,4	26,9±3,8	0,422
<i>SP (mm Hg)</i>	119±12	121±15	0,624
<i>DP (mm Hg)</i>	70±8	77±10	0,865
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	67 (62-73)	79 (71-87)	0,022
<i>Glukoza, mmol/L</i>	5,11±0,62	5,65±0,81	0,011
<i>Insulin, μU/L#</i>	10,26 (8,36-12,59)	11,55 (8,93-14,92)	0,466
<i>HOMA-IR#</i>	2,47 (2,02-3,03)	2,92 (2,17-3,93)	0,357
<i>UH, mmol/L</i>	4,99±1,14	4,79±1,19	0,517
<i>LDL-H, mmol/L#</i>	2,87 (2,47-3,34)	2,79 (2,43-3,20)	0,218
<i>HDL-H, mmol/L</i>	1,18±0,34	1,20±0,28	0,794
<i>TG, mmol/L#</i>	1,43 (1,21-1,69)	1,60 (1,34-1,91)	0,366
<i>Dijametar LDL čestica, nm</i>	26,6±1,2	25,4±1,5	0,002
<i>Dijametar HDL čestica, nm</i>	9,70±0,91	9,31±1,00	0,111
<i>Male HDL čestice, %</i>	31,18±4,72	34,97±9,06	0,032
<i>hsCRP, mg/L#</i>	1,91 (1,55-4,35)	3,56 (2,27-5,60)	0,494
<i>IL-6, ng/L#</i>	1,36 (1,08-3,77)	1,67(1,21-3,93)	0,803
<i>Normalizovana iRNK CAPI</i>	1,447±0,233	1,471±0,310	0,738
<i>Normalizovana iRNK IL-6#</i>	0,488 (0,303-0,787)	0,548 (0,392-0,765)	0,504
<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	1,633±0,438	1,558±0,399	0,484
Lekovi (sa/bez terapije)			
<i>ACE-inhibitori</i>	20/7	27/11	0,999
<i>β-blokatori</i>	21/6	26/12	0,583
<i>Diuretici</i>	8/19	9/29	0,802
<i>Statini</i>	10/17	17/21	0,715

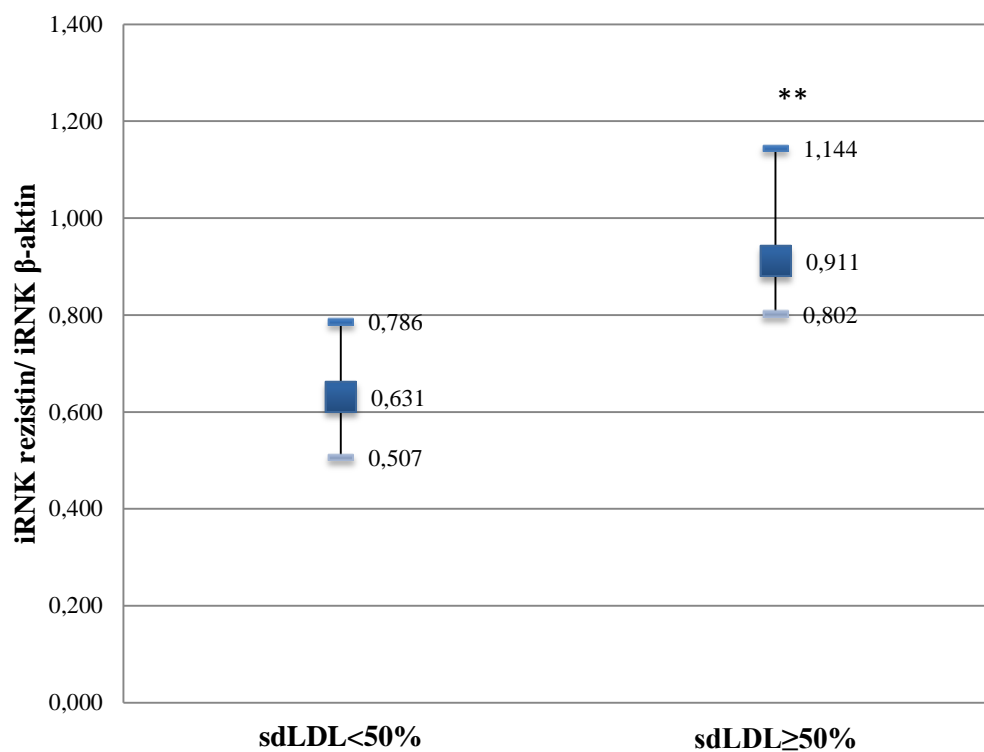
Vrednosti su testirane Student-ovim t-testom i prikazane kao srednje vrednosti±standardne devijacije; #-vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalima pouzdanosti;||-p<0,05 poređenje je vršeno Chi-kvadrat testom

sdLDL-male, guste LDL čestice; ITM-indeks telesne mase; SP- Sistolni krvni pritisak; DP- Dijastolni krvni pritisak; UH-ukupni holesterol; HDL-H- holesterol u lipoproteinima visoke gustine; LDL-H- holesterol u lipoproteinima niske gustine; Tg-trigliceridi; hsCRP- C-reaktivni protein visoke osetljivosti; HOMA-IR- HOMA indeks insulinske rezistencije;



Slika 35. Koncentracija rezistina u plazmi kod pacijenata bez AKS prema sadržaju malih, gustih LDL čestica

*Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti i testirane Student-ovim t-testom, * $p=0,031$; sdLDL-male, guste LDL čestice;*



Slika 36. Normalizovane vrednosti nivoa iRNK rezistina kod pacijenata prema sadržaju malih, gustih LDL čestica

Vrednosti su prikazane kao geometrijske sredine sa 95% intervalom pouzdanosti i testirane Student-ovim t-testom, ** $p=0,004$; sdLDL-male, guste LDL čestice;

Tabela 23. Korelacije rezistina u plazmi i normalizovanih vrednosti iRNK rezistina sa dijametrima LDL i HLD čestica, kao i sa procentualnim udelom malih, gustih LDL, tj. malih HDL-čestica kod pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	Rezistin u plazmi, µg/L		Normalizovane vrednosti iRNK rezistina	
	r	p	r	P
<i>Dijametar HDL čestica, nm</i>	-0,146	0,252	-0,225	0,071
<i>Male HDL čestice, %</i>	0,001	0,996	0,214	0,087
<i>Dijametar LDL čestica, nm</i>	-0,085	0,507	-0,273	0,028
<i>Male, guste LDL čestice, %</i>	0,197	0,121	0,271	0,029

Tabela 24. Korelacije normalizovanih vrednosti iRNK CAP1 i CD36 dijametrima LDL i HLD čestica, kao i sa procentualnim udelom malih, gustih LDL, tj. malih HDL-čestica kod pacijenata bez AKS

<i>Parametar</i>	Normalizovane vrednosti iRNK CAP1		Normalizovane vrednosti iRNK CD36	
	r	p	r	P
<i>Dijametar HDL čestica, nm</i>	-0,094	0,465	-0,154	0,229
<i>Male HDL čestice, %</i>	0,052	0,685	0,132	0,301
<i>Dijametar LDL čestica, nm</i>	-0,027	0,832	0,241	0,057
<i>Male, guste LDL čestice, %</i>	0,117	0,361	-0,062	0,629

4.2.5. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa normalizovanim nivoima iRNK rezistina, CAP1 i CD36 kod pacijenata bez AKS i zdravih ispitanika

U cilju ispitivanja doprinosa nezavisnih prediktora koncentracijama rezistina u krvi, nivoima iRNK rezistina, CAP1 i CD36 u grupi pacijenata bez AKS i u grupi zdravih ispitanika, izvršena je višestruka linearna regresiona analiza.

