

# Značaj novih biomarkera upale i angiogeneze u perifernoj arterijskoj bolesti

---

**Perkov, Sonja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:262565>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sonja Perkov

**ZNAČAJ NOVIH BIOMARKERA  
UPALE I ANGIOGENEZE  
U PERIFERNOJ ARTERIJSKOJ BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Sonja Perkov

**THE IMPORTANCE  
OF NEW BIOMARKERS OF  
INFLAMMATION AND ANGIOGENESIS  
IN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sonja Perkov

**ZNAČAJ NOVIH BIOMARKERA  
UPALE I ANGIOGENEZE  
U PERIFERNOJ ARTERIJSKOJ BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Zlata Flegar-Meštrić  
Doc. dr. sc. Vinko Vidjak, dr. med.

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice "Merkur", Referentnom centru Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi za izradu referentnih vrijednosti iz područja opće medicinske biokemije, akreditiranom prema normi HRN EN ISO 15189 od 2007. g., u sklopu projekta "Novi biokemijski biljezi ateroskleroze u krvožilnim bolestima" Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (044-0061245-0551).

Zahvale:

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Zlati Flegar-Meštrić, pročelnici Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, voditeljici projekta "Novi biokemijski biljezi ateroskleroze u krvožilnim bolestima" Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH, što mi je omogućila izradu ovog rada, na njenom stalnom poticanju, stručnom vodstvu, savjetima i razumijevanju.

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Vinku Vidjaku, dr. med., predstojniku Kliničkog zavoda za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, na stručnom vodstvu i savjetima.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Anti Grgi na pomoći u odabiru ispitanika.

Zahvaljujem se dr. med. Marku Slavici i dr. med. Lovri Kavuru na analizi angiografskih slika.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mirjani Mariani Kardum Paro i dr. sc. Lei Sokolić na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Svim djelatnicima Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, zahvaljujem se na pomoći i susretljivosti.

## SAŽETAK

Periferna arterijska bolest klinička je manifestacija ateroskleroze sa značajnim morbiditetom i mortalitetom. Upala i angiogeneza imaju važnu ulogu u njenom razvoju, progresiji i komplikacijama. Cilj rada bio je ispitati postoji li povezanost između katalitičkih koncentracija i genetskog polimorfizma paraoksonaze (PON1), katalitičkih koncentracija acetil hidrolaze trombocitnog čimbenika aktivacije (PAF-AH), koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), angiopietina 2 (Ang - 2) i njegovog Tie-2 receptora, kao novih biomarkera u procesu upale i angiogeneze, sa pojavnošću i stupnjem stenotično/okluzivnih promjena perifernih arterija.

U ispitivanju je sudjelovalo 110 ispitanika s angiografski potvrđenom dijagnozom periferne arterijske bolesti i 118 kontrolnih osoba. Katalitičke koncentracije PON1 i PAF-AH određene su spektrofotometrijskim metodama. Genetski polimorfizmi *pon1* (Q192R, L55M i -108C>T) i *pon2* (S311C) gena određeni su PCR-RFLP metodom. Koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora određene su enzimimunokemijskim metodama. Razmatrana je njihova povezanost s pokazateljima lipidnog statusa, koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) i angiografskim sustavom bodovanja kao mjerom anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija.

Ispitanici su imali značajno više koncentracije CRP-a, triglicerida, indeksa ateroskleroze, omjera ukupnog i HDL-kolesterola, a niže koncentracije ukupnog-, LDL- i HDL-kolesterola. Katalitičke koncentracije PON1 bile su značajno niže u ispitanika. Katalitičke koncentracije PON1 značajno su se razlikovale ovisno o genotipovima *pon1* i *pon2* gena. Genotipovi QQ, MM i TT *pon1* gena, te genotip SS *pon2* gena imali su najniže katalitičke koncentracije u obje istraživane skupine. Frekvencije genotipova Q192R i -108C>T polimorfizama *pon1* gena značajno su se razlikovale između ispitanika i kontrolne skupine, pri čemu su ispitanici imali veću učestalost QQ genotipa za Q192R, odnosno CC genotipa za -108C>T polimorfizam. Katalitičke koncentracije PAF-AH-a nisu se značajno razlikovale između istraživanih skupina. Statistički značajna korelacija nađena je između katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola u obje istraživane skupine. Ispitanici na terapiji lipoliticima imali su značajno niže katalitičke koncentracije PAF-AH-a u odnosu na ispitanike bez terapije lipoliticima. Ispitanici su

imali značajno više koncentracije Ang-2 i Tie-2 receptora, za razliku od koncentracija VEGF-a, koje se nisu značajno razlikovali između istraživanih skupina. U serumu ispitanika sva tri biomarkera angiogeneze korelirala su sa koncentracijom CRP-a. Međutim nijedan od istraživanih biokemijskih parametara nije korelirao sa angiografskim sustavom bodovanja.

U ovom istraživanju potvrđena je uloga hipertrigliceridemije i CRP-a kao čimbenika rizika u razvoju periferne arterijske bolesti. Niže koncentracije HDL-kolesterola u ispitanika mogle bi ukazivati na njegovu smanjenu zaštitnu ulogu u sprječavanju aterogenog procesa. Snižene katalitičke koncentracije PON1 i polimorfizmi Q192R i -108C>T *pon1* gena mogli bi imati ulogu u razvoju periferne arterijske bolesti. Razlike u frekvenciji Q i R alela između ispitanika i kontrolne skupine mogu biti jedan od uzroka sniženih katalitičkih koncentracija PON1, što može doprinosti smanjenoj zaštitnoj ulozi HDL-kolesterola i povećanom riziku od prijevremene ateroskleroze kod rizičnih skupina bolesnika. PAF-AH se ne može smatrati pouzdanim dijagnostičkim pokazateljem periferne arterijske bolesti budući da su promjene u katalitičkim koncentracijama ovisne o koncentraciji parametara lipidnog statusa i terapiji lipoliticima. Povezanost CRP-a sa koncentracijama VEGF-a, Ang-2 i Tie-2 receptora u ispitanika ukazuje na povezanost upale i angiogeneze u razvoju periferne arterijske bolesti. Povećane koncentracije Ang-2 i Tie-2 receptora mogle bi ukazivati na povećano vaskularno remodeliranje kao odgovor na prisutne čimbenike rizika, te bi se mogli smatrati novim biomarkerima angiogeneze koji ukazuju na prisustvo periferne arterijske bolesti. Nepostojanje povezanosti između koncentracije istraživanih biokemijskih parametara i angiografskog sustava bodovanja ukazuje na važnost drugih čimbenika u progresiji bolesti. Potrebna su dodatna istraživanja na većim skupinama ispitanika kako bi se potvrdila vrijednost PON1, Ang-2 i Tie-2 receptora, kao novih dijagnostičkih pokazatelja ateroskleroze perifernih arterija.

**Ključne riječi:** acetil hidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije, paraoksonaza, polimorfizam, vaskularni endotelni čimbenik rasta, angiopoietin-2, Tie-2 receptor, periferna arterijska bolest.



## SUMMARY

Peripheral artery disease is a clinical manifestation of atherosclerosis with significant morbidity and mortality. Inflammation and angiogenesis play an important role in its development, progression and complications. The aim of this thesis was to investigate the association of the catalytic concentrations and genetic polymorphism of paraoxonase (PON1), the catalytic concentrations of platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), the concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin 2 (Ang-2) and its receptor Tie-2, as novel biomarkers of inflammation and angiogenesis with the appearance and degree of stenotic-occlusive changes in the peripheral arteries.

The study included 110 patients with clinically and angiographically confirmed diagnosis of peripheral arterial disease and 118 control subjects. The catalytic concentrations of PAF-AH and PON1, as novel biomarkers of inflammation, were determined by spectrophotometric methods. Polymorphisms of *pon1* (Q192R, L55M and -108C> T) and *pon2* (S311C) gene were determined by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP). The concentrations of VEGF, Ang-2 and its receptor Tie-2, as novel biomarkers of angiogenesis, were determined by enzyme immunoassays. Their relationship with lipid profile, concentration of C-reactive protein (CRP) and angiographic score as a measure of the anatomic extent of atherosclerotic lesions to the peripheral arteries, was assessed.

The patients had significantly higher concentrations of CRP, triglyceride, index of atherosclerosis, the ratio of total and HDL cholesterol, and lower concentrations of total, LDL and HDL-cholesterol. The catalytic concentrations of PON1 were significantly lower in the patients and were significantly different depending on the genotypes of *pon1* and *pon2* gene. Genotypes QQ, MM and TT *pon1* gene and genotype SS *pon2* gene had the lowest catalytic concentration in both groups studied. The frequencies of genotypes Q192R and -108C> T polymorphisms of *pon1* gene were significantly different between patients and control groups, where patients had a higher frequency of QQ genotype for Q192R or CC genotype of -108C>T polymorphism. The catalytic concentrations of PAF-AH did not differ between the two groups. A statistically significant correlation was found between the catalytic concentration of

PAF-AH and the concentration of triglycerides, total and LDL-cholesterol in both groups studied. The patients with hypolipidemic drug therapy had significantly lower catalytic concentrations of PAF-AH, compared to subjects without hypolipidemic drug therapy. The patients had higher concentrations of Ang-2 and Tie-2 receptor. The concentration of VEGF did not differ significantly between groups. All three serum biomarkers of angiogenesis correlated with the CRP concentrations. However, none of the biochemical parameters investigated correlated with the angiographic score.

This study confirmed the role of hypertriglyceridemia and CRP as risk factors in the development of peripheral arterial disease. Lower concentrations of HDL cholesterol in patients could indicate its reduced protective role in preventing the atherogenic process. Lower catalytic concentrations of PON1 and polymorphisms Q192R and-108C> T *pon1* gene could play a role in the development of peripheral arterial disease. Differences in the frequency of Q and R alleles between patient and control groups may be one of the causes of the reduced catalytic concentrations of PON1, which may contribute to a reduced protective role of HDL-cholesterol and increased risk of early atherosclerosis in the risk group of patients. PAF-AH can not be considered a reliable diagnostic indicator of peripheral arterial disease since the changes in enzyme activity may reflect the altered lipid parameters. Correlation between the CRP concentrations and the concentrations of VEGF, Ang-2 and its receptor Tie-2 appears to suggest an association between inflammation and angiogenesis in the development of peripheral arterial disease. An increased concentration of Ang-2 and Tie-2 receptor could indicate increased vascular remodeling in response to the presence of risk factors and could be considered new biomarkers of angiogenesis which indicate the presence of peripheral arterial disease. The absence of significant correlation between the concentrations of the biochemical parameters investigated and the angiographic score suggests that other factors are more important in the progression of the disease. Further research is needed on larger groups of subjects to confirm the value of PON1, Ang-2 and Tie-2 receptor, as new diagnostic indicators of atherosclerosis of peripheral arteries.

**Key words:** platelet-activating factor acetylhydrolase, paraoxonase, polymorphism, vascular endothelial growth factor, angiotensin-2, Tie-2 receptor, peripheral arterial disease.

## SADRŽAJ

### POPIS KRATICA

<b>1. UVOD</b>	1
1.1 UPALA I ANGIOGENEZA	1
1.1.1 Upala	1
1.1.2 Mehanizmi vaskularnog rasta	2
1.1.3 Kronična upala i angiogeneza	3
1.2 ATEROSKLEROZA	5
1.2.1 Upala i ateroskleroza	5
1.2.2 Angiogeneza i ateroskleroza	7
1.2.3 Periferna arterijska bolest	7
1.3. BIOMARKERI U PERIFERNOJ ARTERIJSKOJ BOLESTI	13
1.3.1 C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)	15
1.3.1.1 Struktura i funkcija CRP-a	15
1.3.1.2 CRP kao čimbenik kardiovaskularnog rizika	16
1.3.2 PARAOKSONAZE	17
1.3.2.1 Struktura i funkcija paraoksonaze 1 (PON1)	17
1.3.2.2 Uloga genetskih polimorfizama <i>pon1</i> i <i>pon2</i> gena u srčanožilnim bolestima	18
1.3.3 ACETILHIDROLAZA TROMBOCITNOG ČIMBENIKA AKTIVACIJE	19
1.3.3.1 Struktura i funkcija acetilhidrolaze trombocitnog čimbenika aktivacije (PAF-AH)	19
1.3.3.2 Uloga PAF-AH u srčanožilnim bolestima	22
1.3.4 VASKULARNI ENDOTELNI ČIMBENIK RASTA (VEGF)	23
1.3.4.1 Struktura i funkcija VEGF-a	23
1.3.3.2 Uloga VEGF u srčanožilnim bolestima	29
1.3.5 ANGIOPOIETINI I NJIHOVI RECEPTORI	30
1.3.5.1 Struktura i funkcija angiopietina i njihovih receptora	30
1.3.5.2 Angiopietini i Tie-2 receptor u srčanožilnim bolestima	38
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	39
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	41
3.1 ISPITANICI	41
3.1.1 Ispitanici s perifernom arterijskom bolesti	41
3.1.2 Kontrolna skupina	43
3.2 UZORCI	44
3.2.1 Primarni uzorci za biokemijske pretrage	44
3.2.2 Uzorci za određivanje polimorfizma <i>pon1</i> i <i>pon2</i> gena	44
3.3 METODE	45
3.3.1 Određivanje lipidnog statusa	45
3.3.2 Određivanje koncentracije CRP-a u serumu	47
3.3.3 Određivanje katalitičke koncentracije PAF-AH-a	48
3.3.4 Određivanje bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije PON1	49
3.3.5 Određivanje polimorfizama <i>pon1</i> i <i>pon2</i> gena	50
3.3.6 Određivanje koncentracije VEGF u serumu	56
3.3.7 Određivanje koncentracije Angiopietina 2 (Ang-2) u serumu	58
3.3.8 Određivanje koncentracije Tie-2 receptora u serumu	60

3.3.9 Statistička analiza podatka	63
<b>4. REZULTATI</b>	64
4.1 ISPITANICI	64
4.2 LIPIDNI STATUS I CRP	67
4.2.1 Lipidni status i CRP u serumu ispitanika i kontrolne skupine	67
4.2.2 Povezanost dobi i spola s pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om	71
4.2.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti	72
4.2.4 Koncentracija CRP-a kao čimbenik kardiovaskularnog rizika	74
4.3 KATALITIČKE KONCENTRACIJE ENZIMA PON1 i PAF-AH	76
4.3.1 Katalitičke koncentracije enzima PON1 i PAF-AH u serumu ispitanika i kontrolne skupine	76
4.3.2 Povezanost dobi i spola sa katalitičkim koncentracijama enzima	78
4.3.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa katalitičkim koncentracijama enzima u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti	80
4.4 POLIMORFIZMI <i>pon1</i> I <i>pon2</i> GENA	87
4.4.1 Učestalost genotipova i alela <i>pon1</i> i <i>pon2</i> gena	87
4.4.2 Polimorfizmi <i>pon1</i> i <i>pon2</i> gena i katalitičke koncentracije paraoksonaze	92
4.5 KONCENTRACIJE BIOMARKERA ANGIOGENEZE	100
4.5.1 Koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora	100
4.5.2 Povezanost dobi i spola sa koncentracijama biomarkera angiogeneze	102
4.5.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa koncentracijama biomarkera angiogeneze u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti	104
4.5.4 Odnos biomarkera angiogeneze i ostalih biokemijskih pretraga	105
4.6 ODNOS ISTRAŽIVANIH BIOKEMIJSKIH PRETRAGA I STUPNJA ANGIOGRAFSKIH PROMJENA PERIFERNIH ARTERIJA	111
<b>5. RASPRAVA</b>	112
5.1 ISPITANICI	112
5.2 LIPIDNI STATUS I CRP	113
5.3 KATALITIČKE KONCENTRACIJE ENZIMA PON1 i PAF-AH	116
5.4 POLIMORFIZMI <i>pon1</i> I <i>pon2</i> GENA	118
5.5 KONCENTRACIJE BIOMARKERA ANGIOGENEZE	121
5.6 ODNOS ISTRAŽIVANIH BIOKEMIJSKIH PRETRAGA I STUPNJA ANGIOGRAFSKIH PROMJENA PERIFERNIH ARTERIJA	125
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	128
<b>7. LITERATURA</b>	131
<b>8. PRILOZI</b>	143
<b>9. ŽIVOTOPIS</b>	144

## POPIS KRATICA

AA	terminalna aorta (lat. <i>aorta abdominalis</i> )
ABI	pedobrahijalni indeks (engl. <i>ankle brachial index</i> )
ADAMTS-1	ADAMTS-1 proteaza (engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 1</i> )
AF	lisna arterija (lat. <i>arteria fibularis</i> )
Ang	angiopietini (engl. <i>Angiopietins</i> )
Ang-1	angiopietin 1 (engl. <i>Angiopietin 1</i> )
Ang-2	angiopietin 2 (engl. <i>Angiopietin 2</i> )
AIC	zajednička bočna arterija (lat. <i>arteria iliaca communis</i> )
AIE	vajnska bočna arterija (lat. <i>arteria iliaca externa</i> )
AFC	zajednička bedrena arterija (lat. <i>arteria femoralis communis</i> )
AFS	površinska bedrena arterija (lat. <i>arteria femoralis superficialis</i> )
AFP	duboka bedrena arterija (lat. <i>arteria profunda femoris</i> )
AKT/PKB	AKT/PKB protein kinaza (engl. <i>Akt/PKB serine/threonine protein kinase</i> )
ALI	akutna ishemija ekstremiteta (engl. <i>acute limb ischemia</i> )
AP	zakoljenska arterija (lat. <i>arteria poplitea</i> )
ATA	prednja arterija potkoljenice (lat. <i>arteria tibialis anterior</i> )
ATP	stražnja arterija potkoljenice (lat. <i>arteria tibialis posterior</i> )
BAD	čimbenik apoptoze BAD (engl. <i>BCL2-antagonist of cell death</i> )
bFGF	bazični čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i> )
CI	intervali pouzdranosti (engl. <i>confidence interval</i> )
COX-2	cikloksigenaza-2 (engl. <i>Cyclooxygenase-2</i> )
CRP	C- reaktivni protein (engl. <i>C-reactive protein</i> )
CLI	kritična ishemija ekstremiteta (engl. <i>critical limb ischemia</i> )
DAG	diacilglicerol (engl. <i>diacylglycerol</i> )
DM	šećerna bolest, dijabetes (lat. <i>diabetes mellitus</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )

DSA	digitalna subtrakcijska angiografija (engl. <i>digital subtraction angiography</i> )
Dok-R	Dok-R protein (engl. <i>Dok-related docking protein</i> )
EC	endotelne stanice (engl. <i>endothelial cells</i> )
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellularmatrix</i> )
EIA	enzimimunokemijski test (engl. <i>enzyme immunoassay</i> )
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbentassay</i> )
eNOS	endotelna dušik oksid sintetaza (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
EPC	endotelne prekursorske stanice (engl. <i>endothelial precursor cells</i> )
FAK	fokalna adhezijska kinaza (engl. <i>focal adhesion kinase</i> )
FOXO1	transkripcijski čimbenik FOTO1 (engl. <i>transcription factor Forkhead box O1</i> )
HB-EFG	heparin vezujući epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>heparin-binding epidermal-like growth factor</i> )
HDL	lipoproteini velike gustoće (engl. <i>high density lipoprotein</i> )
HGF	čimbenik rasta hepatocita (engl. <i>hepatocyte growth factor</i> )
HIF	čimbenik induciran hipoksijom (engl. <i>hypoxia-inducible factor</i> )
HPC	hematopoetske progenitorske stanice (engl. <i>haematopoietic progenitor cells</i> )
hs-CRP	CRP određen visoko osjetljivom metodom (engl. <i>high-sensitivity CRP</i> )
HSP27	protein toplinskog stresa- 27 (engl. <i>heat-shock protein-27</i> )
HSPG	heparan sulfat proteoglikani (engl. <i>heparan sulfate proteoglycans</i> )
IC	intermitentna klaudikacija (engl. <i>Intermittent claudication</i> )
ICAM-1	unutarstanična adhezijska molekula (engl. <i>Intracellular adhesion molecule 1</i> )
IFCC	Međunarodno udruženje za kliničku kemiju (engl. <i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i> )
Ig	imunoglobulin
LCAT	lecitin kolesterol aciltransferaza (engl. <i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i> )
LDL	lipoproteini male gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
LPC	lizo-fosfatidilkolin (engl. <i>lyso-phosphatidylcholine, LPC</i> )
Lp-PLA	lipoprotein vezana fosfolipaza A2 (engl. <i>lipoprotein-associated phospholipase A2</i> )
MAPK	mitogen aktivirana protein kinaza (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )

MCP-1	kemotaktični monocitni protein 1 (engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MCSF-1	čimbenik poticanja kolonija monocita 1 (engl. <i>monocyte colony stimulating factor-1</i> )
MMP	metaloproteinaza matriksa (engl. <i>Matrix metalloproteinase</i> )
MRA	magnetno rezonantna angiografija (engl. <i>magnetic resonance angiography</i> )
MSCTA	višeslojna kompjuterizirana tomografska angiografija (engl. <i>multi-slice computed tomographic angiography</i> )
NaCl-PON1	stimulirana katalitička koncentracija PON1
NaCl-PON1/HDL	stimulirana katalitička koncentracija PON1 standardizirana prema HDL-u
NF- κB	nuklearni transkripcijski čimbenik-κB (engl. <i>nuclear transcriptionfactor kappa B</i> )
NIST	američka nacionalna ustanova za standardizaciju (engl. <i>National Institute of Standards and Technology</i> )
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
OxLDL	oksidirani LDL (engl. <i>oxidized low density lipoproteins cholesterol</i> )
OxPAPC	oksidirani 1-palmitoil-2-arahidonoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilkolin (engl. <i>oxidized 1-palmitoyl -2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine</i> )
PAF	trombocitni čimbenik aktivacije (engl. <i>Platelet-Activating Factor</i> )
PAF-AH	acetilhidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije (engl. <i>Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase</i> )
PAF-AH /LDL	katalitička koncentracija PAF-AH-a standardizirana prema LDL-u
PAB	periferna arterijska bolest
PC	fosfokolin (engl. <i>phospho-choline</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PECAM 1	trombocitna adhezijska molekula (engl. <i>platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1</i> )
PDGF	čimbenik rasta porjeklom iz trombocita (engl. <i>platelet derived growth factor</i> )
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol 3' kinase</i> )
PLCγ	fosfolipaza C (engl. <i>phospholipase C-γ</i> )
PLA2	fosfolipaza A2 (engl. <i>Phospholipase A2</i> )
PON1	paraoksonaza 1 (engl. <i>paraoxonase-1</i> )
PON2	paraoksonaza 2 (engl. <i>paraoxonase-2</i> )

PON3	paraoksonaza 3 (engl. <i>paraoxonase-3</i> )
<i>pon1</i>	gen za paraoksonazu 1
<i>pon2</i>	gen za paraoksonazu 2
<i>pon3</i>	gen za paraoksonazu 3
PON1/HDL	bazalna katalitička koncentracija PON1 standardizirana prema HDL-u
PSV	maksimalna brzina sistoličkog protoka (engl. <i>Peak systolic velocity</i> )
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment length polymorphism analysis</i> )
SAA	serumski amiloid A (engl. <i>Serum amyloide A</i> )
SAD	Sjedinjene Američke Države
SMC	glatkomišićne stanice (engl. <i>smooth muscle cells</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SRM	standardni referentni materijal
STAT	signalni aktivator transkripcije (engl. <i>signal transducers and activators</i> )
TBI	indeks tlaka nožnog palca (engl. <i>toe-brachial index</i> )
Tie-2	tirozin kinazni receptor Tie-2
TFTr	goljenično-lisni trunkus (lat. <i>truncus tibiofibularis</i> )
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta- $\beta$ (engl. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TMB	tetrametil benzidin
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora- $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor -<math>\alpha</math></i> )
VCAM-1	vanstanična adhezijska molekula (engl. <i>Vascular adhesion molecule1</i> )
VE-cadherin	vaskularni endotelni kadherin (engl. <i>vascular endothelial cadherin</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
VE-PTP	vaskularna endotelialna fosfotirozin fosfataza (engl. <i>vascular endothelial protein tyrosine phosphatase</i> )
VLDL	lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. <i>very low density lipoprotein</i> )



# 1. UVOD

## 1.1 UPALA I ANGIOGENEZA

### 1.1.1 UPALA

Upala je kompleksni proces u kojem sudjeluju različiti stanični tipovi i čimbenici koji na koordinirani način sudjeluju u kontroli oštećenja tkiva protiv različitih patogena, traumatskih ili toksičnih oštećenja. Upalni proces regulira staničnu kemotaksiju, migraciju i proliferaciju koordiniranim djelovanjem pro- i antiupalnih molekula. Osim obrambene i cjelidbene uloge upalni procesi u organizmu imaju i štetne učinke, koji uključuju prolaznu disfunkciju tkiva, trajno smanjenje djelatne sposobnosti i generalizaciju upalotvornih procesa. Odnos upalotvornih i upalostatskih mehanizama određuje kliničko očitovanje upalne reakcije. Sustavne reakcije organizma na upalu koje omogućavaju homeostazu, te funkcionalnu ustrojbenost cjelovitost organizma, značajno se razlikuju u akutnoj i kroničnoj upali.

**Akutnofazni odgovor jetre**, kao dio sustavnog odgovora akutne faze, očituje se promjenama proteina akutne faze, pri čemu koncentracija pozitivnih reaktanata akutne faze u prva 24 sata višestruko naraste. Mnogi proteini akutne faze sudjeluju kao plazmatski pojačivački upalotvornih sustava (komplementne molekule, koagulacijski sustav). Drugi djeluju upalostatski (inhibitori proteaza), a treći imaju istodobno upalotvorne i upalostatske učinke (C- reaktivni protein i serumski amiloid A).

**Kronična upala** danas se povezuje sa mnogim patofiziološkim stanjima znakovitim za stariju životnu dob, uključujući kardiovaskularne, neurodegenerativne i maligne bolesti, te metabličke i mišićnokoštane poremećaje. Može se razviti iz akutne upale, ali i bez akutnog očitovanja. Karakterizirana je infiltracijom limfocita i makrofaga, izobiljem krvnih žila, fibrozom i nekrozom. U početnoj fazi kronične upale fibroblasti, endotelne stanice, monociti i limfociti čine histološku sliku granuloma, a u kasnijoj fazi upale prevladavaju vezivotvorni i angiogenetski procesi (1-3).

### 1.1.2 MEHANIZMI VASKULARNOG RASTA

Angiogeneza označava rast i procese remodeliranja u kojima se inicijalni vaskularni sustav modificira do kompleksne krvožilne mreže (2). U procesu nastanka krvnih žila, koji se u širem smislu naziva neovaskularizacija (4) ili angiogeneza (5) razlikuju se tri procesa: vaskulogeneza, angiogeneza i arteriogeneza (4).

**Vaskulogeneza** je primarno proces rane embriogeneze u kojem primarna kapilarna mreža nastaje iz cirkulirajućih endotelnih prekursorskih stanica (engl. *endothelial precursor cells*, EPC), poznatih i kao angioblasti (6). Angioblasti proliferiraju, međusobno se povezuju i čine primitivni vaskularni pleksus. Novija istraživanja pokazala su da se vaskulogeneza može odvijati i u odraslom organizmu, pri čemu endotelne progenitorske stanice pridonose nastanku krvnih žila u ishemičnim, malignim ili upalnim tkivima, te se mogu i terapijski koristiti za stimulaciju rasta krvnih žila u ishemičnim tkivima, procesu označenom kao terapijska vaskulogeneza (7).

**Angiogeneza** je proces u kojem krvne žile nastaju pupanjem iz već postojećih (8). To je kompleksni biološki proces, koji zahtjeva preciznu koordinaciju između pro- i antiangiogenih čimbenika rasta (9,10). Fiziološki prevladavaju angiostatski mehanizmi i u odraslom organizmu nema rasta krvnih žila, osim u iznimnim situacijama, kao što su cijeljenje rane, formiranje žutog tijela i folikula jajnika, te rast endometrija. Patološka angiogeneza nastaje kao posljedica gubitka ravnoteže između čimbenika koji stimuliraju i inhibiraju angiogenezu. Zbog toga dolazi do prekomjernog rasta krvnih žila tijekom patoloških procesa kao što su nastanak solidnih i krvnih tumora, kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroza), kroničnih upalnih bolesti (reumatoidni artritis, Chronova bolest), dijabetesa (dijabetička retinopatija), psorijaze, endometrioze i pretilosti. Nedostatan rast krvnih žila sastavni je dio patoloških zbivanja kao što su ishemijska bolest srca, cerebrovaskularni inzult, sklerodermija i infertilitet (5).

**Arteriogeneza**, označava proces stvaranja zrelih arterija iz postojećih arteriola nakon arterijske okluzije (11). Važno je naglasiti da se radi o procesu aktivne proliferacije i remodeliranja (8) u koji su uključene vaskularne glatke mišićne stanice u velikim arterijama i periciti u manjim arteriolama (12). Arteriogeneza uključuje aktivaciju endotelnih stanica, razgradnju bazalne membrane, invaziju leukocita, proliferaciju vaskularnih stanica, stvaranje neointime, promjene izvanstaničnog matriksa i sudjelovanje brojnih citokina (11). Premda isti čimbenici rasta sudjeluju u angiogenezi i arteriogenezi, ta dva procesa se značajno

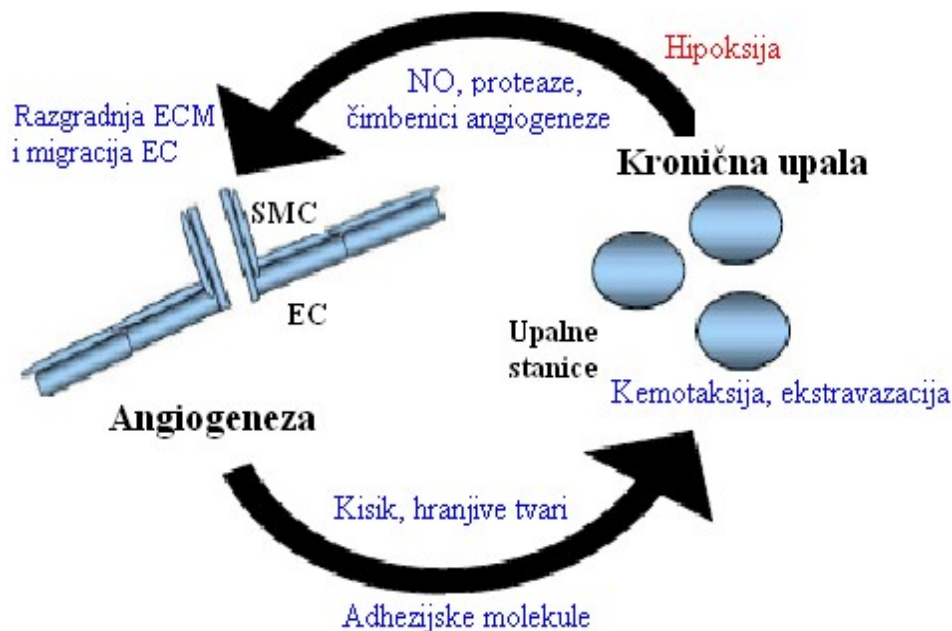
razlikuju. Arteriogeneza može u potpunosti nadomjestiti protok kroz okludiranu arteriju, za razliku od angiogeneze koja to ne može. Druga temeljna razlika između ova dva procesa je ovisnost o hipoksiji. Angiogeneza je ovisna o hipoksiji, za razliku od arteriogeneze koja se javlja u uvjetima normoksije, a njeni glavni pokretači su žilni stres i upala (8).

### 1.1.3 KRONIČNA UPALA I ANGIOGENEZA

Kronična upala i angiogeneza su dva kompleksna i međuovisna procesa. Hipoksija, čest pokretač oba procesa, dovodi do akumulacije makrofaga i drugih imunih stanica, kao i povećanog stvaranja čimbenika rasta. Većina stanica koje su uključene u upalni proces oslobađa nekoliko čimbenika rasta koji direktno ili indirektno djeluju na endotelne stanice. S druge strane angiogeneza održava upalu dovođenjem kisika i hranjivih tvari stanicama koje se nalaze na mjestima upale. U upalnim stanicama aktivacijom inducibilne dušik oksid sintetaze, stimulira se dilatacija i permeabilnost krvnih žila, što je preduvjet za ekstravazaciju imunih stanica. Osim toga mnogi proinflamatorni citokini i kemokini oslobođeni tijekom upale potentni su aktivatori susjednih endotelnih stanica. Jedan od najznačajnijih procesa u tom začaranom krugu (slika 1.1.) je adhezija imunih stanica na endotel. Njihov izražaj je reguliran različitim proinflamatornim medijatorima koje oslobađaju različite vrste stanica. E-selektin je primjerice potpuno odsutan na zrelim stanicama krvnih žila, ali je visoko eksprimiran na aktiviranim angiogenim endotelnim stanicama gdje sudjeluje u ekstravazaciji imunih stanica. Osim toga inflamatorni medijatori koje stvaraju imune stanice potiču fibroblaste i endotelne stanice da oslobađaju angiogene čimbenike, pri čemu djeluju kao indirektni pokretači angiogeneze. Osim indirektnog djelovanja, upalne stanice mogu i same oslobađati angiogene čimbenike uključujući vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF), angiopoietine (engl. *Angiopoietins*, Ang), bazični čimbenik rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), čimbenik rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF), čimbenik rasta porjeklom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*, PDGF), transformirajući čimbenik rasta- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ), čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), između mnogih drugih, koji na mjestima upale imaju mitogeni i migratorni učinak na endotelne stanice.

Hipoksija je karakteristična za upalu. Povećani izražaj čimbenika induciranog hipoksijom (engl. *hypoxia-inducible factor*, HIF) djeluje na transkripciju nekoliko angiogenih gena

uključujući VEGF i angiopoietine. Aktivacija nuklearnog transkripcijskog čimbenika- $\kappa$ B (engl. *nuclear transcription factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) proinflamatornim medijatorima, primarni je događaj u upali. NF- $\kappa$ B ključna je molekula koja regulira izražaj i funkciju širokog spektra gena uključenih u preživljenje, rast i migraciju. To uključuje metaloproteinaze matriksa (engl. *Matrix metalloproteinase*, MMP), urokinazni tip aktivatora plazminogena i adhezijske molekule: unutarstaničnu adhezijsku molekulu (engl. *Intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), vanstaničnu adhezijsku molekulu (engl. *Vascular adhesion molecule 1*, VCAM-1) i E-selektin. Većina autora povezuju NF- $\kappa$ B sa upalom i angiogenezom, a novi dokazi upućuju da međuodnos upale i angiogeneze ovisi o molekularnim interakcijam između signalnih puteva NF- $\kappa$ B i Angiopoietin-Tie signalnog puta (2).



Slika 1.1. Shematski prikaz međuviznosti kronične upale i angiogeneze (preuzeto iz literaturnog navoda 2). Upalne stanice izlučuju čimbenike rasta, dušikov oksid (engl. *nitric oxide*, NO), proteaze i citokine koji dovode do razgradnje izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM), rasta endotelnih stanica (engl. *endothelial cells*, EC), njihove migracije i invazivnog kapaciteta, te na taj način potiču angiogenezu. S druge strane, stanice stjenke krvne žile, prenoseći citokine, kisik i hranjive tvari na mjesto upale omogućavaju kemotaksiju upalnih stanica. To dalje povećava upalu i angiogenezu.

## 1.2 ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je kronični upalni fibroproliferativni proces koji zahvaća srednje i velike arterije, a obuhvaća čitav niz zbivanja koja rezultiraju zadebljanjem krvožilne stjenke, promjenom njezine kvalitete, smanjenjem elastičnosti i odgovarajućom opstrukcijom lumena zahvaćene arterije. To je difuzni proces u kojem sudjeluju stanice stjenke krvne žile (endotelne stanice, glatke mišićne stanice) i krvne stanice (monociti, T limfociti, trombociti) sa svojim proizvodima koji autokrinim i parakrinim djelovanjem potiču međusobnu aktivnost i oštećenje stanica.

### 1.2.1 UPALA I ATEROSKLEROZA

U posljednje vrijeme sve je više dokaza koji upućuju da upala igra važnu ulogu u nastanku ateroskleroze, te da je još važnija u procesu koji ateroskleroznu nakupinu čini nepostojanom. Upalni proces može biti reverzibilan i može potpuno obnoviti cjelovitost endotela u stadiju razvoja masne pruge. Međutim kad zakažu homeostatski mehanizmi ili ako su čimbenici rizika stalno prisutni, dolazi do daljnjeg napredovanja aterosklerotskog procesa. Progresija lezije od masne pruge do fibroznog plaka ovisi o ravnoteži između rasta i apoptoze glatkih mišićnih stanica. Poremećaj ravnoteže između sinteze i razgradnje međustanične tvari ili proteinaza koje ragrađuju matriks i njihovih inhibitora može oslabiti fibrozu "kapu" i pogodovati razvoju trombotičnih komplikacija.

Danas se smatra da proces aterogeneze započinje oštećenjem ili promjenom funkcije endotela uzrokovanim čimbenicima rizika. Proinflammatory poticaji potiču izražaj adhezijskih molekula na membranama endotelnih stanica, te otpuštanje proinflammatory citokina. Koordiniranim procesom stanične adhezije, kemotaksije i leukocitne aktivacije dolazi do regrutacije cirkulirajućih leukocita u stjenku krvne žile i razvoja upalnog procesa. Smatra se da u patogenezi i progresiji aterosklerotskih lezija ključnu ulogu ima aktivacija transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B. Kao odgovor na oksidirani LDL, vazoaktivne peptide, aktivirani CD40 receptor, citokine oslobođene iz monocita (TNF- $\alpha$  i IL-1) ili krajnje proizvode napredne glikacije dolazi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B. Aktivirani NF- $\kappa$ B koordinira izražaj adhezijskih molekula VCAM-1 i ICAM-1, te sintezu kemotaktičnog monocitnog proteina 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) i čimbenika poticanja kolonija makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*, MCSF).

Monociti prijanjaju uz adhezijske molekule na endotelnim stanicama, ulaze u intimu privučeni kemokinom MCP-1 i diferenciraju se u makrofage. Makrofazi ističu receptore čistače, pretrpavaju se lipidima i postaju pjenaste stanice. Lokalnim stvaranjem IL-6 kontrolira se aktivacija monocita. Aktivirani monociti u interakciji s fibroblastima povećavaju stvaranje MCP-1 i IL-6, što dodatno amplificira proces. Na promjenjeni endotel prijanjaju i nakupljaju se trombociti, te se aktiviraju. Nakupljeni trombociti luče PDGF koji zajedno sa čimbenicima rasta i citokinima što ih luče aktivirane endotelne stanice, makrofazi i T limfociti (PDGF, TGF- $\beta$ ) potiče migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije u intimu i njihovu proliferaciju. Promjena fenotipa glatkih mišićnih stanica iz kontraktilnog u sintetski dovodi do stvaranja povećane količine međustanične tvari, što pridonosi daljnjem razvoju ateroma.

Poznato je da za kliničko očitovanje ateroskleroze nije toliko važna veličina ateroma, već prvenstveno njegov sastav. Nestabilni ateromi sadrže mnogo lipida (estera i kristala kolesterola), brojne upalne stanice i imaju tanku vezivnu kapu koja sadrži malo veziva. Za razliku od njih, stabilni ateromi imaju debelu vezivnu kapu, malu lipidnu jezgru i malo upalnih stanica, rjetko pucaju i rjeđe uzrokuju pogibeljne kliničke posljedice. Nakon aktivacije upalnih stanica one oslobađaju proinflamatorne citokine, koji smanjuju stvaranje kolagena i induciraju izražaj tkivnog čimbenika. Međuodnos između anti- i proinflamatornih citokina i proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora koje luče aktivirani makrofazi, limfociti, glatke mišićne i mast stanice značajno utječe na stabilnost ateroma. TNF- $\alpha$ , potentni proinflamatorni citokin, kojeg luče aktivirane mast stanice, može inducirati parakrinu sintezu i oslobađanje MMP-9 u makrofazima. Osim toga TNF- $\alpha$  potiče apoptozu glatkih mišićnih i endotelnih stanica, te na taj način destabilizira aterom. CD 40 ligand kao i IL-1 što ga luče aktivirani T limfociti inducira u makrofazima oslobađanje intersticijalnih kolagenaza (MMP1, -8 i 13). Aktivirani makrofazi i glatke mišićne stanice smještene uz rubove ateroma luče MMP-2 i MMP-9, koje razgrađuju kolagen, gelatin, elastin, fibronektin i složene proteoglikane matriksa. Interferon gama, kojeg luče aktivirani T limociti može ograničiti sintezu kolagena u glatkim mišićnim stanicama i reparacijske procese neophodne za očuvanje cjelovitosti fibrozne kape. Dodatno serinske proteinaze mogu sudjelovati u remodeliranju međustanične tvari, te pogodovati prsnuću plaka i trombozi. S druge strane tromboza potiče izražaj P selektina i CD 40 liganda na površini tromocita, a te molekule potiču novačenje leukocita i upalni proces (1,2,13).

### 1.2.2 ANGIOGENEZA I ATEROSKLEROZA

Nedavna istraživanja potvrdila su važnu ulogu angiogeneze u aterosklerozi (14-17). Većina aterosklerotskih lezija su vaskularizirane mrežom kapilara koje nastaju iz adventicijalnih *vasa vasorum*, a predstavljaju nezrele endotelne cijevi, koje su fragilne i sklone rupturi. Zahvaljujući upalnom mikrokruženju ove kapilare mogu biti važni regulatori nestabilnosti plaka. Istraživanja Bockhova i suradnika (18) pojasnila su mehanizam angiogeneze u aterosklerotskom plaku. Prema njihovim istraživanjima lipoproteini koji se akumuliraju u izvanstaničnom prostoru plaka, osobito su osjetljivi na oksidativne modifikacije, obzirom da nisu u kontaktu sa staničnim antioksidansima. Općenito je poznata činjenica da oksidacijski stres predstavlja ključni čimbenik aterogeneze i njezine progresije u trombogenezu. Izvor oksidiranih fosfolipida su fosfolipidni ostaci u LDL česticama. Jedan od najistraživanijih oksidiranih fosfolipida je oksidirani 1-palmitoil-2-arahidonoil-*sn*-glicero-3-fosforilkolin (engl. *oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine*, OxPAPC), komponenta minimalno modificiranog lipoproteina male gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL). Bockhov i suradnici (18) potvrdili su da OxPAPC stimulira pupanje krvnih žila, te potiče rast kapilara u miševa. Osim toga OxPAPC potiče izražaj VEGF *in vivo* u nekim normalnim i tumorskim stanicama *in vitro*. Povećani izražaj VEGF-a dovodi do porasta permeabilnosti i može biti uzrokom krvarenja u plak. Osim što povećavaju ekspresiju VEGF, oksidirani fosfolipidi imaju ulogu u regulaciji leukocitno endotelnih staničnih interakcija i indukciji upalnih citokina, kao što su interleukin 8 (IL-8), ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase-2*, COX-2) i ADAMTS-1 proteaza (engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif*, ADAMTS-1), čija proupalna svojstva značajno pridonose razvoju aterosklerotskog plaka (15).

### 1.2.3 PERIFERNA ARTERIJSKA BOLEST

Periferna arterijska bolest (PAB) naziv je za aterosklerotsku, stenozirajuću, okluzivnu ili aneurizmatsku bolest aorte i njenih ogranaka i najčešće zahvaća donje ekstremitete. Oboljeli od periferne arterijske bolesti imaju višestruko veći rizik za kardiovaskularnu smrt, akutni koronarni sindrom i cerebrovaskularni inzulit. Međutim, bolest se u praksi nedovoljno i kasno dijagnosticira, kao bolest i kao čimbenik ukupnog kardiovaskularnog rizika, bolesnici nisu svjesni dijagnoze i nedovoljno intenzivno se provode preventivni i terapijski postupci za

smanjenje rizičnih čimbenika.

### **Klinička manifestacija bolesti**

Postoje razni oblici i stupnjevi zahvaćenosti, te više oblika kliničkih manifestacija bolesti. Bolest može biti asimptomatska ili se može manifestirati kliničkom slikom intermitentne klaudikacije (engl. *intermittent claudication*, IC) i kritične ishemije ekstremiteta (engl. *critical limb ischemia*, CLI). Klaudikacija je pojam koji označava umor ili bol u grupi mišića zahvaćenih ishemijom i proporcionalna je opsegu tjelesnog opterećenja. Kritična ishemija, mnogo je teži oblik i predstavlja tešku arterijsku insuficijenciju koja se očituje bolom u mirovanju i prijetećim gubitkom ekstremiteta ako se ne liječi. Kliničku sliku kronične kritične ishemije čine bol u mirovanju, ulceracije ili gangrene. Akutna ishemija ekstremiteta (engl. *acute limb ischemia*, ALI) označava iznenadno smanjenje ili pogoršanje arterijske perfuzije ekstremiteta koja uzrokuje potencijalnu ugroženost vitalne održivosti ekstremiteta, a u užem smislu odnosi se na akutnu arterijsku tromboemboliju. Progresija bolesti od klaudikacije, preko boli u mirovanju do ishemijskih ulceracija i gangrene, dovodi do amputacije ekstremiteta. Može biti postepena ili nagla, što ovisi o stupnju aterosklerotske opstruktivne bolesti, prisutnosti kolateralne cirkulacije, te o intenzitetu tjelesne aktivnosti (19-23).

### **Epidemiologija i čimbenici rizika**

Periferna arterijska bolest vrlo je proširen sindrom. Rezultati nekoliko prospektivnih istraživanja provedeni na evropskoj populaciji pokazali su da se prevalencija PAB kreće od 3 do 18% kod osoba starijih od 55 godina. Godinama značajno progredira, tako da u osoba starijih od 70 godina iznosi oko 20%, a u osoba iznad 85 godina čak 60% (24-28).

Čimbenici rizika za perifernu arterijsku bolest slični su onima koji dovode do ateroskleroze u drugim vaskularnim teritorijima (20), ali je njihov značaj za razvoj i progresiju bolesti bitno drugačiji u odnosu na čimbenike rizika u koronarnoj bolesti (29). S rastućom životnom dobi značajan je porast incidencije i prevalencije bolesti. Smatra se da se rizik od nastanka periferne arterijske bolesti udvostručuje za svaku dekadu života. Prevalencija simptomatske i asimptomatske bolesti nešto je veća u muškaraca nego u žena, osobito u mlađim dobnim skupinama (20). Pušenje je uz šećernu bolest najznačajni čimbenik rizika za razvoj periferne arterijske bolesti. Dijagnoza PAB-a u pušača se postavlja dekadu ranije nego u nepušača. Težina PAB-a u korelaciji je sa brojem popušanih cigareta. Teški



pušači imaju četiri puta veći rizik za razvoj intermitentne klaudikacije u odnosu na nepušače (20). Oboljeli od šećerne bolesti imaju visok rizik za razvoj periferne arterijske bolesti. Kod njih bolest ima mnogo agresiviji tijek, pa je potreba za amputacijama pet do deset puta veća u odnosu na bolesnike bez šećerne bolesti (30). U odnosu na pušenje i šećernu bolest, značaj arterijske hipertenzije i dislipidemije manje je značajan. Dislipidemija u perifernoj arterijskoj bolesti uključuje porast koncentracije LDL-kolesterola, snižen HDL-kolesterol i hipertrigliceridemiju (20).

### **Patofiziologija periferne arterijske bolesti**

Periferna arterijska bolest klinička je manifestacija ateroskleroze, a kompleksni i međuovisni patološki procesi uključeni u njen razvoj, doprinose progresiji i komplikacijama. Oni obuhvaćaju poremećaje hemodinamike, poremećaje metabolizma lipoproteina, aktivaciju trombocita i trombozu, endotelnu disfunkciju i upalu, oksidacijski stres, aktivaciju glatkih mišićnih stanica, poremećaj metabolizma matriksa, remodeliranje i angiogenezu (29,31).

Upala i angiogeneza važne su u patogenezi periferne arterijske bolesti (32-39), a njihovi odnosi su kompleksni i međuovisni (2, 40-42). Pušenje i šećerna bolest promoviraju oksidacijski stres, koji direktno i indirektno pospješuje razvoj upalnih mehanizama. Upala može biti čimbenik arterijske hipertenzije, koja je prisutna u 80% bolesnika s perifernom arterijskom bolesti. Angiotenzin II izaziva stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i povećani izražaj VCAM-1 na endotelnim stanicama. Angiotenzin II povećava izražaj interleukina 6 (IL-6) i MCP-1 u glatkim mišićnim stanicama. Osim toga dislipidemija može aktivirati upalu kroz modifikaciju oksidacije LDL-a i lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL). Upala utječe na strukturu i funkciju HDL čestica (43). Tijekom reakcije akutne faze i u kroničnim upalnim stanjima HDL podliježe značajnim strukturnim promjenama i gubi apoA-I, apoA-II, te svoje enzime: paraoksonazu i acetilhidrolazu trombocitnog čimbenika aktivacije. Strukturno modificiran HDL manje je djelotvoran od nativnog oblika u zaštiti LDL-a od oksidativnih modifikacija i u aktivaciji lecitin kolesterol aciltransferaze (engl. *lecithin-cholesterol acyltransferase*, LCAT) (44). Druga stanja koja mogu biti uključena u sistemski upalni odgovor i predisponirati razvoju periferne arterijske bolesti su polimorfizmi jednog nukleotida u genima koji kodiraju upalne molekule, infekcije, te autoimune bolesti (32).

Suženjem lumena arterija remeti se linearno strujanje krvi na ulazu u stenozu. To dovodi do gubitka kinetičke energije, smanjenja brzine cirkulacije i sniženja tlaka. Gubitak

energije razmjeran je četvrtoj potenciji polumjera arterije. Smanjenje promjera za polovinu (50% stenoza) odgovara 75%-om smanjenu površine presjeka arterije. Takvo suženje naziva se kritičnom ili hemodinamski značajnom stenozom, jer bitno snizuje tlak i protok krvi. Kritična stenoza nije statična vrijednost, već se mijenja ovisno o potrebi distalnog tkiva za kisikom. U ljudi su vrlo česte multiple stenozе arterija. U konačnom djelovanju na perfuziju periferije njihovi učinci se zbrajaju. Posljedice za periferni optok ovise o tome da li je smanjenje protoka i sniženje tlaka progresivno, kronično ili se radi o akutnoj okluziji arterije (1). Akutna ishemija tkiva ili organa nastaje kao posljedica naglog prestanka arterijskog krvog optoka. Neovisno o uzroku akutne ishemije, slijed patofizioloških promjena ovisi o trajanju ishemije, kolateralnom krvotoku, lokalizaciji arterije, te ishemičnoj toleranciji tkiva. Proksimalno i distalno od mjesta zapreke dolazi do staze krvi, koja povećava aglomeraciju trombocita i otpuštanje tromboksana A<sub>2</sub>, te smanjuje nastajanje prostaciklina, što dovodi do tromboze. Ako je okluzija arterije uzrok ishemije, na mjestu okluzije arteriju infiltriraju upalne stanice. Unutar prva 24 sata puca membrana elastika, te se stvaraju naslage fibrina. Slijedećih dana *vasa vasorum* tromboziraju, nastaje edem medije uz krvarenje, te edem okolnog tkiva. Anaerobni metabolizam uzrokuje metaboličku acidozu i hiperkalijemiju, a ulazak toksina i raspadnutih produkata u krvotok povećava metaboličke i cirkulacijske smetnje. Preživljavanje distalnog tkiva nakon suženja glavne arterije ovisi o kapacitetu kolateralnog krvotoka.

### **Dijagnostika periferne arterijske bolesti**

Dijagnoza periferne arterijske bolesti postavlja se na osnovi anamnestičkih podataka, kliničke slike i čitavog niza kliničkih i dijagnostičkih pretraga kojima se procjenjuje tip i težina nastalih promjena. Neinvazivne metode daju informaciju o morfološkim i hemodinamskim aterosklerotičnim promjenama perifernih arterija, a obuhvaćaju funkcionalne metode: pedobrahijalni indeks (engl. *ankle brachial index*, ABI) i segmentalno mjerenje tlakova, te morfološke metode: obojeni dupleks ultrasonografiju (engl. *color-Doppler*, CD), višeslojnu kompjuteriziranu tomografsku angiografiju (engl. *multi-slice computed tomographic angiography*, MSCTA) i magnetno rezonantnu angiografiju (engl. *magnetic resonance angiography*, MRA). U prvoj fazi primjenjuju se neinvazivne funkcionalne metode kojima se nastoji isključiti ili potvrditi postojanje periferne arterijske bolesti (slika 1.2), a u daljnoj dijagnostičkoj obradi primjenom slikovnih metoda nastoji se utvrditi anatomska lokalizacija i stupanj morfoloških oštećenja perifernih arterija.

**Pedobrahijalni indeks** predstavlja omjer sistoličkih vrijednosti tlakova arterija gležnja i arterija nadlaktice. Kod normalnih zdravih osoba ABI je 1,1-1,2. Vrijednost ABI-ja manje od 0,90 potvrđuju PAB uz 95% osjetljivost i 100% specifičnost. Kod graničnih vrijednosti ABI-ja (0,92-1,0) preporuča se testirati s opterećenjem na pokretnoj traci tijekom 5 minuta. Vrijednosti ABI-ja manje od 0,4 znak su teške ishemije. U slučaju nekompresibilne kalcifikacije medije potkoljениčnih arterija i arterija stopala vrijednost ABI-ja su lažno povišene (ABI>1,4), pa je određivanje **indeksa tlaka nožnog palca** (engl. *toe-brachial index*, TBI) pouzdanija metoda. Vrijednosti TBI-ja između 0,90 i 0,80 nalaze se kod zdravih osoba, dok vrijednosti TBI-ja <0,64 upućuju na hemodinamski značajnu stenozu (20,45).

**Obojena dupleks ultrasonografija** neinvazivna je slikovna metoda kojom se dobivaju podaci o anatomiji, morfologiji i hemodinamici arterija, a temelji se na ultrazvučnoj dijagnostici i doplerovom efektu. Značajna stenozu dovodi do povišenja brzine protoka na mjestu stenozu, kao i do promjene doplerskog izgleda spektra. Glavni dijagnostički kriteriji za procjenu stenozu na dopleru arterija donjih ekstremiteta su izravno mjerenje stupnja stenozu, mjerenje maksimalne brzine sistoličkog protoka (engl. *Peak systolic velocity*, PSV), te promjena doplerskog signala (tablica 1.1.). Ova metoda ima važnu ulogu u potvdi dijagnoze PAB u bolesnika s nejasnim ili graničnim vrijednostima ABI-ja, te u planiranju i praćenju uspješnosti endovaskularnih i operativnih zahvata (20,45,46).

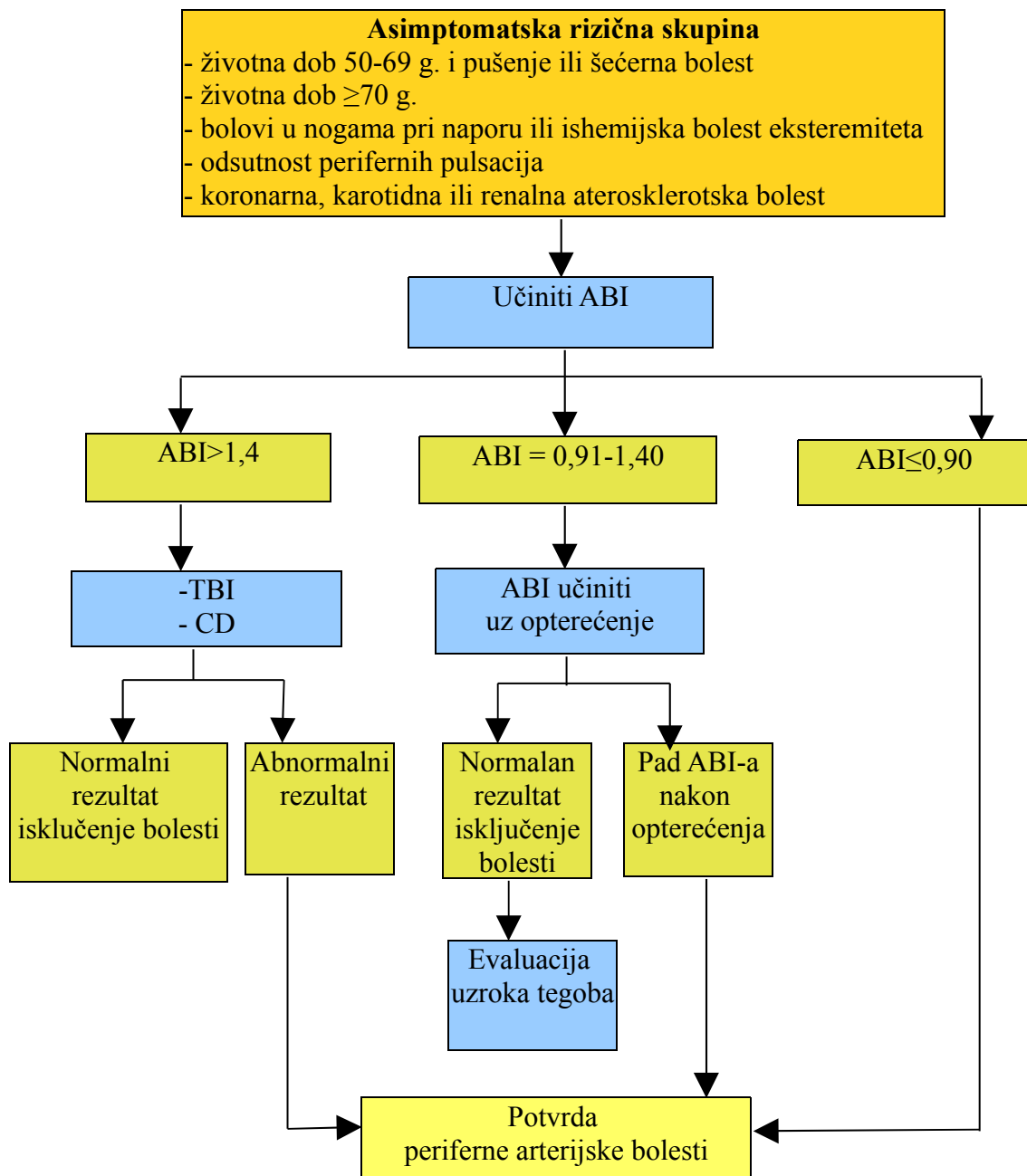
Tablica 1.1. Dijagnostički kriteriji za kvantifikaciju stenozu perifernih arterija obojenim doplerom (preuzeto iz literaturnog navoda 46).

	Smanjenje promjera	Izgled doplerskog signala	Promjene doplerskog signala	Omjer brzina (distalno/proksimalno)
Normalno (bez stenozu)	0	Trifazičan	Odsutna	+++ Nema promjena
Blaga	1%-19%	Trifazičan	Prisutna	< 2.1
Srednja	20%-49%	Bifazičan	Prisutna	< 2.1
Teška	50%-99%	Monofazičan	Prisutna	> 2.2*

\*>4:1 ukazuje na 75% stenozu, >7:1 ukazuje na >90% stenozu

**Digitalna suptraksijska angiografija** (engl. *digital subtraction angiography*, DSA) invazivna je dijagnostička metoda koja omogućuje prikaz arterija kontrastnim sredstvom uz brisanje okolnih sjena digitalnim postupkom. Zbog velike dijagnostičke osjetljivosti (99%) i

specifičnosti (99%) ova metoda predstavlja zlatni standard za dijagnostiku periferne arterijske bolesti. Njena primjena opravdana je u sklopu izvođenja endovaskularnih metoda liječenja i određivanja indikacija za operacijski zahvat.



Slika 1.2. Algoritam za dijagnostiku periferne arterijske bolesti (preuzeto iz literaturnog navoda 20, 21, 22, 30). ABI (engl. *ankle brachial index*); TBI, (engl. *toe-brachial index*); CD (engl. *color-Doppler*).

Usprkos brojnim dijagnostičkim metodama, periferna arterijska bolest se nedovoljno i kasno dijagnosticira. Poseban problem predstavljaju aterosklerotske promjene femoropoplitealnog područja, koje se razlikuje od aortoiliakalnog po svom razvoju i kasnoj simptomatologiji. Ova lokalizacija stenotično-okluzivnih promjena nalazi se u više od polovine bolesnika s perifernom arterijskom bolesti, a obično se dijagnosticira tek u uznapređovalom stadiju kad su stenozе višestruke, a obliteracije zahvaćaju jednu ili više natkoljениčnih ili potkoljениčnih arterija (20, 45).

### **1.3. BIOMARKERI U PERIFERNOJ ARTERIJSKOJ BOLESTI**

Razvoj novih dijagnostičkih metoda u području specijalne i visokodiferentne laboratorijske dijagnostike, u prvom redu enzimimunokemijskih metoda, metoda protočne citometrije i molekularne dijagnostike, posljednih godina omogućio je određivanje cijele palete "novih" biomarkera upale, tromboze, metabolizma lipoproteina, oksidacijskog stresa, remodeliranja tkiva i angiogeneze u perifernoj arterijskoj bolesti (tablica 1.2. ).

Iako je velik broj radova potvrdio povezanost novih biomarkera upale i tromboze sa rizikom razvoja i/ili progresije bolesti, stupnja funkcionalnog oštećenja, neželjnih kardiovaskularnih događanja i mortaliteta, još uvijek je mnogo nepoznanica, osobito o ulozi biomarkera metabolizma lipoproteina, oksidativnog stresa i angiogeneze u razvoju periferne arterijske bolesti. Novi markeri, uz mjerenje pedobrahijalnog indeksa, koji se smatra rutinskom neinvazivnom metodom probira, daju dodatnu informaciju o rizicima razvoja periferne arterijske bolesti, međutim za sada nema jedinstvenog stava ni preporuka o njihovoj rutinskoj primjeni (38, 39).

Tablica 1.2. Biomarkeri periferne arterijske bolesti

Upalni biomarkeri	<ul style="list-style-type: none"> <li>- C-reaktivni protein</li> <li>- interleukin-6</li> <li>- stanične adhezijske molekule</li> <li>- broj leukocita</li> <li>- beta-2-mikroglobulin</li> <li>- monocitni kemotaktični protein-1</li> <li>- topljivi CD-40 ligand</li> <li>- mijeloperoksidaze</li> <li>- neopterin</li> <li>- osteoprotegrin</li> <li>- čimbenik nekroze tumora-alfa</li> </ul>
Markeri tromboze	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fibrinogen</li> <li>- D-dimer</li> <li>- von Willebrandov čimbenik</li> <li>- tkivni plazminogen aktivator</li> <li>- plazminogen aktivator inhibitor</li> </ul>
Markeri metabolizma lipoproteina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acetilhidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije</li> <li>- lipoprotein (a)</li> </ul>
Markeri oksidativnog stresa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- glutation peroksidaza 2</li> <li>- 8-izo-prostaglandin F2-alfa</li> <li>- vitamin C</li> </ul>
Markeri remodeliranja matriksa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- matriks metaloproteinaze i njihovi inhibitori</li> <li>- plazmatski protein A povezan s trudnoćom</li> </ul>
Biomarkeri angiogeneze	<ul style="list-style-type: none"> <li>- VEGF i njegovi receptori</li> <li>- angiopietini i njihovi receptori</li> </ul>
Ostali markeri	<ul style="list-style-type: none"> <li>- homocistein</li> <li>- asimetrični dimetilarginin</li> </ul>

### 1.3.1 C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)

C-Reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*, CRP) prvi put su opisali Tillet i Frances davne 1930 godine, kao treću serološku frakciju ili "frakciju C", koja je izolirana iz seruma pacijenata inficiranih sa streptokokom pneumonije (47). U posljednjih 80 godina intenzivno se istraživala njegova struktura i uloga u upali, aterogenezi, trombogenezi i ukupnom kardiovaskularnom riziku.

#### 1.3.1.1 Struktura i funkcija CRP-a

CRP se sintetizira primarno u jetri, kao odgovor na interleukin 6 (IL-6) i druge inflamatorne citokine. CRP predstavlja prototip markera upale, obzirom da njegove koncentracije u plazmi rastu više od tisuću puta unutar 24 do 72 sata, kao dio akutnofaznog odgovora na infekciju, upalu ili oštećenje tkiva. CRP je protein iz obitelji pentraksina, karakteristične diskoidalne konfiguracije. Sastoji se od pet identičnih ciklički nekovalentno vezanih podjedinica (protomera). Svaki protomer sastoji se od 206 aminokiselina, molekulske mase od približno 23 kDa, sa veznim mjestom za dva iona kalcija i fosfokolin, te za receptor komplementa C1q.

Funkcija CRP-a u organizmu je višestruka. Vežanjem za specifične ligande, može aktivirati komplement klasičnim putem, te na taj način sudjeluje u nespecifičnoj obrani organizma od infekcija i prevenira razvoj autoimunih reakcija. Fosfokolin (engl. *phosphocholine*, PC), glavni ligand za CRP, prisutan je stanicama većine patogena uključujući bakterijske, gljivične i eukariotske endotelne stanice. Smatra se da CRP reagira samo sa aktiviranim endotelnim ili apoptotičnim stanicama koje na svojoj površini izražavaju PC. Osim za PC, CRP se veže i za male ribonukleoproteine i dijelove DNA, a na humanim leukocitima veže se za različite imunoglobulinske receptore, kao što je Fc $\gamma$ -RIIa (CD32) i Fc $\gamma$ -RIII (CD64), koji posreduju u fagocitozi. Osim toga CRP ima i proupalno i aterotrombotsko djelovanje. U aterosklerotskom plaku on može potaknuti izražaj adhezijskih molekula, poticati preuzimanje LDL-čestica u endotelnim makrofazima, poticati prodiranje monocita iz krvi u arterijsku stijenu i poticati proizvodnju MCP-1.

Nedavna istraživanja pokazala su da postoje najmanje dva različita konformacijska oblika CRP-a u ljudskoj plazmi: nativni pentamerni (pCRP) i monomerni (mCRP) (48). Gubitkom pentamerne simetrije pCRP prelazi u mCRP (49), koji ima izrazito proupalno i

protrombotsko djelovanje. Oba oblika CRP-a, pCRP i mCRP, vežu se endotelne stanice, trombocite, neutrofile i monocite preko specifičnog Fc receptora. Simultano se aktivira nekoliko signalnih mehanizama, uključujući različite kinaze i transkripcijske čimbenike. Oblik mCRP-a posjeduje snažno proupalno i protrombotsko djelovanje, dok nativni pCRP održava antiupalni adaptivni imuni odgovor. Za razliku od nativnog pCRP-a, mCRP inducira sekreciju IL-8 u neutrofilima i humanim koronarnim endotelnim stanicama, promovira adheziju neutrofila na endotelne stanice i odgađa apoptozu humanih neutrofila. Oba oblika različito reagiraju sa komponentama komplementa. Aktivirani trombociti predstavljaju okidač koji pokreće disocijaciju pCRP-a u mCRP. Pretpostavlja se da cirkulirajući trombociti adheriraju na oštećeni endotel, pri čemu se aktiviraju i na svojoj površini izražavaju lizo-fosfatidilkolin (engl. *lyso-phosphatidylcholine*, LPC), bioaktivni lipid. Nativni pCRP veže se za fosfokolin i disocira u mCRP LPC-posredovanim mehanizmom uz djelovanje kalcij neovisne fosfolipaze A2. Osim aktiviranih trombocita i neke apoptotične stanice izražavaju na svojoj površini LPC. Nastali mCRP može dovesti do pojačanog izražaja P-selektina na trombocitima, što dalje pokreće adheziju monocita. Eisenhardt i suradnici (50) su predložili hipotezu da se u aterosklerozi mCRP stvara iz cirkulirajućeg pCRP i da se nastali mCRP odlaže u aterosklerotski plak gdje ima snažno proupalno djelovanje.

### **1.3.1.2 CRP kao čimbenik kardiovaskularnog rizika**

CRP jedan je od najsnažnijih neovisnih prediktora infarkta miokarda, moždanog udara i ukupnog kardiovaskularnog mortaliteta čija je prognostička vrijednost potvrđena u različitim etničkim grupama, u muškaraca i žena, kod različitih dobnih skupina (51). Istraživanja Ridkera i suradnika (52) pokazala su da određivanje CRP-a visoko osjetljivom metodom (engl. *high sensitivity CRP, hs-CRP*) može imati veću prediktivnu vrijednost za predviđanje prvog kardiovaskularnog događaja od koncentracije LDL-kolesterola, te da procjena bazalnih vrijednosti CRP-a ima dodatnu prognostičku važnost u odnosu na "*Framingham risk score*", koji obuhvaća konvencionalne čimbenike rizika: spol, dob, razinu ukupnog kolesterola, pušenje i arterijski tlak. Rezultati velikih prospektivnih studija, potvrdili su značaj hs-CRP-a kao markera progresije (53), funkcionalne aktivnosti i neželjenog kardiovaskularnog ishoda u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti (54).



### 1.3.2 PARAOKSONAZE

Paraoksonaze su multifunkcionalni enzimi koji kataliziraju hidrolizu širokog spektra estera i laktone. **Paraoksonaza-1** (aril-dialkil-fosfataza, EC. 3.1.8.1; engl. *paraoxonase-1*, PON1) je visokoglikolizirani protein molekulske mase 43-45 kDa. Sintetizira se u jetri, a u plazmi se prenosi vezan najvećim dijelom na HDL. **Paraoksonaza-2** (engl. *paraoxonase-2*, PON2) je intracelularni protein čija je ekspresija nađena u mnogim tkivima s molekulskom masom od oko 44 kDa. **Paraoksonaza-3** (engl. *paraoxonase-3*, PON3), je protein molekulske mase oko 40 kDa, koji je u cirkulaciji vezan na HDL, ali u puno manjoj mjeri nego PON1. Naziv im potječe od sposobnosti enzima da hidrolizira paraokson, toksični metabolit insekticida parationa. Međutim, za razliku od PON1, PON2 i PON3 ne posjeduju paraoksonaznu aktivnost. Sva tri enzima, PON1, PON2 i PON3 hidroliziraju aromatske i dugolančane alifatske laktone, pa se čini da bi naziv laktonaze bio mnogo primjereniji. Od sva tri člana obitelji paraoksonaza, PON1 je najviše istražen enzim (57).

#### 1.3.2.1 Struktura i funkcija paraoksonaze 1 (PON1)

PON1 protein sastoji se od 354 aminokiselinska ostatka. Jedinstvenost zrelog proteina sastoji se u zadržavanju N-terminalne hidrofobne signalne sekvence iz koje je otcjepljen jedino metionin. Taj amino terminalni signalni peptid potreban je za povezivanje PON1 s HDL-om (58). Povezanost PON1 s HDL-om neophodna je za održavanje normalne serumske aktivnosti enzima, obzirom da HDL pruža optimalni fiziološki akceptorski kompleks koji stimulira izlučivanje i stabilizira izlučeni enzim (59).

Paraoksonaza hidrolizira različite vrste supstrata: oksone (paraokson, klorpirifos okson, diazokson), neurotoksične agense (sarin, soman), aromatske estere (fenilacetat, tiofenilacetat, 2-naftilacetat), aromatske, alifatske laktone i cikličke karbonate. Uz hidrolitičko, paraoksonaza posjeduje i antioksidacijsko i antiaterogeno djelovanje. Dokazano je da paraoksonaza može inhibirati lipidnu peroksidaciju LDL-a, te da je to mehanizam kojim štiti LDL i HDL od oksidacije. Nadalje djelujući kao fosfolipaza A2 razgrađuje biološki aktivne oksidirane lipide na lipoproteinima i u arterijskoj stijenci te ima antiaterogeno djelovanje (58). Osim toga djeluje i kao homocistein laktonaza, te štiti proteine i lipoproteine od homocisteinilizacije (59). Sve to ukazuje na kompleksnost antiaterogene uloge paraoksonaze (60).

Na aktivnost paraoksonaze djeluje niz genetskih i negenetskih čimbenika. Negenetski čimbenici koji utječu na aktivnost paraoksonaze obuhvaćaju čimbenike okoliša (pušenje, alkohol, prehranu, kemikalije, lijekove, dob), te razna fiziološka i patološka stanja. Aktivnost paraoksonaze fiziološki je snižena u trudnoći. Umjerena tjelovježba može povećati aktivnost za 14%. U pušača koji imaju snižene vrijednosti paraoksonaze tjelovježbom se mogu vratiti na razine nepušača. Niska aktivnost paraoksonaze nađena je u brojnim patološkim stanjima uključujući kroničnu bubrežnu insuficijenciju, inzulin ovisni i inzulin neovisni dijabetes (61), perifernu arterijsku bolest (62).

### 1.3.2.2 Uloga genetskih polimorfizama *pon1* i *pon2* gena u srčanožilnim bolestima

Genetski čimbenici koji utječu na aktivnost paraoksonaze obuhvaćaju razne polimorfizme u regulacijskim, intronskim i kodirajućim regijama paraoksonazne obitelji gena locirane na dugom kraku kromosoma 7 (q21-q22). Sva tri gena sadrže 9 eksona približno iste duljine i imaju značajnu strukturnu homologiju u sastavu nukleotida. Polimorfizmi *pon1* i *pon2* gena povezuju se s povećanim rizikom od razvoja ateroskleroze, no nije jasno da li u tom procesu presudnu ulogu ima fenotip ili genotip.

Dva polimorfizma u kodirajućoj regiji *pon1* gena detaljno su istraženi: polimorfizam Q192R i L55M. Zamjena nukleotida A u G u eksonu 6 *pon1* gena rezultira zamjenom glutamina argininom na poziciji 192, dok zamjena nukleotida T u A u eksonu 3 *pon1* gena rezultira zamjenom leucina metioninom na poziciji 55.

Alozim R na poziciji 192 (PON1<sub>R192</sub>) odgovoran je za višu paraoksonaznu aktivnost prema paraoksonu, dok je Q alozim na istoj poziciji (PON1<sub>Q192</sub>) odgovoran za nižu aktivnost. Njihov učinak je suprotan u slučaju hidrolize somana i sarina (61). Premda RR-genotip ima višu aktivnost prema paraoksonu od QQ-genotipa, u slučaju zaštite od oksidativne modifikacije lipoproteina aktivnost im je suprotna. Naime, Q-alel je mnogo učinkovitiji u metaboliziranju oksidiranog HDL-a i LDL-a u odnosu R-alel (63). Polimorfizam L55M utječe na aktivnost paraoksonaze neovisno o Q192R polimorfizmu. Nosioci alozima L na poziciji 55 pokazuju visoku aktivnost prema paraoksonu, za razliku od nosioca alozima M koji imaju nisku aktivnost. Kodirajući polimorfizmi R192Q i M55L su u neravnoteži povezanosti, što favorizira simultano prisustvo alela povezanih s visokom paraoksonaznom aktivnosti. Osobe sa 192QQ i 55MM genotipom imaju veći zaštitni kapacitet u spriječavanju oksidacije LDL-a ali je njihova hidrolitička aktivnost prema paraoksonu slabija u odnosu na 192RR i 55LL

genotipove (55).

U promotorskoj regiji *pon1* gena postoji najmanje pet polimorfizama koji se nalaze na pozicijama -909/907 (G ili C), -832/824 (A ili G), -162 (A ili G), -126 (C ili G) i -108/-107 (C ili T) (64). Identifikacija klinički značajnih polimorfizama otežana je zbog prisustva neravnoteže povezanosti između svih promotorskih polimorfizama. Analiza haplotipova pokazala je da polimorfizam C(-107)T najznačajnije utječe na varijaciju paroksonazne aktivnosti, a pozitivna povezanost između niske aktivnosti T alela i vaskularnih bolesti dobivena je u adolescenata i u bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti (64, 65).

Antioksidativna i antiupalna svojstva PON2, zbog njene intracelularne lokalizacije, raširene ekspresije i povećanog izražaja u uvjetima oksidacijskog stresa, ukazuju na značajnu ulogu u aterosklerozi. Smatra se da PON2 i PON1 imaju sličnu ulogu u metabolizmu lipida i lipoproteina. Dva polimorfizma u kodirajućoj regiji *pon2* gena, zamjena alanina glicinom na položaju 148 (G148A) i cisteina serinom na položaju 311 (S311C) povezana su sa promjenama u koncentraciji glukoze i lipida u plazmi. Zamjena cisteina serinom na položaju 311 dovodi do normalne sinteze i lokalizacije proteina, ali mu je promjenjena glikozilacija i smanjena laktonazna aktivnost, što može imati značaj u aterosklerozi (66).

Interakcije između polimorfizma *pon1* i *pon2* gena povezane su sa koronarnom bolesti i moždanim udarom. Brojni autori istraživali su utjecaj genetskog polimorfizma paraoksonaze na razvoj srčanožilnih bolesti, ali rezultati nisu bili dosljedni. Wang i sur. (67) proveli su meta-analizu četiri polimorfizma: Q192R, L55M, -108 C>T *pon1* gena i S311C *pon2* gena, koja je uključila rezultate 88 istraživanja objavljenih do kolovoza 2010 godine, pri čemu je obuhvaćeno ukupno 247 702 bolesnika s koronarnom bolesti i 38 232 kontrolne osobe. Meta-analiza je ukazala da postoji slaba povezanost između R192 polimorfizma i rizika od razvoja koronarne bolesti.

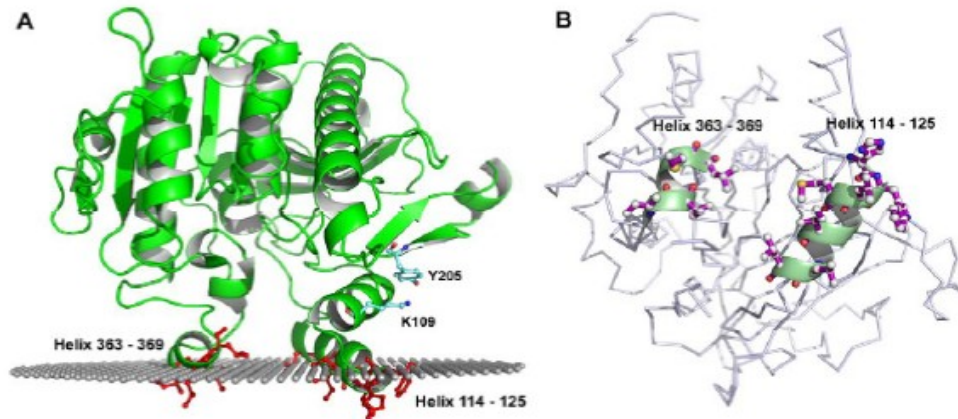
### **1.3.3 ACETILHIDROLAZA TROMBOCITNOG ČIMBENIKA AKTIVACIJE**

#### **1.3.3.1 Struktura i funkcija acetilhidrolaze trombocitnog čimbenika aktivacije**

##### **(PAF-AH)**

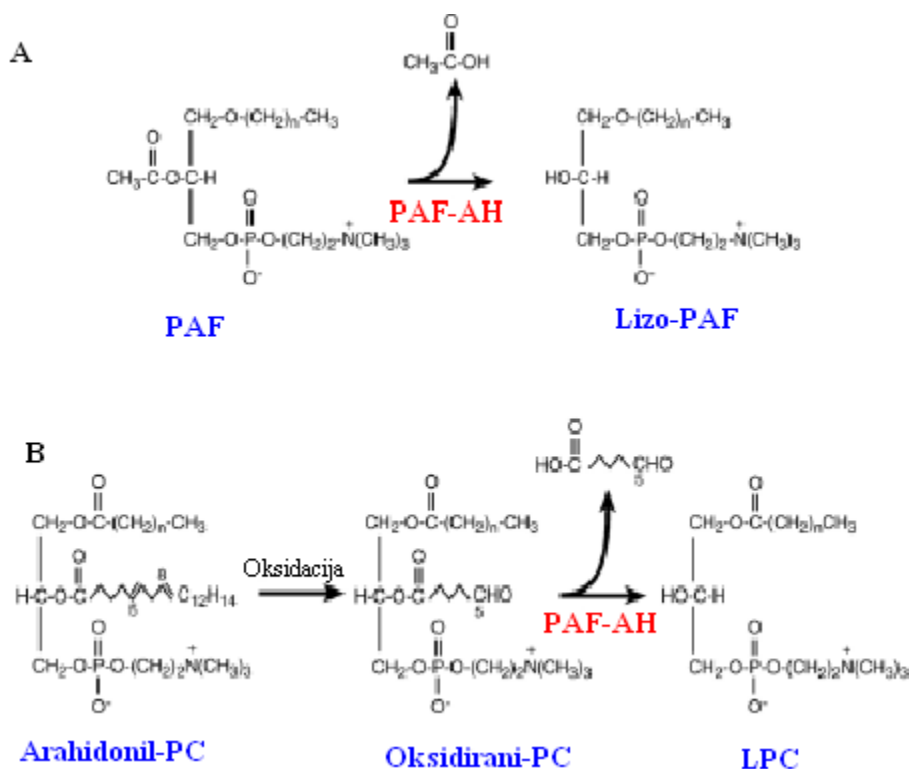
Acetilhidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije (engl. *Platelet-activating factor acetylhidrolase*, PAF-AH), (EC 3.1.1.47), enzim je iz superporodice fosfolipaza. Fosfolipaze A2 (engl. *Phospholipase A2*, PLA2) čine obitelj enzima koja katalizira hidrolizu *sn*-2 esterski vezanih glicerofosfolipida, pri čemu nastaju lizo-fosfolipidi i slobodne masne kiseline, važni

lipidni medijatori i vjesničke molekule sa širokim rasponom fizioloških i patoloških učinaka u metabolizmu lipida i upali. PAF-AH, pripada grupi VIIa fosfolipaza A2. Sastoji se od 441 aminokiselinska ostatka i ima relativnu molekulsku masu od 45.4 kDa (slika 1.3.).