Utvrđeno je da 30% varijacije u koncentracijama rezistina u krvi kod pacijenata potiče od varijacija u koncentracijama kreatinina i UH u krvi (Tabela 25).

Višestruka linearna regresiona analiza je primenjena i za ispitivanje doprinosa nezavisnih prediktora koncentracijama rezistina u krvi kod zdravih ispitanika, međutim ni u jednom modelu (model 1: insulin, TG, iRNK rezistina; model 2: HOMA-IR, TG, iRNK rezistina) nije postojao značajan prediktor koncentracija rezistina.

Utvrđeno je da je nezavisni prediktor nivoa iRNK rezistina dijametar LDL čestica (Tabela 26, model 1), tj. dijametar LDL čestica i nivoi iRNK CD36, pri čemu 19% varijacije u nivou iRNK rezistina potiče od varijacija u dijamentru LDL čestica i nivoima CD36 molekula (Tabela 26, model 2).

Kao značajni nezavisni prediktori nivoa iRNK CAP1 su se pokazali nivoi iRNK CD36 kao i koncentracija TG (Tabela 27), koji doprinose varijaciji od 35% u nivoima iRNK CAP1.

Takođe, kao nezavisni prediktori nivoa iRNK CD36 izdvojeni su hsCRP, kreatinin i nivoi iRNK CAP1, doprinoseći varijaciji od 50% u nivoima iRNK CD36 (Tabela 28).

Tabela 25. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa koncentracijama rezistina u krvi

<i>Nezavisna promenljiva</i>	Koncentracije rezistina u krvi: R²=0,356; adjR²=0,298		
	β	p	VIF
<i>ITM, kg/m²</i>	-0,207	0,072	1,099
<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,330	0,006	1,132
<i>UH, mmol/L</i>	-0,252	0,026	1,046
<i>SP (mm Hg)</i>	-0,190	0,089	1,035
<i>Normalizovana iRNK rezistina</i>	0,169	0,153	1,173

ITM-indeks telesne mase; *UH*-ukupni holesterol; *SP*-sistolni pritisak; *adjR²*- korigovani R² za model; *β*- standardizovani koeficijenti; *VIF*- faktor rasta varijanse (variance inflation factor)

Tabela 26. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa normalizovanom iRNK rezistina

	<i>Nezavisna promenljiva</i>	Normalizovana iRNK rezistina		
		β	p	VIF
Model 1 R²=0,258 adjR²=0,190	<i>ITM, kg/m²</i>	-0,230	0,069	1,140
	<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,190	0,170	1,381
	<i>Dijametar LDL čestica</i>	-0,269	0,026	1,026
	<i>Dijametar HDL čestica</i>	-0,093	0,454	1,121
	<i>Rezistin, μg/L</i>	0,105	0,449	1,401
Model 2 R²=0,279 adjR²=0,192	<i>ITM, kg/m²</i>	-0,212	0,138	1,375
	<i>Kreatinin, μmol/L</i>	0,010	0,948	1,572
	<i>Dijametar LDL čestica</i>	-0,412	0,002	1,144
	<i>Dijametar HDL čestica</i>	0,000	0,998	1,117
	<i>Rezistin, μg/L</i>	0,156	0,283	1,433
	<i>Normalizovana iRNK CD36</i>	0,302	0,048	1,541

adjR²- korigovani R² za model; *β*- standardizovani koeficijenti; *VIF*- faktor rasta varijanse (variance inflation factor)

Tabela 27. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa normalizovanom iRNK CAP1

Nezavisna promenljiva	Normalizovane vrednosti iRNK CAP1: $R^2=0,432$; $adjR^2=0,352$		
	β	p	VIF
Starost, (godine)	0,007	0,957	1,199
ITM, kg/m ²	0,117	0,472	1,953
Glukoza, mmol/L	0,126	0,417	1,799
Insulin, μ U/L	-0,150	0,332	1,768
TG, mmol/L	0,410	0,010	1,758
Normalizovana iRNK CD36	0,383	0,005	1,273

ITM-indeks telesne mase; Tg-trigliceridi; $adjR^2$ - korigovani R^2 za model; β - standardizovani koeficijenti; VIF- faktor rasta varijanse (variance inflation factor)

Tabela 28. Višestruka linearna regresiona analiza za ispitivanje povezanosti određivanih parametara sa normalizovanom iRNK CD36

Nezavisna promenljiva	Normalizovana iRNK CD36: $R^2=0,598$; $adjR^2=0,505$		
	β	p	VIF
Starost, godine	-0,215	0,075	1,340
ITM, kg/m ²	0,167	0,224	1,784
Kreatinin, μ mol/L	0,296	0,013	1,260
Insulin, μ U/L	-0,038	0,785	1,817
HDL-H, mmol/L	-0,135	0,268	1,400
Dijametar LDL čestica, nm	0,152	0,184	1,229
hsCRP, mg/L	0,277	0,037	1,609
Normalizovana iRNK rezistina	0,161	0,179	1,342
Normalizovana iRNK CAP1	0,305	0,014	1,354

$adjR^2$ - korigovani R^2 za model; β - standardizovani koeficijenti; VIF- faktor rasta varijanse (variance inflation factor)

5. Diskusija

IBS predstavlja i dalje jedan od glavnih uzroka smrtnosti u razvijenim zemljama. Ono što je zabrinjavajuće je da i pored napretka u otkrivanju novih biomarkera i razvoja savremenih dijagnostičkih metoda za vizualizaciju krvnih sudova, koji zajedno omogućavaju pravovremenu i pravilniju dijagnozu bolesti, trend smrtnosti od ove bolesti u konstantnom porastu već skoro tri decenije (1). Tokom poslednjih godina, stav naučne javnosti je da ateroskleroza ne predstavlja puku bolest prekomernog skladištenja holesterola, već jedno multifaktorsko oboljenje, u čijem razvoju inflamacija ima presudnu ulogu (1, 4-7). U velikom broju slučajeva stepen i morfološko prisustvo stenoza koje ometaju protok kroz krvne sudove ne predviđaju dovoljno dobro ishod bolesti, odnosno njene kliničke komplikacije, jer najveća opasnost aterosklerotskog plaka potiče od njegove dinamičke nestabilnosti, određene proinflamatornim procesima koji se dešavaju unutar samog plaka (6). Utvrđeno je da u AKS nepovoljan klinički ishod predviđaju povišene vrednosti markera inflamacije u krvi, jer je uzrok koronarne nestabilnosti kod svih pacijenata sa AKS upravo aktivacija inflamatornih ćelija u kritičnom aterosklerotskom plaku (9,11). Iz tog razloga je od presudnog značaja ispitivanje molekularnih i ćelijskih mehanizama koji doprinose razvoju inflamacije u aterosklerozi sa aspekta dijagnostičke, prognostičke i terapijske vrednosti.