Slika 1.3. Model molekule acetilhidrolaze trombocitnog čimbenika aktivacije (preuzeto iz literaturnog navoda 71).

Gen odgovoran za PAF-AH protein (PLA2G7) lociran je na kratkom kraku kromosoma 6 (6p12-21.1) i sastoji se od 12 eksona. Opisano je sedam mutacija unutar navedenog gena koje mogu utjecati na izlučivanje, aktivnost i vezanje na lipoproteine. Točkasta mutacija  $G^{994} \rightarrow T$ , u eksonu 9 gena, koja se nalazi u blizini katalitičke domene enzima, uzrokom je zamjene valina na poziciji 279 sa fenilalaninom, što se manifestira sniženom aktivnosti enzima u plazmi. Kod približno 4% japanaca snižena aktivnost PAF-AH genetski je uvjetovana. Nedostatak enzimske aktivnosti nasljeđuje se kao autosomno recesivno svojstvo (68). Ta mutacija predstavlja genetski čimbenik rizika za infarkt miokarda i moždani udar (69) kod japanaca, a smatra se i jednim od genetskih čimbenika za razvoj ateroskleroze u japanskoj populaciji (70). Za razliku od drugih fosfolipaza, PAF-AH je specifična za kratkolančane acilne grupe esterificirane na *sn*-2 položaju u fosfolipidnim supstratima, te dodatno za trombocitni čimbenik aktivacije (engl. *Platelet-activating factor*, *PAF*) i oksidirane fosfolipide nastale tijekom LDL oksidacije (Slika 1.4) (71).



Slika 1.4. Razgradnja tromboцитnog čimbenika aktivacije (PAF) do lizo-PAF-a (A) i arahidonil fosfatidilkolina (arahidonil-PC) do lizo-fosfatidilkolina (LPC) pomoću PAF-AH-a (B), (preuzeto iz literaturnog navoda 71).

U plazmi se PAF-AH prenosi kompleksno vezan za lipoproteine, zbog čega je poznata kao lipoprotein vezana fosfolipaza A2 (engl. *lipoprotein-associated phospholipase A2*, Lp-PLA2). U normolipemičnim osoba PAF-AH je primarno vezan na LDL (70-80%) zbog specifičnih interakcija protein-protein između N-terminalnog dijela PAF-AH-a i C-terminalnog dijela apoB (72). Većina LDL vezane PAF-AH aktivnosti potječe od aterogenih malih gustih LDL čestica (73). Samo mali dio enzima vezan je na HDL. Raspodjela PAF-AH-a između LDL-a i HDL-a promjenjena je u različitim tipovima dislipidemija. Na raspodjelu između lipoproteina utječe i prisustvo i koncentracija lipoproteina a (Lp a) u plazmi, za koji PAF-AH ima veći afinitet u odnosu na LDL. Smatra se da uloga PAF-AH u plazmi ovisi o vrsti lipoproteinske čestice na kojoj se prenosi u plazmi, pri čemu PAF-AH vezan na LDL ima aterogeno djelovanje, dok PAF-AH vezan na HDL ima antiaterogeno djelovanje (74). Dokazano je da PAF-AH značajno doprinosi protektivnom učinku HDL-a u prevenciji

oksidacije LDL-a. PAF-AH vezan na Lp(a), iako malo pridonosi sveukupnom poolu aktivnosti enzima u plazmi ima značajnu ulogu u upalnim procesima u arterijskoj stijenci, naročito u pacijenata sa koncentracijama Lp(a) većim od 0,30 g/L (75). Zbog velike strukturne sličnosti Lp(a) s LDL-kolesterolom, i PAF-AH vezan na Lp(a) ima aterogeno djelovanje. Glavnu ulogu na vezanje PAF-AH-a za LDL-kolesterol i Lp(a) ima apolipoprotein B (apoB100).

Čimbenici koji utječu na raspodjelu PAF-AH-a između HDL-a i LDL-a nisu jasno ustanovljeni. Međutim poznato je da stupanj glikozilacije enzima utječe na raspodjelu enzima između različitih lipoproteinskih frakcija, pri čemu povećana glikozilacija enzima smanjuje njegovo povezivanje s HDL-om.

### **1.3.3.2 Uloga PAF-AH u srčanožilnim bolestima**

Biološka uloga PAF-AH u razvoju srčanožilnih bolesti je kontradiktorna, obzirom da joj se pripisuje i anti- i proupalni učinak.

Antiupalni učinak nastaje zbog sposobnosti enzima da katalizira hidrolizu PAF-a i razgradnju oksidiranih fosfolipida koji su po građi slični PAF-u pa se zato i smatra mogućim antiupalnim i antiaterogenim enzimom (76). PAF je biološki aktivni fosfolipid, koji nakon vezanja na specifičan receptor aktivira trombocite, leukocite, monocite, makrofage i glatke mišićne stanice. Aktivno sudjeluje u trombozi i aterosklerozi. Tijekom tromboze, PAF se sintetizira lokalno na mjestu oštećenja endotela i akumulira u aterosklerotskom plaku bolesnika s uznapredovalom koronarnom bolešću. Osim toga, PAF stvaraju endotelne stanice, kao odgovor na oksidativni stres ili različite fiziološke agoniste (trombin, bradikinin, histamin, leukotriene), te njegovo stvaranje stimulira nastanak superoksidnih aniona u makrofagima. Lokalno sintetiziran PAF u krvnim žilama u kojima se događaju aterosklerotske promjene može povećati oksidativnu modifikaciju LDL-a i dodatno amplificirati patološki proces. Djelovanjem PAF-AH-a učinkovito se hidrolizira PAF na lizo-PAF i neesterificirane masne kiseline, pri čemu se smanjuje upalni učinak PAF-a.

S druge strane nekoliko istraživanja ukazalo je na mogući aterogeni učinak PAF-AH, kroz stvaranje bioaktivnih oksidiranih slobodnih masnih kiselina i lizo-fosfatidilkolina koji ima izrazito proupalno djelovanje i važnu regulatornu ulogu u napredovanju aterosklerotskog plaka (71). Proaterogena uloga lizo-fosfatidilkolina očituje se u povećanju kemotaksije, stvaranju reaktivnih kisikovih spojeva, stimulaciji sekrecije upalnih citokina i kemokina,

indukciji proliferacije glatkih mišićnih stanica i apoptozi makrofaga, T-stanica, endotelnih i glatkomišićnih stanica.

Iako se o ulozi PAF-AH-a kao proaterogenog ili antiaterogenog enzima još uvijek dosta raspravlja, velik broj istraživanja pokazao je da je PAF-AH prediktivni biomarker kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti u različitim populacijama, neovisno o konvencionalnim čimbenicima rizika i CRP-u. Međutim nameće se pitanje da li je PAF-AH direktni uzročni čimbenik ili indirektni pokazatelj, obzirom da supstrati i produkti katalitičkih reakcija u kojima sudjeluje imaju proaterogena svojstva. Do sada je oko 40 kliničkih studija pokazalo da je povećana razina PAF-AH povezana sa različitim kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim rizikom u različitim populacijama. Međutim u 7 istraživanja nije nađena povezanost između razine PAF-AH-a i kardiovaskularnih bolesti nakon ujednačenja prema konvencionalnim čimbenicima rizika. Prema najnovijim preporukama PAF-AH se smatra neovisnim čimbenikom rizika i preporuča se njegovo određivanje za procjenu kardiovaskularnog rizika u asimptomatskih bolesnika umjerenog rizika (77-80).

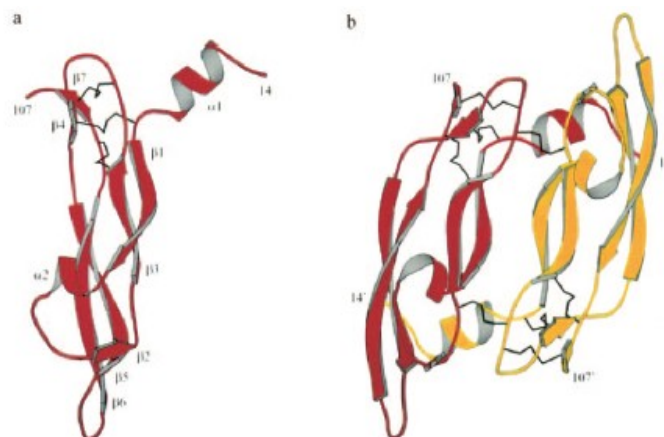
Uloga PAF-AH u nastanku periferne arterijske bolesti nedovoljno je istražena. U Rotterdamskom istraživanju aktivost PAF-AH bila je povezana s niskim pedobrahijalnim indeksom ( $ABI < 0.90$ ), međutim nakon ujednačenja prema ukupnom i HDL kolesterolu povezanost nije bila značajna. U drugom prospektivnom istraživanju aktivnost PAF-AH-a nije bila povezana s neželjenim kardiovaskularnim ishodom (39).

### **1.3.4 VASKULARNI ENDOTELNI ČIMBENIK RASTA (VEGF)**

#### **1.3.4.1 Struktura i funkcija VEGF-a**

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF ili VEGF-A), poznat i kao vaskularni permeabilni faktor (engl. *vascular permeability factor*), član je porodice faktora rasta porjeklom iz trombocita, koju karakterizira prisustvo osam konzerviranih cisteinskih ostataka i stvaranje antiparalelnih dimera povezanih disulfidnim vezama (Slika 1.5).

VEGF obitelj obuhvaća skupinu strukturno sličnih glikoproteina s jakim angiogenim učinkom, koji uključuju VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i placentalne faktore rasta (engl. *placental derived growth factor*, PlGF), PlGF-1 i PlGF-2.



Slika 1.5 Trodimenzionalna struktura VEGF monomera (a) i dimera (b) ( preuzeto iz literaturnog navoda 81).

VEGF-A je dimerni glikoprotein vezan disulfidnim vezama, mase 34 do 42 kDa, koji postoji u najmanje sedam homodimernih izoformi. Monomeri se sastoje od 121, 145, 148, 165, 183, 189 ili 206 aminokiselina. Gen za VEGF-A se nalazi na kratkom kraku šestog kromosoma (6p21.3), sastoji se od 8 eksona i 7 introna. Alternativnim spajanjem (engl. *alternative splicing*) stvara se nekoliko postranskripcijskih izoformi koje se razlikuju po svojoj topljivosti i vezanju za heparin (81). Članovi VEGF obitelji vežu se različitim afinitetom za najmanje tri tirozn kinazna receptora (tablica 1.3.): VEGFR-1 (Flt-1) , VEGFR-2 (KDR, Flk-1) i VEGFR-3 (Flt-4) i dva koreceptora (5,82).

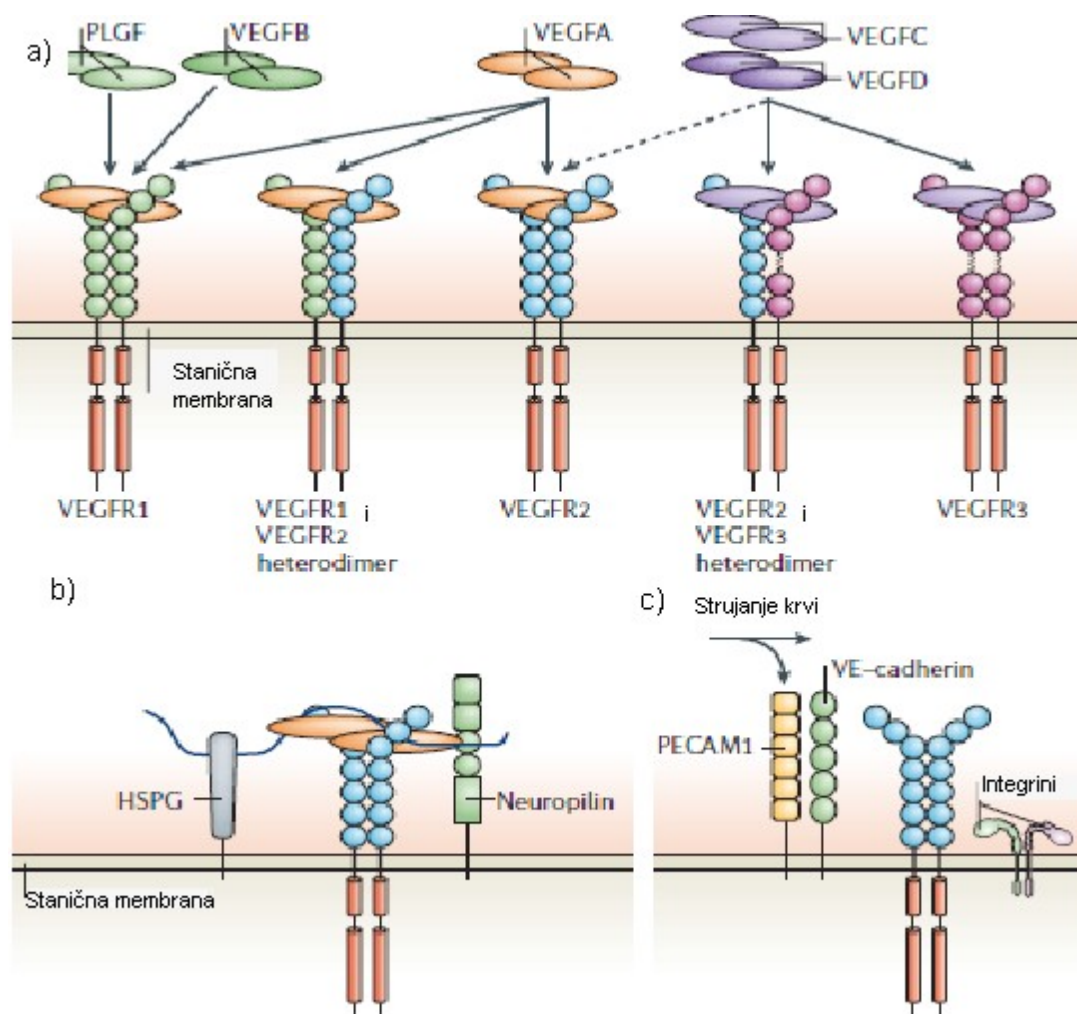
Signalni putevi koje aktivira VEGF imaju važnu ulogu u procesu vaskulogeneze, angiogeneze i limfangiogeneze, a uključuju međudjelovanje VEGFR i brojnih signalnih molekula (slika 1.6.). Vezanjem VEGF za specifični receptor dolazi do autofosforilacije multiplih tirozinskih ostataka na unutarstaničnoj domeni. Unutarstanične domene dimeriziranih i aktiviranih receptora VEGFR1, VEGFR 2 i VEGFR3 imaju više mjesta za vezanje signalnih molekula. Vezanje signalnih molekula za receptor regulirano je angiogenim stanjem endotelnih stanica (VEGFR2), ligandom (VEGFR1) ili heterodimerizacijom (VEGFR3). Vezanjem signalnih molekula na mjesta fosforilacije pokreće se signalna kaskada koja rezultira specifičnim biološkim odgovorom ( slike 1.7.-1.9.) (83).



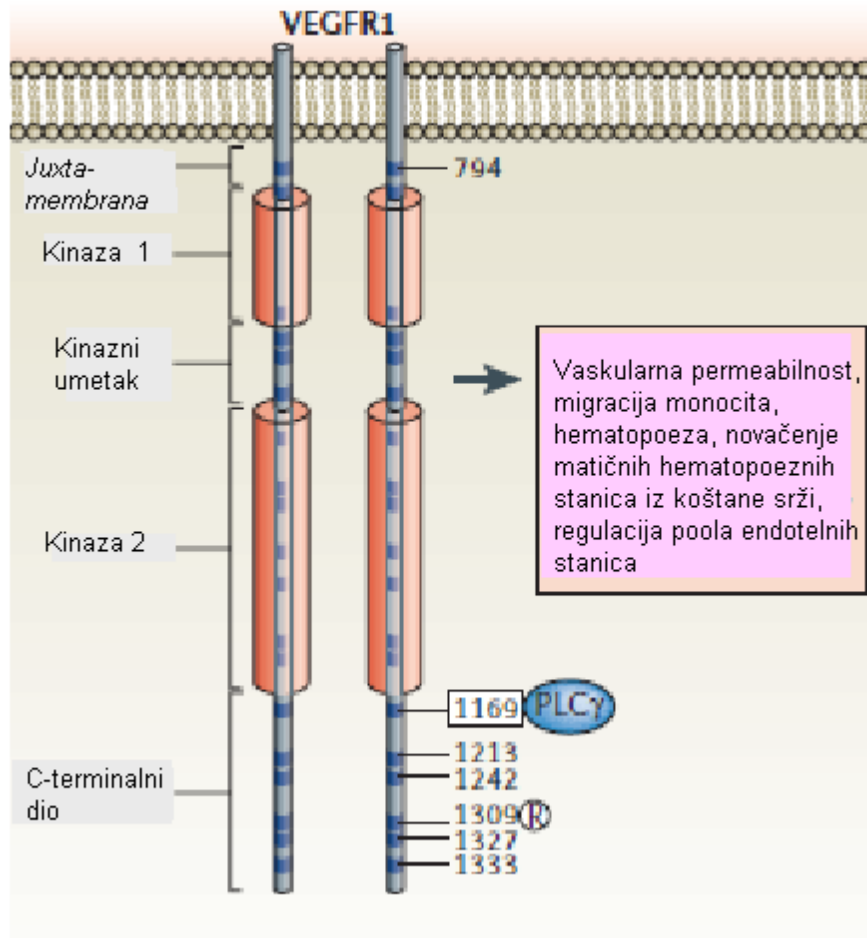
Tablica 1.3 . VEGF receptori (preuzeto iz literaturnog navoda 5).

Receptor	Ligand	Funkcija
VEGFR-1 (Flt-1)	VEGF-A121 VEGF-A165 VEGF-B PlGF-1 PlGF-2	Poticanje stanične migracije Organizacija krvnih žila Ekspresija gena na monocitima i makrofazima
VEGFR-2 (KDR, Flk-1)	VEGF-A121 VEGF-A145 VEGF-A165 VEGF-C VEGF-D	Mitogeneza, diferencijacija endotelnih stanica Poticanje stanične migracije Povećanje stanične permeabilnosti
VEGFR-3 (Flt-4)	VEGF-A145 VEGF-A165 VEGF-A189 PlGF-2 VEGF-B167	Remodeliranje primarne kapilarne mreže Embrionalni kardiovaskularni razvoj Regulacija rasta i održavanje limfatičnog sistema
Neu-1	VEGF-A165 PlGF-2	Razvoj kardiovaskularnog sistema
Neu-2	VEGF-A165	Organizacija perifernih nervnih vlakana Razvoj vaskularne mreže

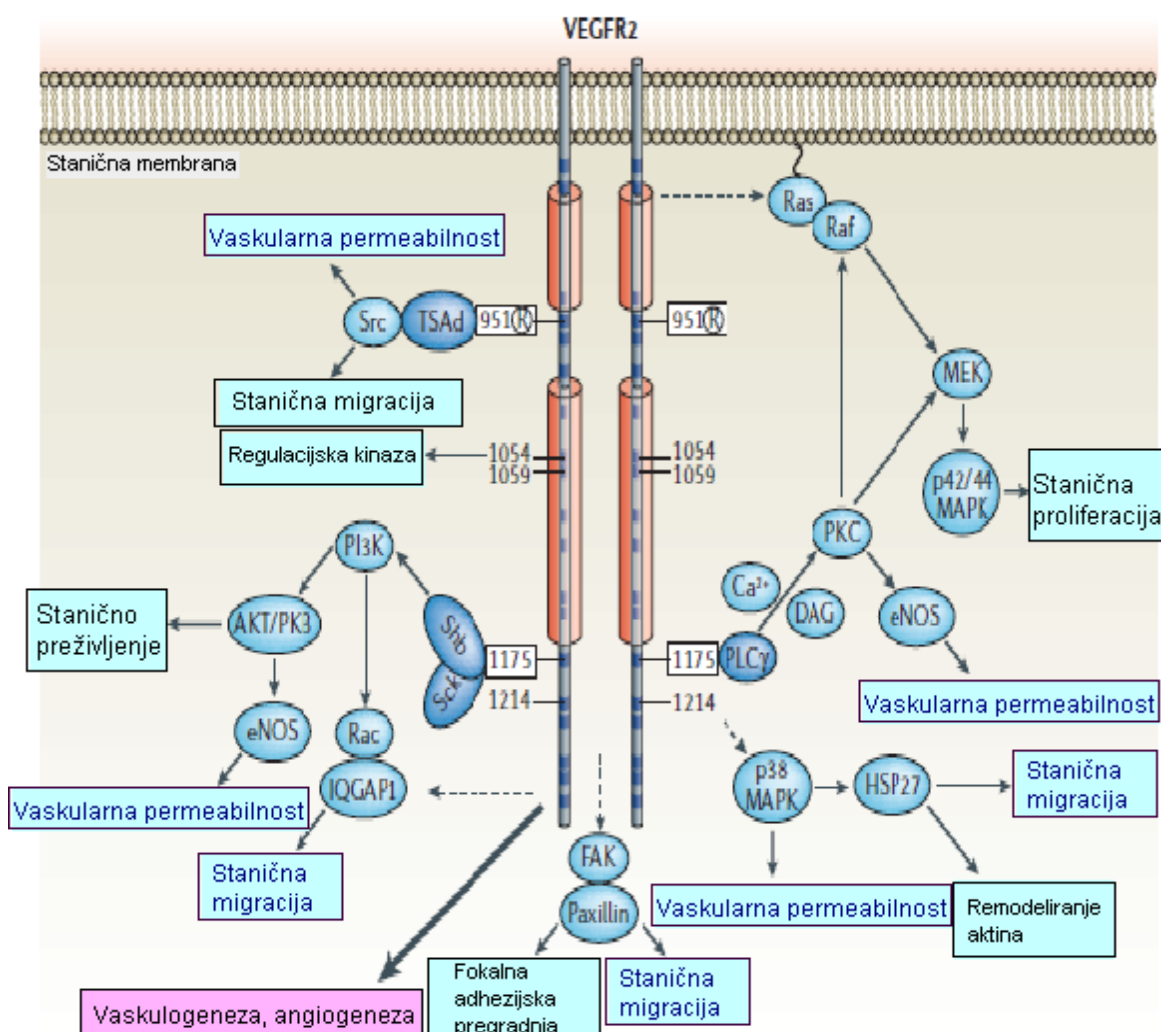
Osim što je esencijalan regulator fiziološkog endotelnog rasta, permeabilnosti i migracije *in vivo* i *in vitro*, VEGF je značajan čimbenik u hematopoezi gdje utječe na diferencijaciju raznih staničnih linija. Osim toga, VEGF djeluje i kao proinflamatorni citokin, povećavajući endotelijalnu permeabilnost. Kim i suradnici (84) dokazali su da VEGF inducira adheziju leukocita na endotelnim stanicama tijekom upale. VEGF potiče izražaj VCAM-1, ICAM-I i E-selektina, aktivacijom dva signalna puta koja imaju suprotne učinke na indukciju ekspresije adhezijskih molekula: prvi uključuje aktivaciju NF- $\kappa$ B, a drugi supresiju fosfoinozitol-3-kinaze.



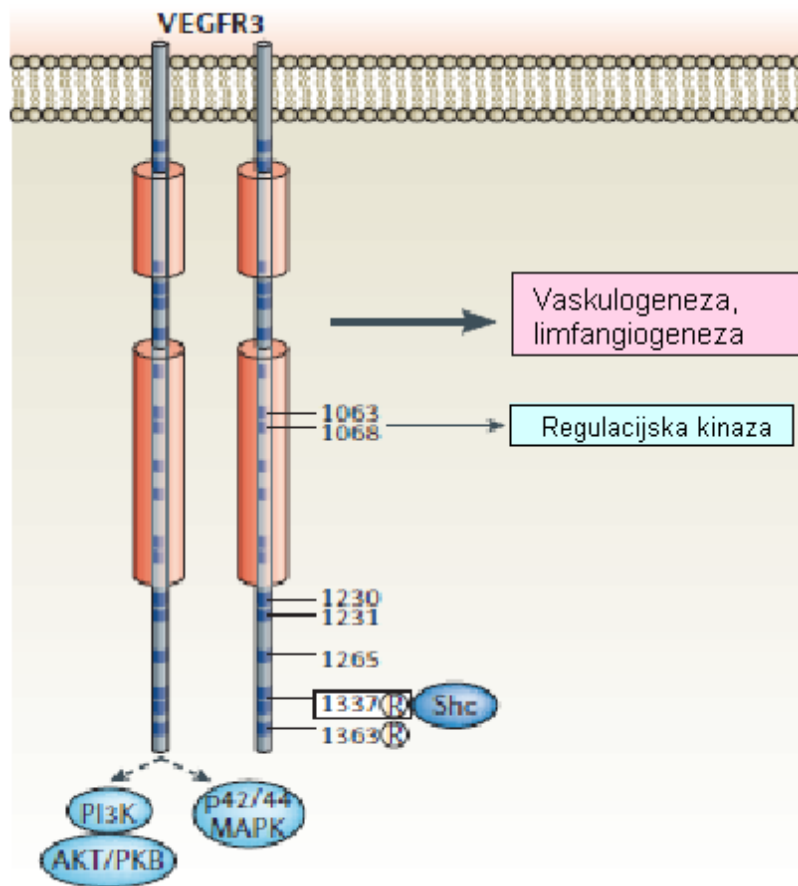
Slika 1.6. Svojstva i kompleksi VEGF i njegovih receptora (VEGFR) : a) VEGF veže se na tri tirozinkinazna VEGF receptora (VEGFR), pri čemu nastaju homo ili heterodimeri VEGFR-a; b) Prenošenje signala VEGFR moduliraju različiti koreceptori: heparan sulfat proteoglikani (engl. *heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) i neuropilini; c) Strujanje krvi može aktivirati VEGFR na ligand neovisan način, stvaranjem mehanosenzornih kompleksa koji se sastoje od trombocitne adhezijske molekule 1 (engl. *platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1*, PECAM1), vaskularnog endotelnog kadherina (engl. *vascular endothelial-caadherin*, VE-cadherin), VEGFR i integrina (preuzeto iz literaturnog navoda 83).



Slika 1.7. Struktura tirozin kinazne domene VEGFR1 i signalni put VEGF/VEGFR1. Biološki učinci signalnog puta VEGF/VEGFR1: vaskularna permeabilnost, migracija monocita, hematopoeza, novačenje hematopoeznih matičnih stanica iz koštane srži i regulacija poola endotelnih stanica, posredovani su putem aktivacije fosfolipaze C (engl. *phospholipase C-γ*, PLCγ) (preuzeto iz literaturnog navoda 83).



Slika 1.8. Signalni putevi VEGF/VEGFR2 dovode do povećane vaskularne permeabilnosti, stanične migracije, proliferacije i preživljenja (preuzeto iz literaturnog navoda 83). diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*, DAG); endotelna dušik oksid sintetaza (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS); fokalna adhezijska kinaza (engl. *focal adhesion kinase*, FAK); hematopoetske progenitorske stanice (engl. *haematopoietic progenitor cells*, HPC); protein toplinskog stresa- 27 (engl. *heat-shock protein-27*, HSP27); mitogen aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK ); fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3' kinase*, PI3K); protein kinaza C (engl. *protein kinase C*, PKC); fosfolipaza C (engl. *phospholipase C-γ*, PLCγ ); Shb adaptor protein (engl. *Shb Adaptor Protein*, Shb); T-stanični specifični adaptor protein (engl. *T-cell-specific adapter* , TSAd); AKT/PK3 serin treonin kinaza ( AKT/PK3).



Slika 1.9. Signalni putevi VEGF/VEGFR3 imaju ulogu u vaskulogenezi i limfangiogenezi (preuzeto iz literaturnog navoda 83). Shc adaptor protein (engl. *Sch adaptor protein*, Shc), fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3' kinase*, PI3K); mitogen aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), AKT/PKB protein kinaza (engl. *Akt/PKB serine/threonine protein kinase*, AKT/PKB).

#### 1.3.4.2 Uloga VEGF u srčanožilnim bolestima

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na ulogu vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u srčanožilnim bolestima (5). Povećane koncentracije VEGF-a nađene su u bolesnika s koronarnom (85,86) i perifernom arterijskom bolesti (87,88), kod oboljelih od šećerne bolesti (89), te kod bolesnika s hipertenzijom, pri čemu su vrijednosti korelirale sa stupnjem endotelne disfunkcije i cjelokupnog kardiovaskularnog rizika (90).

## 1.3.5 ANGIOPOIETINI I NJIHOVI RECEPTORI

### 1.3.5.1 Struktura i funkcija

**Angiopoietini** (engl. *Angiopoietins*, Ang), obitelj čimbenika rasta, sastoji se od četiri strukturno slična glikoproteina: Ang-1, Ang-2, Ang-3 i Ang-4. Građeni su od aminoterminalne angiopoietin specifične domene, nakon koje slijedi "coiled-coil" domena, vezni peptid i karboksi terminalna fibrinogenu slična domena. Fibrinogenu slična domena odgovorna je za vezanje na receptor, a *coiled-coil* domena važna je za dimerizaciju angiopoietin monomera. Kratki aminoterminalni dijelovi čine prstenu slične strukture koje spajaju dimere u multimerne različite veličine, nužni su za aktivaciju Tie-2 receptora (91).

Angiopoietini imaju različita svojstva u pogledu vezanja na stanice i izvanstanični matriks. Ang-1 se uklapa u izvanstanični matriks, za razliku od Ang-2 koji se izlučuje, ali nije povezan sa izvanstaničnim matriksom i može biti pohranjen u Weibel-Palade-jevim tjelešcima u citoplazmi endotelnih stanica. Za razliku od Ang-1 i Ang-2, Ang-3 vezan je na površinu stanice preko heparan-sulfat proteoglikana. Razlike u vezanju na izvanstanični matriks i stanične membrane mogu regulirati raspoloživost i biološku aktivnost angiopoietina. U tablici 1.4. prikazane su njihove osnovne karakteristike.

Ang-1, poznat je kao Tie-2 agonist, posreduje u sazrijevanju krvnih žila, pospješuje cjeljenje rana te ima antiupalno i antiaterogeno djelovanje. Ang-2 je prirodni endogeni antagonist Tie-2 koji djeluje kao autokrini negativni regulator endotelne funkcije. U prisustvu VEGF pokreće inflamatorni odgovor aktivacijom endotela i indukcijom permeabilnosti. U odsutvu VEGF destabilizira postojeće krvne žile i dovodi do vaskularne regresije.

**Tie receptori** (engl. *tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains*) predstavljaju novu klasu tirozin kinaznih receptora koji su prvenstveno izraženi na vaskularnim endotelnim stanicama (92). Ovoj klasi tirozin kinaznih receptora pripadaju dva člana: Tie-1 (poznat kao Tie) i Tie-2 (poznat kao Tek).

Tie-2, u citoplazmatskom dijelu pokazuje visok stupanj homologije s Tie-1 receptorom. Sastoji se od tri imunoglobulinske (Ig) domene, tri epidermalnom faktoru rasta slične domene i tri fibronektinu slične domene, koje se drže zajedno s tri domene epidermalnog faktora rasta i formiraju streličastu strukturu. U izvanstaničnom dijelu receptora nalaze se dvije kinazne domene (93). Vezanjem Ang-1 na kinaznu domenu Tie-2 dolazi do

autofosforilacije receptora. Međutim za razliku od ostalih faktora rasta vezanjem Ang-1 na Tie-2 ne stimulira se mitogeneza, što ukazuje na novu ulogu u endotelijalnoj biologiji. Vezanjem Ang-2 na Tie-2 receptor ne dolazi do njegove autofosforilacije, već se blokira aktivacija Tie-2 posredovana Ang-1 i endotelna migracija, što ukazuje da je Ang-2 prirodni inhibitor Tie-2 aktivacije. Prepoznavanje Ang-2 i Tie-2 receptora slično je prepoznavanju antigena i protutijela. Ang-2 se veže na vrhu stelice, pri čemu dvije komplementarne površine stupaju u međusobne interakcije, bez značajnih konformacijskih promjena u obje molekule (94). Međutim u nekim uvjetima Ang-2 može stimulirati Tie-2 što ukazuje da Ang-2 može djelovati kao antagonist ili agonist Tie-2 na kontekst ovisan način (93).

Tablica 1.4: Osnovna svojstva angipoietina (preuzeto iz literaturnog navoda 91).

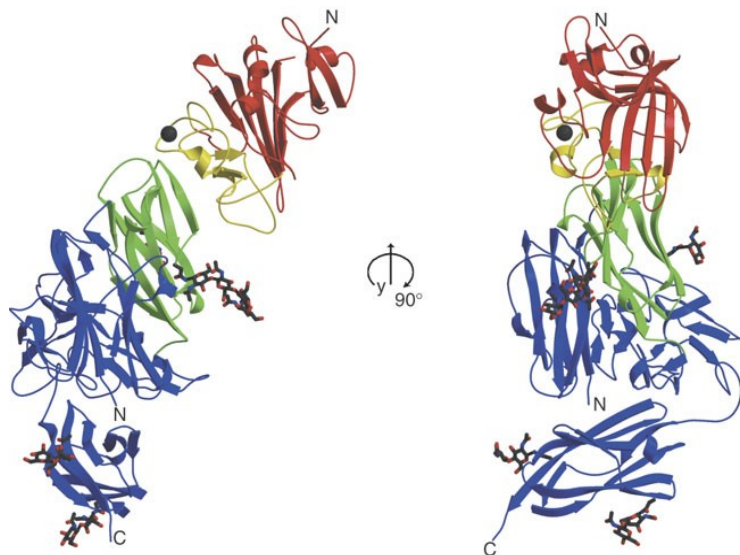
Svojstvo	Ang-1	Ang-2	Ang-3	Ang-4
Vezanje na Tie-2	Da	Da	Da	Da
Aktivacija Tie-2	Obavezna	Ovisna o kontekstu	Ovisna o kontekstu	Obavezna
Aktivacija Tie-1	Da	Ne	Ne	Da
Izražaj u odraslih	Mnoga tkiva	Na mjestima staničnog remodeliranja	Mnoga tkiva	Osobito u plućima
Primarni stanični izvori	Ne-endotelne stanice	Endotelne stanice	Nije nađeno	Nije nađeno
Ektopični izražaj u tumorskim stanicama	Smanjuje veličinu tumora	Povećava veličinu tumora	Smanjuje veličinu tumora	Nije nađeno
Veza sa izvanstaničnim matriksom	Ugrađen	Izlučuje se, ali se ne ugrađuje	Nije nađeno	Nije nađeno
Vezanje na površinu stanica preko HSG	Ne	Ne	Da	Nije nađeno
Pohrana u Weibel-Palade-tjelešcima	Ne	Da	Nije nađeno	Nije nađeno

### **Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa**

Angiopoetin-Tie kompleks (slika 1.10. i 1.11.) ima ključnu ulogu u fiziološkoj (slika 1.12.) i patološkoj (slika 1.13.) angiogenezi, u održavanju fenotipa mirne endotelne stanice (slika 1.14.), te u procesima aktivacije endotelne stanice (slika 1.14.) (94-96).

## Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u fiziološkoj angiogenezi

Angiogeneza započinje kao odgovor na koncentracijski gradijent VEGF-a, pri čemu specifične endotelne stanice, poznate i kao "*tip*" stanice izražavaju brojne filopodije. Nakon toga slijedi proliferacija i diferencijacija endotelnih stanica, poznatih i kao "*stalk*" stanice, koje nisu ili su vrlo oskudno prekrivene pericitima i glatkim mišićnim stanicama. Ispod "*stalk*" stanica nalaze se "*phalanx*" stanice koje su u bliskom kontaktu sa pericitima i glatkim mišićnim stanicama, te osiguravaju njihovu zaštitu, odnosno miran fenotip. Ang-2 je obavezno prisutan na aktiviranim endotelnim stanicama. "*Stalk*" i "*phalanx*" stanice mogu pohranjivati Ang-2 u svojim Weibel Paladijevim tjelešcima. Parakrinim djelovanjem Ang-1 može stvarati nakupine sa Tie-2.

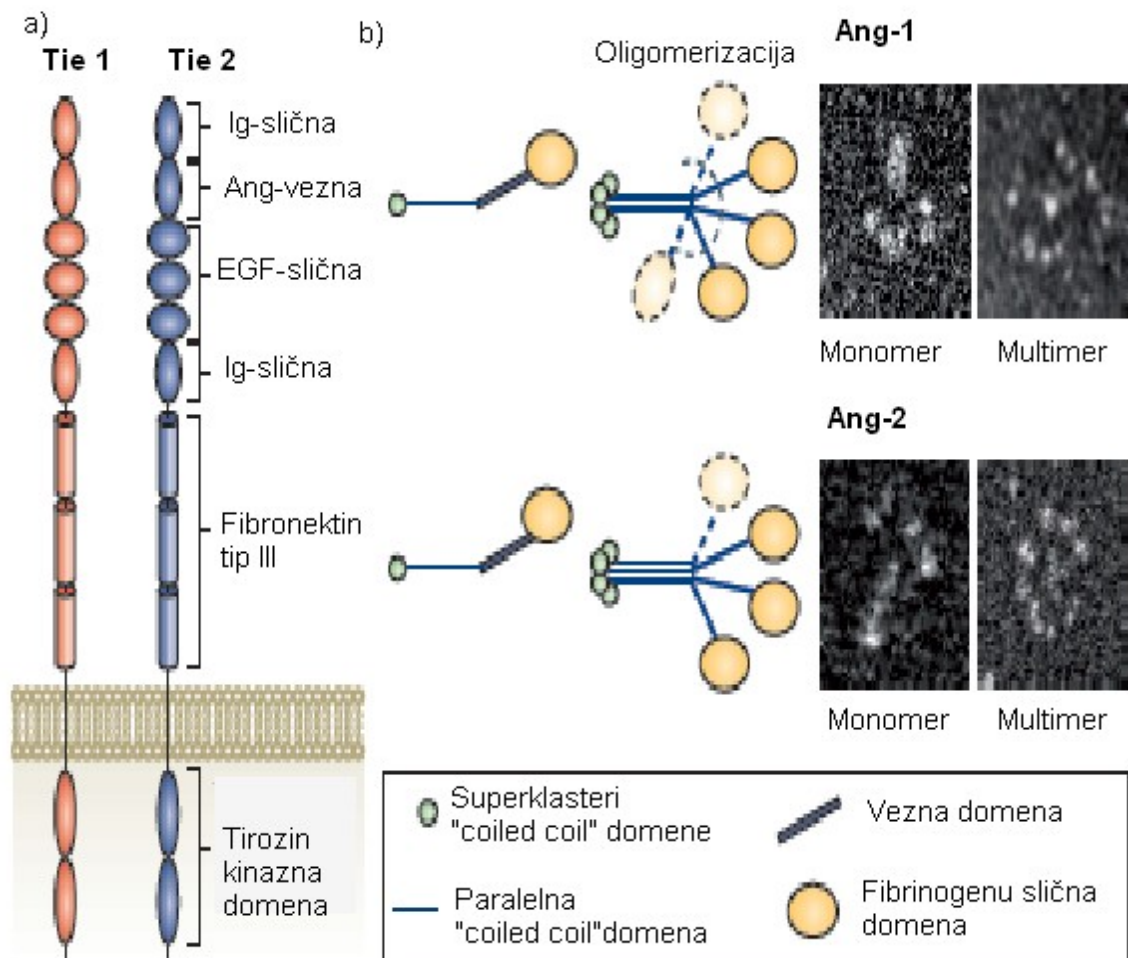


Slika 1.10 Kristalna struktura Ang2–Tie2 kompleksa (preuzeto iz literaturnog navoda 94).