Iako otkriven pre skoro 2 decenije (39), funkcija koju rezistin ima u humanom organizmu nije još uvek do kraja rasvetljena, što zbog nemogućnosti translacije podataka o ovom proteinu sa miševa i pacova na humani organizam (39, 46-50), što zbog relativno kasnog otkrivanja receptora za humani rezistin (66). Identifikovanje glavnih mesta sinteze i sekrecije humanog rezistina omogućilo je dalje ispitivanje funkcije ovog proteina. *In vitro* i *in vivo* studije su nedvosmisleno pokazale da rezistin u humanom organizmu ima ulogu proinflamatornog citokina (46-49). Interesovanje naučne javnosti za ulogu koju ovaj protein može imati u razvoju ateroskleroze upravo je proisteklo iz njegove sposobnosti da stimuliše proinflamatorne procese, koji predstavljaju osnovu za razvoj ove bolesti (1-11). Iako je njegov doprinos aterosklerozi potvrđen brojnim *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (53-63), kliničke studije koje su izvedene do sada navodile su različite zaključke vezane za ulogu ovog proteina u IBS i njegovoj upotrebi kao dijagnostičkog i prognostičkog biomarkera (58, 72-79).

U ovom istraživanju prvi put je opisana genska ekspresija CAP1 i rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, zajedno sa rezistinom u plazmi kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika. Takođe, u ovom istraživanju prvi put je opisana povezanost genske ekspresije CAP1 i rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, i genske ekspresije CD36 receptora čistača, kao i njihova povezanost sa tradicionalnim i sa novijim faktorima rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa ishemijskom bolesti srca i zdravih ispitanika.

In vitro studije su nedvosmisleno pokazale da rezistin može doprineti svim fazama razvoja aterosklerotskog plaka, od endotelne disfunkcije do destabilizacije plaka (53-63). U prilog tome govore i rezultati ove studije, koji su pokazali da je rezistin u krvi povišen kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na ulogu koju ovaj protein ima u razvoju IBS (Slike 22, 27 i 32). Iako je i u brojnim kliničkim studijama ukazano na povezanost povišenih koncentracija rezistina u krvi i kako prisustva tako i stadijuma IBS (58, 72, 73), određena istraživanja su imala i kontradiktorne rezultate (74). Ipak, najnovijom meta-analizom je utvrđeno da povišene koncentracije rezistina u krvi predstavljaju povišen rizik za kardiovaskularnu smrtnost (79). Takođe, koncentracije rezistina kod pacijenata sa AKS su bile više u odnosu na pacijente sa SAP i u odnosu na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе (Slika 22). Studije koje su se bavile ispitivanjem povezanosti rezistina sa kliničkim manifestacijama IBS su pokazale da pacijenti sa nestabilnom anginom pectoris imaju povišene koncentracije rezistina u krvi u odnosu na pacijente sa stabilnom anginom pectoris (75). Qiao i saradnici su pokazali da su koncentracije rezistina u plazmi više kod pacijenata sa AIM, NAP i SAP u odnosu na zdrave ispitanike (76), dok su Lubos i saradnici takođe pokazali da pacijenti sa AKS imaju povišene koncentracije rezistina u plazmi i ukazali na njegovu potencijalnu dijagnostičku vrednost (77).

Bitno je istaći da su nivoi rezistina u krvi, odnosno njegov metabolizam zavisni od bubrežne funkcije, što sugerišu i rezultati naše studije, obzirom da je rezistin bio u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa vrednostima serumskog kreatinina (Tabela 12), i da je kreatinin bio jedan od nezavisnih prediktora koncentracija rezistina u krvi u grupi pacijenata bez AKS (Tabela 25). Ovi rezultati su u skladu i sa drugim studijama, gde je uočeno da su koncentracije rezistina u obrnutoj korelaciji sa brzinom glomerularne filtracije kod pacijenata sa hroničnom bolesti bubrega (84). Zbog toga bi vrednosti

rezistina trebalo tumačiti u skladu sa koncentracijama kreatinina u krvi, tj. sa jačinom glomerularne filtracije.

Takođe, u ovoj studiji je uočena i pozitivna korelacija rezistina u plazmi i nivoa iRNK rezistina kod obe grupe pacijenata (u grupi pacijenata sa AKS, SAP i bez anginoznih tegoba i značajne stenozе, Tabela 12, i u grupi pacijenata bez AKS, Tabela 20) i u kontrolnoj grupi (Tabela 18). Mezaghi i saradnici su takođe uočili povezanost ova dva parametra kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 (85), dok su Tsiotra i saradnici pokazali istu vezu između rezistina u plazmi i genske ekspresije rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi obogaćenih monocitima kod žena sa dijabetesom tip 2 (80). Ipak, i pored povišenih nivoa rezistina u plazmi kod pacijenata, nivoi iRNK rezistina u ovoj studiji se nisu razlikovali između ispitivanih grupa (Slike 23 i 28). Iako se ne može potceniti doprinos sinteze i sekrecije rezistina iz mononuklearnih ćelija periferne krvi ukupnim koncentracijama rezistina u plazmi, drugi faktori, pored bubrežne funkcije, mogu imati dodatni uticaj na njegove konačne nivoe u plazmi. Naime, pokazano je da se rezistin lokalno sintetiše i sekretuje iz makrofaga koje infiltriraju aterosklerotske plakove u velikoj količini, gde svoje proinflamatorne i proaterogene efekte ostvaruje autokrinim i parakrinim putem (63), a smatra se da je upravo aktivacija inflamatornih ćelija u kritičnom aterosklerotskom plaku uzrok koronarne nestabilnosti kod svih pacijenata sa AKS (6). Takođe, određene studije su pokazale da rezistin može doprineti aterotrombozi stimulacijom ekspresije tkivnog faktora, na taj način predstavljajući efektorski molekul koji indukuje protrombogeni fenotip u ćelijama zida krvnog suda (58). Na ovakav način, rezistin bi mogao da doprinese kompleksnim intravaskularnim inflamatornim i protrombogenim odgovorima koji su glavne komponente koje doprinose dinamičkoj nestabilnosti aterosklerotskog plaka i predstavljaju osnovu za razvoj kliničkih sindroma koji uključuju NAP i AIM. To bi moglo da objasni zašto je, i pored nepromenjenih nivoa iRNK rezistina, njegova koncentracija bila povišena kod pacijenata sa AKS: tokom destabilizacije plaka, koja se dešava u NAP i AIM, rezistin bi dodatno mogao da se oslobodi i iz samog plaka (58, 63). Shodno tome, povećanje rezistina u plazmi pre može biti u vezi sa dinamičkom nestabilnošću aterosklerotskog plaka, tj. sa kliničkim manifestacijama ishemijske bolesti srca, nego samo sa morfološkim prisustvom ili odsustvom značajne stenozе (57, 75-78). U tom slučaju je i očekivano da između podgrupa pacijenata bez AKS ne postoji

značajna razlika u koncentracijama rezistina u plazmi, kao što je i pokazano u ovoj studiji (Slike 22, 27, 32).

Genska ekspresija receptora za rezistin, CAP1, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je bila značajno viša kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (Slike 24, 29). Uloga CAP1 proteina nikada nije ispitivana kod pacijenata sa IBS, niti je CAP1 posmatran u kontekstu receptora za rezistin, ali je u onkološkim kliničkim studijama utvrđeno da je u mnogim tipovima tumorskih ćelija genska ekspresija CAP1 povišena (86-88). Uzimajući u obzir da je jedna od fundamentalnih funkcija CAP proteina ćelijska pokretljivost, prekomerna ekspresija CAP1 može imati ulogu u invaziji i metastazi tumorskih ćelija, što je udruženo sa lošijim kliničkim ishodom pacijenata (17, 87, 88). Sa druge strane, Walker i saradnici su pokazali da rezistin ispoljava hemoatraktivna svojstva prema CD4+ limfocitima, koji iako malobrojniji, predstavljaju glavne ćelije koje utiču na funkciju brojnijih makrofaga u aterosklerotskim plakovima. Pošto se rezistin u velikim količinama sintetiše i sekretuje u ateromima, neki autori smatraju da bi on mogao delovati kao medijator migracije ćelija u aterosklerotske lezije, što predstavlja jedan od glavnih koraka u razvoju ateroskleroze (62). Cho i saradnici su takođe pokazali da rezistin poseduje hemoatraktivna svojstva prema monocitima, čime se povećava ne samo veličina plaka stimulacijom infiltracije monocita, već i njegova destabilizacija (57). Utvrđeno je da upravo vezivanje rezistina za centralni domen bogat prolinom CAP1 aktivira domen receptora koji vezuje aktin, što omogućava migraciju monocita zavisnu od rezistina (66).

Ovi podaci ukazuju na to da rezistin u povišenim koncentracijama može ostvariti snažnije efekte na mononuklearne ćelije periferne krvi sa prekomernom ekspresijom CAP1 kod pacijenata sa IBS, što bi doprinelo povećanoj invaziji mononuklearnih ćelija periferne krvi u aterosklerotske lezije. Nakon korigovanja vrednosti genske ekspresije CAP1 za godine starosti, koncentracije glukoze i vrednosti ITM i HOMA-IR, značajna razlika između grupa pacijenata sa i bez značajne stenozе više nije postojala (Slika 33). Međutim, važno je istaći da ova korekcija nije uticala na razliku između ove dve grupe pacijenata i zdravih ispitanika. Ovi podaci ukazuju na to da je prekomerna ekspresija CAP1 udružena sa početnim fazama razvoja bolesti koje karakteriše povećanja migracija mononuklearnih ćelija u aterosklerotske lezije (57, 62, 66), što je u skladu i sa

predloženim mehanizmom dejstva CAP1 proteina (66). Uzimajući to u obzir, genska ekspresija CAP1 bi se mogla koristiti kao marker za procenu prisustva bolesti u ranim fazama.

U ovom istraživanju utvrđeno je da su nivoi iRNK CD36 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi viši kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 26). Pored toga, razlika u nivoima iRNK CD36 je uočena i u grupi pacijenata bez AKS, pri čemu su nivoi CD36 bili viši kod pacijenata sa značajnom stenozom u odnosu na pacijente bez značajne stenozе (Slika 31). Nakon korigovanja vrednosti genske ekspresije CD36 za ITM, godine starosti, vrednosti HDL-H i hsCRP-a, razlika između grupa sa i bez značajne stenozе je bila na granici statističke značajnosti (Slika 34). U početnim fazama razvoja aterosklerotskih lezija u intimi-mediji krvnih sudova pod dejstvom citokina poreklom iz T-ćelija dolazi do diferencijacije monocita u makrofage. Taj proces aktivira i ekspresiju više vrsta receptora čistača na membrani makrofaga, među kojima je i CD36, što omogućava unos modifikovanih lipida u ove ćelije (89, 90). Za razliku od procesa preuzimanja LDL holesterola od strane LDL-receptora, koji je visoko regulisan mehanizmom negativne povratne sprege, unos modifikovanih lipida u ćelije putem CD36 receptora čistača ne dovodi do smanjene ekspresije ili povećane degradacije receptora čistača, već suprotno, stimuliše ekspresiju ovog proteina, što vodi masovnoj akumulaciji holesterola unutar makrofaga i nastanku penastih ćelija (17, 89, 90). Smatra se da je CD36 receptor čistač odgovoran za više od 50% unosa modifikovanih lipida u makrofagama (17, 90), što sugerise da pacijenti sa prekomernom genskom ekspresijom CD36 receptora čistača imaju povećan rizik za razvoj ateroskleroze. Ovi rezultati su u skladu i sa studijom Teupseret i saradnika, koji su pokazali da je genska ekspresija CD36 u CD14+ monocitima povišena kod pacijenata sa IBS, i da CD36 može biti marker opterećenja ćelija oxLDL-om i inflamacije kod pacijenata sa IBS (91, 92). Naša studija je i pokazala da je jedan od nezavisnih prediktora nivoa iRNK CD36 kod pacijenata bez AKS marker inflamacije niskog stepena, hsCRP (Tabela 28). Ovi podaci ukazuju na to da je ekspresija CD36 receptora čistača pod uticajem pro-inflamatornih medijatora, i da kao takva može predstavljati biomarker aktivacije ćelija koji se može koristiti za procenu rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (93).

U našoj studiji je pokazano da je kreatinin takođe jedan od nezavisnih prediktora nivoa iRNK CD36 (Tabela 28). Ovi rezultati su u skladu sa zapažanjima Kennedy-a i saradnika koji su u svojoj studiji ukazali na ulogu CD36 receptora čistača u razvoju bubrežne disfunkcije koja nastaje kao posledica povećane inflamacije, dislipidemije i hipertenzije, jednom rečju, u prisustvu faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Utvrđeno je da ligandi koji se generišu u stanjima hiperlipidemije imaju značajnu ulogu u aktivaciji CD36 receptora čistača u makrofagama i u ćelijama proksimalnih tubula bubrega, pri čemu se dalje aktiviraju proinflamatorni putevi u ovim ćelijama, koji omogućavaju razvoj hronične inflamacije, oksidativnog stresa i fibroze, što predstavlja osnovu za razvoj bubrežne disfunkcije u proaterogenim stanjima (94).

In vitro, rezistin dovodi do povećane akumulacije lipida (holesterola i Tg) u THP-1 makrofagama, stimulacijom i genske i proteinske ekspresije CD36 receptora čistača u humanim makrofagama poreklom iz mononuklearnih ćelija periferne krvi i humanim THP-1 ćelijama (58, 59). Kod pacijenata sa IBS u ovoj studiji nije uočena korelacija između nivoa iRNK CD36 receptora i koncentracija rezistina u plazmi. Međutim, nivoi iRNK CD36 su snažno korelirali sa genskom ekspresijom CAP1 i u celokupnoj grupi pacijenata (Tabela 13) i u kontrolnoj grupi (Tabela 19), pri čemu je nivo iRNK CAP1 jedan od nezavisnih prediktora nivoa genske ekspresije CD36 kod pacijenata bez AKS (Tabela 28). Ovi podaci sugerišu da rezistin može snažnije delovati na ćelije koje imaju prekomernu ekspresiju CAP1 i doprineti povećanoj genskoj ekspresiji CD36 receptora čistača i progresiji ateroskleroze.