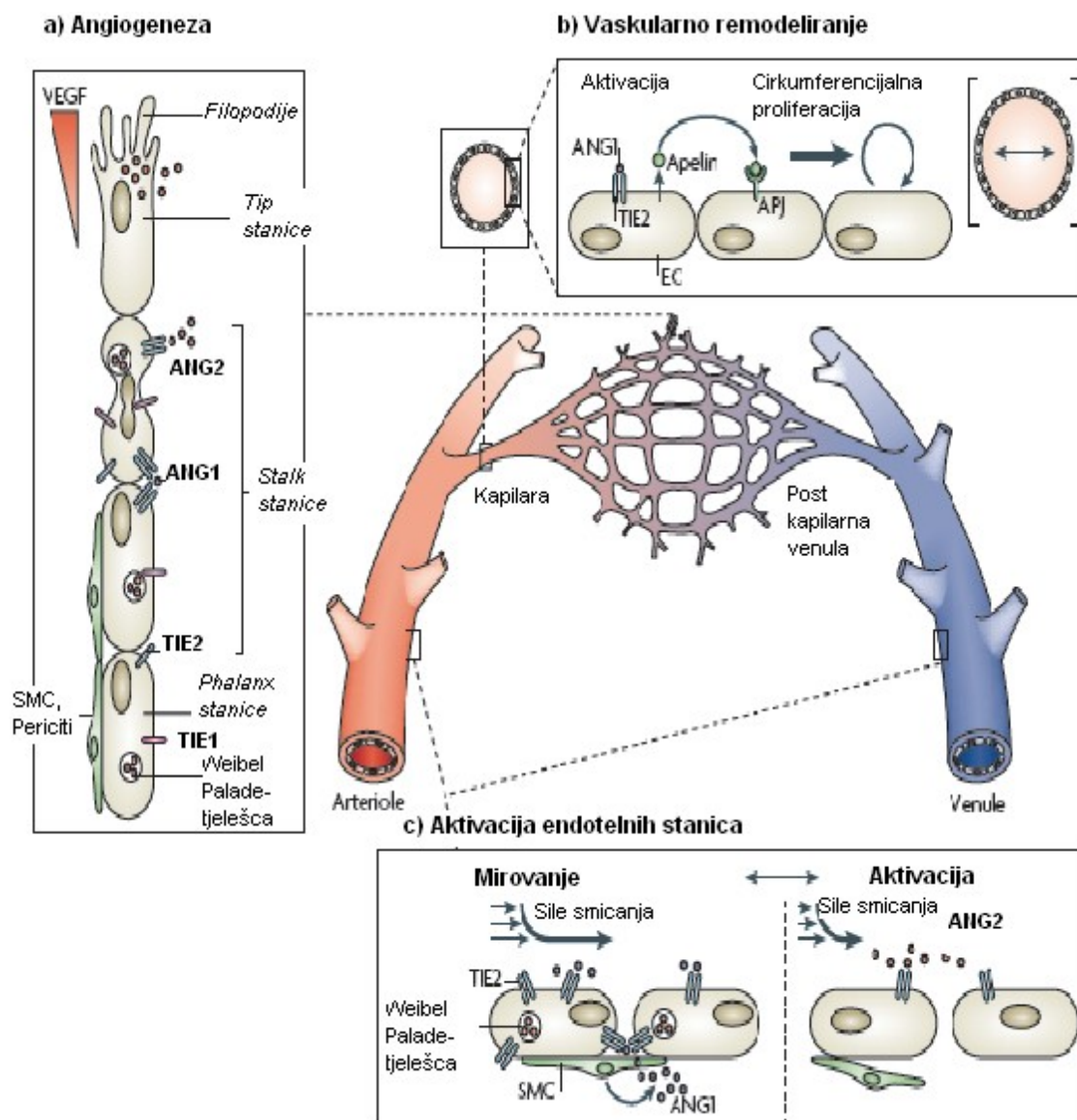
Povećani izražaj Ang-1 inducira vaskularno remodeliranje i dovodi do stvaranja žila većeg lumena. Aktivacija endotelnih stanica posredovana s Tie-2 kontrolira izražaj endotelnog apelina koji djeluje autokrino na endotelne stanice koje izražavaju G-vezan protein na APJ receptore i negativnom povratnom spregom kontrolira rast polumjera krvne žile. Održavanje fenotipa mirne endotelne stanice postiže se konstitutivnim održavanjem Ang-1/Tie-2 signalnog puta. Razlike u arterio venskom žilnom stresu kontroliraju Ang-Tie signalni sistem. Tijekom promjene iz mirnog u aktivirani fenotip endotelne stanice oslobađaju endogeno pohranjen Ang-2, koji antagonizira sa Ang-1/Tie-2 kompleksom i olakšava odgovor



endotelnih stanica na vanjske citokine. Na taj način Ang-2 pridonosi kontroli adaptivnih promjena u fiziološkim uvjetima.



Slika 1.11. Strukturna svojstva Tie receptora i njihovih liganda angiopoietina. a) Tie receptor sastoji se od N-terminalne angiopoietin vezne domene i C-terminalne tirozin kinazne domene. Izvanstanična domena sastoji se od dvije imunoglobulinu (Ig) slične domene, tri epidermalnom čimbeniku rasta (EGF) slične domene, zatim jedna Ig domena i fibronektin tip III ponavljajuća dijela. Druga Ig-slična domena predstavlja ligand vezujuću domenu. b) Angiopoietini, sastoje od N-terminalne "coiled-coil" domene i C-terminalne fibrinogenu slične domene. Molekule oligomeriziraju preko paralelnih "coiled-coil" domena, koje sadrže dodatnu sekvencu koja stvara superklaster s N-terminalnom domenom. Trodimenzionalne strukture rekombinantnih Ang-1 i Ang-2 dobivene elektronskim mikroskopom (preuzeto iz literaturnog navoda 95).



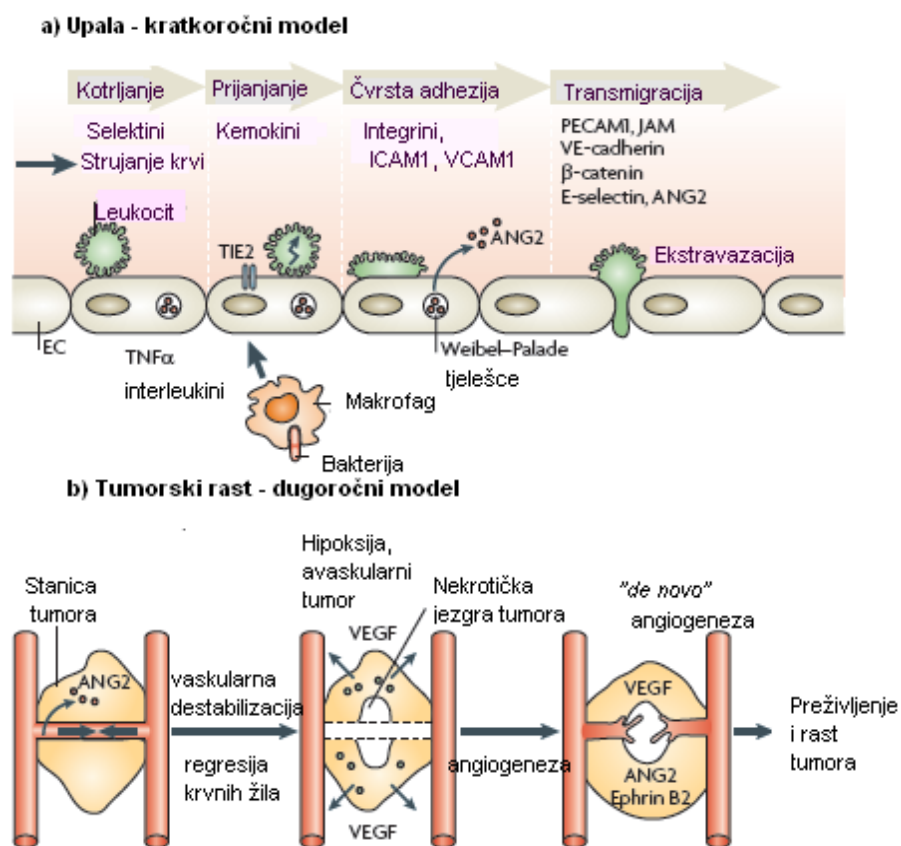
Slika 1.12 Fiziološka uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u angiogenezi (a), vaskularnom remodeliranju (b) i aktivaciji endotelnih stanica (c) (preuzeto iz literaturnog navoda 95).

### Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u patološkoj angiogenezi

Osim u normalnoj angiogenezi, Tie-2 ima ulogu i u patološkoj angiogenezi. Tijekom upale, koja predstavlja model brzog vaskularnog odgovora, vanjski stimuli (npr.  $\text{TNF}\alpha$  ili interleukini porjeklom iz makrofaga koji fagocitiraju bakterije) induciraju izražaj adhezijskih molekula uključujući selektine, integrine, ICAM, VCAM. Kemokini koji su prisutni na površini endotelnih stanica imaju kemotaktične funkcije. Posljedično, vaskularni endotel

aktivno sudjeluje u kaskadi događanja koja dovodi do utkivljenja leukocita, počevši od početnog dodira i kotrljanja, do čvrste adhezije i postepene transmigracije. Kao odgovor na upalne citokine Ang-2 autokrinim djelovanjem regulira prijelaz od kotrljanja do čvrste adhezije leukocita.

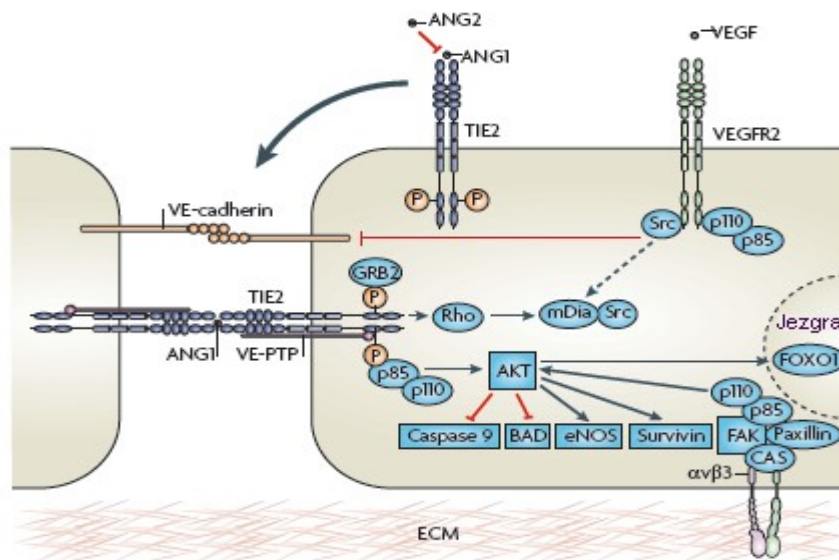
Tumorski rast primjer je dugoročnog modela djelovanja Ang-Tie kompleksa u patološkoj angiogenezi. U nedostatku angiogenih aktivnosti okolina tumora destabilizira postojeće krvne žile na Ang-2 ovisan način, te dovodi do postepene regresije. Regresiju krvnih žila povećava hipoksija u tumoru i pridonosi izražaju angiogenih citokina (npr. VEGF). Ovi citokini postepeno podržavaju tumorski rast indukcijom "de novo" angiogeneze (neoangiogeneze) (95).



Slika 1.13 Kratkoročna (a) i dugoročna (b) uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u patološkoj angiogenezi (preuzeto iz literaturnog navoda 95).

## Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u održavanju fenotipa mirne endotelne stanice

Angiopoietin-Tie kompleks ima presudnu ulogu u održavanju fenotipa mirne endotelne stanice (slika 1.14). Ang-1 vezan na Tie-2 translocira se na međustanične veze gdje ostvaruje transkompleksno povezivanje sa drugom Tie-2 molekulom susjedne stanice. Kompleks sadrži i vaskularnu endotelialnu fosfotirozin fosfatazu (engl. *vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*, VE-PTP), čiji se signali prenose na endotelnu dušik oksid sintetazu preko AKT signalnog puta. Na apoptotički učinak Ang-Tie signalnog puta pozitivno djeluju survivin i eNOS, a negativno kaspaza 9 (engl. *caspase 9*) i čimbenik apoptoze BAD (engl. *BCL2-antagonist of cell death*) (95).

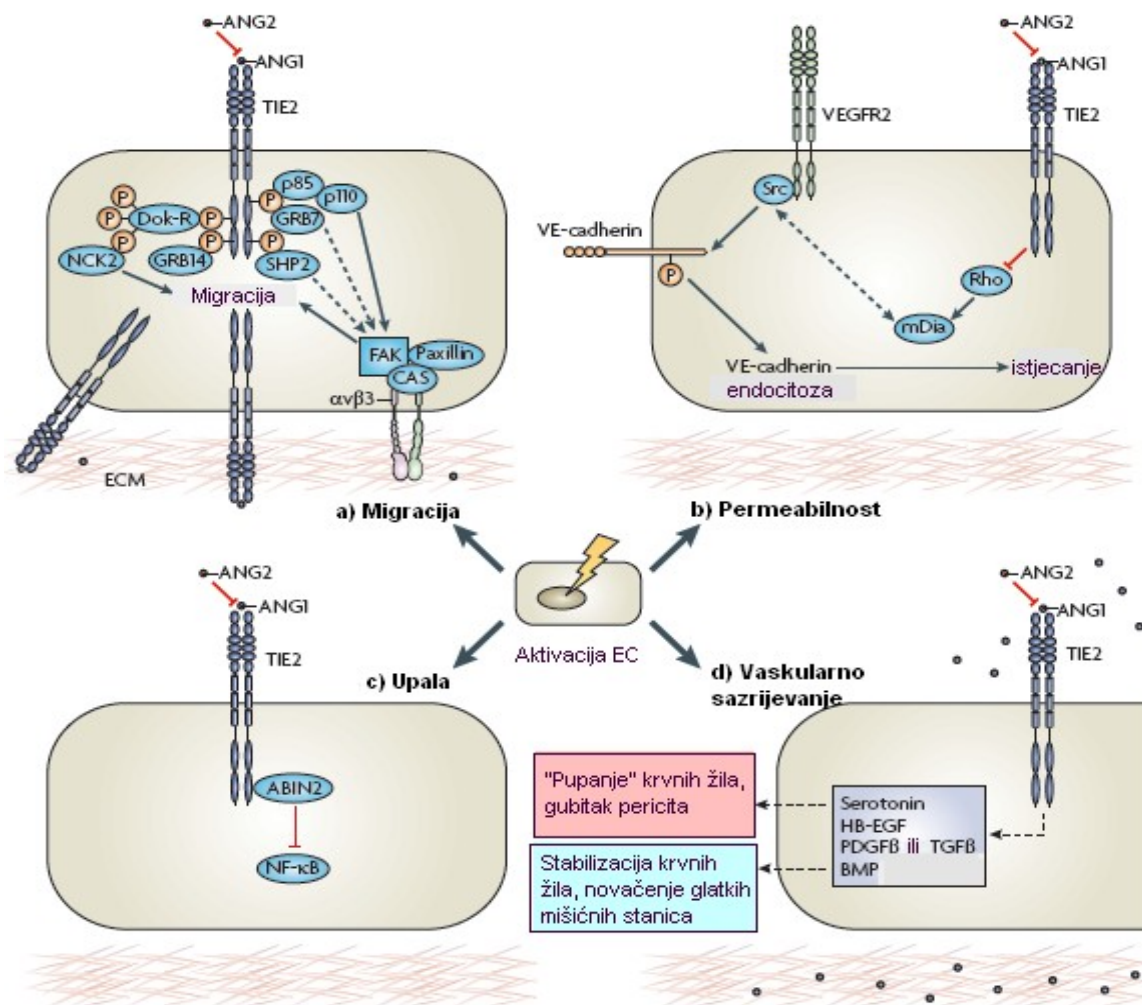


Slika 1.14 Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u održavanju fenotipa mirne endotelne stanice (preuzeto iz literaturnog navoda 95).

## Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u aktivaciji endotelnih stanica

U migraciji endotelnih stanica (slika 1.15a) važnu ulogu ima fosfoinozitol-3-kinaza, koja se sastoji od regulatorne p85 i katalitičke p110 podjedinice. Regulatorna p85 podjedinica veže se na fosforilirani oblik Tie-2, što dovodi do aktivacije AKT signalnog puta. PI3K može biti povezana sa fokalnim adhezijskim kompleksima, koji zatim stimuliraju AKT kinazu. AKT signalni sistem fosforilizira i inaktivira transkripcijski čimbenik FOXO1 (engl. *transcription factor Forkhead box O1*, FOXO1). Rho-GTP-aze također reguliraju endotelno mirovanje i preživljenje. Angiopoietin 1 posreduje u aktivaciji fosfoinozitol-3-kinaze, koja fosforilira fokalnu adhezijsku kinazu, što predstavlja signal za staničnu migraciju. Novačenje

adaptor proteina (GRB14) i SH2 domene tirozin fosfataze 2 (SHP2) na Tie-2 receptor čini se da povećava migraciju kroz fosfoinozitol-3-kinazani put. Migraciju endotelnih stanica podržava i Dok-R protein (engl. *Dok-related docking protein, Dok-R*) vezan na Tie-2 receptor. U nedostatku Ang-1, Src se ne sekvestrira u mDia (engl. *Mammalian homolog of Drosophila diaphanous, mDia*). VEGF simultano aktivira Src, koji dovodi do internalizacije vaskularnog endotelnog kadherina. To destabilizira interendotelijalne veze i povećava permeabilnost (slika 1.15b.) (95). Tie-2 aktivacija dovodi do novačenja intracelularnog proteina ABIN2 (poznatog i kao TNIP2). To blokira signalni put NF- $\kappa$ B i dovodi do antiinflamatornog učinka. Djelovanje Ang-2 suprosvavlja se Ang-1/Tie 2 signalnom putu i olakšava upalni odgovor (slika 1.15c.) (95).



Slika 1.15. Uloga Angiopoietin-Tie kompleksa u aktivaciji endotelnih stanica: a) migracija, b) permeabilnost, c) upala, d) vaskularno sazrijevanje (preuzeto iz literaturnog navoda 95).

Ang-1 potreban je za stabilizaciju krvnih žila (slika 1.15d). Ang-2 djeluje kao antagonistički regulator endotelnih stanica i na taj način dovodi do destabilizacije krvnih žila i "ispada" pericita. Točan molekularni mehanizam ovog procesa slabo je poznat. Mogući pozitivni regulatori tog procesa uključuju koštani morfogeni protein (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP), PDGF $\beta$  i TGF $\beta$ , a negativni su serotonin i heparin vezujući epidermalni čimbenik rasta (engl. *heparin-binding epidermal-like growth factor*, HB-EGF).

### **1.3.5.2 Angiopietini i Tie-2 receptor u srčanožilnim bolestima**

Zbog brojnih djelovanja u upali i angiogenezi, oba procesa povezana s aterosklerozom, angiopietini imaju potencijal da mijenjaju patološke procese ključne za razvoj ateroskleroze i periferne arterijske bolesti. Kronična upala povezana je sa visokim koncentracijama citokina i proteolitičkih enzima koji dovode do narušavanja strukture medije. Ang-1 dovodi do stabilizacije krvnih žila tijekom angiogeneze, inhibira permeabilnost i pokazuje antiupalni učinak preko Tie-2 receptora. Osim toga smanjuje inflamatorni učinak VEGF-a smanjenjem indukcije adhezijskih molekula. Za razliku od njega, Ang-2 ima suprotan učinak i podržava upalu. Ang-2 ima kemotaktična svojstva prema monocitima i makrofazima koji izražavaju Tie-2 receptor, te na taj način povećava transmigraciju leukocita u žilnu stijenku (98). Tressel i suradnici (99) pokazali su da Ang-2 stimulira protok krvi nakon okluzije femoralne arterije indukcijom upale i arteriogeneze. Findley i suradnici (87) našli su povećane koncentracije Ang-2 u pacijenta s intermitentnom klaudikacijom i kritičnom ishemijom ekstremiteta. Topljivi receptori angiogenih čimbenika rasta koji se oslobađaju u cirkulaciju mogu djelovati kao inhibitori angiogeneze (100). Findley i suradnici (87) našli su povećane koncentracije Tie-2 receptora u pacijenata s perifernom arterijskom bolesti, pri čemu su razine bile više kod pacijenata s težim simptomima. Ovi nalazi ukazuju da povećana razina Tie-2 receptora korelira s težinom bolesti neovisno o hemodinamskom oštećenju (100).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Periferna arterijska bolest klinička je manifestacija ateroskleroze sa značajnim morbiditetom i mortalitetom. Iako tradicionalni čimbenici rizika imaju značajnu ulogu u inicijaciji i progresiji bolesti, do danas nisu razjašnjeni svi uzroci, kao ni mehanizmi koji dovode do razvoja bolesti. Patofiziološko zbivanje u perifernoj arterijskoj bolesti čini ishemija tkiva, a težina kliničke slike ovisi o mjestu i opsegu stenoze, te o stanju kolateralne cirkulacije. Upala, angiogeneza i aktivacija endotela važni su patogenezi periferne arterijske bolesti, a njihovi odnosi su kompleksni i međuovisni. Upala može stimulirati angiogenezu, kao što angiogeneza može pospješiti razvoj upale. Pri tome je aktivacija endotela preduvjet inicijacije angiogeneze i presudna je za nastanak upale.

Rezultati velikih prospektivnih istraživanja, potvrdili su značaj hs-CRP-a kao markera progresije, funkcionalne aktivnosti i neželjenog kardiovaskularnog ishoda u pacijenata s perifernom arterijskom bolesti. Niska koncentracija HDL kolesterola danas se smatra neovisnim čimbenikom rizika za nastanak ateroskleroze, a paraoksonaza (PON1) i acetilhidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije (PAF-AH) svojim antioksidacijskim i antiupalnim djelovanjem pridonose njegovim antiaterogenim svojstvima. Poznato je da na aktivnost PON1 djeluje niz genetskih i negenetskih čimbenika. Genetski čimbenici obuhvaćaju razne polimorfizme u regulacijskim, intronskim i kodirajućim regijama *pon* gena. Polimorfizmi za koje je poznato da utječu na aktivnost i koncentraciju paraoksonaze, obuhvaćaju Q192R i L55M u promotorskoj regiji i -108 C>T u intronskoj regiji *pon1* gena, te S311C u *pon2* genu. Iako je antiaterogeni učinak paraoksonaze neosporiv, objavljeni rezultati o povezanosti polimorfizama paraoksonaze s razvojem ateroskleroze su diskrepantni. Biološka uloga PAF-AH u razvoju srčanožilnih bolesti je kontraverzna, obzirom da supstrati i produkti katalitičkih reakcija u kojima sudjeluje imaju proaterogena svojstva. Vaskularni endotelni čimbenika rasta (VEGF) i angiopoietini koji djeluju kao modulatori endotelne aktivacije preko tirozin kinaznog Tie-2 receptora važni su za angiogenezu i vaskularno remodeliranje. VEGF povećava mikrovaskularnu permeabilnost, te uzrokuje proliferaciju, migraciju i diferencijaciju endotelnih stanica. Angiopoietin-2 prirodni je endogeni antagonist Tie-2 koji djeluje kao autokrini negativni regulator endotelne funkcije. U prisustvu VEGF pokreće upalni odgovor aktivacijom endotela i indukcijom permeabilnosti, a u odsutvu VEGF destabilizira postojeće krvne žile i dovodi do vaskularne regresije. Topljivi receptori angiogenih čimbenika rasta koji se oslobađaju u cirkulaciju mogu djelovati kao inhibitori

angiogeneze, te u nekim slučajevima mogu korelirati sa težinom bolesti neovisno o hemodinamskom oštećenju.

Hipoteza postavljena u ovom istraživanju je da PON1 i PAF-AH, kao novi biomarkeri upale, te VEGF, Ang-2 i njegov Tie-2 receptor, kao novi biomarkeri angiogeneze imaju značajnu ulogu u nastanku i razvoju periferne arterijske bolesti. Određivanjem katalitičke koncentracije i genskog polimorfizma PON1, katalitičke koncentracije PAF-AH-a, koncentracije VEGF, Ang-2 i njegovog Tie-2 receptora, želimo ispitati postoji li povezanost novih biomarkera u procesu upale i angiogeneze sa pojavnošću i stupnjem stenotično/okluzivnih promjena perifernih arterija, te procijeniti njihovu vrijednost kroz moguću kliničku primjenu kao novih dijagnostičkih i prognostičkih pokazatelja ateroskleroze perifernih arterija.

Iz navedenog proizlaze specifični ciljevi ovog istraživanja:

1. skupina bolesnika s perifernom arterijskom bolesti (ispitanici) usporediti će se s kontrolnom skupinom u odnosu na demografske, biometrijske, metaboličke i terapijske karakteristike.
2. U ispitanika i kontrolnoj skupini odrediti će se i usporediti
  - lipidni status i CRP, kao nespecifični biljeg upale i čimbenik kardiovaskularnog rizika
  - katalitičke koncentracije PON1 i PAF-AH-a, kao novih biomarkera upale. Ispitati će se njihov odnos sa parametrima lipidnog statusa i CRP-om, te povezanost čimbenika rizika i terapije sa katalitičkim koncentracijama enzima.
  - distribucije genotipova Q192R, L55M, -108 C>T polimorfizma *pon1* i S311C *pon2* gena koji se povezuju sa sniženom katalitičkom koncentracijom PON1.
  - koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora, kao novih biomarkera angiogeneze. Ispitati će se njihov odnos sa ostalim biokemijskim parametrima, te povezanost čimbenika rizika i terapije s njihovim koncentracijama.
3. U skupini ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ispitat će se odnos istraživanih biokemijskih pretraga i stupnja anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija, te će se procijeniti njihova vrijednost kroz moguću kliničku primjenu kao novih dijagnostičkih i prognostičkih pokazatelja ateroskleroze perifernih arterija.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u skupini ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice "Merkur".

##### 3.1.1 Ispitanici s perifernom arterijskom bolesti

U periodu od 2005-2010. godine obrađeno je 257 bolesnika upućenih na angiografiju u Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku angiografiju Kliničke bolnice "Merkur" zbog stenoze jedne ili više perifernih arterija.

Kriteriji uključena bolesnika u istraživanje bili su:

- a) informirani pristanak o sudjelovanju u znanstvenom istraživanju (Prilog 1);
- b) angiografski utvrđena hemodinamski značajna stenoza jedne ili više perifernih arterija, pri čemu je dijagnostički kriterij za hemodinamski značajnu stenozu bio suženje lumena periferne arterije veće od 50%;
- c) ispunjen upitnik za bolesnike (Prilog 2);
- d) procjena anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija i izračun angiografskog scora (Prilog 3).

Neposredno nakon digitalne suptrakcijske angiografije, liječnik, specijalista intervencijske radiologije popunjavao je upitnik za bolesnike (prilog 2), koji je uz demografske i biometričke podatke, obuhvaćao i procjenu metaboličkog, terapijskog, kliničkog i angiografskog statusa. Angiografski status obuhvatio je procjenu stenotično/okluzivnih aterosklerotskih promjena u terminalnoj aorti i zdjelničnim arterijama (aortoilijačni tip), te u natkoljениčnim i potkoljениčnim arterijama (femoropoplitealni tip) prema kriterijima hemodinamske značajnosti stenoze perifernih arterija. Obzirom da su u većine nađene multiple stenoze i/ili okluzije, nerjetko na više arterija (aortoilijačni tip femoropoplitealni tip, kombinirani tip), za preciznu mjeru težine aterosklerotskih promjena učinjeno je bodovanje naknadnom analizom angiografskih slika. Za svakog je pacijenta određen angiografski "Merkur" *score*, procjenom lezija na svim analiziranim perifernim arterijama (prilog 3). Ukupno je obuhvaćena 21 arterija: terminalna aorta (lat. *aorta abdominalis*, AA), te deset arterija svakog ekstremiteta, uključujući zajedničke bočne arterije

(lat. *arteria iliaca communis*, AIC), vanjske bočne arterije (lat. *arteria iliaca externa*, AIE), zajedničke bedrene arterije (lat. *arteria femoralis communis*, AFC), površinske bedrene arterije (lat. *arteria femoralis superficialis*, AFS), duboke bedrene arterije (lat. *arteria profunda femoris*, AFP), zakoljske arterije (lat. *arteria poplitea*, AP), goljenično-lisni trunkus (lat. *truncus tibiofibularis*, TFTr), prednje arterije potkoljenice (lat. *arteria tibialis anterior*, ATA), stražnje arterije potkoljenice (lat. *arteria tibialis posterior*, ATP) i lisne arterije (lat. *arteria fibularis*, AF). Bodovanje je izvršeno prema prema kriterijima hemodinamske značajnosti stenozе: nula = normalna arterija; 1 bod = stenozа manja od 50%; 2 boda = stenozа 50-99% i 3 boda = okluzija arterije. Ukupan zbroj svih bodova za svakog bolesnika predstavljao je angiografski "Merkur" score, kao jedinstvenu mjeru anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena. Ovakav način bodovanja mnogo je relevantniji pokazatelj anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena od podjele ispitanika u skupine prema mjestu i kriterijima hemodinamske značajnosti stenozе, jer istovremeno obuhvaća stupanj (postotak suženja lumena krvne žile) i proširenost aterosklerotskih promjena (broj zahvaćenih perifernih arterija).

Od ukupno 257 obrađenih bolesnika u istraživanje je uključeno 110 bolesnika (91 muškarac i 19 žena), dobi od 40 do 84 godine, koje su dale pisanu suglasnost o sudjelovanju u znanstvenom istraživanju, kod kojih je dijagnoza periferna arterijske bolesti potvrđena angiografski, kao hemodinamski značajna stenozа (>50% lumena) jedne ili više perifernih arterija, a stupanj aterosklerotskih promjena perifernih arterija procjenjen naknadnom analizom angiografskih slika i izražen kao "Merkur" score.

Kriteriji za neuključivanje u istraživanje bili su

- a) metodom digitalne suptraksijske angiografije nije utvrđena hemodinamski značajna stenozа perifernih arterija (3 bolesnika)
- b) nepotpuni podaci u upitniku za bolesnike (12 bolesnika)
- c) nedostupnost angiografskih slika i nemogućnost procjene anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija (132 bolesnika)

### 3.1.2 Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu činile su osobe upućene na CD-ultrazvučni pregled zbog sumnje na perifernu arterijsku bolest, ali im je ovim postupkom utvrđen normalan izgled i normalan hemodinamski protok u perifernim arterijama (Tablica 1.1. na str. 11).

Kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su

- a) isključeno postojanje periferne arterijske bolesti CD-ultrazvučnim pregledom arterija donjih ekstremiteta
- b) životna dob iznad 40 godina
- c) izmjereni krvni tlak manji od 145/90 mm Hg
- d) bez znakova dijabetesa
- e) bez terapije lipoliticima, antihipertenzivima i/ili hormonskom nadomjesnom terapijom
- f) bez simptoma moždane i/ili koronarne ishemije
- g) suglasnost za uzimanje uzoraka krvi za određivanje planiranog biokemijskog statusa (Prilog 4).

Od ukupno 158 osoba uključenih u istraživanje u razdoblju od 2002.- 2009. godine za kontrolnu skupinu odabrano je 118 osoba (57 muškaraca i 61 žena), dobi od 43 do 82 godine. Njihovi demografski, biometrički, metabolički pokazatelji i terapijski status dobiveni su iz upitnika za kontrolne osobe (Prilog 4).

Kriteriji za neuključivanje u istraživanje bili su:

- a) nepotpuni podaci u upitniku za kontrolne osobe (12 osoba);
- b) nalaz CD-ultrazvučnog pregleda arterija donjih ekstremiteta ukazuje na prisustvo periferne arterijske bolesti (3 osobe)
- c) izmjereni krvni tlak veći od 145/90 mm Hg ( 6 osoba)
- d) uzimanje lipolitika i antihipertenziva (1 osoba)
- e) uzimanje hormonske nadomjesne terapije (4 osobe)
- f) koncentracije CRP- a veće od 10 mg/L, zbog mogućnosti akutne upale (14 osoba).

## 3.2 UZORCI

Uzorci za određivanje biokemijskih pretraga i polimorfizama *pon1* i *pon2* gena uzimali su se u jutarnjim satima, natašte, pri čemu se vodilo računa o utjecaju prijeanalitičkih čimbenika na kvalitetu konačnih rezultata. Ispitanicima s perifernom arterijskom bolesti krv se oduzimala neposredno prije angiografije, a kontrolnim osobama između 7 i 9 sati, 12 sati nakon uzimanja zadnjeg obroka. Prije uzorkovanja ispitanici su se pridržavali općih i specifičnih uputa za uzimanje uzoraka krvi za određivanje lipidnog statusa, prema Uputama za bolesnike za medicinsko-biokemijske pretrage (<http://www.kb-merkur.hr>).

Sukladno akreditacijskim zahtjevima za prijeanalitičku fazu definirana je vrsta spremnika i dodatka, način prikupljanja i transport primarnih uzoraka, te njihova pohrana i stabilnost.

### 3.2.1 Primarni uzorci za biokemijske pretrage

Primarni uzorci za određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, CRP-a, VEGF-a, Ang-2, Tie-2 receptora i katalitičkih koncentracija PON1 i PAF-AH, uzimali su se u standardizirane epruvete s podtlakom za biokemijske pretrage/serum (bez antikoagulansa; crveni čep) bez polistirenske smole za odjeljivanje seruma od stanica. Centrifugiranje uzoraka za biokemijske pretrage provodilo se najmanje 30 minuta nakon uzorkovanja, 10 min na 3500 okretaja u minuti. Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i CRP-a u serumu određene su isti dan, a alikvoti ostatnog seruma pohranjeni su unutar dva sata od uzorkovanja na temperaturu od -80°C za određivanje ostalih biokemijskih pretraga.

### 3.2.2 Uzorci za određivanje polimorfizama *pon1* i *pon2* gena

Primarni uzorci za određivanje polimorfizama *pon1* i *pon2* gena uzimali su se u standardizirane epruvete s podtlakom (ljubičasti čep; K<sub>3</sub>EDTA; 7,5 ml). Primarni uzorci odmah su se dostavljali u Jedinicu za molekularnu dijagnostiku i imunofenotipizaciju krvotvornih stanica u kojoj je DNA izdvojena iz pune krvi. Izdvojena DNA je pohranjena u Tris-EDTA puferu na temperaturi od 2-8° C ili -20° C, ovisno o planu i dinamici određivanja polimorfizama *pon1* i *pon2* gena.

### 3.3 METODE

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i CRP-a, te katalitičke koncentracije enzima PAF-AH i PON1 određene su na selektivnom biokemijskom analizatoru Olympus AU 600 (Olympus, Tokyo, Japan) u Jedinici za kliničku kemiju, Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, Kliničke bolnice “Merkur”, Zagreb.

Polimorfizmi Q192R, L55M, -108C>T *pon1* gena i polimorfizam S311C *pon2* gena određeni su lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*), metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP*), PCR-RFLP metodom u Jedinici za molekularnu dijagnostiku i fenotipizaciju krvotvornih stanica Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, Kliničke bolnice “Merkur”, Zagreb.

Koncentracije VEGF-a, Ang-2 i Tie-2 receptora određene su imunoenzimskim metodama (engl. *enzyme immunoassay, ELISA*) u Jedinici za za reproduktivnu biokemiju i metabolizam stanica, Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, Kliničke bolnice “Merkur”, Zagreb, uz korištenje Stat Fax®2100, Microplate reader, spektrofotometra, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, SAD i Plate Shaker-Thermostat PST-60HL-4, tresalice mikrotitarskih pločica s termostatom, LKB, Turku, Finska.

#### 3.3.1 Određivanje lipidnog statusa

Metode za određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog i HDL kolesterola su akreditirane prema međunarodnoj normi: HRN EN ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost (prilog potvrdi o akreditaciji <http://www.kb-merkur.hr> ).

Analitička potvrda dobivenih rezultata provodila se redovitim sudjelovanjem u organiziranim shemama vanjske procjene kvalitete na nacionalnoj i međunarodnoj razini:

1. Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara (HDMB), Modul 1 Opća i specijalna medicinska biokemija, tri puta godišnje, u organizaciji Povjerenstva za vanjsku procjenu kvalitete rada Hrvatskog društva medicinskih biokemičara.
2. Labquality, Finska, shema Short-term survey, četiri puta godišnje, u organizaciji neovisnog međunarodnog organizatora «Labquality –WHO Collaborating Centre for

Education and Training in Laboratory Quality Assurance», FIN-00520 Helsinki, Ratamestarinkatu 11, Finska.

Varijabilnost dobivenih rezultata iskazana je kao proširena mjerna nesigurnost uz obuhvatni faktor  $k=2$ , sa vjerojatnosti od 95% (Popis akreditiranih pretraga i metoda u Jedinici kliničke kemije Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, <http://www.kb-merkur.hr>)

**Koncentracije triglicerida** određene su spektrofotometrijskom metodom primjenom reagensa TRIGLYCERIDE, OSR61118, tvrtke Beckman Coulter (O'Callaghans Mill Co. Clare, Irska). Vrijednosti triglicerida dobivene ovom metodom sljede su prema referentnoj metodi izotopne dilucijske masene spektrometrije, IDMS.

Načelo metode: Određivanje triglicerida temelji se na nizu povezanih enzimatskih reakcija. Trigliceridi iz uzorka hidroliziraju se kombinacijom mikrobnih lipaza da bi se dobio glicerol i masne kiseline. Glicerol se fosforilira adenzin trifosfatom u prisustvu glicerol kinaze i stvara glicerol- 3-fosfat. Glicerol -3-fosfat se oksidira molekulom kisika u prisustvu glicerol fosfat oksidaze i stvara vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i dihidroksiaceton fosfat. Stvoreni  $H_2O_2$  reagira s 4-aminofenazonom i di natrijevom soli N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina (MADB) u prisutnosti peroksidaze i stvara kromofor koji se mjeri pri 660/800 nm. Povećanje apsorpcije pri 660/800 nm proporcionalno je koncentraciji triglicerida u uzorku.

**Koncentracije kolesterola** određene su spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu reagensa CHOLESTEROL, OSR 6116, tvrtke Beckman Coulter (O'Callaghans Mill Co. Clare, Irska). Vrijednosti kolesterola dobivene ovom metodom sljede su prema Standardnom referentnom materijalu, SRM 909b, razina 1, metodi izotopne dilucije masene spektrometrije, IDMS, Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju. Metoda je potvrđena prema referentnoj metodi američkog Centra za kontrolu bolesti (Centers of Disease Control Reference Method).

Načelo metode: Kolesterol esterase hidroliziraju estere kolesterola u uzorku. Kolesterol oksidaza oksidira stvoreni slobodni kolesterol u kolesten-3-on uz istodobno stvaranje vodik-peroksida. Vodikov peroksid se oksidativno veže s 4-aminoantipirinom i fenolom u prisutnosti peroksidaze. Nastala crvena kinoniminska boja, proporcionalna je koncentraciji kolesterola u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski pri 540/600 nm.

**Koncentracije HDL-kolesterola** određena je imunoinhibicijskom metodom uz upotrebu HDL Cholesterol reagensa, OSR 6187, tvrtke Beckman Coulter (O'Callaghans Mill Co. Clare, Irska). Vrijednosti HDL-kolesterola određene ovom metodom sljede su prema referentnoj metodi za HDL-kolesterol američkog Centra za kontrolu bolesti (Center for Disease Control, CDC).

Načelo metode: Ljudska  $\beta$ -lipoproteinska antitijela vezuju se za lipoproteine koji nisu HDL (LDL, VLDL i hilomikroni). Stvoreni kompleksi antigen-antijelo blokiraju reakcije enzima kolesterol esteraze i kolesterol oksidaze koje razgrađuju HDL-kolesterol do masnih kiselina i vodik peroksida. U indikatorskoj reakciji nastali vodikov peroksid djelovanjem peroksidaze stvara plavi kompleks, a intenzitet nastale boje određuje se na 600/700 nm i proporcionalan je koncentraciji HDL-kolesterola u uzorku.

**Koncentracija LDL-kolesterola** određena je imunoinhibicijskom metodom uz upotrebu LDL Cholesterol reagensa, OSR 6183, tvrtke Beckman Coulter ( O'Callaghans Mill Co. Clare, Irska). Vrijednosti LDL-kolesterola određene ovom metodom sljede su prema referentnoj metodi za LDL-kolesterol američkog Centra za kontrolu bolesti (Center for Disease Control, CDC).

Načelo metode: Zaštitni agens štiti LDL od enzimskih reakcija. Svi ne-LDL lipoproteini (HDL, VLDL, hilomikroni) razgrađuju se u reakciji s kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom. Vodik-peroksid stvoren u ovoj reakciji razgrađuje se djelovanjem peroksidaze. Dodatkom druge komponente reagensa s LDL-a se otpušta zaštitni reagens, a natrijev azid deaktivira peroksidazu. U indikatorskoj reakciji nastali vodikov peroksid djelovanjem peroksidaze stvara plavi kompleks, a intenzitet nastale boje određuje se na 600/700 nm i proporcionalan je koncentraciji LDL-kolesterola u uzorku.

### **3.3.2 Određivanje koncentracije CRP-a u serumu**

C-reaktivni protein određen je visoko osjetljivom imunoturbidimetrijskom metodom. Metoda je akreditirana prema međunarodnoj normi: HRN EN ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost (vidi prilog potvrdi o akreditaciji <http://www.kb-merkur.hr>). Metoda je potvrđena sudjelovanjem u međulaboratorijskim usporedbama na nacionalnoj razini, u organizaciji Povjerenstva za vanjsku procjenu kvalitete

medicinsko-biokemijskih laboratorija Hrvatskog društva medicinskih biokemičara.

Korišten je CRP Latex reagens, OSR 6229, tvrtke Beckman Coulter (O'Callaghans Mill Co. Clare, Irska. uz primjenu postavki za normalnu aplikaciju, koje osiguravaju linearnost u mjernom području od 0,2-480,0 mg/L, preciznost do 3,8% i osjetljivost od 0,10 mg/L.

Vrijednosti CRP-a dobivene ovom metodom sljedeće su prema standardu Međunarodnog udruženja za kliničku kemiju (engl. *International Federation of Clinical Chemistry*, IFCC), CRM 470.

Načelo metode: CRP iz uzorka specifično reagira s antitijelima na humani CRP vezanim na čestice lateksa, te daje netopljive agregate. Apsorpcija tih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku.

### **3.3.3 Određivanje katalitičke koncentracije PAF-AH-a**

Katalitička koncentracija PAF-AH-a određena je spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu komercijalnog reagensa Azwell Auto PAF-AH, AZWELL Alfresa Pharma Corporation, Osaka, Japan.