Vrednosti rezistina kod pacijenata sa većim procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica su bile više u odnosu na pacijente sa sadržajem malih, gustih LDL čestica <50% (Slika 35). Abate i saradnici su pokazali da je povišen rezistin udružen sa prisustvom manjih, gušćih LDL čestica u cirkulaciji pacijenata sa dijabetesom tip 2 (72), dok su Gerber i saradnici pokazali da su vrednosti rezistina u plazmi u pozitivnoj korelaciji sa procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica kod muškaraca sa dijabetesom tip 2 i pre-dijabetesom (95). Jedan od glavnih tradicionalnih faktora rizika za razvoj ishemijske bolesti srca predstavlja povišena koncentracija LDL holesterola u krvi. Ali pored koncentracije LDL holesterola u krvi i sastav LDL čestica ima značajan uticaj na rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (96, 97). Naime, populaciju LDL-a čini širok spektar čestica, koje se razlikuju po veličini, gustini i sadržaju proteina, pa

samim tim poseduju i drugačiji aterogeni potencijal. Smatra se da male, guste LDL čestice (povećan sadržaj TG, a manji sadržaj slobodnog i esterifikovanog holesterola) imaju najveći aterogeni potencijal i da značajno doprinose razvoju kardiovaskularnih bolesti (96-98). Stvaranje malih, gustih LDL čestica u cirkulaciji se dešava u procesu intravaskularnog remodelovanja lipoproteina, pri čemu je glavni predisponirajući faktor povišena koncentracija triglicerida u cirkulaciji, pogotovo povišeni nivoi velikih VLDL₁ čestica (lipoproteini veoma male gustine) bogatih trigliceridima i povišene aktivnosti holesterol-estar transfernog proteina (CETP-a) i lipoproteinske lipaze. Na ovaj način omogućeno je stvaranje sporo-metabolišućih LDL čestica koje imaju dug poluživot u cirkulaciji (5 dana). Ovakve čestice su podložne intenzivnijem dejstvu CETP, koji katalizuje razmenu holesterol-estara sa LDL čestica za trigliceride. Tako nastala LDL čestica bogata trigliceridima, postaje dobar supstrat za lipoproteinsku lipazu, koja hidrolizujući trigliceride na ovim česticama doprinosi stvaranju manjih i gušćih LDL čestica (99). Pokazano je da i rekombinantni rezistin i rezistin iz humanog seruma dovode do povećane sinteze glavnih proteinskih i lipidnih komponenata VLDL čestica, apolipoproteina B (apoB), triglicerida i esterifikovanog holesterola, i da povećavaju aktivnost mikrozomalnog triglicerid transfernog proteina koji kontroliše ograničavajući korak u sastavljanju VLDL čestica u humanim hepatocitima. Na ovaj način rezistin stimuliše produkciju većeg broja lipoproteinskih čestica od strane ovih ćelija (64). Sa druge strane, rezistin dovodi do nishodne regulacije LDL-receptora u humanim hepatocitima, tako što povećava ćelijske nivoe proteina PCSK9 (proprotein konvertaza subtilizin/keksin tip 9, *eng. proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) koji ubrzava degradaciju LDL receptora u lizozomima (65). Na ovaj način rezistin može dovesti do smanjenog uklanjanja LDL čestica iz cirkulacije, odnosno do povećanja i njihovog poluživota i broja u cirkulaciji.

U ovoj studiji je prvi put pokazano da je genska ekspresija rezistina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi viša kod pacijenata sa sadržajem malih, gustih LDL čestica $\geq 50\%$ (Slika 36). Pored toga, pokazano je da su nezavisni prediktori nivoa iRNK rezistina u ovim ćelijama kod pacijenata bez AKS bili nivoi iRNK CD36 receptora čistača i dijametar LDL čestica (Tabela 26), dok su nezavisni prediktori nivoa iRNK receptora za rezistin bili takođe nivoi iRNK CD36 i koncentracija TG u krvi (Tabela 27), koji umnogome doprinose formiranju malih, gustih LDL čestica (98, 99).

Pozitivna asocijacija između nivoa iRNK CAP1 i nivoa iRNK CD36 i koncentracija TG je uočena i u grupi svih pacijenata sa IBS. Zid arterija je posebno permeabilan za male, guste LDL čestice, jer promena sastava čestice dovodi i do promene u konformaciji apoB proteina koja sa jedne strane otežava vezivanje čestice za LDL receptor i efikasno uklanjanje iz cirkulacije, dok sa druge strane omogućava lakše vezivanje za proteoglikane zidova krvnih sudova i prolazak u subendotelni prostor. Nakon toga, ovakve čestice se i duže zadržavaju u subendotelnom prostoru i postaju podložne hemijskim modifikacijama, na prvom mestu oksidaciji (98, 99). OxLDL koji preuzimaju monociti i makrofage značajno utiče na transkripciju brojnih gena u ovim ćelijama (17). Pokazano je da oxLDL dovodi do prekomerne ekspresije gena za rezistin u makrofagama poreklom iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, međutim mehanizmi kojima se to dešava nisu još uvek utvrđeni (60). Ovi podaci ukazuju na činjenicu da ne samo da je moguće da cirkulišući rezistin doprinosi stvaranju proaterogenijeg lipidnog profila, već da modifikovani lipidi uneti u ćelije putem CD36 receptora čistača mogu dovesti do ushodne regulacije gena za rezistin i doprineti daljem razvoju inflamacije. Takođe, ispitivanje efekata koji modifikovani lipidi uneti putem CD36 receptora čistača imaju na transkripciju gena za CAP1 bi moglo dati dodatne odgovore o povezanosti rezistina, CAP1 i CD36 receptora.

U našoj studiji rezistin u plazmi je negativno korelirao sa HDL-H kod pacijenata sa IBS (Tabela 12), što je skladu sa prethodnim istraživanjima (74, 84). Takođe, prvi put je pokazano da je nivo iRNK rezistina kod pacijenata sa IBS negativno udružen sa koncentracijama HDL-H (Tabela 12). Na osnovu koncentracija HDL-H, možemo zaključiti da su pacijenti u najvišem tercilu koncentracija rezistina imali i proaterogeniji lipidni fenotip u odnosu na pacijente u prvom tercilu (Tabela 14). U skladu sa rezultatima prethodnih studija (74), rezistin u plazmi je bio u negativnoj korelaciji sa UH (Tabela 12), koncentracije UH su bile najniže u najvišem tercilu koncentracija rezistina (Tabela 14) i UH je bio jedan od nezavisnih prediktora koncentracija rezistina u grupi pacijenata bez AKS (Tabela 25). Ova veza može biti posledica negativne asocijacije rezistina u plazmi i koncentracija HDL-H. Sato i saradnici su pokazali da mišiji rezistin može nishodno regulisati ekspresiju iRNK apolipoproteina A1 u jetri, što može biti uzrok sniženih koncentracija HDL-H koje su uočene kod miševa tretiranih sa adenovirusom koji sadrži gen za rezistin (100). Međutim, treba imati u vidu da postoje

veoma značajne razlike kako u strukturi tako i funkciji između humanog i mišijeg rezistina (46-49), tako da daljim istraživanjem treba utvrditi tačnu prirodu veze između rezistina u plazmi, nivoa iRNK rezistina i HDL-H.

Takođe, određene studije su ukazale na povezanost rezistina u plazmi i markera inflamacije kao što je hsCRP (72, 74, 75) i IL-6 (101). U ovoj studiji uočena je pozitivna korelacija između rezistina i hsCRP-a, ali nakon isključivanja pacijenata koji su bili na terapiji statinima (Tabela 12). Naime, statini pored svojih glavnih efekata, ispoljavaju i vrlo dobro poznate plejotropne, anti-inflamatorne efekte preko hidrosimetilglutaril-koenzim A reduktaza-nezavisnih puteva. Pokazano je da simvastatin inhibira ekspresiju rezistina u kulturi humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi preko mevalonat-geranilgeranil pirofosfat puta (102), što može biti objašnjenje zašto je samo kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima postojala pozitivna asocijaciju ova dva parametra. Iako u ovoj studiji nije uočena razlika između pacijenata koji su bili na terapiji statinima i onih koji nisu (rezultati nisu prikazani), ne može se izuzeti uticaj lekova na vrednost ovih parametara. Sa druge strane, nivoi iRNK rezistina su pozitivno korelirali sa koncentracijama proinflamatornog citokina, IL-6, u plazmi (Tabela 12), što može biti posledica činjenice da ne samo da rezistin može stimulisati ekspresiju IL-6, već i IL-6 može stimulisati ekspresiju rezistina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (48, 64). Anderson i saradnici su uočili povećanje i u koncentracijama IL-6 u plazmi i genske ekspresije IL-6 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa AIM (103), što u našoj studiji nije potvrđeno, najverovatnije zbog različitog dizajna studija.

Pušenje predstavlja značajan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Od ispitivanih parametara jedino je nivo iRNK CD36 bio viši kod zdravih pušača u odnosu na zdrave nepušače (Tabela 11). Nikotin može indukovati ekspresiju CD36 receptora makrofaga *in vitro* i *in vivo*, i na taj način doprineti razvoju ateroskleroze kod pušača (104). U grupi pacijenta ta razlika nije uočena, što može biti posledica drugih faktora uticaja u toj grupi.

Rezimirajući rezultate ove studije, možemo zaključiti da postoji značajna veza između rezistina i IBS, pogotovo sa kliničkim manifestacijama ove bolesti. Ispitivanjem genske ekspresije rezistina, receptora za rezistin i CD36 molekula, omogućeno je

sveobuhvatnije sagledavanje uloge ovog proteina u IBS. Paralelno posmatrajući rezistin i njegov receptor, možemo zaključiti da dejstvo rezistina putem CAP1 na mononuklearne ćelije periferne krvi može imati značajnu ulogu u ranijim fazama razvoja ateroskleroze, koja je vezana za migraciju ćelija unutar aterosklerotskog plaka, pri čemu bi se genska ekspresija CAP1 mogla koristiti kao biomarker za procenu prisustva bolesti još u ranim fazama. Međutim, obzirom na značajan porast koncentracija rezistina u AKS, ne može se isključiti doprinos rezistina kasnijim fazama razvoja bolesti putem svojih snažnih proinflammatoryh dejstava koje može ostvariti na ćelije u aterosklerotskom plaku autokrinim i parakrinim putem.

Povišene vrednosti rezistina u krvi su udružene sa proaterogenijim lipidnim statusom kod pacijenata, koji se ogleda i kroz niže vrednosti HDL-H i kroz veću zastupljenost malih, gustih LDL čestica. Takođe, lošiji lipidni status može uticati na ekspresiju ovog proinflammatoryh molekula, obzirom da je pokazano da lipidi (dijametar LDL čestica i TG) kao i CD36 receptor pokazuju nezavisni uticaj na nivo iRNK rezistina i CAP1 receptora u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

CD36 molekul bi, obzirom na uočene razlike, mogao doprineti u određivanju stepena progresije bolesti. Nivoi iRNK CD36 receptora čistača su pod uticajem proinflammatoryh faktora krvi, povezani su i sa funkcijom bubrega, ali značajan uticaj na njih ima i CAP1, tj. receptor za rezistin. Ovi prediktori doprinose varijaciji od čak 50% u nivoima iRNK CD36. Od toga, najsnažniji uticaj ima upravo CAP1, što znači da rezistin može ostvariti svoje efekte snažnije na ćelije sa prekomernom ekspresijom CAP1 i dovesti do ushodne regulacije iRNK CD36, na taj način doprinoseći daljem razvoju ateroskleroze.

Imajući u vidu iznete rezultate, buduća istraživanja bi trebala biti fokusirana na izučavanje *in vivo* efekata rezistina koje ostvaruje putem CAP1 receptora, rasvetljavanju mehanizama kojima rezistin *in vivo* najviše doprinosi razvoju ateroskleroze, i koja dejstva rezistina, autokrini, parakrini ili sistemski, imaju u tome presudnu ulogu. Takođe, trebalo bi da ispitivanja na široj populaciji pacijenata sa IBS budu fokusirana na detaljniju evaluaciju dijagnostičkog i prognostičkog potencijala rezistina i njegovog receptora. Kako između rezistina, CAP1 i CD36 postoji međusobna povezanost, od značaja je detaljnije ispitivanje ove spone, tj. efekata koji modifikovani lipidi uneti

putem CD36 receptora mogu imati na regulaciju ovih gena i njihovih proteinskih produkata kao i signalnih puteva kojima se oni ostvaruju.

6. Zaključci

1. Koncentracije rezistina u krvi su bile značajno više kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na ulogu koji rezistin ima u razvoju IBS.
2. Koncentracije rezistina su bile u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama kreatinina, što ukazuje na ulogu koju bubrezi zauzimaju u metabolizmu ovog proteina. Zbog toga vrednosti rezistina u krvi treba tumačiti u skladu sa vrednostima kreatinina.
3. Koncentracije rezistina se nisu razlikovale između pacijenata sa i bez značajne stenozе; bez anginoznih tegoba i značajne stenozе i SAP. Koncentracije rezistina u krvi su bile veće kod pacijenata sa AKS u odnosu na pacijente bez anginoznih tegoba i značajne stenozе i u odnosu na pacijente sa SAP. Ovi podaci ukazuju na to da su povišene vrednosti rezistina u vezi sa dinamičkom nestabilnošću aterosklerotskog plaka, tj. sa kliničkim manifestacijama bolesti, a ne samo sa morfološkim prisustvom ateroskleroze.
4. Kako se nivoi iRNK rezistina nisu razlikovali između ispitivanih grupa, povišene koncentracije rezistina kod pacijenata sa NAP i AIM mogu biti posledica dodatnog oslobađanja rezistina iz aterosklerotskih plakova u AKS.
5. Nivoi genske ekspresije CAP1 su bili povišeni kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na moguću ulogu CAP1 proteina u razvoju IBS. Ovi podaci ukazuju i na to da rezistin može snažnije delovati na ćelije sa prekomernom ekspresijom CAP1 i doprineti razvoju bolesti.
6. Nivoi genske ekspresije CAP1 se nisu razlikovali između podgrupa pacijenata, dok su razlike između pacijenata i zdravih ispitanika ostale značajne i nakon korekcije za odgovarajuće kovarijante. Ovi podaci ukazuju na činjenicu da je prekomerna ekspresija CAP1 udružena sa početnim fazama razvoja bolesti, i da se genska ekspresija CAP1 može koristiti za procenu prisustva bolesti u ranim fazama.
7. Nivoi iRNK CD36 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi su bili viši kod svih grupa pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na moguću ulogu CD36 receptora čistača u razvoju IBS.