Načelo metode: PAF-AH hidrolizira supstrat koji je analog PAF-a s 4-nitrofenilnom skupinom: 1-miristoil-2-(p-nitrofenilsukcinil) fosfatidilkolin u *sn*-2 položaju na 37°C pri pH 7,6. U reakciji nastaje p-nitrofenil sukcinat, koji se u vodenoj otopini odmah razgrađuje u p-nitrofenol. Oslobođanje p-nitrofenola prati se spektrofotometrijski na 405/505 nm, a katalitička koncentracija PAF-AH-a izračunava se iz razlike promjene apsorbancije uzorka i slijepe probe reagensa.

Reagensi:

R1: 200 mmol/L HEPES pufer (2-[4-(2-hidroksietil-1-piperazini)]etansulfatna kiselina), pH 7,6; 2x 60 ml, spreman za upotrebu.

R2A: 20 mmol/L pufer monohidrata limunske kiseline pH 4,5; 2 x 19 ml

R2B: 1-miristoil-2-(p-nitrofenilsukcinil) fosfatidilkolin, 90 mmol/L; 1x 2,2 ml.

Prije rada načini se radni reagens R2, mješajući reagente R2A i R2B u omjeru 19:1. Smjesa je stabilna 14 dana na temperaturi 2-8°C.

Postupak: U 240 µl reagensa 1 (R1), dodano je 2 µl seruma i predinkubirano pet minuta na 37°C. Reakcija je započeta dodatkom 80 µl reagensa 2 (R2). Apsorbancija je



mjerena nakon druge i pete minute. Kontinuirano mjerenje oslobođenog p-nitrofenola pri 405/505 nm bilo je osnova za određivanje katalitičke koncentracije enzima (101). Katalitička koncentracija PAF-AH-a izračunava se pomoću formule:

$$\text{PAF-AH (U/L)} = (\Delta\text{EA} - \Delta\text{EB}) \times V \times 10^6 / (\varepsilon \times v \times b), \text{ gdje je}$$

$\Delta\text{EA}$  = promjena apsorbancije uzorka

$\Delta\text{EB}$  = promjena apsorbancije slijepe probe reagensa

$V$  = volumen reakcijske smjese (322  $\mu\text{l}$ ),

$v$  = volumen uzorka (2  $\mu\text{l}$ ),

$\varepsilon$  = molarni apsorpcijski koeficijent (17900  $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$b$  = debljina kivete (1 cm)

$10^6$  faktor za preračunavanje mola u mikromole.

Katalitička koncentracija PAF-AH-a izražena je u internacionalnim jedinicama po litri seruma (U/L) i u internacionalnim jedinicama po mmolu LDL-kolesterola (U/mmol), što predstavlja standardiziranu katalitičku koncentraciju PAF-AH-a.

### 3.3.4 Određivanje bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije PON1

Bazalna (PON1) i stimulirana (NaCl-PON1) katalitička koncentracija paraoksonaze određena je spektrofotometrijskom metodom.

Načelo metode: PON1 hidrolizira supstrat paraokson (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat) pri čemu se oslobađa p-nitrofenol koji se određuje spektrofotometrijski na 410/480 nm, pri temperaturi od 37° C (102). Bazalna katalitička koncentracija paraoksoanze u serumu određena je kontinuiranim mjerenjem oslobođenog p-nitrofenola bez prisustva NaCl, a stimulirana uz prisutnost NaCl.

Reagens za PON1:

1. 2,5 mM paraokson
2. 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$  u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH=8,0.

Reagens za NaCl-PON1

1. 2,5 mM paraokson
2. 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$  u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH=8,0.
3. 1,0 mM 1 NaCl

Postupak: Reakcijska smjesa za određivanje bazalne katalitičke koncentracije PON1 ukupnog volumena 315  $\mu$ l sadržavala je 15  $\mu$ l seruma i 300  $\mu$ l reagensa za PON1. Reakcijska smjesa za određivanje stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze, NaCl-PON1, sadržavala je još i 1,0 mM NaCl. Kontinuirano mjerenje oslobođenog p-nitrofenola pri 410/480 nm bilo je osnova za određivanje bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze:

$$\text{PON1 (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times V \times 10^6 / (\epsilon \times v \times b) \quad \text{i}$$

$$\text{NaCl-PON1 (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times V \times 10^6 / (\epsilon \times v \times b)$$

gdje je

V = volumen reakcijske smjese (315 $\mu$ l),

v = volumen uzorka (15 $\mu$ l),

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski koeficijent (17900 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

b = debljina kivete (1cm), a

10<sup>6</sup> faktor za preračunavanje mola u mikromole.

Katalitičke koncentracije enzima izražene su u internacionalnim jedinicama po litri seruma (U/L), te u internacionalnim jedinicama po mmolu HDL-kolesterola (U/mmol), što predstavlja standardizirane katalitičke koncentracije paraoksonaze.

### 3.3.5 Određivanje polimorfizama *pon1* i *pon2* gena

Polimorfizmi Q192R, L55M, -108C>T *pon1* gena i polimorfizam S311C *pon2* gena određeni su lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*), metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP*), PCR-RFLP metodom. PCR-RFLP metoda za određivanje polimorfizama Q192R, L55M, -108C>T *pon1* i S311C *pon2* gena validirana je i potvrđena je sudjelovanjem u međulaboratorijskim usporedbama na nacionalnoj razini. Sustav unutrašnje kontrole obuhvatio je određivanje čistoće i koncentracije DNA, provjeru integriteta i cjelovitosti DNA, te analizu pozitivnih i negativnih kontrolnih uzoraka. Kao pozitivna kontrola koristili su se humani uzorci s dokazanim i nanovo umnoženim ciljanim genom za svaki polimorfizam. Uzorak MQ vode (MQ *Water, PCR Grade, Roche; kat. broj 03315932001*) predstavljao je negativan kontrolni uzorak, budući da se ne umnaža tijekom lančane reakcije polimeraze.

Metoda je akreditirana prema međunarodnoj normi: HRN EN ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost (vidi prilog potvrdi o akreditaciji <http://www.kb-merkur.hr>).

### **Izdvajanje DNA**

Načelo metode: DNA je izdvojena iz pune krvi uzete na antikoagulans EDTA (standardizirana epruveta s podtlakom; K<sub>3</sub>EDTA; 7,5 ml) na automatskom analizatoru ABI Prism 6100; Applied Biosystems, SAD, prema preporučenom protokolu proizvođača.

Postupak: Puna krv (150 µl) se inkubira smjesom pufera za digestiju (85 µl; *BloodPrep DNA Proteinase K Digestion Buffer; Applied Biosystems, SAD*) i proteinaze K (15 µl; 20 mg/ml; *Applied Biosystems, SAD*) i promiješa. Nakon inkubacije (10 minuta na 58°C), smjesi se dodaje 500 µl otopine za pročišćavanje (*DNA Purification solution; Applied Biosystems, SAD*). Iz nastalog lizata se DNA izdvaja prema preporučenom protokolu proizvođača na automatskom analizatoru ABI Prism 6100, Applied Biosystems, SAD. Izdvojena DNA otopljena u puferu se za daljnje postupke pohranjuje na temperaturi 2-8°C.

### **Provjera integriteta DNA**

Nakon izdvajanja DNA iz pune krvi, integritet DNA je provjeren elektroforezom na 1% agaroznom gelu uz bojanje etidij bromidom. Nakon elektroforeze na 1% agaroznom gelu cjelovita DNA vidljiva je kao jasna vrpca visokomolekularne DNA.

### **Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

Načelo metode: Lančana reakcija polimerazom je metoda umnažanja relativno kratkog slijeda DNA u veliki broj identičnih kopija *in vitro* pomoću termostabilnog enzima DNA polimeraze i odgovarajućih jednolančanih oligonukleotidnih početnica (od engl. *primers*) koje omeđuju ciljni slijed DNA i komplementarne su krajevima dijela DNA koji se želi umnožiti (DNA kalup). Uz DNA kalup, odgovarajuće jednolančane oligonukleotidne početnice i DNA polimerazu, reakcijska smjesa za umnažanje DNA mora sadržavati još i smjesu četiriju oligonukleotida u jednakom omjeru (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), magnezijeve ione i odgovarajući pufer. Reakcija PCR se odvija u tri faze: faza denaturacije dvolančane DNA u dva jednolančana lanca nakon koje slijedi faza vezivanja početnica s DNA lancem i na kraju faza produljenja DNA lanca. Faze denaturacije, vezivanja početnica i sinteze novog lanca se ponavljaju u ciklusima, pri čemu se bilježi eksponencijalan rast količine umnožene DNA.

Dijelovi DNA s polimorfim mjestima Q192R, L55M, -108C>T (*pon1* gena) i S311C (*pon2* gena) su umnoženi PCR metodom (103-105) uz prilagođen broj i duljinu ciklusa umnažanja, te koncentracije pojedinih reagensa u reakcijskoj smjesi.

Postupak: U ukupnom volumenu smjese za umnožavanje (25 µl) nalazi se 1 µl izdvojene DNA, 2,5 ml reakcijskog pufera za PCR (10x; *Applied Biosystems, SAD*), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM; *Applied Biosystems, SAD*), 2,5 µl deoksinukleotida (dNTP) (10 mM dTTP, dATP, dCTP, dGTP; *Applied Biosystems, SAD*), 2 µl svake početnice (10 nmol/L; *Applied Biosystems, SAD*), 0,1 µl AmpliTaq Gold polimeraze (250 Units; 5 U/µl; *Applied Biosystems, SAD*) i 13 µl ultračiste vode (1 ml Water, PCR Grade; *Roche Diagnostics, GmbH, Germany*).

Umnožavanje izdvojene DNA je učinjeno u uređaju za umnažanje PCR GeneAMP PCR System 2720 (*Applied Biosystems, SAD*) prema slijedećoj shemi: početna denaturacija na 95°C tijekom 12 minuta, 35 ciklusa umnažanja (denaturacija tijekom 30 sekundi na 94°C, nakon čega slijedi vezivanje početnica tijekom 30 sekundi na specifičnoj temperaturi vezivanja, rast lanca DNA tijekom 1 minute na 72°C) i završno istežanje DNA lanca na 72°C tijekom 7 minuta. Nakon umnažanja se PCR produkti ostavljaju najmanje 10 minuta u uređaju za umnažanje na 4°C. Početnice, temperature vezivanja početnica, kao i veličina PCR produkata za svaki polimorfizam su prikazane u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Početnice, temperature vezivanja početnica i veličina PCR produkata za svaki polimorfizam.

Polimorfizam	Početnice	Temperatura vezivanja početnica (°C)	Veličina PCR produkta (pb)
Q192R	For: 5'- TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G- 3' Rew: 5'- CCT GAG AAT CTG AGT AAA TCC ACT- 3'	60	238
L55M	For: 5'- CCT GCA ATA ATA TGA AAC AAC CTG- 3' Rew: 5'- TGA AAG ACT TAA ACT GCC AGT C- 3'	63	172
-108C>T	For: 5'- AGC TAG CTG CCG ACC CGG CGG GGA GGa G- 3' Rew: 5'- GGC TGC AGC CCT CAC CAC AAC C- 3'	69	240
S311C	For: 5'- ACA TGC ATG TAC GGT GGT CTT ATA- 3' Rew: 5'- AGC AAT TCA TAG AAA ATT AAT TGT TA- 3'	55	265

pb = parova baza; malo slovo „a“ u C(-108)T početnici označava uvođenje dodatnog nukleotida zbog kreiranja restriktivskog mjesta za enzim *BsrBI*.

### **Elektroforeza umnoženih dijelova DNA (PCR produkata) na agaroznom gelu**

Načelo metode: Nakon izdvajanja DNA, uspješnost njenog umnažanja lančanom reakcijom polimeraze (PCR) je provjeravana elektroforezom PCR produkata na 2% agaroznom gelu. Elektroforetska pokretljivost fragmenata DNA (PCR produkata) ovisila je o njihovoj veličini i obliku.

Postupak: U Erlenmayerovoj tikvici se uz zagrijavanje otopi 1,2 g agaroze u 60 mL 1x TBE pufera za elektroforezu (100 mL 5x TBE pufera (27 g TRIS, 13,75 g borne kiseline, 10 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0) nadpuniti redestiliranom vodom do 500 mL). Agarozu otopiti i po potrebi ohladiti na približno 50-60°C, dodati 5-7 µl etidij-bromida (500 µg/mL; *Sigma Aldrich*). Uzorci (5 µl PCR produkta) se prije nanošenja na gel razrjeđuju s 2,0 µl pufera za nanošenje (*Gel loading solution, Sigma Aldrich*), kao i DNA marker (*DNA Molecular Marker XIV; 50 µg; Roche Diagnostics, GmbH, Germany*) koji se prethodno razrijedi s 1x TBE puferom u omjeru 1:5.

Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata se vrši u sustavu za elektroforezu uz napajачku jedinicu EPS 150/2000 (*Elchrom Scientific, Cham, Švicarska*) u kadici HE 99X (*Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska*). Svi uzorci se u jažicu stavljaju polako tako da pufer za nanošenje povuče uzorak u jažicu. Elektroforeza se provodi u 1x TBE puferu na sobnoj temperaturi tijekom 35-40 minuta na 120 V i 80 mA. Vizualizacija umnoženih fragmenata se vrši na transluminatoru TFX20-MC (*Vilber Lourmat, Eberhardzell, Njemačka*) pod UV svjetlom uz fotografiranje digitalnom kamerom (*Canon, PowerShot G10, Velika Britanija*)

### **Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP)**

Načelo metode: Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata se zasniva na korištenju restrikcijskog enzima za kidanje dvolančane DNA na mjestu određenom specifičnim oligonukleotidnim slijedom, a radi otkrivanja polimorfizama s promjenom slijeda DNA u jednom nukleotidu (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*). Uvjet korištenja analize RFLP je da SNP dovodi do gubitka postojećeg ili nastanka novog restrikcijskog mjesta za korišteni enzim. Ovisno o nukleotidu u polimorfnom će mjestu doći do kidanja dijela DNA ili će ono izostatati.

Postupak: Svaka restrikcijska smjesa (15 µl) sadržavala je odgovarajući restrikcijski enzim i pufer, te odgovarajuću količinu umnoženog odsječka DNA (PCR produkt) i ultračistu vodu. Restrikcijska smjesa za otkrivanje Q192R polimorfizma (6 µl) je sadržavala 2,0 µl

restriksijskog enzima *Bsp*PI (2 U/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l 10x restriksijskog pufera (330 mmol/L Tris-acetat, pH 7,9, 100 mmol/L magnezij acetat, 660 mmol/L kalij- acetat, 1 mg/mL BSA), 2,5  $\mu$ l ultračiste vode i 9  $\mu$ l PCR produkta. Restriksijska smjesa za otkrivanje L55M polimorfizma (5  $\mu$ l) je sadržavala 1,0  $\mu$ l restriksijskog enzima *Hin*1III (5 U/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l 10x restriksijskog pufera (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5, 100 mmol/L magnezij klorid, 500 mmol/L natrij klorid, 1 mg/mL BSA), 2,5  $\mu$ l ultračiste vode i 10  $\mu$ l PCR produkta. Restriksijska smjesa za otkrivanje -108C>T polimorfizma (6  $\mu$ l) je sadržavala 0,3  $\mu$ l restriksijskog enzima *Bsr*BI (10 U/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l 10x restriksijskog pufera (330 mmol/L Tris- acetat, pH 7,9, 100 mmol/L magnezij acetat, 660 mmol/L kalij acetat, 1 mg/mL BSA), 4,2  $\mu$ l ultračiste vode i 9  $\mu$ l PCR produkta. Restriksijska smjesa za otkrivanje S311C polimorfizma (5  $\mu$ l) je sadržavala 0,3  $\mu$ l restriksijskog enzima *Dde* I (10 U/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l 10x restriksijskog pufera (500 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L magnezij klorida, 1 mol/L natrij klorid), 3,2  $\mu$ l ultračiste vode i 10  $\mu$ l PCR produkta. Restriksijske smjese su se inkubirale tijekom noći na odgovarajućim temperaturama (na 37°C za otkrivanje L55M, -108C>T i S311C polimorfizama, odnosno na 55°C za otkrivanje Q192R polimorfizma). U tablici 3.2 su navedeni korišteni restriksijski enzimi i veličina fragmenata (veličina RFLP produkata) za svaki polimorfizam.

### **Elektroforeza RFLP produkata**

Načelo metode: Genotip, kao i prisutnost polimorfizma nakon cijepanja PCR produkata restriksijskim enzimima je otkrivan elektroforezom na 4% agaroznom gelu temeljem različite veličine i broja razdvojenih fragmenata. Vizualizacija razdvojenih fragmenata je učinjena na transiluminatoru TFX20-MC (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Njemačka) pod UV svjetlom uz fotografiranje digitalnom kamerom (*Canon, PowerShot G10, Velika Britanija*). Temeljem veličine (u parovima baza; pb) i broja fragmenata dobivenih cijepanjem restriksijskim enzimima i njihovog razdvajanja nakon elektroforeze na 4% agaroznom gelu dokazivano je prisustvo polimorfizma i genotip (tablica 3.2)

Postupak: U Erlenmayerovoj tikvici se uz zagrijavanje otopi 2,4 g agaroze u 60 mL 1x TBE pufera za elektroforezu (100 mL 5x TBE pufera (27 g TRIS, 13,75 g borne kiseline, 10 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0) nadpuniti Re-vodom do 500 mL). Agarozu otopiti i po potrebi ohladiti na približno 50-60°C, dodati 5-7  $\mu$ l etidij-bromida (500  $\mu$ g/mL; *Sigma Aldrich*). Uzorci (15  $\mu$ l RFLP produkta) se prije nanošenja na gel razrjeđuju s 2,0  $\mu$ l pufera za nanošenje (*Gel loading solution, Sigma Aldrich*), kao i DNA marker (*DNA Molecular Marker XIV; 50  $\mu$ g; Roche Diagnostics, GmbH, Germany*) koji se prethodno razrijedi s 1x TBE

puferom u omjeru 1:5.

Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata se vrši u sustavu za elektroforezu uz napajачku jedinicu EPS 150/2000 (*Elchrom Scientific, Cham, Švicarska*) u kadici HE 99X (*Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska*). Svi uzorci se u jažicu stavljaju polako tako da pufer za nanošenje povuče uzorak u jažicu. Elektroforeza se provodi u 1x TBE puferu na sobnoj temperaturi tijekom 65-70 minuta na 120 V i 80 mA. Vizualizacija razdvojenih fragmenata se vrši na transiluminatoru pod UV svjetlom uz fotografiranje digitalnom kamerom (*Canon, PowerShot G10, Velika Britanija*).

Tablica 3.2. Korišteni restrikcijski enzimi, veličina fragmenata i genotipovi za svaki polimorfizam.

Polimorfizam	Restrikcijski enzim	veličine fragmenata RFLP produkata ( pb)	Veličine fragmenata ( pb) na 4% agaroznom gelu	genotip
Q192R	<i>Bsp</i> PI	Q alel: 238 pb	238	QQ
		R alel: 175 i 63 pb	238 , 175 i 63	QR
			175 i 63	RR
L55M	<i>Hin</i> 1II	L alel: 172 pb	172 pb	LL
		M alel: 103 i 69 pb	172, 103 i 69	LM
			103 i 69	MM
C(-108)T	<i>Bsr</i> BI	C alel: 121 i 28 pb	212 i 28	CC
		T alel: 240 pb	240, 212 i 28	CT
			240	TT
S311C	<i>Dde</i> I	S alel: 123, 75 i 67 pb	123, 75 i 67	SS
		C alel: 142 i 123 pb	142, 123, 75 i 67	SC
			142 i 123	CC

*pb* = parova baza

### 3.3.6 Određivanje koncentracije VEGF u serumu

Za određivanje koncentracije VEGF-a korišten je komercijalno dostupni imunoenzimski test (engl. enzyme immunoassay, ELISA) Quantikine, Human VEGF Immunoassay, DVE00, proizvođača R&D Systems, Minneapolis, SAD.

Načelo metode: Test koristi kvantitativnu sendvič enzim imunokemijsku metodu. Standardi i uzorci pipetiraju se u jažice na mikrotitarskoj ploči i VEGF prisutan u uzorku veže se s imobiliziranim monoklonalnim anti VEGF protutijelima. Nakon ispiranja nevezanih supstanci dodaje se konjugat koji sadrži specifično poliklonalno protutijelo na VEGF na koje je vezan enzim peroksidaza. Nakon inkubacije sav nevezani konjugat se ispere i u jažice se doda otopina supstrata potrebnog za razvijanje boje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji VEGF u uzorku. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine, a intenzitet nastale boje mjeri se na 450 nm. Koncentracija VEGF-a u uzorku izračuna se iz kalibracijske krivulje.

Kit je sadržavao:

- polistirensku mikroploču (Part 890218) s 96 jažica presvučenih mišjim monoklonalnim anti VEGF protutijelom;
- VEGF konjugate (Part 890219) - 21 mL poliklonalnog protutijela na VEGF konjugiranog peroksidazom u prisutstvu konzervansa;
- VEGF standard (Part 890220) - liofilizirani rekombinantni humani VEGF165 u puferiranoj proteinskoj bazi uz dodatak konzervansa (3 bočice, 2000 pg/po bočici);
- Diluent RD1W (Part 895117) - 11 mL puferirane proteinske baze s konzervansima;
- Kalibrator Diluent RD5K za uzorke supernatanta staničnih kultura (Part 895119) - 21 mL puferirane proteinske baze s konzervansima
- Kalibrator Diluent RD6U za uzorke seruma/plazme (Part 895148) - 21 mL životinjskog seruma s konzervansima;
- Wash Buffer concentrate (Part 895003) - 21 mL, 25x koncentrirane otopine za ispiranje puferiranog surfaktanta s konzervansima;
- Kolor Reagens A (Part 895000) - 12.5 mL stabiliziranog hidrogen peroksida;
- Kolor Reagens B (Part 895001) - 12.5 mL stabiliziranog kromogena, tetrametilbenzidina (TMB);



- Stop otopinu (Part 895032) - 6 mL 2 N sulfatna kiselina i
- Prijanjajuće pokrivače za mikrotitarsku ploču (4 komada).

Postupak:

Priprema uzoraka i standarda:

1. Alikvoti seruma ispitanika s perifernim arterijskom bolesti i kontrolne skupine odmrznuti su i dobro homogenizirani.
2. Liofilizirani standard otopljen je u 1,0 ml kalibrator diluenta RD6U, koristeći umjerenu volumetrijsku pipetu. Sadržaj je promješan laganim okretanjem i ostavljen stajati kroz 15 minuta. Standard je promješan laganim kružnim okretanjem neposredno prije izrade razrijeđenja za kalibracijsku krivulju. Serijom razrijeđenja matičnog VEGF standarda koncentracije 2000 ng/L i kalibrator diluenta RD6U u polipropilenskim epruvetama načinjeni su radni standardi za kalibracijsku krivulju slijedećih koncentracija: 0 ng/L (kalibrator diluent RD6U); 32,2 ng/L, 62,5 ng/L, 125 ng/L, 250 ng/L, 500 ng/L i 1000 ng/L.

Priprema reagensa:

1. Mikrotitarska ploča ostavljena je prije uporabe 30 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Koncentrirana otopina za ispiranje (20 ml) razrijeđena je s destiliranom vodom (480 ml) da bi se dobilo 500 ml razrijeđenog radnog pufera za ispiranje.
3. Otopina supstrata priređena je neposredno prije završetka druge inkubacije mješajući stabiliziran vodikov peroksid (reagens A) i stabiliziran kromogen tetrametilbenzidine (reagens B) u jednakom omjerima. Otopina supstrata upotrebljena je unutar 15 minuta od pripreme.

Postupak: U svaku jažicu pipetirano je 100 µl Diluenta RD1W, zatim 100 µl standarda ili uzoraka. Mikrotitarska ploča pokrivena je folijom i inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 3 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl konjugata, poliklonalnog protutijela na VEGF konjugiranog peroksidazom u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča ponovno inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 3 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl otopine supstrata u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča inkubirana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla 25 minuta uz miješanje. Zatim je dodano redom u svaku jažicu 50 µl

stop otopine. Apsorbancija mikrotitarske ploče izmjerena je unutar 30 minuta na 450 nm koristeći uređaj Stat Fax®2100, Microplate reader, spektrofotometar, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, SAD.

Koncentracije VEGF-a u uzorcima očitane su direktno iz kalibracijske krivulje u 7 točaka u mjernom području od 0 do 2000 ng/L. Preciznost u seriji i preciznost između serija određivanja prema proizvođaču iznosila je do 6,7% odnosno 8,8%. Osjetljivost određivanja iznosila je 9 ng/L. Test je specifičan za prirodni i humani rekombinantni VEGF. Nađena je križna reaktivnost sa VEGFR1 i VEGFR2 u koncentracijama iznad 500 ng/L, odnosno 2000 ng/L.

### **3.3.7. Određivanje koncentracije Angiopoietina-2 u serumu**

Za određivanje koncentracije Ang-2 korišten je komercijalno dostupni imunoenzimski test (engl. *enzyme immunoassay*, *ELISA*) Quantikine, Human Angiopoietin-2 Immunoassay DANG20, proizvođača R&D Systems, Minneapolis, SAD.

Načelo metode: Test koristi kvantitativnu sendvič enzim imunokemijsku metodu. Standard i uzorci pipetiraju se u jažice na mikrotitarskoj ploči i Ang-2 prisutan u uzorku veže se s imobiliziranim protutijelima na mikrotitarskoj ploči. Nakon ispiranja nevezanih supstanci dodaje se konjugat koji sadrži specifično monoklonalno protutijelo na koje je vezan enzim peroksidaza. Sav nevezani konjugat se ispere i u jažice se doda otopina supstrata potrebnog za razvijanje. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine, a intenzitet nastale boje mjeri se na 450 nm. Koncentracija Ang-2 u uzorku izračuna se iz kalibracijske krivulje.

Kit je sadržavao:

- polistirensku mikroploču (Part 892359) s 96 jažica presvučenih mišjim monoklonalnim anti Ang-2 protutijelom;
- Ang-2 konjugate (Part 892360) - 21 ml mišjeg monoklonalnog protutijela na Ang-2 konjugiranog peroksidazom u prisutstvu konzervansa;
- Ang-2 standard (Part 892361) - liofilizirani rekombinantni humani Ang-2 u puferiranoj proteinskoj bazi uz dodatak konzervansa (3 bočice, 30 ng/po bočici);
- Diluent RD1-76 (Part 895812) - 11 mL puferirane proteinske baze s konzervansima;

- Kalibrator Diluent RD5-5 (Part 895485) - 21 mL puferirane proteinske baze s konzervansima
- Wash Buffer concentrate (Part 895003) - 21 mL, 25x koncentrirane otopine za ispiranje puferiranog surfaktanta s konzervansima;
- Kolor Reagens A (Part 895000) - 12.5 mL stabiliziranog hidrogen peroksida;
- Kolor Reagens B (Part 895001) - 12.5 mL stabiliziranog kromogena TMB-a;
- Stop otopinu (Part 895032) - 6 mL 2 N sulfatna kiselina i
- Prijanjajuće pokrivače za mikrotitarsku ploču (4 komada).

Postupak:

Priprema uzoraka i standarda:

1. Alikvoti seruma ispitanika s perifernim arterijskom bolesti i kontrolne skupine odmrznuti su i dobro homogenizirani. Prije rada uzorci seruma razrijeđeni su u polipropilenskim epruветama s kalibrator diluentom RD5-5 u omjeru 1:5: 50 µl seruma i 200 µl diluenta RD5-5.
2. Liofilizirani standard otopljen je u 1,0 ml destilirane vode, koristeći umjerenu volumetrijsku pipetu. Sadržaj je promješан laganim okretanjem i ostavljen stajati kroz 15 minuta. Standard je promješан laganim kružnim okretanjem neposredno prije izrade razrijeđenja za kalibracijsku krivulju. Matični standard Ang-2 koncentracije 30 000 ng/L razrijedi se s kalibrator diluentom RD5-5 u omjeru 1:10, da se dobije radni standard koncentracije 3 000 ng/L, koji ujedno predstavlja najveću koncentraciju za izradu kalibracijske krivulje. Serijom razrijeđenja radnog standarda Ang-2 koncentracije 3 000 ng/L i kalibrator diluenta RD5-5 u polipropilenskim epruветama načinjene su radni standardi za kalibracijsku krivulju slijedećih koncentracija: 0 ng/L (kalibrator diluent RD5-5); 46,9 ng/L, 93,7 ng/L, 187,5 ng/L, 375 ng/L, 750 ng/L i 1500 ng/L.

Priprema reagensa:

1. Mikrotitarska ploča ostavljena je prije uporabe 30 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Koncentrirana otopina za ispiranje (20 ml) razrijeđena je s destiliranom vodom (480 ml) da bi se dobilo 500 ml razrijeđenog radnog pufera za ispiranje.
3. Otopina supstrata priređena je neposredno prije završetka druge inkubacije mješajući stabiliziran vodikov peroksid (reagens A) i stabiliziran kromogen tetrametilbenzidine

(reagens B) u jednakim omjerima. Otopina supstrata upotrebljena je unutar 15 minuta od pripreme.

Postupak: U svaku jažicu pipetirano je 100 µl Diluenta RD1-76, zatim 50 µl standarda ili razrijeđenih uzoraka. Mikrotitarska ploča pokrivena je folijom i inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 4 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl konjugata, mišjeg monoklalnog protutijela na Ang-2 konjugiranog peroksidazom u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča ponovno inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 4 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl otopine supstrata u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča inkubirana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla 30 minuta uz miješanje. Zatim je dodano redom u svaku jažicu 50 µl stop otopine. Apsorbancija mikrotitarske ploče izmjerena je unutar 30 minuta na 450 nm koristeći uređaj Stat Fax<sup>®</sup>2100, Microplate reader, spektrofotometar, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, SAD.

Koncentracije Ang-2-a u uzorcima očitane su direktno iz kalibracijske krivulje u 7 točaka u mjernom području od 0 do 3000 ng/L. Dobiveni rezultati pomnoženi su sa faktorom dilucije seruma. Preciznost u seriji i preciznost između serija određivanja prema proizvođaču iznosila je do 6,9% odnosno 10,4%. Osjetljivost određivanja iznosila je 8,3 ng/L. Test je specifičan za prirodni i humani rekombinantni Ang-2, nema križne reaktivnosti.

### **3.2.8 Određivanje koncentracije Tie-2 receptora u serumu**

Za određivanje koncentracije Tie-2 receptora korišten je komercijalno dostupni imunoenzimski test (*engl. enzyme immunoassay, ELISA*) Quantikine, Human Tie-2 Immunoassay DTE200, proizvođača R&D Systems, Minneapolis, SAD.

Načelo metode: Test koristi kvantitativnu sendvič enzim imunokemijsku metodu. Standard i uzorci pipetiraju se u jažice na mikrotitarskoj ploči i Tie-2 prisutan u uzorku veže se s imobiliziranim mišjim monoklonskim protutijelima na Tie-2. Nakon ispiranja nevezanih supstanci dodaje se konjugat koji sadrži specifično mišje monoklonsko protutijelo na koje je vezan enzim peroksidaza. Sav nevezani konjugat se ispere i u jažice se doda otopina supstrata potrebnog za razvijanje boje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji Tie-2 u uzorku. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine, a intenzitet nastale boje mjeri se na 450 nm.

Koncentracija Tie-2 u uzorku očita se iz kalibracijske krivulje.

Kit je sadržavao:

- polistirensku mikroploču (Part 892400) s 96 jažica presvučenih mišjim monoklonalnim anti Tie-2 protutijelom;
- Humani Tie-2 konjugate (Part 892401) - 21 ml mišjeg monoklonalnog protutijela na Tie-2 konjugiranog peroksidazom u prisutstvu konzervansa;
- Humani Tie-2 standard (Part 892402) - liofilizirani rekombinantni humani Tie-2 u puferiranoj proteinskoj bazi uz dodatak konzervansa (3 bočice, 100 ng/po bočici);
- Diluent RD1W (Part 895117) - 11 mL puferirane proteinske baze s konzervansima;
- Kalibrator Diluent RD5P (Part 895151) - 21 mL puferirane proteinske baze s konzervansima
- Wash Buffer concentrate (Part 895003) - 21 mL, 25x koncentrirane otopine za ispiranje puferiranog surfaktanta s konzervansima;
- Kolor Reagens A (Part 895000) - 12.5 mL stabiliziranog hidrogen peroksida;
- Kolor Reagens B (Part 895001) - 12.5 mL stabiliziranog kromogena TMB-a;
- Stop otopinu (Part 895032) - 6 mL 2 N sulfatna kiselina i
- Prijanjajuće pokrivače za mikrotitarsku ploču (4 komada).

Postupak:

Priprema uzoraka i standarda:

1. Alikvoti seruma ispitanika s perifernim arterijskom bolesti i kontrolne skupine odmrznuti su i dobro homogenizirani. Prije rada uzorci seruma razrijeđeni su u polipropilenskim epruветama s kalibrator diluentom RD5P u omjeru 1:10: 25  $\mu$ l seruma i 225  $\mu$ l diluenta RD5P.
2. Liofilizirani standard otopljen je u 1,0 ml destilirane vode, koristeći umjerenu volumetrijsku pipetu. Sadržaj je promješšan laganim okretanjem i ostavljen stajati kroz 15 minuta. Standard je promješšan laganim kružnim okretanjem neposredno prije izrade razrijeđenja za kalibracijsku krivulju. Matični standard Tie-2 koncentracije 100  $\mu$ g/L razrijeđi se s kalibrator diluentom RD5P u omjeru 1:10, da se dobije radni standard koncentracije 10  $\mu$ g/L, koji ujedno predstavlja najveću koncentraciju za izradu kalibracijske krivulje. Serijom razrijeđenja radnog standarda Tie-2

koncentracije 10 µg/L i kalibrator diluenta RD5P u polipropilenskim epruvetama načinjene su radni standardi za kalibracijsku krivulju slijedećih koncentracija: 0 ng/L (kalibrator diluent RD5P); 0,156 µg/L, 0,313 µg/L, 0,625 µg/L, 1,25 µg/L, 2,5 µg/L i 5 µg/L

Priprema reagensa:

1. Mikrotitarska ploča ostavljena je prije uporabe 30 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Koncentrirana otopina za ispiranje (20 ml) razrijeđena je s destiliranom vodom (480 ml) da bi se dobilo 500 ml razrijeđenog radnog pufera za ispiranje.
3. Otopina supstrata priređena je neposredno prije završetka druge inkubacije mješajući stabiliziran vodikov peroksid (reagens A) i stabiliziran kromogen tetrametilbenzidine (reagens B) u jednakom omjerima. Otopina supstrata upotrebljena je unutar 15 minuta od pripreme.

Postupak: U svaku jažicu pipetirano je 100 µl Diluenta RD1W, zatim 100 µl standarda ili razrijeđenih uzoraka. Mikrotitarska ploča pokrivena je folijom i inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 4 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl konjugata, mišjeg monoklalnog protutijela na Tie-2 konjugiranog peroksidazom u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča ponovno inkubirana na sobnoj temperaturi 2 sata uz miješanje. Nakon toga mikrotitarska ploča je ispražnjena od sadržaja i isprana 4 puta s otopinom za ispiranje. Dodano je 200 µl otopine supstrata u svaku jažicu te je pokrivena mikrotitarska ploča inkubirana na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetla 30 minuta uz miješanje. Zatim je dodano redom u svaku jažicu 50 µl stop otopine. Apsorbancija mikrotitarske ploče izmjerena je unutar 30 minuta na 450 nm koristeći uređaj Stat Fax®2100, Microplate reader, spektrofotometar, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, SAD.

Koncentracije Tie-2-a u uzorcima očitane su direktno iz kalibracijske krivulje u 7 točaka u mjernom području od 0 do 10 µg/L. Dobiveni rezultati pomnoženi su sa faktorom dilucije seruma. Preciznost u seriji i preciznost između serija određivanja prema proizvođaču iznosila je do 5,0% odnosno 8,3%. Osjetljivost određivanja iznosila je 0,014 µg/L. Test je specifičan za prirodni i humani rekombinantni Tie-2, nema križne reaktivnosti.

### 3.2.9 Statistička analiza podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću SPSS statističkog programa, verzija 13 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Upotrebom Kolmogorov-Smirovljevog testa testirana je normalnost distribucije podataka. Rezultati su prikazani parametrima deskriptivne statistike: izmjerene vrijednosti kvantitativnih varijabli su prikazane aritmetičkim sredinama i standardnim devijacijama, medijanima, te interkvartilnim rasponom između prvog i trećeg kvartila. Vrijednosti kvalitativnih varijabli su prikazane apsolutnim i relativnim frekvencijama.

Za određivanje statistički značajnih razlika između skupina korišten je parametrijski Studentov t-test ili neparametrijski testovi Mann Whitneyev test ili Kruskal Wallisov test. Korelacija između pojedinih varijabli utvrđena je pomoću Spearmanovog ili Pearsonovog koeficijenta korelacije ovisno o normalnosti razdiobe podataka. Raspodjela vrijednosti kvalitativnih varijabli između skupina testirana je  $X^2$  testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Rezultati su tumačeni uz najvišu prihvatljivu razinu značajnosti  $P=0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1 ISPITANICI

Osnovne demografske, biometrijske, metaboličke i terapijske značajke ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolne skupine prikazane su u tablici 4.1.1.

Tablica 4.1.1. Osnovne demografske značajke ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolne skupine.

Varijable	Ispitanici (n=110)	Kontrolna skupina (n=118)	P
Dob (godine), srednja vrijednost ± standardna devijacija	64,33 ± 9,79	59,11 ± 7,31	P<0,001
Muški spol, n (%)	91 (83%)	57 (48%)	P<0,001
Indeks tjelesne mase (kg/m <sup>2</sup> ), srednja vrijednost ± standardna devijacija	26,63 ± 4,04	26,51 ± 3,08	P = 0,795
Sistolički krvni tlak >140 mm Hg, n(%)	74 (67%)	0	P<0,001
Dijastolički krvni tlak >90 mm Hg, n (%)	30 (27%)	0	P<0,001
Dijabetes, n (%)	39 (35%)	0	P<0,001
Pušenje, >10 cigareta na dan, n (%)	49 (45%)	13 (11%)	P<0,001
Menopauza, n (% žena)	16 (84%)	45 (74%)	P = 0,532
Terapija lipoliticima, n (%)	64 (58%)	0	P<0,001
Terapija antihipertenzivima, n (%)	69 (63%)	0	P<0,001
Hormonska nadomjesna terapija, n (%)	0	0	-
Anamnestički simptomi cerebrovaskularne bolesti, n (%)	11 (10%)	0	P<0,001
Auskultatorni nalaz stenoze karotidnih arterija, n (%)	5 (5%)	0	P<0,001
Podaci o simptomima koronarne insuficijencije, n (%)	26 (24%)	0	P<0,001
Nalaz EKG-a (zadnjih godinu dana) ukazuje na koronarnu bolest, n (%)	21 (19%)	0	P<0,001



Skupina ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolna skupina statistički se značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ) prema dobi, spolu, prisustvu hipertenzije, dijabetesa, uživanju duhana, terapiji lipoliticima i antihipertenzivima, te prisutnim simptomima cerebrovaskularne i koronarne bolesti.

Kliničke i dijagnostičke značajke ispitanika prikazane su u tablicama 4.1.2 do 4.1.4. Kod svih ispitanika dijagnoza periferne arterijske bolesti potvrđena je klinički i angiografski. Najčešće se radilo o okluziji (49 bolesnika) ili stenozama (10 bolesnika) nadkoljениčnih arterija, zatim o okluziji (15 bolesnika) ili stenozama (12 bolesnika) zdjeličnih arterija. Okluzije potkoljениčnih arterija imalo je 6 bolesnika, dijagnozu kritične ishemije ekstremiteta imalo je 5 bolesnika, isto kao i dijagnozu ishemije stopala (5 bolesnika). Ostale dijagnoze bile su ateroskleroza, Burgerova bolest, Ciste regije ingvinalis, stenozama potkoljениčnih arterija i stenozama nakon premosnice (tablica 4.1.2.).

Tablica 4.1.2. Kliničke dijagnoze ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Kliničke dijagnoze	Ispitanici, n
Okluzija AFS	47
Okluzija AI/AIC/AIE	16
Stenoza AI/AIC/AIE	12
Stenoza AFS	9
kritična ishemija ekstremiteta (CLI)	5
ishemija stopala	5
Okluzija AP	3
Okluzija AFC	2
Okluzija ATA/ATA i ATP	3
Okluzija bikurkacije	1
Stenoza AF	1
Stenoza AFP	1
ciste regije ingvinalis bilateralis	1
Stenoza ATA	1
Stenoza nakon premosnice	1
ateroskleroza	1
Burgerova bolest	1

Metodom digitalne suptrakcijske angiografije precizno je određen stupanj i lokalizacija ateroskleroze perifernih arterija: terminalne aorte, zdjeličnih arterija, natkoljениčnih i potkoljениčnih arterija.