8. Uočena razlika u nivoima iRNK CD36 između grupa pacijenata sa i bez značajne stenoze, ukazuje na mogućnost korišćenja genske ekspresije CD36 receptora čistača u proceni stepena progresije bolesti.
9. Vrednosti rezistina kod pacijenata sa većim procentualnim sadržajem malih, gustih LDL čestica su bile više u odnosu na pacijente sa sadržajem malih, gustih LDL čestica <50%, što sugeriše da rezistin može doprineti povećanom stvaranju malih, gustih LDL čestica kod pacijenata sa IBS.
10. Genska ekspresija rezistina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je bila viša kod pacijenata sa sadržajem malih, gustih LDL čestica $\geq 50\%$ u odnosu na pacijente sa sadržajem malih, gustih LDL čestica <50%, pri čemu su nezavisni prediktori nivoa iRNK rezistina u ovim ćelijama bili nivoi iRNK CD36 receptora čistača i dijametar LDL čestica. Ovi podaci ukazuju na činjenicu da unos modifikovanih lipida putem CD36 receptora čistača u ćelije može dovesti do ushodne regulacije gena za rezistin i doprineti daljem razvoju inflamacije.
11. Kako su nezavisni prediktori nivoa iRNK CAP1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bili takođe nivoi iRNK CD36 i koncentracija TG u krvi (koji doprinose formiranju malih, gustih LDL čestica), ispitivanje efekata koje mogu imati modifikovani lipidi uneti u ćelije preko CD36 receptora na transkripciju gena za CAP1 bi moglo dati dodatne odgovore o povezanosti rezistina, CAP1 i CD36 receptora.
12. I obratno, jedan od nezavisnih prediktora nivoa iRNK CD36 su bili nivoi iRNK CAP1, što ukazuje na snažnu vezu ova dva gena, i sugeriše da rezistin može snažnije delovati na ćelije koje imaju prekomernu ekspresiju CAP1 i doprineti povećanoj genskoj ekspresiji CD36 receptora čistača i progresiji ateroskleroze.
13. Inflamacija i funkcija bubrega ostvaruju značajan efekat na nivo iRNK CD36 receptora čistača.
14. Koncentracije rezistina su negativno korelirale sa koncentracijama HDL-H, što ukazuje na to da su povišene vrednosti rezistina udružene sa prisustvom proaterogenijeg lipidnog profila.
15. Nivo genske ekspresije rezistina je udružen sa markerom inflamacije IL-6, dok su koncentracije rezistina u pozitivnoj asocijaciji sa markerom inflamacije, hsCRP-om.

7. Literatura

1. Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:276-89.
2. Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization 2011.
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. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Review: Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart Lung Circ* 2013;22:399–411.
5. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010;74:213-20.
6. Crea F, Liuzzo G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1-11.
7. Jrosteřád J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med* 2013;11:117.
8. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-25.
9. Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B. *Kardiologija*. Zavod za Udžbenike, Beograd 2011.
10. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;15:109(23 suppl 1):III-27.
11. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis, *Circulation* 2002;105:1135-43.
12. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:228-32.

13. Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-91.
14. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol* 1993;143:1551-9.
15. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002;8:1211-7.
16. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93-102.
17. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007;75:468-77.
18. Gu L, Okada Y, Clinton S, Gerard C, Sukhova G, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275-81.
19. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-7.
20. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-42.
21. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 2013;339:161-6.
22. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008;451:904-13.
23. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2129-38.

24. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999;104:1041–50.
25. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876–90.
26. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281–91.
27. Nakashima Y, Chen YX, Kinukawa N, Sueishi K. Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: from an early age. *Virchows Arch* 2002;441:279–88.
28. Orekhov AN, Andreeva ER, Mikhailova IA, Gordon D. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis* 1998;139:41–8.
29. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:63–71.
30. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998;97:2433–44.
31. Natural history of aortic and coronary atherosclerotic lesions in youth. Findings from the PDAY Study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1291–8.
32. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678–89.
33. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2016;13:79–98.

34. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1262–75.
35. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 2004;90:1385–91.
36. Fox K, Garcia MA, Ardissino D, Buszman P, Camici PG, Crea F, et al. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2006;27:1341-81.
37. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
38. Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömstrom-Lundqvist C, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;33:2569-619.
39. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
40. Li FP, He J, Li ZZ, Luo ZF, Yan L, Li Y. Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine* 2009;35:243–51.
41. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R et al. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4848–56.

42. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:243-56.
43. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, Wallace TM, Hull RL, Zraika S, et al. Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia* 2005;48:2330-3.
44. Heilbronn LK, Rood J, Janderoova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1844-8.
45. Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005;48:2203-5.
46. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:927-35.
47. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472-6.
48. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:286-90.
49. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *J Immunol* 2005;174:5789-95.
50. Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* 2003;305:27-34.
51. Al Hannan F, Culligan KG. Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:54.

52. Singh AK, Battu A, Mohareer K, Hasnain SE, Ehtesham NZ. Transcription of human resistin gene involves an interaction of Sp1 with peroxisome proliferator-activating receptor gamma (PPARgamma). *PLoS One* 2010;29;5(3):e9912.
53. Jamaluddin S, Yan s, Lu J, Liang Z, Yao Q, Chen C. Resistin Increases Monolayer Permeability of Human Coronary Artery Endothelial Cells. *PLoS One* 2013;8(12):e84576.
54. Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299: H193–H201.
55. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine–endothelial interaction. *Circulation* 2003;108:736–40.
56. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine– endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:415–9.
57. Cho Y, Lee SE, Lee HC, Hur J, Lee S, Youn SW, et al. Adipokine resistin is a key player to modulate monocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, leading to progression of atherosclerosis in rabbit carotid artery. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:99-109.
58. Jamaluddin S, Weakley SM, Qizhi Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012;165:622–32.
59. Rae C, Graham A. Human resistin promotes macrophage lipid accumulation. *Diabetologia* 2006;49:1112-4.
60. Xu W, Yu L, Zhou W, Luo M. Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:376-82.

61. Lee TS, Lin CY, Tsai JY, Wu YL, Su KH, Lu KY et al. Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life Sci* 2009;84:97–104.
62. Walcher D, Hess K, Berger R, Aleksic M, Heinz P, Bach H, et al. Resistin: a newly identified chemokine for human CD4-positive lymphocytes. *Cardiovasc Res* 2010;85:167-74.
63. Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, et al. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006;69:76-85.
64. Costandi J, Melone M, Zhao A, Rashid S. Human resistin stimulates hepatic overproduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein particles by enhancing apoB stability and impairing intracellular insulin signaling. *Circ Res* 2011;108:727-42.
65. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1697-705.
66. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab* 2014;19:484–97.
67. Hubberstey AV, Mottillo EP. Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J* 2002;16:487-99.
68. H Matviw, G Yu, D Young. Identification of a human cDNA encoding a protein that is structurally and functionally related to the yeast adenylyl cyclase-associated CAP proteins. *Mol Cell Biol* 1992;12:5033–40.
69. Wakeel A, Kuriakose JA, McBride JW. An *Ehrlichia chaffeensis* tandem repeat protein interacts with multiple host targets involved in cell signaling, transcriptional regulation, and vesicle trafficking. *Infect Immun* 2009;77:1734–45.

70. Freeman NL, Lila T, Mintzer KA, Chen Z, Pahk AJ, Ren R, Drubin DG, Field J. A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol Cell Biol* 1996;16:548-56.
71. T Lila, D G Drubin. Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 1997; 8:367–85.
72. Abate N, Sallam HS, Rizzo M, Nikolic D, Obradovic M, Bjelogrljic P, Isenovic ER. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 2014;20:4961-9.
73. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, et al. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2005;182:241–8.
74. Pilz S, Weihrauch G, Seelhorst U, Wellnitz B, Winkelmann BR, Boehm BO, et al. Implications of resistin plasma levels in subjects undergoing coronary angiography. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:380–6.
75. Hu WL, Qiao SB, Hou Q, Yuan JS. Plasma resistin is increased in patients with unstable angina. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:871-5.
76. Qiao XZ, Yang YM, Xu ZR, Yang LA. Relationship between resistin level in serum and acute coronary syndrome or stable angina pectoris. *J Zhejiang UnivSci B* 2007;8:875–80.
77. Lubos E, Messow CM, Schnabel R, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Bickel C, et al. Resistin, acute coronary syndrome and prognosis results from the Athero Gene study. *Atherosclerosis* 2007;193:121–8.
78. Chu S, Ding W, Li K, Pang Y, Tang C. Plasma resistin associated with myocardium injury in patients with acute coronary syndrome. *Circ J* 2008;72:1249-53.
79. Fontana A, Spadaro S, Copetti M, Spoto B, Salvemini L, Pizzini P, et al. Association between resistin levels and all-cause and cardiovascular mortality: a new study and a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(3):e0120419.

80. Tsiotra PC, Tsigos C, Anastasiou E, Yfanti E, Boutati E, Souvatzoglou E, et al. Peripheral mononuclear cell resistin mRNA expression is increased in type 2 diabetic women. *Mediators Inflamm* 2008;2008:892864.
81. Kolh P, Windecker S, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, Falk V, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;46:517-92.
82. Grundy SM, Cleeman JI, Bairey Merz CN, Brewer BH, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004;110:227-39.
83. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010;210:548-54.
84. Cabrera de León A, Almeida González D, González Hernández A, Domínguez Coello S, Marrugat J, Juan Alemán Sánchez J, et al. Relationships between serum resistin and fat intake, serum lipid concentrations and adiposity in the general population. *J Atheroscler Thromb* 2014;21:454-62.
85. Menzaghi C, Bacci S, Salvemini L, Mendonca C, Palladino G, Fontana A, et al. Serum resistin, cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *PLoS ONE* 2013;8:e64729.
86. Hua M, Yan S, Deng Y, Xi Q, Liu R, Yang S, et al. CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation. *Int J Mol Med* 2015;35:941-9.
87. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, et al. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab Invest* 2009;89:425-32.

88. Liu Y, Cui X, Hu B, Lu C, Huang X, Cai J, et al. Up-regulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 2014;210:169-75.
89. Kaur SC, editor. *Biochemistry of Atherosclerosis*. Springer Science & Business Media 2006.
90. Young Mi Park. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 2014;46(6):e99.
91. D Teupser, MA Mueller, J Koglin, W Wilfert, J Ernst, W Von Scheidt, et al. CD36 mRNA expression is increased in CD14+ monocytes of patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:552-6.
92. Maiwald S, Zwetsloot PP, Sivapalaratnam S, Dallinga-Thie GM. Monocyte gene expression and coronary artery disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:411-7.
93. Sun Y, Scavini M, Orlando RA, Murata GH, Servilla KS, Tzamaloukas AH, et al. Increased CD36 expression signals monocyte activation among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2065-7.
94. Kennedy DJ, Chen Y, Huang W, Viterna J, Liu J, Westfall K, et al. CD36 and Na/K-ATPase- α 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney. *Hypertension* 2013;61:216-24.
95. Philipp A, Gerber PA, Thalhammer C, Schmied C, Spring S, Amann-Vesti B, et al. Small, dense LDL particles predict changes in intima media thickness and insulin resistance in men with type 2 diabetes and prediabetes – a prospective cohort study. *PLoS One* 2013;8:e72763.
96. Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Memon L, et al. Small, dense LDL cholesterol and apolipoprotein B: relationship with serum lipids and LDL size. *Atherosclerosis* 2009;207:496-501.
97. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Peco-Antic A, Kostic M, et al. Characteristics of low-density and high-density lipoprotein subclasses in pediatric renal transplant recipients. *Transpl Int* 2011;24:1094-102.

98. Toft-Petersen AP, Tilsted HH, Aarøe J, Rasmussen K, Christensen T, Griffin BA, et al. Small dense LDL particles - a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case-control study. *Lipids Health Dis* 2011;25:10-21.
99. Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1066-9.
100. Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Imamura M, Sekiguchi N, et al. Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice. *Endocrinology* 2005;146:273–9.
101. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005;111:932-9.
102. Hu WL, Qian SB, Li JJ. Decreased C-reactive protein-induced resistin production in human monocytes by simvastatin. *Cytokine* 2007;40:201–6.
103. Anderson DR, Poterucha JT, Mikuls TR, Duryee MJ, Garvin RP, Klassen LW, et al. IL-6 and its receptors in coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Cytokine* 2013;62:395-400.
104. Zhou MS, Chadipiralla K, Mendez AJ, Jaimes EA, Silverstein RL, Webster K, et al. Nicotine potentiates proatherogenic effects of oxLDL by stimulating and upregulating macrophage CD36 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H563–H574.

Biografija autora

Jelena Munjas rođena je 20.01.1986. godine u Beogradu. Osnovnu školu i XIII beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar upisala je 2004. godine, a završila 11.03.2010. godine sa srednjom ocenom 9.38. Dobitnica je nagrade beogradskog Univerziteta za najbolji studentski naučno-istraživački rad u oblasti medicinskih nauka. Bila je stipendista fonda za mlade talente Republike Srbije za 1000 najboljih studenata završnih godina. Dobitnica je nagrade prof. dr Ivan Berkeš kao najbolji student diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar u školskoj 2009/2010. godini. U oktobru 2010. godine upisala je doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Obavezan staž obavila je u biohemijskoj laboratoriji KBC 'Bežanijska kosa', a 2011. godine položila je državni ispit.

Od 1.1.2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2013. kao saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175035 pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“, čiji je rukovodilac Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska.

Od 2011. godine učestvuje u izvođenju praktične nastave, a od 2013. godine zaposlena je kao asistent na katedri za Medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u okviru predmeta Opšta biohemija, Medicinska biohemija, Statistika u farmaciji i učestvuje u izvođenju nastave iz izbornih predmeta.

Do sada je objavila 9 naučnih radova, od toga 3 rada u časopisima M21 kategorije, 3 rada u časopisima M22 kategorije, 2 rada u časopisima M23 kategorije i jedan rad u časopisu od nacionalnog značaja.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јелена Муњас _____

Број индекса _____ 33/10 _____

Студијски програм _____ Медицинска биохемија _____

Наслов рада _____ Одређивање нивоа генске експресије резистина и рецептора
за резистин у крви пацијената са исхемијском болести срца _____

Ментор _____ проф. др Весна Спасојевић-Калимановска _____

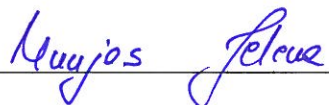
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 25.12.2017.

 _____

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Муњас

Број индекса 33/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Одређивање нивоа генске експресије резистина и рецептора за резистин у крви

пацијената са исхемијском болести срца

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

Потпис аутора

У Београду, 25.12.2017.

Муњас Јелена

Изјава о коришћењу

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

Одређивање нивоа генске експресије резистина и рецептора за резистин у крви

пацијената са исхемијском болести срца

која је моје ауторско дело.

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

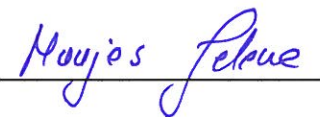
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 25.12.2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.