Temeljem nalaza angiografije i kriterija hemodinamske značajnosti stenozama ispitanici su podjeljeni u aortoilijski tip, femoropopljetalni tip i kombinirani tip (tablica 4.1.3.).

Prema angiografskim kriterijima hemodinamske značajnosti stenoza ispitanici su podjeljeni u dvije skupine:

- stenoze: ispitanici sa 51-99% stenoze jedne ili više perifernih arterija
- okluzije: ispitanici s okluzijom jedne ili više perifernih arterija (tablica 4.1.4.).

Tablica 4.1.3. Lokalizacija stenotično/okluzivnih promjena kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Lokalizacija stenotično-okluzivnih promjena	Ispitanici, n (%)
aortoilijačni tip	7 (7 %)
femoropoplitealni tip	41 (37%)
kombinirani (aortoilijačni i femoropoplitealni ) tip	62 (56 %)

Tablica 4.1.4. Podjela ispitanika s perifernom arterijskom bolesti prema angiografskim kriterijima hemodinamske značajnosti stenoze

Angiografski kriteriji hemodinamske značajnosti stenoze	Ispitanici, n (%)
1-49% stenoze perifernih arterija	0 (0%)
50-99% stenoze perifernih arterija	6 (5%)
okluzija perifernih arterija	104 (95%)

U većine ispitanika nađene su multiple stenoze i/ili okluzije nerjetko na više arterija. Zbog nađenog različitog stupnja, lokalizacije i rasporeda stenotično/okluzivnih lezija naknadnom analizom angiografskih slika za svakog ispitanika određen je angiografski "Merkur" *score*, kao jedinstvena mjera anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena. Vrijednost medijana *scora* kod naših ispitanika bila je 11 (raspon 2-30), što predstavlja 17% od maksimalno moguće vrijednosti, koja iznosi 63.

Utvrđena je statistički značajna korelacija angiografskog *scora* s dobi ( $r= 0,334$ ;  $P<0,001$ ), pri je čemu je starija životna dob bila povezana s većim *scorom*. Muškarci su imali veći *score* u odnosu na žene ( $12,31 \pm 6,06$  u odnosu na  $10,53 \pm 5,98$ ), ali ta razlika nije bila statistički značajna ( $P=0,245$ ). Ispitanici sa šećernom bolesti imali su statistički značajno veći *score* u odnosu na ispitanike bez šećerne bolesti ( $13,77 \pm 6,67$  u odnosu na  $11,02 \pm 5,50$ ;  $P= 0,023$ ).

## 4.2 LIPIDNI STATUS I CRP

### 4.2.1 Lipidni status i CRP u serumu ispitanika i kontrolne skupine

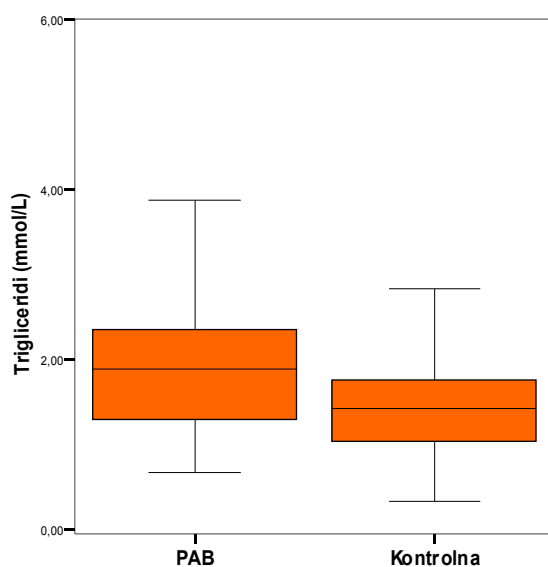
U serumu ispitanika i kontrolne skupine određeni su pokazatelji lipidnog statusa: trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL kolesterol, indeks ateroskleroze (LDL kolesterol/HDL kolesterol), omjer ukupnog i HDL-kolesterola, te CRP, kao nespecifični biljeg upale i čimbenik kardiovaskularnog rizika (tablica 4.2.1., slike 4.2.1.1.-4.2.1.6.).

Tablica 4.2.1. Koncentracije triglicerida, kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i CRP-a u serumu ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini

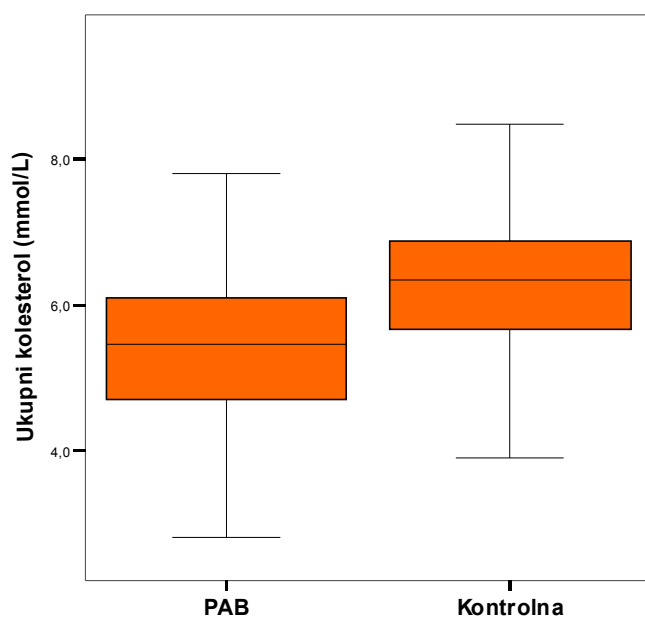
Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici (n=110)	Kontrolna skupina (n=118)	P
Trigliceridi (mmol/L)	1,89 (1,30-2,36)	1,42 (1,03-1,76)	<0,001
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,45 (4,68-6,10)	6,35 (5,66-6,89)	<0,001
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,10 (0,98-1,30)	1,60 (1,39-1,81)	<0,001
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,30 (2,70-3,90)	3,96 (3,40-4,55)	<0,001
Indeks ateroskleroze	2,95 (2,20-3,70)	2,60 (1,90-3,10)	0,004
Ukupni kol./HDL kol.	4,70 (3,78-5,80)	4,05 (3,20-4,70)	<0,001
CRP (mg/L)	3,70 (1,78-7,40)	1,40 (0,60-2,43)	<0,001

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

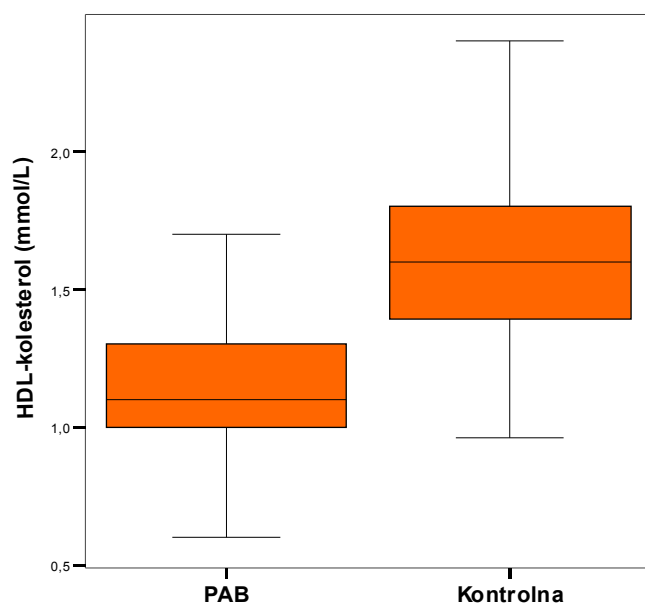
Koncentracije triglicerida bile su statistički značajno više (slika 4.2.1.1.), a koncentracije ukupnog kolesterola (slika 4.2.1.2.), HDL-kolesterola (slika 4.2.1.3.) i LDL-kolesterola (slika 4.2.1.4.) značajno niže u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. U ispitanika s perifernom arterijskom bolesti nađene su statistički značajno više vrijednosti indeksa ateroskleroze (slika 4.2.1.5.), kao i omjera ukupnog i HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 4.2.1.6.).



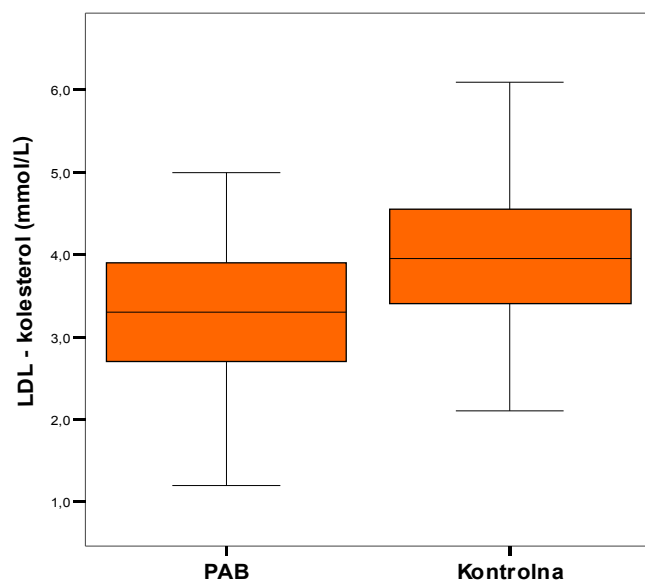
Slika 4.2.1.1. Grafički prikaz koncentracija triglicerida kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



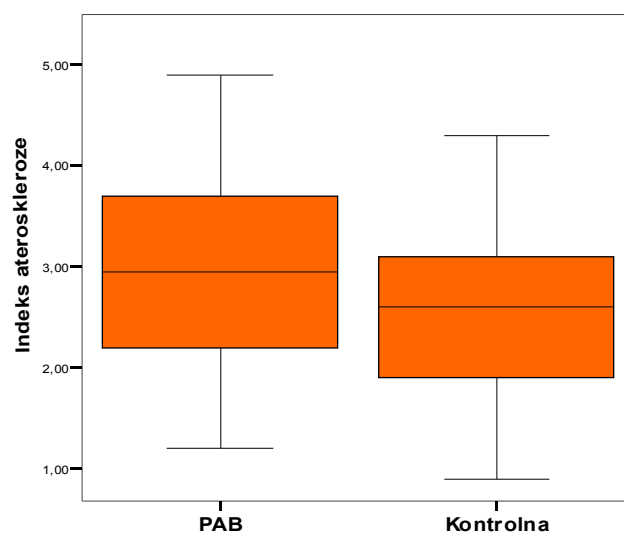
Slika 4.2.1.2. Grafički prikaz koncentracija ukupnog kolesterola kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



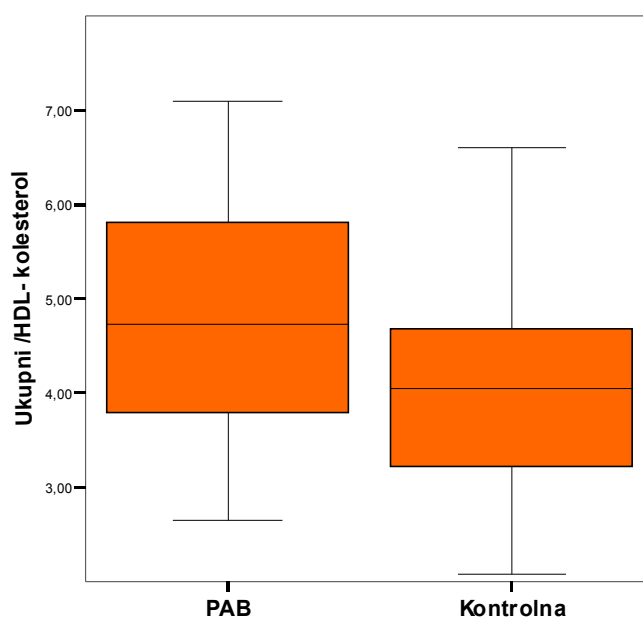
Slika 4.2.1.3. Grafički prikaz koncentracija HDL-kolesterola kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.2.1.4. Grafički prikaz koncentracija LDL-kolesterola kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.2.1.5. Grafički prikaz indeksa ateroskleroze kod ispitanika s perifernom arterijskom bolešću (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.2.1.6. Grafički prikaz omjera ukupnog i HDL-kolesterola kod ispitanika s perifernom arterijskom bolešću (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).

#### 4.2.2 Povezanost dobi i spola s pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om

Da bi ispitali povezanost dobi i biokemijskih parametara, napravili smo korelaciju s dobi, pri čemu je korišten Spearman-ov koeficijent korelacije. Za testiranje razlika između muških i ženskih ispitanika korišten je Mann-Whitney test (tablice 4.2.2.1.-4.2.2.3.).

Tablica 4.2.2.1. Korelacija koncentracija triglicerida, ukupnog, HDL-, LDL-kolesterola i CRP-a sa dobi ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolne skupine.

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici (n=110)		Kontrolna skupina (n=118)	
	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	-0,21	0,028	-0,17	0,066
Ukupni kolesterol (mmol/L)	-0,15	0,122	-0,11	0,241
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,08	0,418	0,16	0,080
LDL-kolesterol (mmol/L)	-0,07	0,455	-0,07	0,454
CRP (mg/L)	0,11	0,259	0,24	0,008

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.2.2.2. Koncentracije pokazatelja lipidnog statusa i CRP-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti muškog i ženskog spola

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici		P
	Muškarci (n=91)	Žene (n=19)	
Trigliceridi (mmol/L)	1,82 (1,27-2,29)	1,06 (1,46-2,94)	0,239
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,30 (4,60-6,00)	5,90 (4,70-6,60)	0,072
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,10 (0,90-1,30)	1,20 (1,00-1,30)	0,456
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,20 (2,70-3,90)	3,80 (2,90-4,20)	0,108
Indeks ateroskleroze	2,90 (2,20-3,70)	3,10 (2,60-3,80)	0,336
Ukupni kol./HDL kol.	4,70 (3,70-5,80)	5,30 (4,20-5,80)	0,359
CRP (mg/L)	3,70 (1,90-6,50)	6,70 (1,60-11,80)	0,311

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.2.2.3. Koncentracije pokazatelja lipidnog statusa i CRP-a u kontrolnoj skupini ispitanika muškog i ženskog spola

Biokemijski parametar (jedinica)	Kontrolna skupina		P
	Muškarci (n=57)	Žene (n=61)	
Trigliceridi (mmol/L)	1,46 (1,15-1,95)	1,39 (1,00-1,74)	0,307
Ukupni kolesterol (mmol/L)	6,10 (5,46-6,70)	6,50 (6,07-7,20)	0,009
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,41 (1,27-1,61)	1,71 (1,53-1,90)	<0,001
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,80 (3,31--4,30)	4,29 (3,55-4,64)	0,026
Indeks ateroskleroze	2,70 (2,10-3,25)	2,60 (1,90-3,10)	0,228
Ukupni kol./HDL kol.	4,20 (3,55-4,95)	3,90 (3,00-4,50)	0,050
CRP(mg/L)	1,30 (0,60-2,25)	1,60 (0,50-2,95)	0,383

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Nije nađena povezanost dobi s koncentracijama triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i CRP-a u ispitanika i kontrolnoj skupini (tablica 4.2.2.1.).

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, indeksa ateroskleroze, omjera ukupnog kolesterola prema HDL-kolesterolu i CRP-a ne razlikuju se između ispitanika muškog i ženskog spola u skupini bolesnika s perifernom arterijskom bolesti (tablica 4.2.2.2.). U kontrolnoj skupini žene su imale značajno više koncentracije ukupnog kolesterola ( $P=0,009$ ), HDL-kolesterola ( $P<0,001$ ) i LDL-kolesterola ( $P=0,026$ ) u odnosu na muškarce (tablica 4.2.2.3.).

#### **4.2.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti**

Povezanost čimbenika rizika, pušenja i dijabetesa, te terapije lipoliticima i antihipertenzivima sa pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti prikazan je u tablici 4.2.3.1. Za testiranje razlika između pušača i nepušača, dijabetičara i nedijabetičara, te ispitanika na terapiji lipoliticima ili antihipertenzivima u odnosu na bolesnike bez terapije korišten je Mann-Whitney test.



Tablica 4.2.3.1. Povezanost čimbenika rizika i terapije sa pokazateljima lipidnog statusa i CRP-om u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Biokemijski parametar (jedinica)	Čimbenici rizika		Terapija	
	Pušenje	Dijabetes	Lipolitici	Antihipertenzivi
	P	P	P	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,759	0,266	0,417	0,638
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,680	0,348	0,001	0,307
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,263	0,068	0,046	0,569
LDL-kolesterol (mmol/L)	0,734	0,383	0,001	0,524
CRP (mg/L)	0,268	0,038	0,111	0,118

Mann-Whitney test

Značajna razlika u koncentracijama ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola nađena je između ispitanika na terapiji i bez terapije lipoliticima, pri čemu su bolesnici na terapiji lipoliticima imali statistički značajno niže koncentracije navedenih biokemijskih parametara (tablica 4.2.3.2). Značajna razlika u koncentracijama CRP-a, nađena je između bolesnika s dijabetesom i bolesnika bez dijabetesa ( $P=0,038$ ), pri čemu su bolesnici s dijabetesom imali statistički značajno više koncentracije CPR-a (tablica 4.2.3.3).

Tablica 4.2.3.2. Koncentracije ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola u ispitanika sa i bez terapije lipoliticima

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici uz terapiju lipoliticima	Ispitanici bez terapije lipoliticima	P
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,80 (4,30-5,70)	5,60 (5,10-6,20)	0,001
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,05 (0,90-1,20)	1,10 (1,10-1,20)	0,046
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,85 (2,40-3,50)	3,60 (2,95-4,15)	0,001

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.2.3.3. Koncentracije C-reaktivnog proteina u ispitanika sa i bez dijabetesa

Biokemijski parametar	Ispitanici sa dijabetesom	Ispitanici bez dijabetesa	P
CRP (mg/L)	5,20 (2,18-11,10)	3,20 (1,73-5,98)	P = 0,038

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

#### 4.2.4 Koncentracija CRP-a kao čimbenik kardiovaskularnog rizika

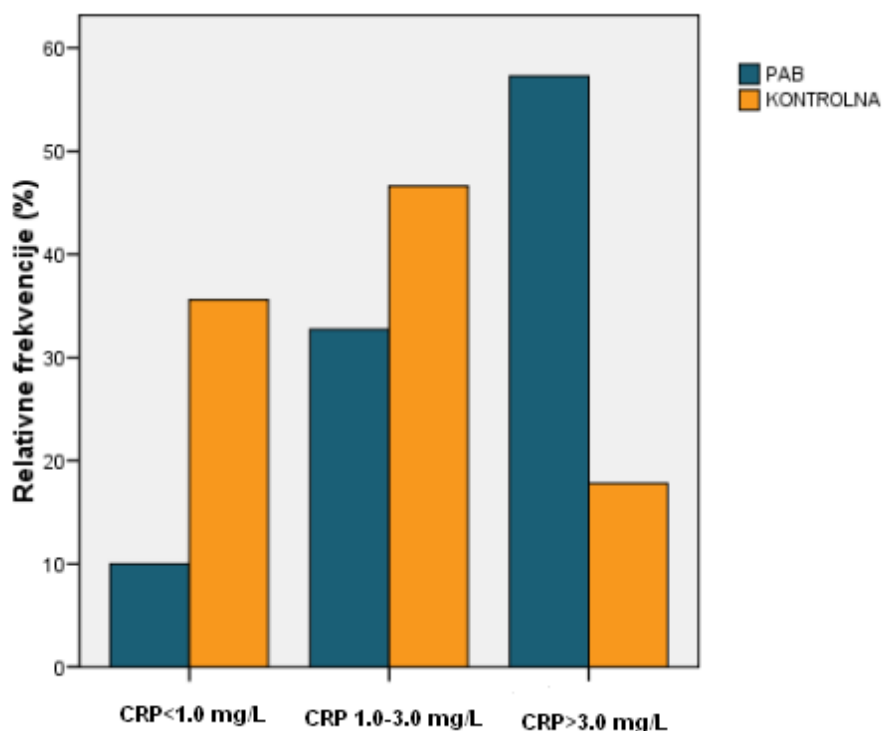
Koncentracije CRP-a bile su statistički značajno više u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 4.2.4.1.). Podjela ispitanika prema koncentraciji CRP-a u tri skupine različitog kardiovaskularnog rizika prikazana je u tablici 4.2.4.2. i grafički na slici 4.2.4.1. U skupini niskog rizika, koncentracije CRP-a <1,0 mg/L, nalazi se 10% ispitanika i 36% kontrolne skupine. U skupini umjerenog rizika, koncentracije CRP-a od 1,0 do 3,0 mg/L, nalazi se 33% ispitanika i 47% kontrolne skupine, a u skupini visokog rizika, koncentracije CRP >3,0 mg/L nalazi se čak 57% ispitanika i 17% kontrolne skupine.

Udio ispitanika u pojedinim kategorijama rizika značajno se razlikuje između istraživanih skupina. Od svih pokazatelja lipidnog statusa, jedino su se koncentracije HDL-kolesterola u ispitanika podjeljenih u tri skupine različitog kardiovaskularnog rizika značajno razlikovale (Tablica 4.2.4.2.). Post hoc analiza (Mann Whitney U test) pokazala je da su koncentracije HDL-kolesterola značajno više kod ispitanika niskog rizika u odnosu na ispitanike umjerenog (P=0,004) i visokog rizika (P=0,011). Skupine ispitanika umjerenog i visokog kardiovaskularnog rizika nisu se značajno razlikovale u koncentraciji HDL kolesterola (P=0,666).

Tablica 4.2.4.1. Podjela ispitanika prema CRP-u, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika

CRP (mg/L)	Rizik	Ispitanici		Kontrolna skupina		P
		n	%	n	%	
<1,0	niski	11	10	42	36	<0,001*
1,0-3,0	umjereni	36	33	55	47	
> 3,0	visoki	63	57	21	17	

\*statistički značajna razlika, Hi-kvadrat test



Slika 4.2.4.1 Podjela ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine prema CRP-u, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika.

Tablica 4.2.4.2 Koncentracija pokazatelja lipidnog statusa prema CRP-u, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti.

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici niskog rizika	Ispitanici umjerenog rizika	Ispitanici visokog rizika	P
Trigliceridi (mmol/L)	1,59 (1,32-2,21)	1,97 (1,39-2,40)	0,87 (1,19-2,38)	0,674
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,60 (4,50-6,00)	5,55 (4,83-6,10)	5,40 (4,50-6,00)	0,732
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,40 (1,10-1,60)	1,10 (0,93-1,30)	1,10 (0,90-1,30)	0,017
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,40 (2,40-3,80)	3,45 (2,80-4,18)	3,20 (2,70-3,90)	0,549

Kruskal Wallisov test, rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

### 4.3 KATALITIČKE KONCENTRACIJE ENZIMA PON1 i PAF-AH

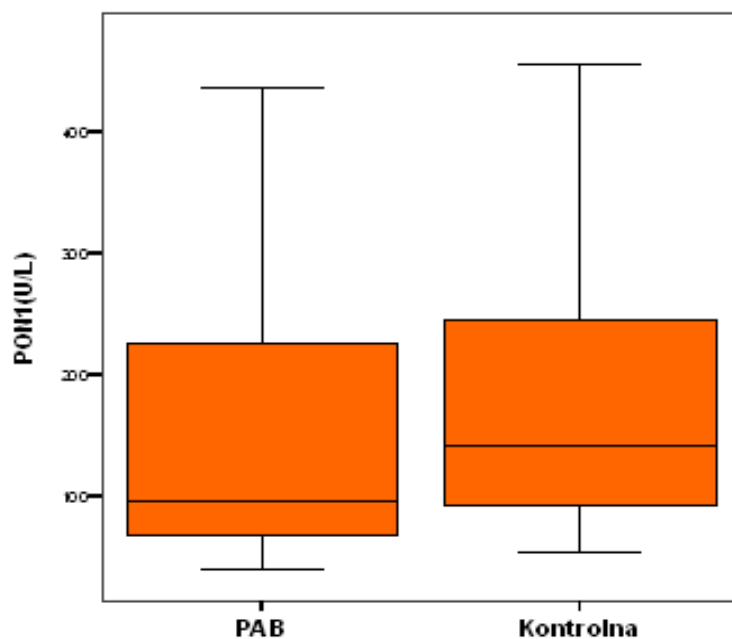
#### 4.3.1 Katalitičke koncentracije enzima PON1 i PAF-AH u serumu ispitanika i kontrolne skupine

Bazalne (PON1) i stimulirane (NaCl-PON1) katalitičke koncentracije paraoksonaze i PAF-AH-a u serumu ispitanika i kontrolnoj skupini prikazane su tablici 4.3.1.1. i na slikama (4.3.1.1.- 4.3.1.3.). Katalitičke koncentracije izražene su u internacionalnim jedinicama (U/L) i standardizirane prema koncentraciji lipoproteinske čestice na koju su enzimi dominantno vezani u plazmi. Katalitička koncentracija PON1 standardizirana je prema HDL-kolesterolu (U/mmol), a katalitička koncentracija PAF-AH-a prema LDL-kolesterolu (U/mmol). Standardizacijom katalitičkih aktivnosti enzima eliminira se mogući utjecaj koncentracije lipoproteinskih čestica na aktivnost enzima: HDL-a na PON1 i LDL-a na PAF-AH.

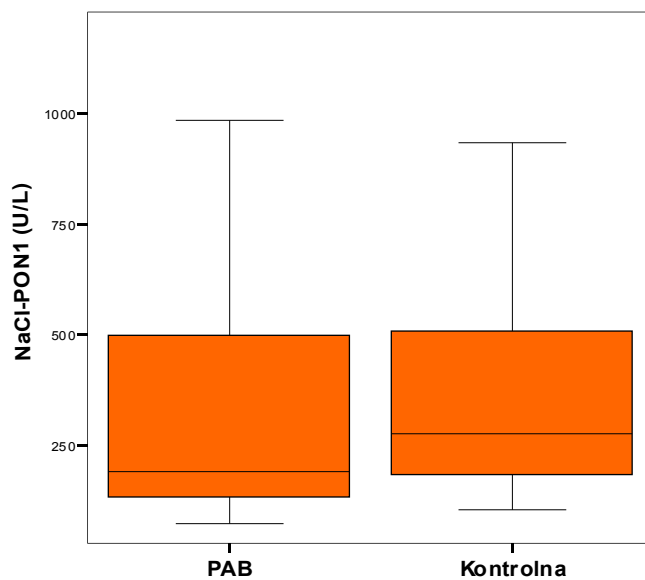
Tablica 4.3.1.1. Katalitičke koncentracije PON1, NaCl-PON1 i PAF-AH-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

Biokemijski parametar (jedinica)	n	Ispitanici	n	Kontrolna skupina	P
PON1 (U/L)	110	95 (69-225)	113	142 (91-245)	0,001
PON1/HDL (U/mmol )	110	90 (58-206)	113	94 (56-171)	0,452
NaCl- PON1 (U/L)	110	190 (134-499)	113	276 (182-508)	0,004
NaCl- PON1/HDL (U/mmol )	110	181 (113-449)	113	192 (111-350)	0,321
PAF-AH (U/L)	93	405 (330-471)	64	406 (359-479)	0,591
PAF-AH/LDL (U/mmol )	93	121 (107-139)	64	98 (86-120)	<0,001

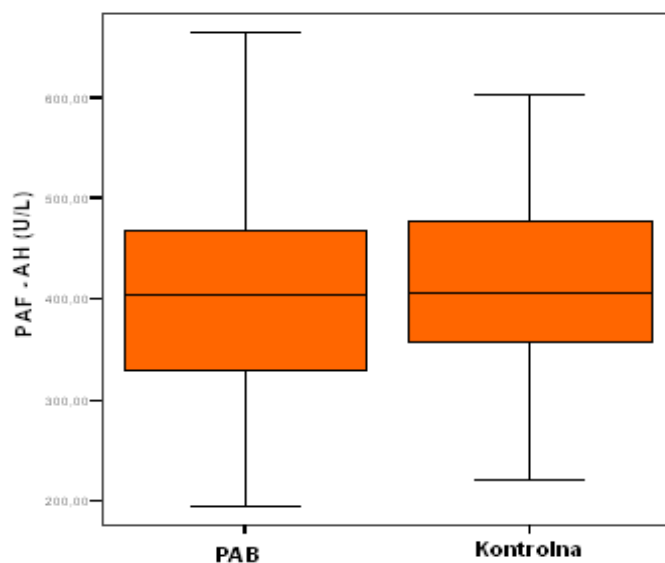
Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)



Slika 4.2.1.1 Grafički prikaz katalitičkih koncentracija PON1 kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.2.1.2. Grafički prikaz katalitičkih koncentracija NaCl-PON1 kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.2.1.3 Grafički prikaz katalitičkih koncentracija PAF-AH-a kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).

#### 4.3.2 Povezanost dobi i spola sa katalitičkim koncentracijama enzima

Da bi ispitali povezanost dobi i katalitičkih koncentracija enzima, napravili smo korelaciju s dobi, pri čemu je korišten Spearman-ov koeficijent korelacije. Za testiranje razlika između muških i ženskih ispitanika korišten je Mann-Whitney test (tablice 4.3.2.1-4.3.2.3).

Tablica 4.3.2.1. Korelacija katalitičkih koncentracijama enzima s dobi ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolne skupine

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici		Kontrolna skupina	
	r	P	r	P
PON1 (U/L)	-0,14	0,148	0,10	0,291
PON1/HDL (U/mmol )	-0,15	0,124	0,03	0,752
NaCl-PON1 (U/L)	-0,13	0,164	-0,13	0,164
NaCl-PON1/HDL (U/mmol )	-0,15	0,120	0,07	0,484
PAF-AH (U/L)	-0,10	0,327	0,04	0,751
PAF-AH / LDL (U/mmol )	-0,02	0,839	0,17	0,180

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.3.2.2. Katalitičke koncentracije enzima u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti muškog i ženskog spola

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici		P
	Muškarci	Žene	
PON1 (U/L)	103 (70-225)	75 ( 54-226)	0,178
PON1/HDL(U/mmol )	102 (59- 206)	64 (50- 168)	0,141
NaCl- PON1 (U/L)	208 (135-499)	149 (103-506)	0,237
NaCl- PON1/HDL(U/mmol )	209 (116- 454)	132 (100-367)	0,202
PAF-AH (U/L)	405 (331- 477)	409 (329-442)	0,722
PAF-AH / LDL (U/mmol )	123 (108-141)	110 (100- 119)	0,031

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.3.2.3. Katalitičke koncentracije enzima u muškaraca i žena kontrolne skupine

Biokemijski parametar (jedinica)	Kontrolna skupina		P
	Muškarci	Žene	
PON1 (U/L)	133 (92- 249)	152 (89-246)	0,970
PON1/HDL(U/mmol )	94 (60-188)	94 (49-158)	0,237
NaCl- PON1 (U/L)	246 (184-507)	288 (176- 510)	0,961
NaCl- PON1/ HDL (U/mmol )	184 (114-394)	202 (99-330)	0,211
PAF-AH (U/L)	459 (383- 519)	385 (319-437)	0,005
PAF-AH / LDL (U/mmol )	121 (95-137)	92 (79-103)	<0,001

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Katalitičke koncentracije PON1 i PAF-AH-a nisu korelirale s dobi ispitanika (tablica 4.3.2.1.). Bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije PON1 nisu se značajno razlikovale po spolu u obje istraživane skupine. Katalitičke koncentracije PAF-AH-a značajno su se razlikovale po spolu u kontrolnoj skupini ( $P=0,005$ ), pri čemu su žene imale niže vrijednosti od muškaraca. Žene su imale i niže standardizirane katalitičke koncentracije PAF-AH-a u ispitanika ( $P=0,031$ ) i u kontrolnoj skupini ( $P<0,001$ ).

### 4.3.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa katalitičkim koncentracijama enzima u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Povezanost pušenja i dijabetesa, te terapije lipoliticima i antihipertenzivima sa katalitičkim koncentracijama PON1 i PAF-AH u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti prikazan je u tablici 4.3.3.1. Značajna razlika u katalitičkim koncentracijama PAF-AH-a, nađena je između ispitanika na terapiji lipoliticima i onih bez terapije, pri čemu su ispitanici na terapiji lipoliticima imali značajno niže vrijednosti PAF-AH-a ( $P=0,032$ ) i značajno više standardizirane katalitičke koncentracije PAF-AH-a, PAF-AH/LDL ( $P=0,004$ ) (tablica 4.2.3.3).

Tablica 4.3.3.1. Povezanost čimbenika rizika i terapije sa katalitičkim koncentracijama enzima u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Biokemijski parametar (jedinica)	Čimbenici rizika		Terapija	
	Pušenje	Dijabetes	Lipolitici	Antihipertenzivi
	P	P	P	P
PON1 (U/L)	0,707	0,238	0,567	0,400
PON1/HDL (U/mmol )	0,928	0,066	0,288	0,380
NaCl- PON1 (U/L)	0,691	0,216	0,577	0,336
NaCl- PON1/ HDL(U/mmol )	0,964	0,061	0,281	0,333
PAF-AH (U/L)	0,138	0,103	0,032	0,396
PAF-AH/LDL(U/mmol )	0,250	0,485	0,004	0,410

Mann-Whitney test

Tablica 4.3.3.2. Katalitičke koncentracije PAF-AH-a u ispitanika sa i bez terapije lipoliticima

Biokemijski parametar (jedinica)	Ispitanici uz terapiju lipoliticima	Ispitanici bez terapije lipoliticima	P
PAF-AH (U/L)	364 (316-427)	425 (351-494)	0,032
PAF-AH/LDL(U/mmol )	127 (118-142)	114 (101-135)	0,004

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)



Odnos između katalitičkih koncentracija enzima, parametara lipidnog statusa i CRP-a prikazan je u tablicama 4.3.3.3-4.3.3.5 i na slikama 4.3.3.1-4.3.3.4. Bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze nisu korelirale sa parametrima lipidnog statusa i CRP-om u istraživanim skupinama.

Tablica 4.3.3.3. Odnos između bazalne katalitičke koncentracije PON1, pokazatelja lipidnog statusa i CRP-a kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

PON1 (U/L)	Ispitanici		Kontrolna skupina	
	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,02	0,819	0,13	0,187
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,11	0,232	0,05	0,595
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,06	0,552	0,01	0,917
LDL-kolesterol (mmol/L)	0,11	0,234	0,01	0,948
Indeks ateroskleroze	0,12	0,205	0,01	0,943
Ukupni kol./HDL kol.	0,08	0,391	0,01	0,894
CRP (mg/L)	-0,11	0,241	0,18	0,061

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.3.3.4. Odnos između stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze, pokazatelja lipidnog statusa i CRP-a kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

NaCl-PON1 (U/L)	Ispitanici		Kontrolna skupina	
	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,01	0,895	0,13	0,164
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,09	0,350	0,06	0,529
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,06	0,565	0,02	0,852
LDL-kolesterol (mmol/L)	0,09	0,352	0,02	0,827
Indeks ateroskleroze	0,10	0,295	0,01	0,875
Ukupni kol./HDL kol.	0,06	0,501	0,02	0,835
CRP (mg/L)	-0,11	0,273	0,20	0,030

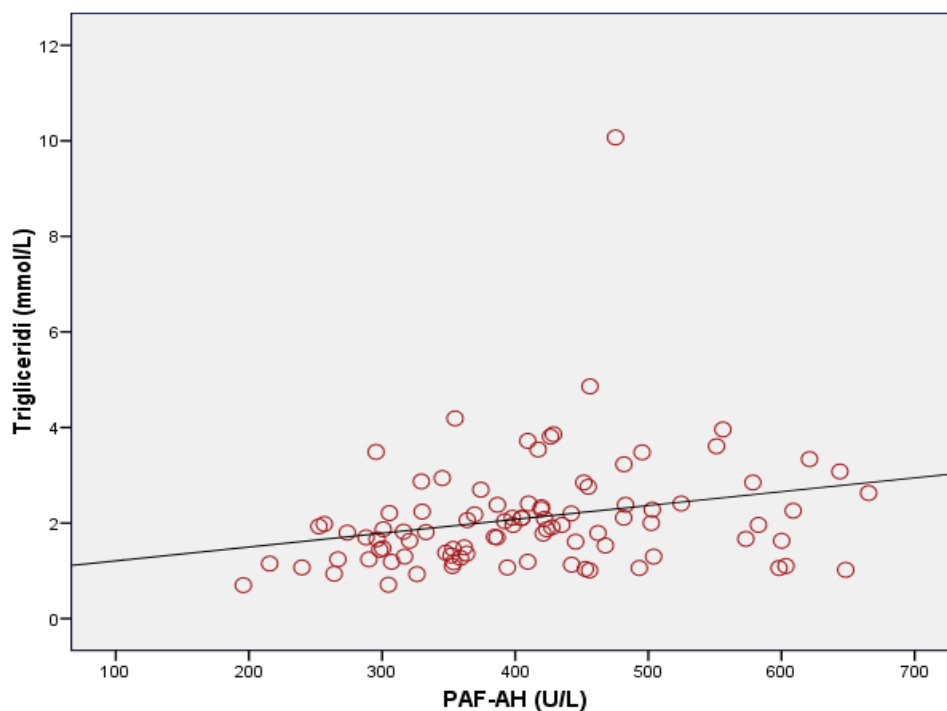
r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.3.3.5. Odnos između katalitičkih koncentracija PAF-AH-a, parametara lipidnog statusa i CRP-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

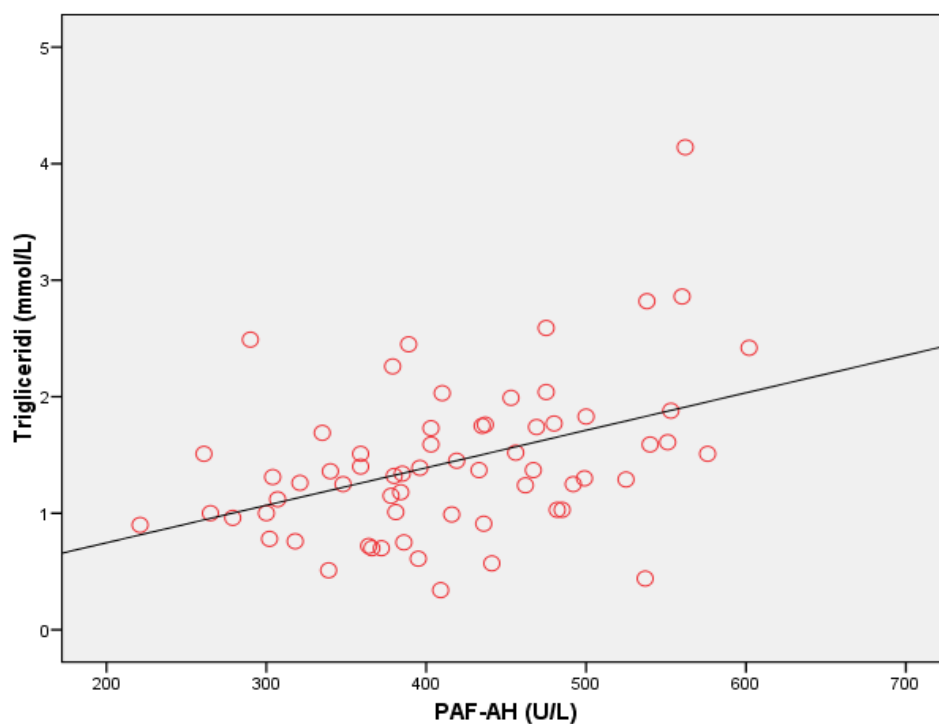
PAF-AH (U/L)	Ispitanici		Kontrolna skupina	
	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,33	0,001	0,41	0,001
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,70	<0,001	0,32	0,010
HDL-kolesterol (mmol/L)	-0,22	0,035	-0,33	0,009
LDL-kolesterol (mmol/L)	0,70	<0,001	0,33	0,009
Indeks ateroskleroze LDL kol./HDL kol.	0,70	<0,001	0,46	<0,001
Ukupni kol./HDL kol.	0,68	<0,001	0,49	<0,001
CRP (mg/L)	-0,09	0,371	-0,06	0,617

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

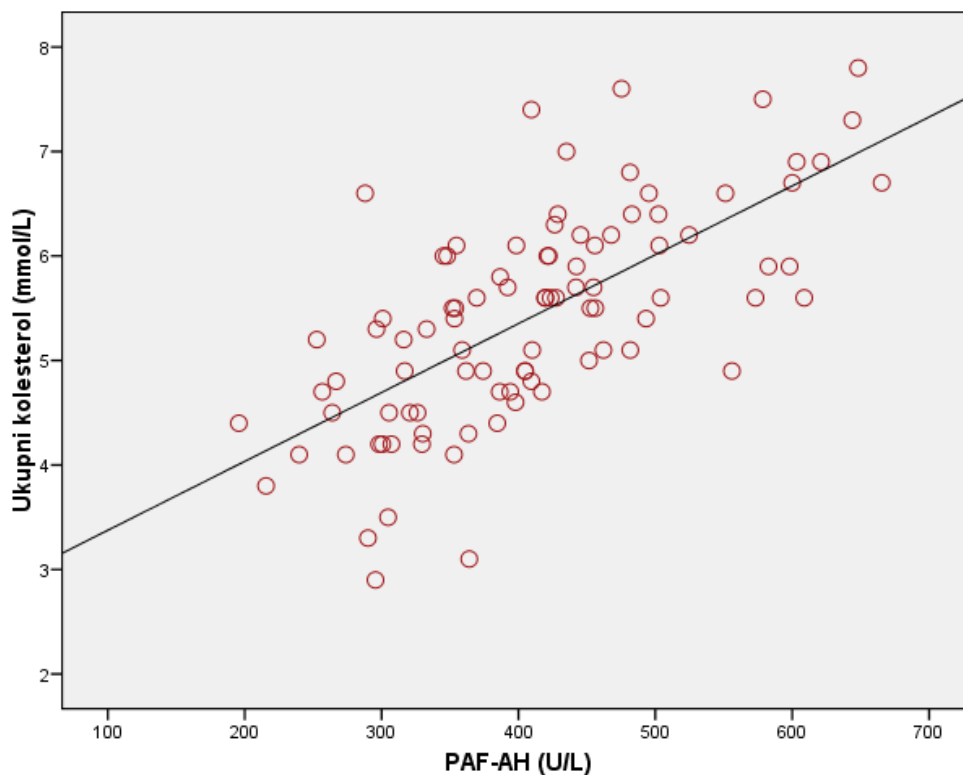
Katalitičke koncentracije PAF-AH-a korelirale su sa koncentracijama triglicerida (slike 4.3.3.1. i 4.3.3.2.), ukupnog kolesterola (slike 4.3.3.3. i 4.3.3.4.) i LDL-kolesterola (slike 4.3.3.5. i 4.3.3.6.) u obje skupine. Slaba negativna povezanost nađena je između katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracije HDL kolesterola u kontrolnoj skupini (slika 4.3.3.7.), dok u ispitanika nije bilo korelacije. Nije bilo statistički značajne korelacije između katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracije CRP-a.



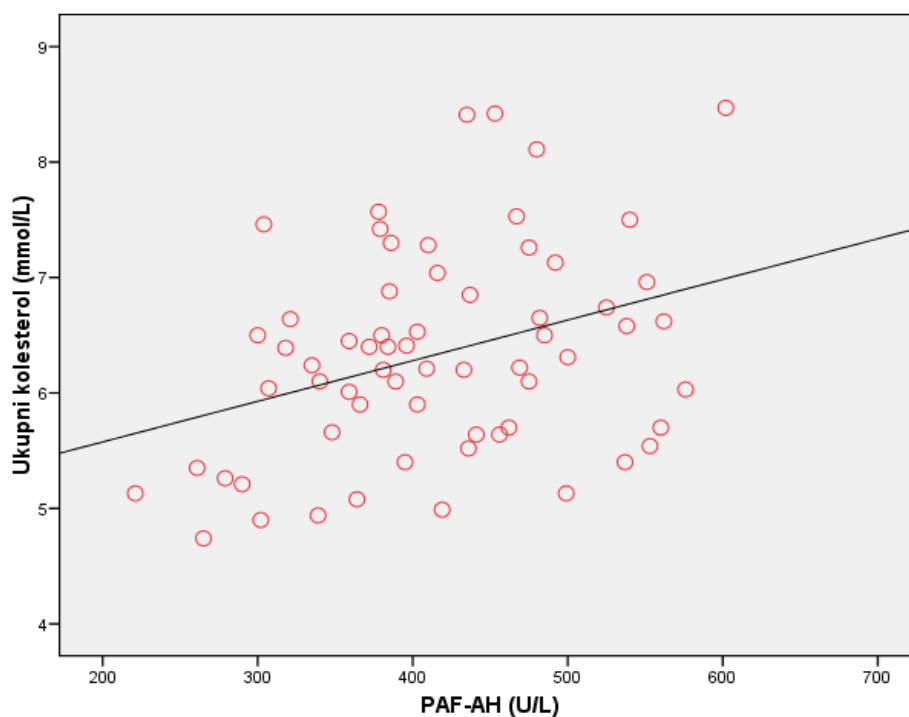
Slika 4.3.3.1. Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija triglicerida u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,33$ ;  $P=0,001$ ).



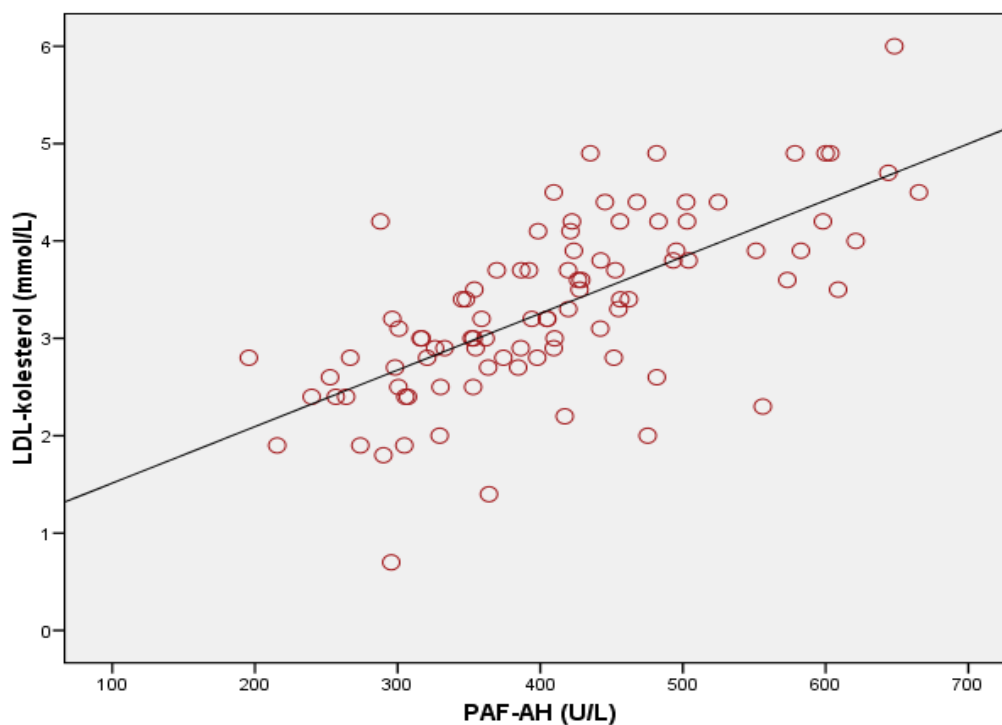
Slika 4.3.3.2 Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija triglicerida u kontrolnoj skupini ( $r=0,41$ ;  $P=0,001$ ).



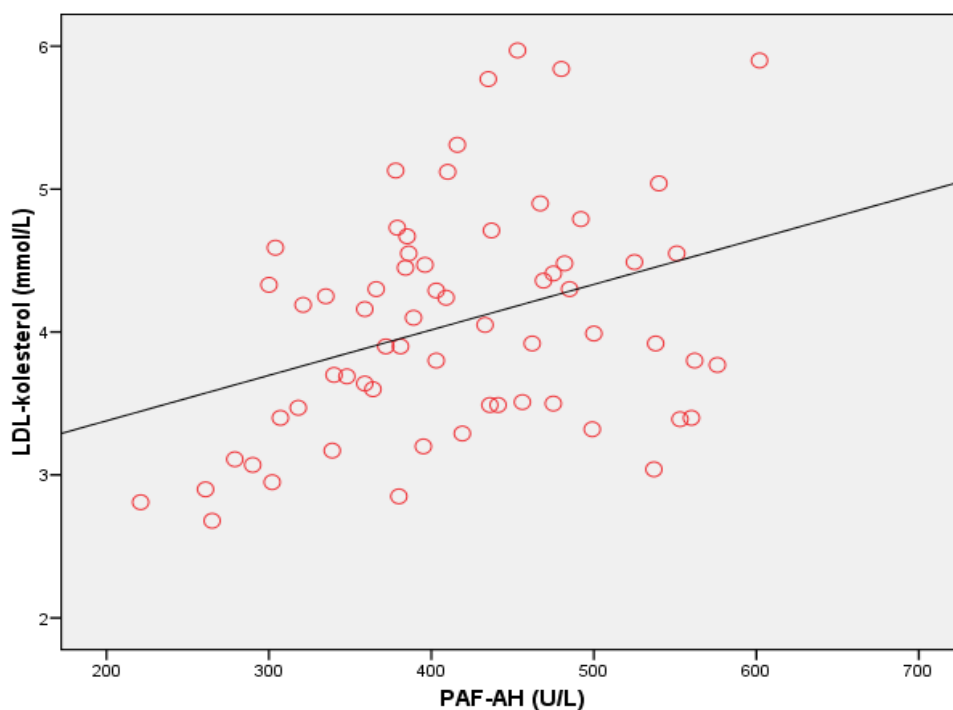
Slika 4.3.3.3. Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija ukupnog kolesterola u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,70$ ;  $P<0,001$ ).



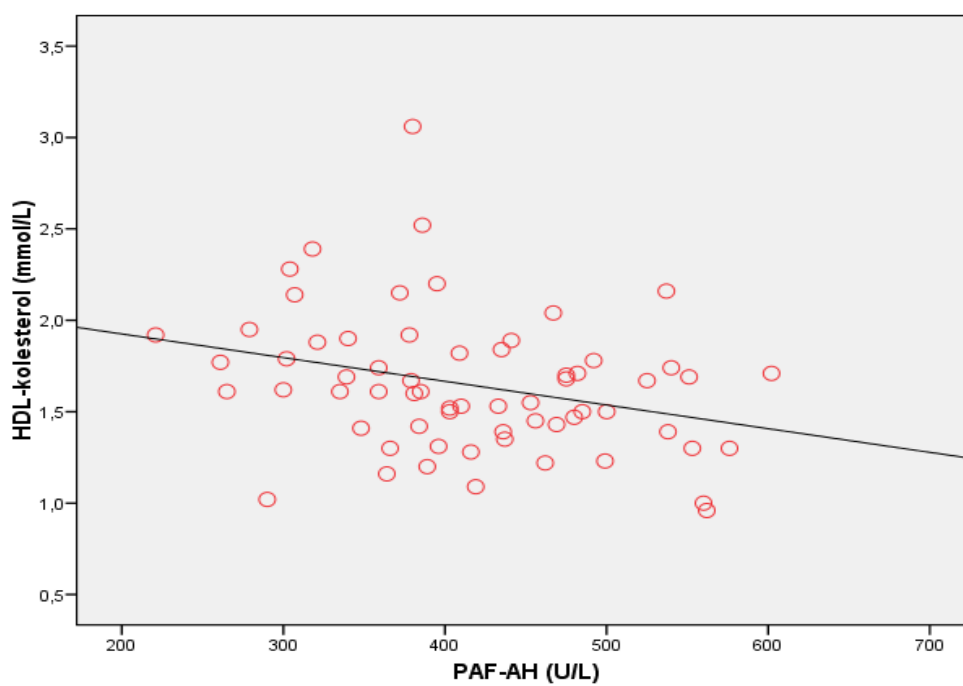
Slika 4.3.3.4. Korelacija koncentracija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i ukupnog kolesterola u kontrolnoj skupini ( $r=0,32$ ;  $P=0,010$ ).



Slika 4.3.3.5. Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija LDL- kolesterola u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,70$ ;  $P<0,001$ ).



Slika 4.3.3.6. Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija LDL- kolesterola u kontrolnoj skupini ( $r=0,33$ ;  $P=0,009$ ).



Slika 4.3.3.7. Korelacija katalitičkih koncentracija PAF-AH-a i koncentracija HDL- kolesterola u kontrolnoj skupini ( $r=-0,33$ ;  $P=0,009$ ).

## 4.4 POLIMORFIZMI *pon1* I *pon2* GENA

### 4.4.1 Učestalost genotipova i alela *pon1* I *pon2* gena

Za ispitivane polimorfizme *pon1* i *pon2* gena izmjerena učestalost pojedinih genotipova uspoređena je s očekivanim frekvencijama prema Hardy Weinbergovoj ravnoteži. Značajnost odstupanja u raspodjeli frekvencija genotipova polimorfizma Q192R, L55M, -108C>T *pon1* i S311C *pon2* gena od Hardy Weinbergove ravnoteže u istraživanim skupinama utvrđena je hi kvadrat ( $X^2$ ) testom ili Fisherovim egzaktnim testom kad su frekvencije u pojedinim skupinama bile male (tablica 4.4.1.1-4.4.1.8.).

Tablica 4.4.1.1. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam Q192 R *pon1* gena u kontrolnoj skupini

Genotip polimorfizma Q192 R <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
QQ	36	49,32	38,48	52,71
QR	34	46,58	29,04	39,78
RR	3	4,11	5,48	7,51

Fisher egzaktni test za QQ: QR+RR genotip, P= 0,749.

Tablica 4.4.1.2. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam Q192 R *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Genotip polimorfizma Q192 R <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
QQ	64	78,05	60,61	73,92
QR	13	15,85	19,77	24,12
RR	5	6,10	1,61	1,97

Hi kvadrat test, P= 0,002; Fisher egzaktni test za QQ: QR+RR genotip, P= 0,159.

Značajno odstupanje od Hardy Weinbergove ravnoteže nađeno je kod raspodjele frekvencija genotipova za polimorfizam Q192R *pon1* gena u ispitanika (P=0,002). Zbog malog broja homozigota mutiranog alela (n<5), odstupanje od Hardy Weinbergove ravnoteže nije se moglo procijeniti  $X^2$  testom za polimorfizam Q192 R *pon1* gena u kontrolnoj skupini. Stoga je primjenjen Fisherov test za testiranje razlika između dobivenih i očekivanih

frekvencija divljeg tipa i nosioca mutiranog alela (heterozigota i homozigota). Određene i očekivane frekvencije genotipova divljeg tipa i nosioca mutiranog alela za polimorfizam Q192R *pon1* gena nisu značajnije odstupali od Hardy Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini (  $P= 0,749$ ) ni kod ispitanika ( $P= 0,159$ ).

Tablica 4.4.1.3. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam L55M *pon1* gena u kontrolnoj skupini

Genotip polimorfizma L55M <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
LL	28	38,36	30,26	41,45
LM	38	52,05	33,48	45,86
MM	7	9,59	9,26	12,69

Hi kvadrat test,  $P= 0,249$

Tablica 4.4.1.4. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam L55M *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Genotip polimorfizma L55M <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
LL	37	46,84	34,23	43,33
LM	30	37,97	35,54	44,99
MM	12	15,19	9,23	11,68

Hi kvadrat test,  $P= 0,166$ .

Tablica 4.4.1.5. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam -108 C>T *pon1* gena u kontrolnoj skupini

Genotip polimorfizma -108 C>T <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
CC	19	26,03	23,59	32,32
CT	45	61,64	35,82	49,06
TT	9	12,33	13,59	18,62

Hi kvadrat test,  $P= 0,028$ ; Fisher egzaktni test za CC:CT+TT genotip,  $P= 0,468$ .



Tablica 4.4.1.6. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam -108 C>T *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Genotip polimorfizma -108 C>T <i>pon1</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije	n	frekvencije
CC	16	55,17	11,80	40,70
CT	5	17,24	13,40	46,20
TT	8	27,59	3,80	13,11

Hi kvadrat test, P= 0,001; Fisher egzaktni test za CC:CT+TT genotip, P= 0,431.

Tablica 4.4.1.7. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam S311C *pon2* gena u kontrolnoj skupini

Genotip polimorfizma S311C <i>pon2</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
SS	42	57,53	44,51	60,97
SC	30	41,10	24,99	34,23
CC	1	1,37	3,51	4,80

Fisher egzaktni test za SS: SC+CC genotip, P= 0,736.

Tablica 4.4.1.8. Ispitivanje Hardy Weinbergove ravnoteže u raspodjeli frekvencija genotipova za polimorfizam S311C *pon2* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Genotip polimorfizma S311C <i>pon2</i> gena	Dobiveno		Očekivano	
	n	frekvencije (%)	n	frekvencije (%)
SS	52	55,91	54,20	58,28
SC	38	40,86	33,59	36,12
CC	3	3,23	5,20	5,60

Fisher egzaktni test za SS: SC+CC genotip, P= 0,882.

Određene i očekivane frekvencije genotipova L55M *pon1* gena nisu značajno odstupale od Hardy Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini (P= 0,249) i u ispitanika (P=0,166).

Značajno odstupanje od Hardy Weinbergove ravnoteže nađeno je kod raspodjele frekvencija genotipova za polimorfizam -108C>T *pon1* gena u kontrolnoj skupini (P=0,028) i kod ispitanika (P=0,001). Stoga je primjenjen Fisherov egzaktni test za testiranje značajnost razlika između dobivenih i očekivanih frekvencija divljeg tipa i nosioca mutiranog alela

(heterozigota i homozigota). Određene i očekivane frekvencije genotipova divljeg tipa i nosioca mutiranog alela za polimorfizam -108 C>T *pon1* gena nisu značajnije odstupali od Hardy Weinbergove ravoteže u kontrolnoj skupini (P= 0,468) ni kod ispitanika (P= 0,431).

Zbog malog broja homozigota mutiranog alela (n<5), za polimorfizam S311C *pon2* gena u obje istraživane skupine, primjenjen je Fisherov egzaktni test za testiranje razlika između dobivenih i očekivanih frekvencija divljeg tipa i nosioca mutiranog alela (heterozigota i homozigota). Određene i očekivane frekvencije genotipova divljeg tipa i nosioca mutiranog alela nisu značajnije odstupali od Hardy-Weinbergove ravoteže u kontrolnoj skupini (P=0,736) ni kod ispitanika (P=0,882).

Učestalost genotipova divljeg tipa i nosioca mutiranog alela istraživanih polimorfizma *pon1* i *pon2* gena u ispitanika i kontrolnoj skupini prikazani su u tablicama 4.4.1.9-4.4.1.12. Razlike između kontrolne skupine i ispitanika s perifernom arterijskom bolesti prikazane su kao omjer izgleda (engl. odds ratio, OR) uz 95% intervale pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI), a značajnost razlika između istraživanih skupina testirana je Fisherovim egzaktnim testom.

Tablica 4.4.1.9. Učestalost genotipova i alela polimorfizma Q192R *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (n=82) i kontrolnoj skupini (n=73).

Polimorfizam	Ispitanici	Kontrolna skupina	*OR (95% CI)	P
Q192R <i>pon1</i> gena	n (%)	n (%)		
QQ genotip	64 (78)	36 (49)	3,65 (1,82-7,33)	<0,001
QR+RR genotip	18 (22)	37 (51)		
Q alel	141 (86)	106 (73)	2,31(1,31-4,10)	<0,001
R alel	23 (14)	40 (27)		

\* OR (95% CI) za genotip QQ: QR+RR i alel Q:R; Fisher egzaktni test.

Tablica 4.4.1.10. Učestalost genotipova i alela polimorfizma L55M *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (n=79) i kontrolnoj skupini (n=73).

Polimorfizam	Ispitanici	Kontrolna skupina	*OR (95% CI)	P
L55M <i>pon1</i> gena	n (%)	n (%)		
LL genotip	37 (47)	28 (38)	1,41 (0,74-2,70)	0,327
LM+MM genotip	42 (53)	45 (62)		
L alel	104 (66)	94 (64)	1,06 (0,66-1,71)	0,649
M alel	54 (34)	52 (36)		

\* OR (95% CI) za genotip LL: LM+MM i alel L:M; Fisher egzaktni test.

Tablica 4.4.1.11. Učestalost genotipova i alela polimorfizma -108 C>T *pon1* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (n=29) i kontrolnoj skupini (n=73).

Polimorfizam	Ispitanici	Kontrolna skupina	*OR (95% CI)	P
-108 C>T <i>pon1</i> gena	n (%)	n (%)		
CC genotip	16 (55)	19 (26)	3,50 ( 1,42-8,59)	0,010
CT+TT genotip	13 (45)	54 (73)		
C alel	37 (64)	83 (57)	1,34 (0,71-2,50)	0,857
T alel	21 (36)	63 (43)		

\* OR (95% CI) za genotip CC: CT+TT i alel C:T; Fisher egzaktni test.

Tablica 4.4.1.12. Učestalost genotipova i alela polimorfizma S311C *pon2* gena u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (n=93) i kontrolnoj skupini (n=73).

Polimorfizam	Ispitanici	Kontrolna skupina	*OR (95% CI)	P
S311C <i>pon2</i> gena	n (%)	n (%)		
SS genotip	52 (56)	42 (57)	0,94 ( 0,50-1,74)	0,875
SC+CC genotip	41 (44)	31 (43)		
S alel	142 (76)	114 (78)	0,90 (0,54-1,52)	0,692
C alel	44 (24)	32 (22)		

\* OR (95% CI) za genotip SS: SC+CC i alel S:C

Učestalost genotipova i alela polimorfizma Q192R *pon1* gena značajno je različita između ispitanika i kontrolne skupine ( $P < 0,001$ ). Omjer izgleda da bolesnici s perifernom arterijskom bolesti imaju QQ genotip u odnosu na QR i RR genotip iznosi 3,65 sa 95% intervalom pouzdanosti od 1,82 do 7,33. Stoga osobe sa QQ genotipom imaju 3,7 puta veću vjerojatnost razvoja periferne arterijske bolesti u odnosu na osobe s QR ili RR genotipom. Učestalost Q alela veća je u istraživanoj skupini ( $P < 0,001$ ). Vjerojatnost da oboljeli od periferne arterijske bolesti imaju Q alel 2,3 puta veća u odnosu na R alel sa 95% intervalom pouzdanosti od 1,31-4,10.

Učestalost genotipova i alela polimorfizma L55M *pon1* gena nije se značajno razlikovala između ispitanika i kontrolne skupine.

Učestalost genotipova polimorfizma -108 C>T *pon1* gena značajno je različita između ispitanika i kontrolne skupine. Omjer izgleda da bolesnici s perifernom arterijskom bolesti imaju CC genotip u odnosu na CT i TT genotip iznosi 3,5 uz 95% interval pouzdanosti od 1,42 do 8,59. Učestalost alela polimorfizma -108 C>T *pon1* gena nije se statistički značajno razlikovala između istraživanih skupina.

Učestalost genotipova i alela polimorfizma S311C *pon2* gena nije se značajno razlikovala između ispitanika i kontrolne skupine.

#### **4.4.2 Polimorfizmi *pon1* i *pon2* gena i katalitičke koncentracije paraoksonaze**

Polimorfizmi *pon1* i *pon2* gena i katalitičke koncentracije paraoksonaze u ispitanika i kontrolnoj skupini prikazani su u tablicama 4.4.2.1. i 4.4.2.2., te na slikama 4.4.2.1.- 4.4.2.8.

Testiranje statističke značajnosti razlika između tri genotipa polimorfizma Q192R, L55M i -108C>T *pon1* gena Kruskal Wallisovim testom pokazalo je da se genotipovi značajno razlikuju u bazalnim i stimuliranim katalitičkim koncentracijama paraoksonaze u ispitanika i u kontrolnoj skupini. Post hoc analiza dobivenih razlika provedena je Mann–Whitneyevim testom.

Ispitanici s QQ genotipom polimorfizma Q192R *pon1* gena imaju statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s QR ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ) i RR genotipom ( $P = 0,001$ ;  $P = 0,001$ ), dok se katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 ne razlikuju značajno između ispitanika s QR genotipom u odnosu na RR genotip ( $P = 0,085$ ;  $P = 0,055$ ).

Tablica 4.4.2.1. Polimorfizmi *pon1* i *pon2* gena i katalitičke koncentracije paraoksonaze, bazalne (PON1) i stimulirane (NaCl-PON1) u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Polimorfizam	Genotipovi	PON1 (U/L)	P	NaCl-PON1 (U/L)	P
<i>pon1</i> Q192R	QQ (n= 64 )	77 (58-101)	<0,001	148 (107-197)	<0,001
	QR (n=13)	234 (211-268)		506 (478-573)	
	RR (n=5)	293 (234-329)		641 (551-727)	
<i>pon1</i> L55M	LL (n= 37)	171 (95-245)	<0,001	408 (184-534)	<0,001
	LM (n= 30)	84 (68-191)		163 (131-412)	
	MM (n=12)	52 (48-57)		95 (89-105)	
<i>pon1</i> -108C>T	CC (n= 16)	104 (87-237)	0,003	200 (172-517)	0,004
	CT (n= 5)	83 (78-139)		162 (145-289)	
	TT (n=8)	56 (51-59)		102 (95-114)	
<i>pon2</i> S311C	SS (n=52 )	82 (58-151)	0,010	161 (109-330)	0,010
	SC (n=38)	137 (74-240)		289 (146-557)	
	CC (n= 3 )	165 (112-200)		408 (239-476)	

\* Kruskal Wallis test, rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Ispitanici s LL genotipom polimorfizma L55M *pon1* gena imaju statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s LM (P=0,016; P=0,017) i MM genotipom (P<0,001; P<0,001), kao i ispitanici s LM genotipom u odnosu na MM genotip (P=0,001; P<0,001).

Ispitanici s CC genotipom polimorfizma -108C>T *pon1* gena imaju statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s TT genotipom (P=0,002; P=0,002), kao i ispitanici s CT genotipom u odnosu na TT genotip

( $P=0,011$ ;  $0,020$ ). Katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 ne razlikuju se između ispitanika s CC i CT genotipom ( $P=0,283$ ;  $P=0,322$ ).

Ispitanici s SS genotipom polimorfizma S311C *pon2* gena imaju statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s SC genotipom ( $P=0,010$ ;  $P=0,010$ ). Katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 ne razlikuju se između ispitanika s SS i CC genotipom ( $P=0,148$ ;  $P=0,159$ ), kao i između ispitanika s SC i CC genotipa ( $P=0,980$ ;  $P=0,841$ ).

U kontrolnoj skupini, osobe s QQ genotipom polimorfizma Q192R *pon1* gena imaju statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s QR ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ) i RR genotipom ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ), kao i osobe s QR genotipom u odnosu na RR genotip ( $P=0,019$ ;  $P=0,017$ ).

Osobe s LL genotipom polimorfizma L55M *pon1* gena u kontrolnoj skupini imaju statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s LM ( $P=0,003$ ;  $P=0,002$ ) i MM genotipom ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ), kao i osobe s LM genotipom u odnosu na MM genotip ( $P=0,003$ ;  $P=0,002$ ).

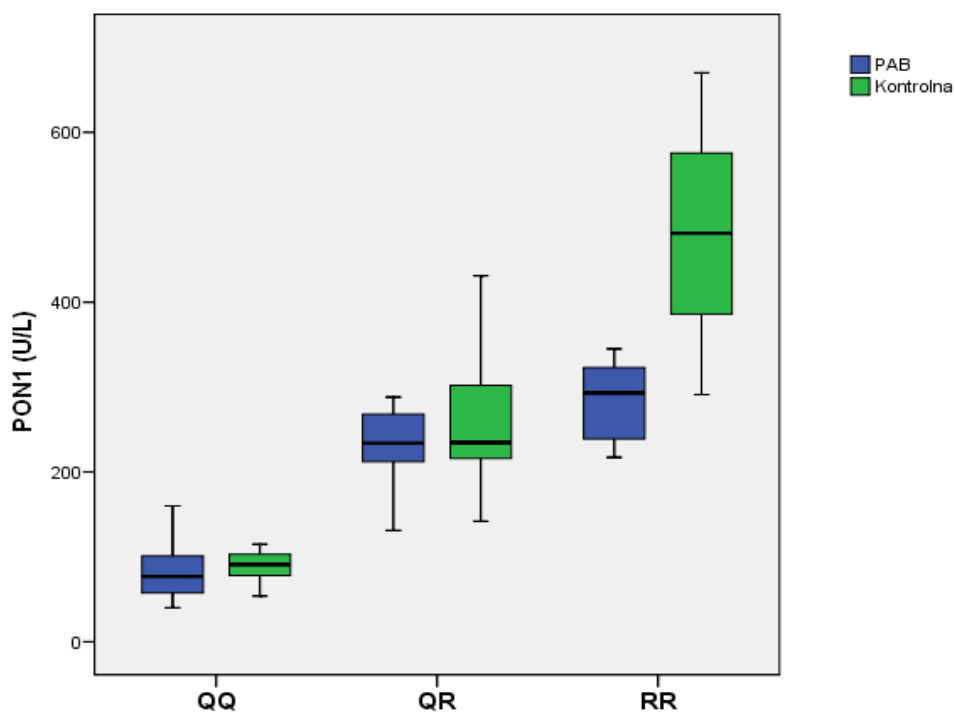
Osobe s CC genotipom polimorfizma -108C>T *pon1* gena u kontrolnoj skupini imaju statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s CT ( $P=0,009$ ;  $P=0,015$ ) i TT genotipom ( $P=0,009$ ;  $P=0,009$ ). Katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u osoba s CT genotipom značajno su više u odnosu na osobe s TT genotipom ( $P=0,049$ ), za razliku od katalitičkih koncentracija PON1, koje se ne razlikuju značajno između ispitanika s CT i TT genotipom ( $P=0,082$ ).

Osobe s SS genotipom polimorfizma S311C *pon2* gena u kontrolnoj skupini imaju statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s SC genotipom ( $P=0,002$ ;  $P=0,001$ ).

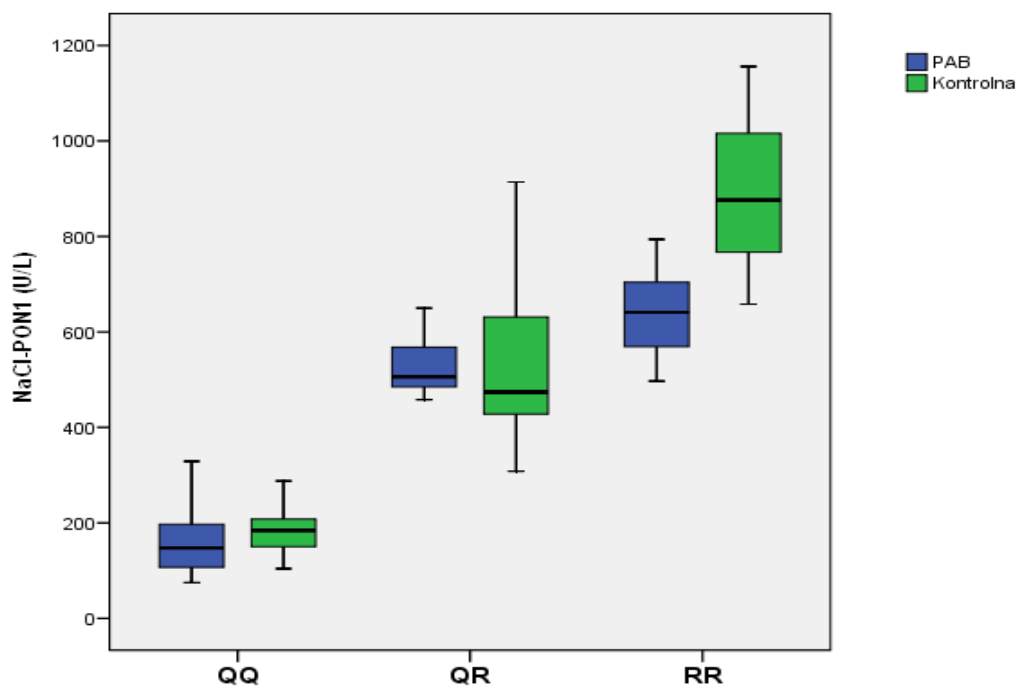
Tablica 4.4.2.2. Polimorfizmi *pon1* i *pon2* gena i katalitičke koncentracije paraoksonaze, bazalne (PON1) i stimulirane (NaCl-PON1) u kontrolnoj skupini.

Polimorfizam	Genotipovi	PON 1 (U/L)	P	NaCl-PON1 (U/L)	P
<i>pon1</i> Q192R	QQ (n=36)	91 (77-102)	<0,001	184 (146-205)	<0,001
	QR (n=34)	235 (216-302)		474 (428-631)	
	RR (n=3)	481 (339-623)		876 (713-1086)	
<i>pon1</i> L55M	LL (n=28)	226 (134-315)	<0,001	453 (256-642)	<0,001
	LM (n=38)	106 (88-236)		212 (171-466)	
	MM (n=7)	68 (58-90)		130 (111-175)	
<i>pon1</i> -108C>T	CC (n=19)	250 (106-341)	0,004	528 (213-678)	0,005
	CT (n=45)	115 (91-227)		224 (184-468)	
	TT (n=9)	80 (66-195)		149 (127-411)	
<i>pon2</i> S311C	SS (n=42)	109 (83-226)	0,002	209 (163-438)	0,001
	SC (n=30)	233 (103-328)		477 (209-654)	
	CC (n=1)	-		-	

\* Kruskal Wallis test, rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

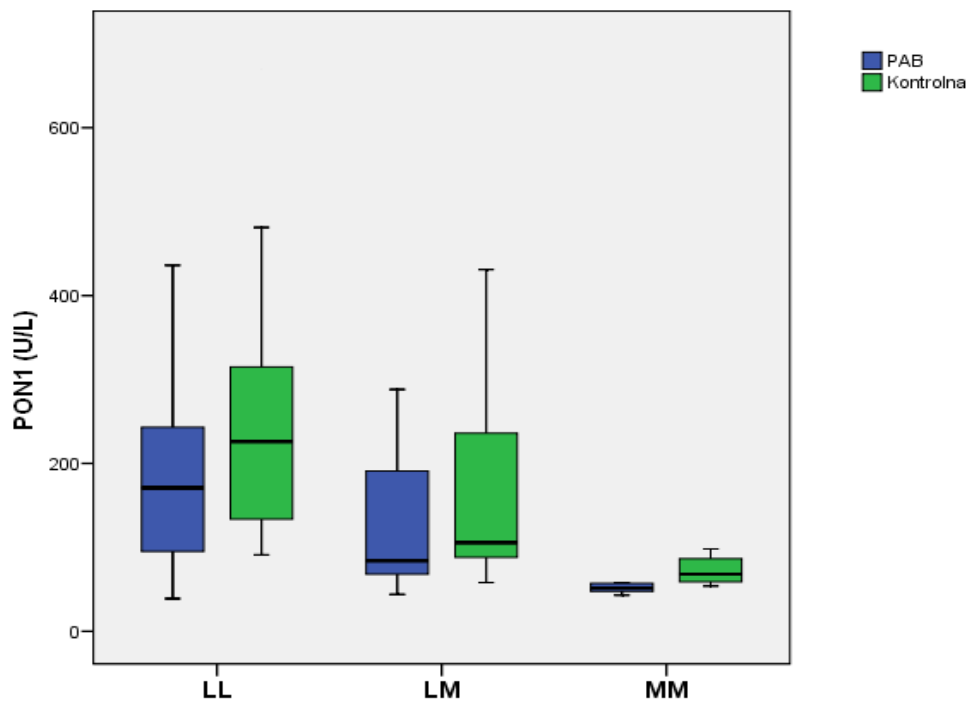


Slika 4.4.2.1. Genotipovi polimorfizma Q192R *pon1* gena i katalitičke koncentracije PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.

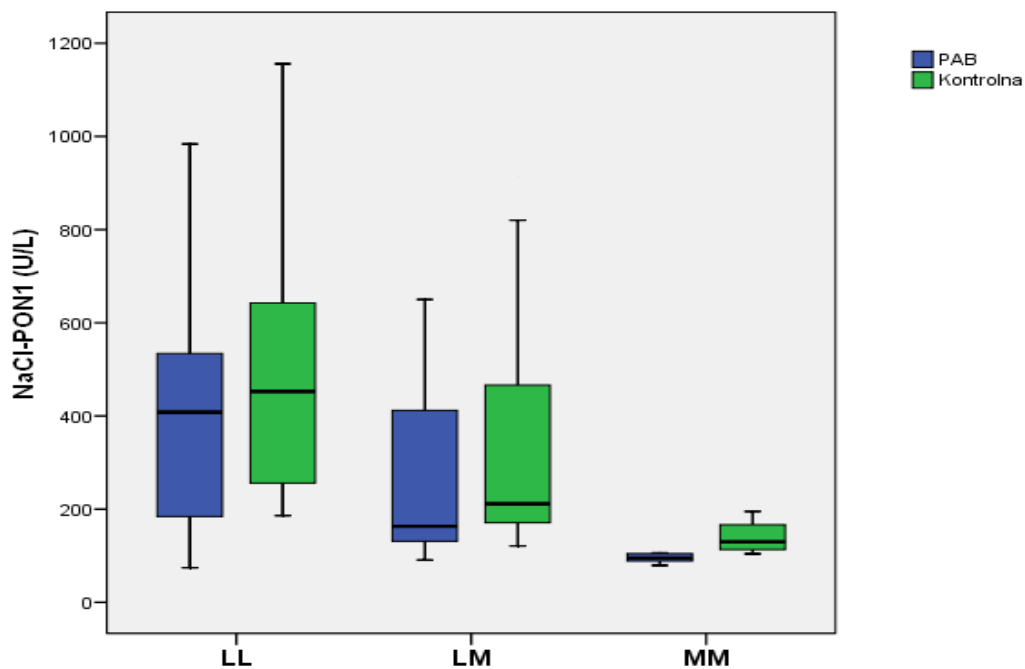


Slika 4.4.2.2. Genotipovi polimorfizma Q192R *pon1* gena i katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.

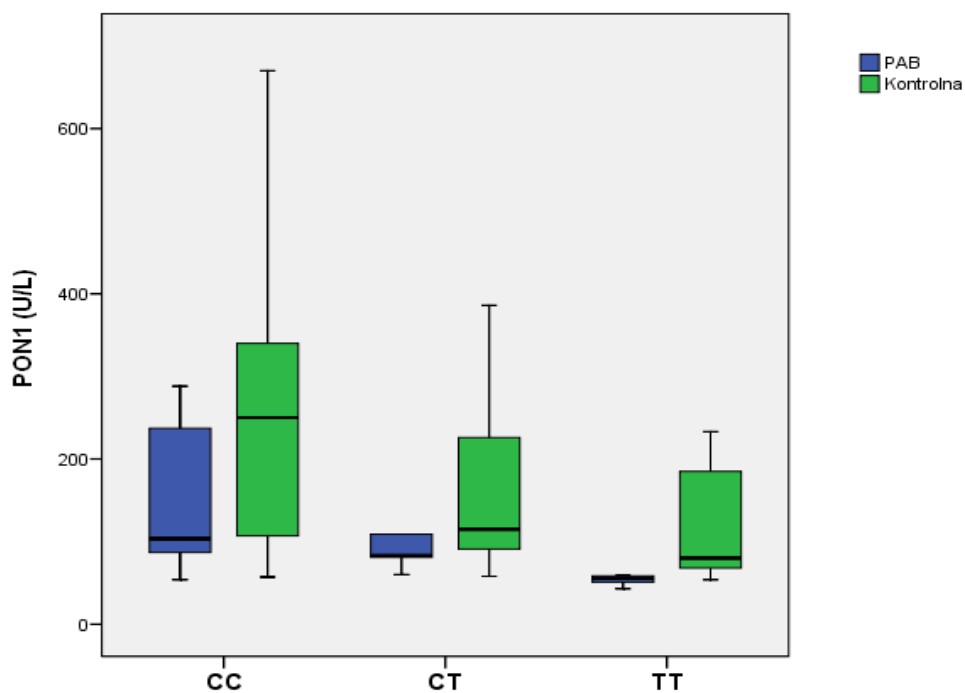




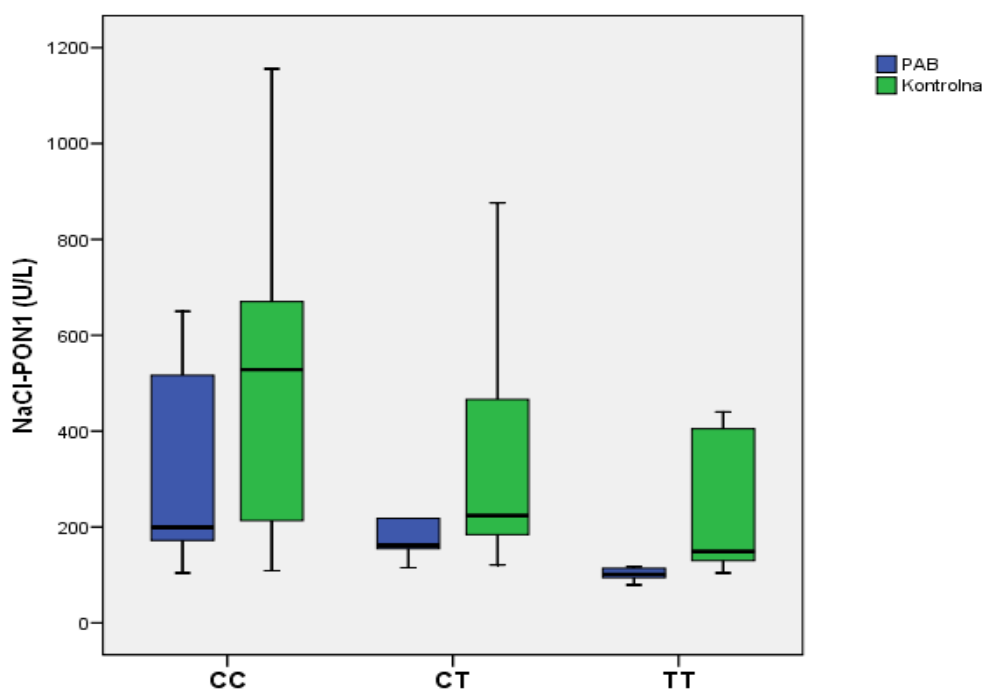
Slika 4.4.2.3. Genotipovi polimorfizma L55M *pon1* gena i katalitičke koncentracije PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



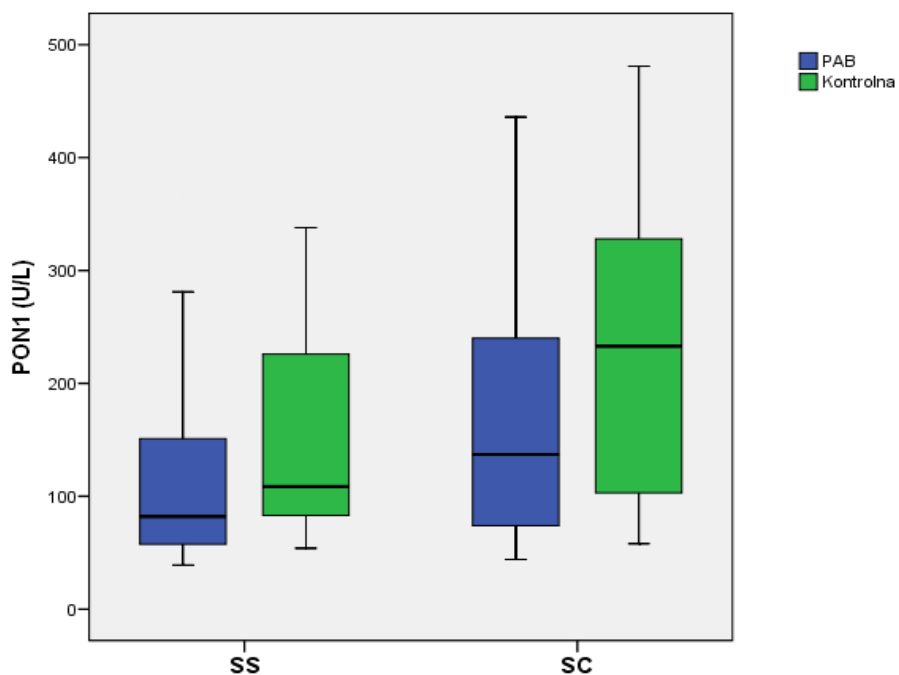
Slika 4.4.2.4. Genotipovi polimorfizma L55M *pon1* gena i katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



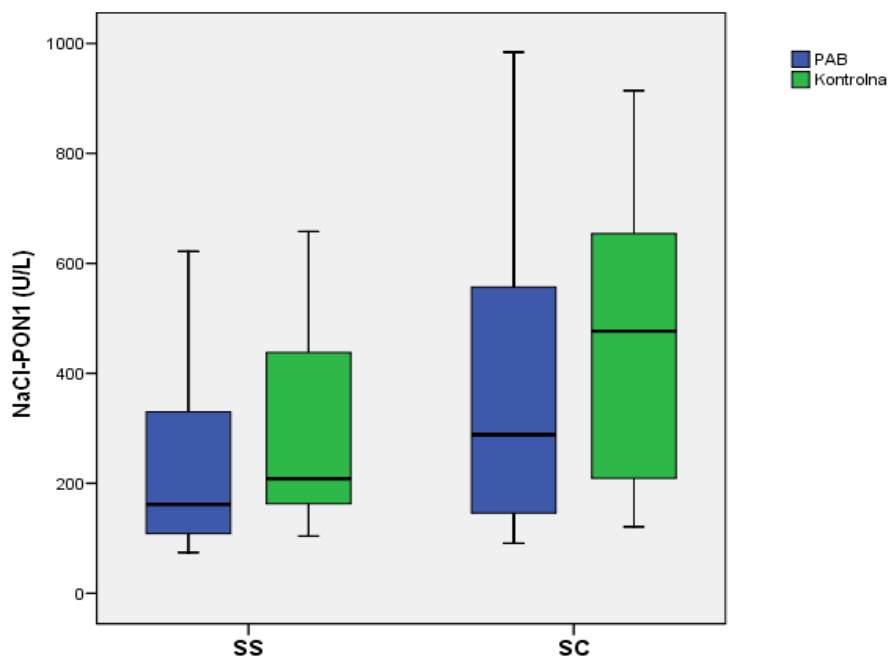
Slika 4.4.2.5. Genotipovi polimorfizma -108C>T *pon1* gena katalitičke koncentracije PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



Slika 4.4.2.6. Genotipovi polimorfizma -108C>T *pon1* gena i katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



Slika 4.4.2.7. Genotipovi polimorfizma S311C *pon2* gena i katalitičke koncentracije PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



Slika 4.4.2.8. Genotipovi polimorfizma S311C *pon2* gena i katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.

## 4.5 KONCENTRACIJE BIOMARKERA ANGIOGENEZE

### 4.5.1 Koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora

Koncentracije biomarkera angiogeneze u serumu ispitanika i kontrolne skupine prikazane su u tablici 4.5.1.1.- 4.5.1.2. i na slikama 4.5.1.1-4.5.1.3.

Tablica 4.5.1.1. Koncentracije VEGF-a i Ang-2 u serumu ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici (n=110)	Kontrolna skupina (n= 54)	P
VEGF (ng/L)	263 (142-403)	287 (115-483)	0,983
Ang-2 (ng/L)	2018 (1613-2689)	1603 (1452-2138)	0,001

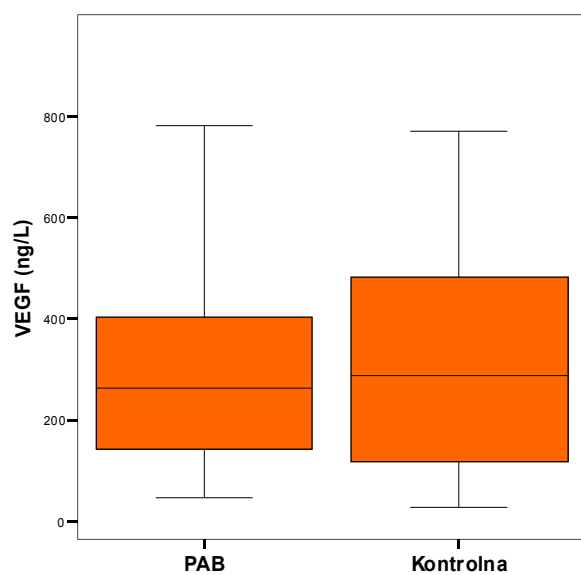
Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.5.1.2. Koncentracije Tie-2 receptora u serumu ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

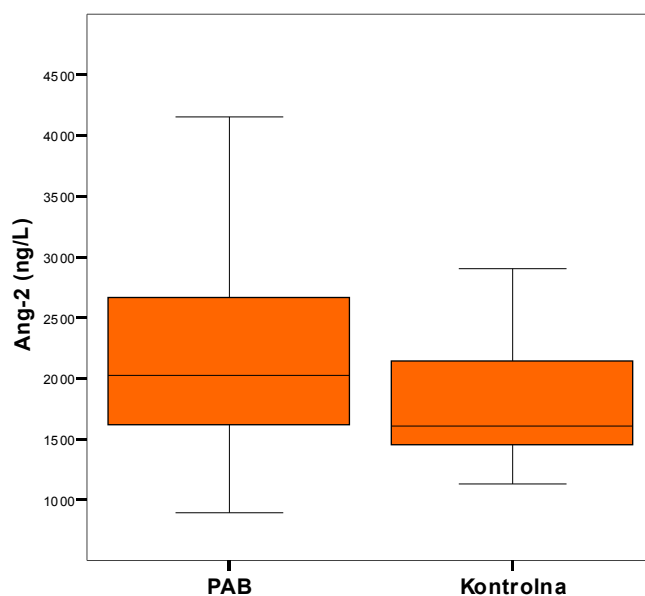
Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici (n=110)	Kontrolna skupina (n= 43)	P
Tie-2 ( $\mu\text{g/L}$ )	21,4 (18,6-23,9)	19,6 (18,1-22,2)	0,049

\*Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

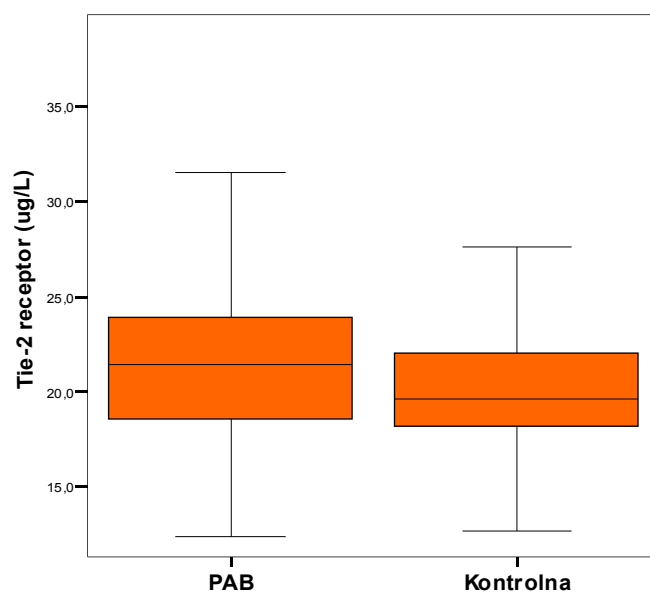
Ispitanici su imali statistički značajno više koncentracije Ang-2 ( $P=0,001$ ) i Tie-2 receptora ( $P=0,049$ ), za razliku od koncentracija VEGF-a koje se nisu značajno razlikovali između istraživanih skupina ( $P=0,983$ ).



Slika 4.5.1.1 Grafički prikaz koncentracija VEGF-a kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.5.1.2 Grafički prikaz koncentracija angiopoietina-2 kod ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).



Slika 4.5.1.3 Grafički prikaz koncentracija Tie-2 receptora kod ispitanika s perifernom arterijskom bolešću (PAB) i kontrolne skupine (medijan i interkvartilni raspon).

#### 4.5.2 Povezanost dobi i spola sa koncentracijama biomarkera angiogeneze

Za ispitivanje povezanosti koncentracija biomarkera angiogeneze s dobi koristili smo Spearman-ovu korelaciju. Za testiranje razlika između muških i ženskih ispitanika korišten je Mann-Whitney test (tablice 4.5.2.1-4.5.2.5).

Tablica 4.5.2.1. Korelacija koncentracija VEGF i Ang-2 s dobi u istraživanim skupinama

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici ( n=110)		Kontrolna skupina (n=54)	
	r	P	r	P
VEGF(ng/L)	0,11	0,245	-0,28	0,041
Ang-2 (ng/L)	0,00	0,979	0,09	0,530

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.5.2.2. Korelacija koncentracija Tie-2 receptora s dobi u istraživanim skupinama

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici ( n=110)		Kontrolna skupina (n=43)	
	r	P	r	P
Tie-2 (μg/L)	0,03	0,746	-0,14	0,361

r= koeficijent Spearman-ove korelacije

Tablica 4.5.2.3. Koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti muškog i ženskog spola.

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici		P
	Muškarci (n=91)	Žene (n=19)	
VEGF(ng/L)	263 (134-395)	318 (199-499)	0,174
Ang-2 (ng/L)	1951 (1545-2532)	2241 (1707-3185)	0,223
Tie-2 (µg/L)	21,4 (18,7-24,2)	20,2 (17,6-23,1)	0,225

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.5.2.4. Koncentracije VEGF i Ang-2 u muškaraca i žena kontrolne skupine

Biokemijski parametar (jedinice)	Muškarci (n=29)	Žene (n=25)	P
VEGF(ng/L)	298 (113-506)	265 (113-451)	0,958
Ang-2 (ng/L)	1511 (1371-1974)	1781 (1482-2181)	0,048

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Tablica 4.5.2.5. Koncentracije Tie-2 receptora u muškaraca i žena kontrolne skupine

Biokemijski parametar (jedinice)	Muškarci (n=22)	Žene (n=21)	P
Tie-2 (µg/L)	19,6 (18,6-21,0)	19,6 (16,1-23,5)	0,932

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Od istraživanih parametara, jedino je VEGF pokazao slabu statistički značajnu negativnu korelaciju s dobi u kontrolnoj skupini. Koncentracije Ang-2 bile su statistički značajno više kod žena u kontrolnoj skupini. Ostali parametri nisu se statistički značajno razlikovali između ispitanika muškog i ženskog spola u istraživanim skupinama.

### 4.5.3 Povezanost čimbenika rizika i terapije sa koncentracijama biomarkera angiogeneze u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Povezanost pušenja i dijabetesa, te terapije lipoliticima i antihipertenzivima sa koncentracijama biomarkera angiogeneze u ispitanika prikazan je u tablici 4.5.3.1.

Tablica 4.5.3.1. Povezanost čimbenika rizika i terapije sa koncentracijama VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (n=110)

Biokemijski parametar (jedinice)	Čimbenici rizika		Terapija	
	Pušenje	Dijabetes	Lipolitici	Antihipertenzivi
	P	P	P	P
VEGF(ng/L)	0,667	0,006	0,596	0,245
Ang-2 (ng/L)	0,966	0,779	0,107	0,161
Tie-2 (µg/L)	0,187	0,710	0,129	0,634

Mann-Whitney test

Tablica 4.5.3.2. Koncentracije VEGF-a u ispitanika sa i bez dijabetesa

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici sa dijabetesom (n=39)	Ispitanici bez dijabetesa (n=71)	P
VEGF(ng/L)	358 (210-463)	197 (130-335)	0,006

Mann-Whitney test; rezultati su prikazani kao medijan ( interkvartilni raspon)

Značajna razlika u koncentracijama VEGF-a nađana je između ispitanika s dijabetesom u odnosu na ispitanike bez dijabetesa, pri čemu su koncentracije u ispitanika s dijabetesom bile više u odnosu na ispitanike bez dijabetesa (tablica 4.5.3.2).



#### 4.5.4 Odnos biomarkera angiogeneze i ostalih biokemijskih pretraga

U tablicama 4.5.3.3. i 4.5.3.4. prikazane su korelacije između biomarkera angiogeneze i ostalih istraživanih biokemijskih pretraga za ispitanike i kontrolnu skupinu.

Tablica 4.5.3.3 Korelacije biomarkera angiogeneze i ostalih istraživanih biokemijskih parametara u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Biokemijski parametar (jedinice)	VEGF( ng/L)		Ang-2 (ng/L)		Tie-2 (µg/L)	
	r	P	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,01	0,955	-0,07	0,489	0,02	0,861
Ukupni kolesterol (mmol/L)	-0,13	0,182	-0,02	0,839	0,08	0,424
HDL-kolesterol (mmol/L)	-0,26	0,006	-0,14	0,134	0,03	0,735
LDL-kolesterol (mmol/L)	-0,05	0,581	0,01	0,955	0,01	0,909
CRP (mg/L)	0,45	<0,001	0,36	<0,001	0,25	0,008
PON1(U/L)	-0,10	0,297	-0,10	0,277	-0,04	0,650
NaCl-PON1(U/L)	-0,09	0,371	-0,11	0,263	-0,04	0,645
PAF-AH (U/L)	-0,12	0,267	0,10	0,328	-0,04	0,468
VEGF(ng/L)	-	-	0,23	0,016	0,02	0,821
Ang-2 (ng/L)	0,23	0,016		-	0,19	0,042
Tie-2 (µg/L)	0,02	0,821	0,19	0,042	-	-

Spearman-ova korelacija

U kontrolnoj skupini nađena je statistički značajna povezanost između koncentracije Tie-2 receptora i koncentracije ukupnog kolesterola, te bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze.

U ispitanika s perifernom arterijskom bolesti koncentracije VEGF-a, Ang 2 i Tie-2 značajno su korelirale sa CRP-om (slika 4.5.3.1.-4.5.3.3.), a nađena je i statistički značajna povezanost između koncentracija VEGF-a i HDL-kolesterola (slika 4.5.3.4.).

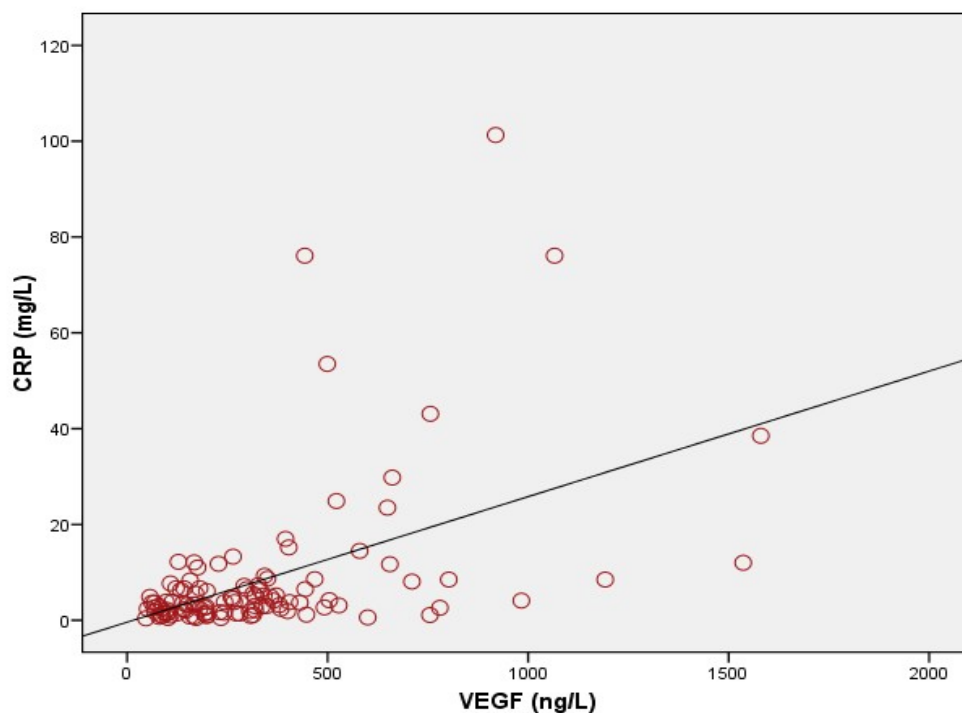
Budući da su u istraživanoj skupini sva tri biomarkera angiogeneze korelirala sa koncentracijom CRP-a, ispitali smo da li se koncentracije VEGF-a, Ang-2 i Tie-2 razlikuju ovisno o koncentraciji CRP-a, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika (tablica 4.5.3.4 i slike

4.5.3.4-4.5.3.6). Post hoc analizom (MannWhitney testom) statistički značajna razlika nađena je između ispitanika niskog i visokog rizika u koncentraciji VEGF-a (P=0,011), Ang-2 (P<0,001) i Tie-2 receptora (P=0,005), kao i između ispitanika umjerenog i visokog kardiovaskularnog rizika u koncentraciji VEGF-a (P=0,012), Ang-2 (P<0,001) i Tie-2 receptora (P=0,02). Između skupina ispitanika niskog i umjerenog kardiovaskularnog rizika nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji VEGF-a (P=0,377), Ang-2 (P=0,438) i Tie-2 receptora (p=0,673).

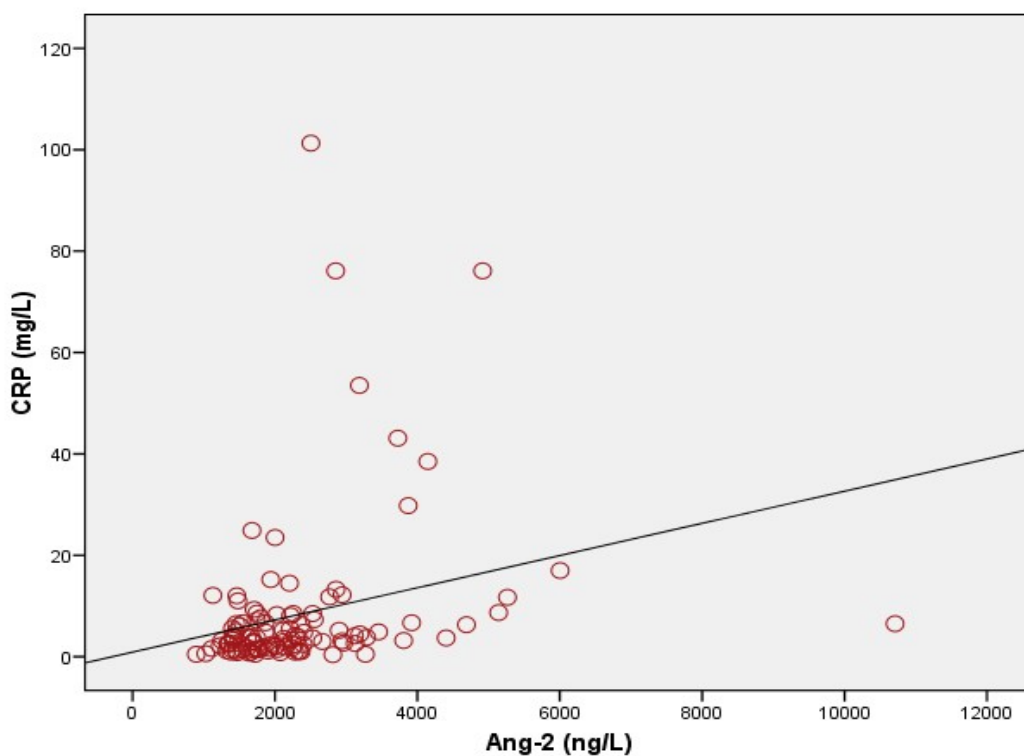
Tablica 4.5.3.4. Korelacije biomarkera angiogeneze i ostalih istraživanih biokemijskih parametara u kontrolnoj skupini

Biokemijski parametar (jedinice)	VEGF( ng/L)		Ang-2 (ng/L)		Tie-2 (µg/L)	
	r	P	r	P	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	0,18	0,191	-0,01	0,917	-0,01	0,930
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,07	0,609	-0,02	0,907	-0,32	0,034
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,00	0,974	0,00	0,975	-0,09	0,546
LDL-kolesterol (mmol/L)	-0,01	0,926	0,04	0,785	-0,23	0,129
CRP (mg/L)	0,11	0,417	0,26	0,058	0,06	0,711
PON1(U/L)	0,09	0,528	-0,06	0,695	-0,32	0,042
NaCl-PON1(U/L)	0,09	0,520	-0,05	0,738	-0,31	0,044
VEGF(ng/L)	-	-	0,02	0,892	0,00	0,998
Ang-2 (ng/L)	0,02	0,892	-	-	0,07	0,669
Tie-2 (µg/L)	0,00	0,998	0,07	0,669	-	-

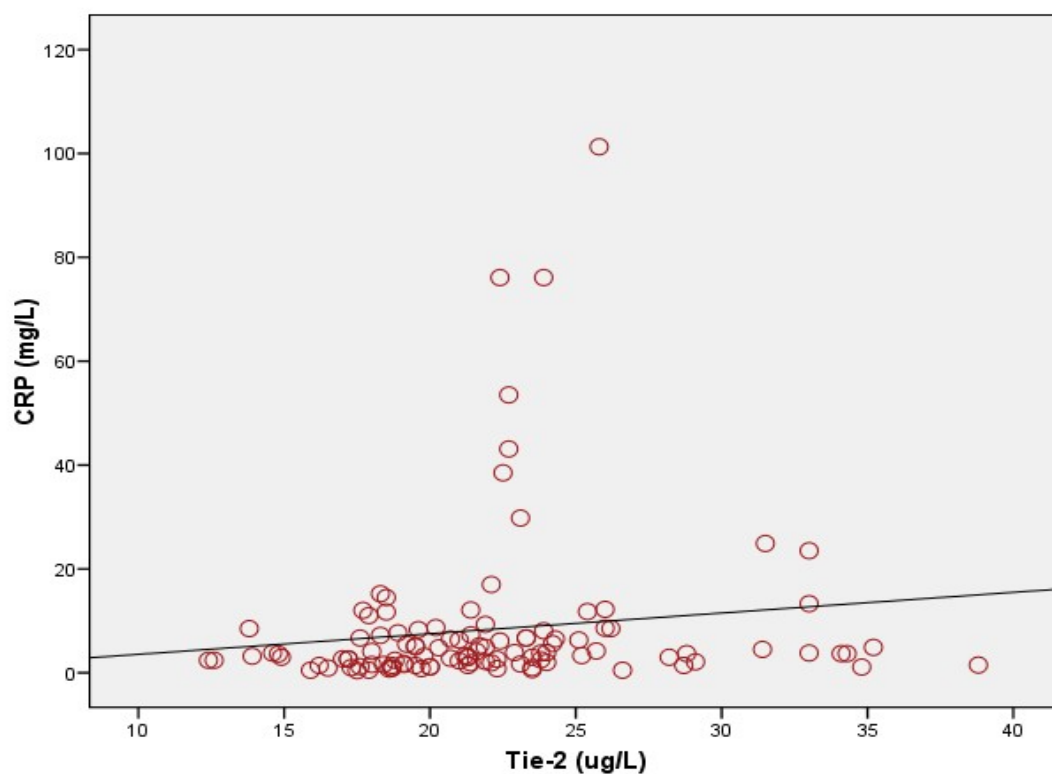
Spearman-ova korelacija



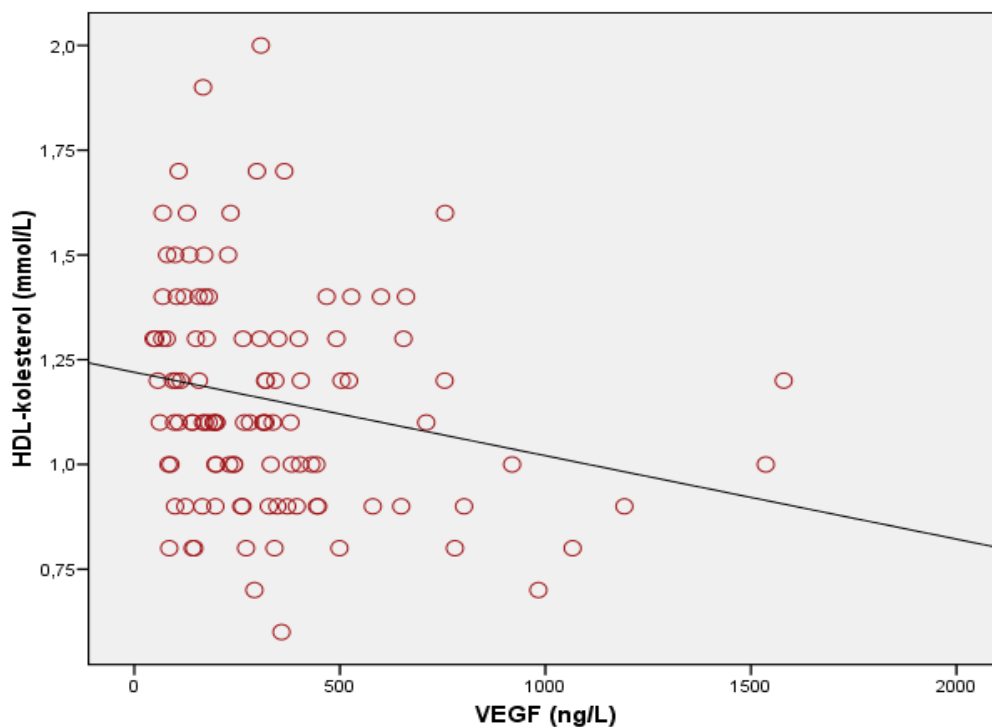
Slika 4.5.3.1. Korelacija koncentracija VEGF-a i CRP-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,45$ ;  $P<0,001$ ).



Slika 4.5.3.2. Korelacija koncentracija Ang-2 i CRP-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,36$ ;  $P<0,001$ ).



Slika 4.5.3.3. Korelacija koncentracija Tie-2 receptora i CRP-a u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r=0,25$ ;  $P=0,008$ ).

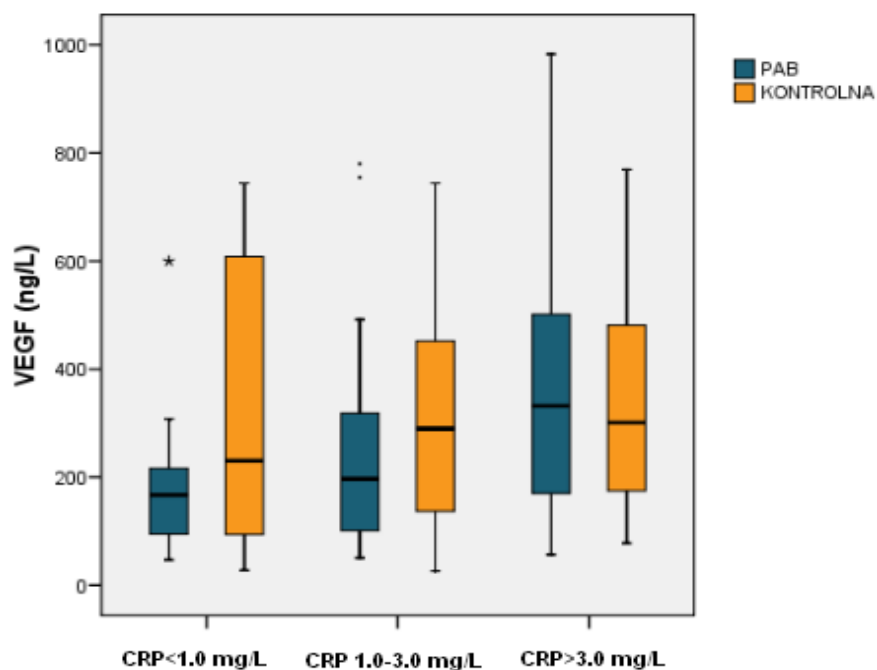


Slika 4.5.3.4. Korelacija koncentracija VEGF-a i HDL-kolesterola u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti ( $r= -0,26$ ;  $P=0,006$ ).

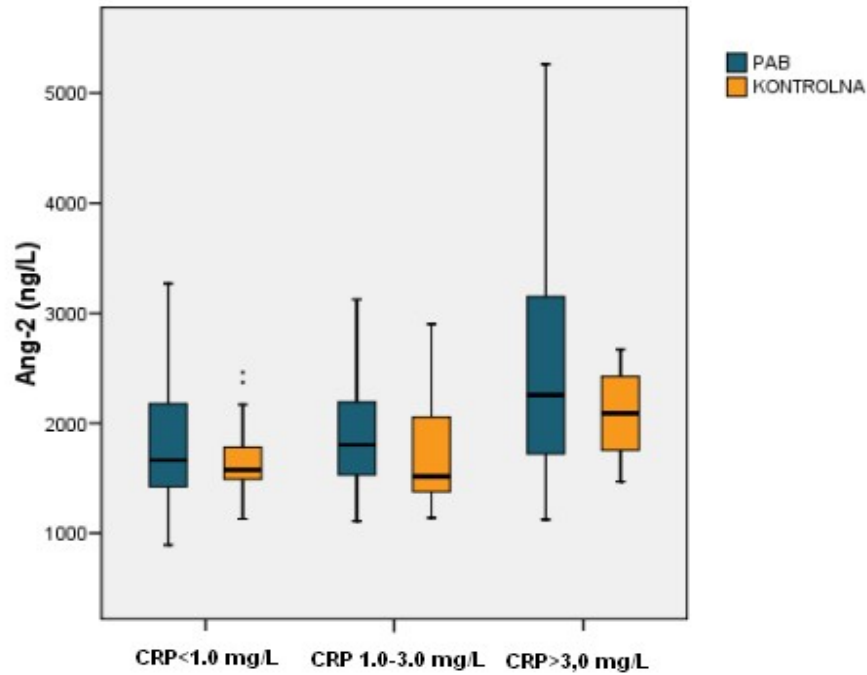
Tablica 4.5.3.4 Koncentracije istraživanih biokemijskih parametara prema CRP-u, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti

Biokemijski parametar (jedinice)	Ispitanici (n=110)			P
	niskog rizika	umjerenog rizika	visokog rizika	
Trigliceridi (mmol/L)	1,59 (1,32-2,21)	1,97 (1,39-2,40)	0,87 (1,19-2,38)	0,674
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,60 (4,50-6,00)	5,55 (4,83-6,10)	5,40 (4,50-6,00)	0,732
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,40 (1,10-1,60)	1,10 (0,93-1,30)	1,10 (0,90-1,30)	0,017
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,40 (2,40-3,80)	3,45 (2,80-4,18)	3,20 (2,70-3,90)	0,549
VEGF (ng/L)	167 (88-234)	197 (100-319)	332 (170-504)	0,002
Ang-2 (ng/L)	1663 (1379-2279)	1803 (1527-2216)	2256 (1707-3185)	0,003
Tie-2 (µg/L)	18,7 (17,5-22,3)	20,4 (17,7-23,4)	22,4 (19,5-25,2)	0,018
PON1 (U/L)	94 (60-281)	145 (70-231)	87 (69-197)	0,608
NaCl-PON1(U/L)	191 (115-616)	320 (135-523)	177(133-430)	0,596
PAF-AH (U/L)	350 (294-458)	417 (355-468)	399 (322-480)	0,452

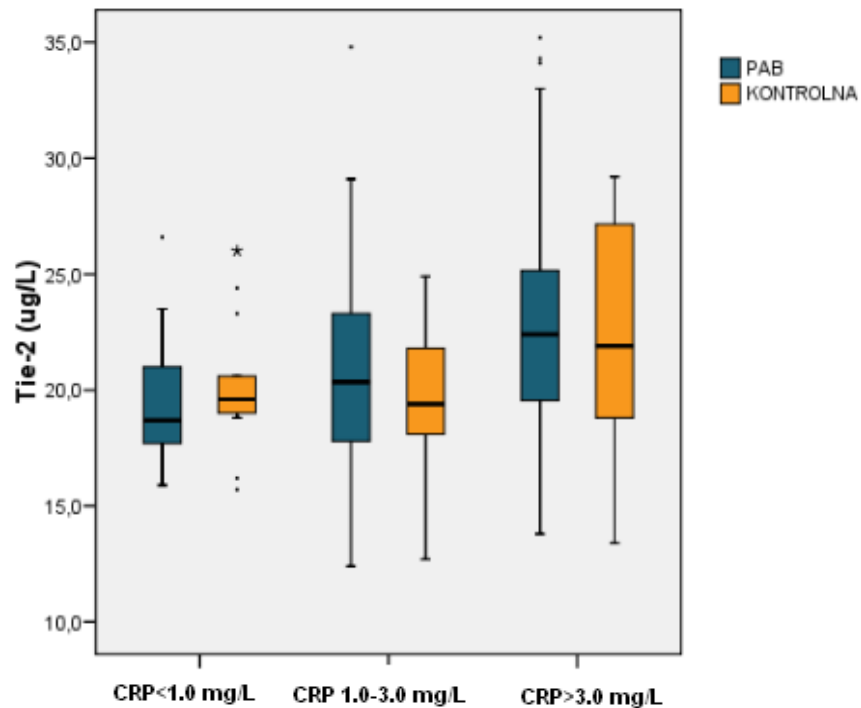
Kruskal Wallisov test, rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)



Slika 4.5.3.4. Koncentracije VEGF-a prema u CRP-a kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini



Slika 4.5.3.5. Koncentracije Ang-2 prema u CRP-a kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.



Slika 4.5.3.6. Koncentracije Tie-2 prema u CRP-a kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (PAB) i kontrolnoj skupini.

#### 4.6 ODNOS ISTRAŽIVANIH BIOKEMIJSKIH PRETRGA I STUPNJA ANGIOGRAFSKIH PROMJENA PERIFERNIH ARTERIJA

Da bi ispitali povezanost istraživanih biokemijskih pretraga sa angiografski utvrđenim stupnjem stenotičko-okluzivnih promjena perifernih arterija napravljena je Spearmanova korelacija pokazatelja lipidnog statusa, CRP-a, katalitičkih koncentracija enzima PON1 i PAF-AH i biljega angiogeneze sa angiografskim "Merkur"*scorom* (Tablica 4.6.1).

Tablica 4.6.2. Korelacija između angiografskog sustava bodovanja stenotičko-okluzivnih promjena perifernih arterija u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti (angiografski *score*) i istraživanih biokemijskih pretraga

Biokemijska pretraga (jedinica)	Angiografski <i>score</i>	
	r	P
Trigliceridi (mmol/L)	-0,13	0,167
Ukupni kolesterol (mmol/L)	-0,14	0,156
HDL-kolesterol (mmol/L)	0,06	0,539
LDL-kolesterol (mmol/L)	-0,12	0,208
Indeks ateroskleroze	-0,12	0,218
Ukupni kol./HDL kol.	-0,11	0,266
CRP (mg/L)	0,07	0,461
PON1 (U/L)	0,03	0,744
PON1/HDL (U/mmol/L)	0,03	0,794
NaCl-PON1 (U/L)	0,04	0,673
NaCl-PON1 /HDL (U/mmol/L)	0,04	0,702
PAF-AH (U/L)	-0,08	0,450
VEGF (ng/L)	0,08	0,406
Ang-2 (ng/L)	0,04	0,684
Tie-2(μg/L)	0,013	0,171

Spearman-ova korelacija

Međutim ni jedan od istraživanih parametara nije značajno korelirao sa težinom stenotičko okluzivnih promjena. Od tradicionalnih čimbenika rizika jedino je životna dob ispitanika značajno korelirala sa angiografskim *scorom*, kao mjerom anatomske proširenosti aterosklerotski promjena perifernih arterija ( $r=0,33$ ;  $P<0,001$ ).

Angiografski *score* statistički je bio značajno viši u ispitanika sa šećernom bolesti u odnosu na ispitanike bez šećerne bolesti ( $13,77 \pm 6,67$  u odnosu na  $11,02 \pm 5,50$ ;  $P=0,023$ ).

## 5. RASPRAVA

Periferna arterijska bolest sistemska je manifestacija ateroskleroze sa značajnim morbiditetom i mortalitetom. Patofiziološki procesi uključeni u njen nastanak, progresiju i komplikacije su kompleksni i međuovisni. Uključuju interakcije genetskih i okolišnih čimbenika. Patofiziološka zbivanja u perifernoj arterijskoj bolesti čini ishemijska tkiva, a težina kliničke slike ovisi o mjestu i opsegu stenotično-okluzivnih promjena perifernih arterija, te o stanju kolateralne cirkulacije. Ishemija pokreće niz biokemijskih reakcija koje direktno ili indirektno dovode do poremećene endotelne homeostaze. Disfunkcionalni endotel ne uspeva održati adhezijsko koagulacijsku neutralnost cirkulirajuće krvi, niti regulirati tonusnu aktivnost arterija. Pored poremećaja žilne motorike i poticanja nastanka ateroskleroze, endotel aktivno modulira arhitekturu već stvorenih aterosklerotskih plakova i potiče vulnerabilnost lezija koje tako postaju sklone rupturi i izravno vode razvoju tromboembolijskih incidenata (106). Uloga novih biopokazatelja upale, tromboze, metabolizma lipoproteina i oksidativnog stresa koji sudjeluju u regulaciji vaskularne homeostaze intenzivno se istražuje s ciljem ranijeg otkrivanja i boljeg razumjevanja etiologije i progresije periferne arterijske bolesti kao i razvoja novih terapijskih mogućnosti (39).

### 5.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na skupini ispitanika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnoj skupini.

Skupinu ispitanika činilo je 110 osoba, dobi od 40 do 84 godine (91 muškarac i 19 žena), kojima je dijagnoza periferne arterijske bolesti potvrđena metodom digitalne suptrakcijske angiografije. Njihovi demografski i biometrički podaci, te metabolički, terapijski, klinički i angiografski status dobiveni su iz upitnika za ispitanike s perifernom aterosklerozom (Prilog 2). Angiografski status određen je prema kriterijima hemodinamske značajnosti stenoze perifernih arterija i lokalizaciji stenotično okluzivnih promjena. Obzirom da su u većine bolesnika nađene multiple stenoze i/ili okluzije nerjetko na više arterija, za preciznu mjeru težine aterosklerotskih promjena učinjeno je bodovanje naknadnom analizom angiografskih slika. Za svakog je pacijenta određen angiografski "Merkur" score, procjenom lezija na svim analiziranim perifernim arterijama (Prilog 3). Ukupno je obuhvaćena 21 arterija: terminalna aorta i deset arterija svakog ekstremiteta. Bodovanje je izvršeno prema kriterijima hemodinamske značajnosti stenoze, a ukupan zbroj svih bodova (angiografski



"Merkur" *score*) za ispitanika je predstavljao jedinstvenu mjeru anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena.

Za kontrolnu skupinu odabrano je 118 osoba (57 muškaraca i 61 žena), dobi od 43 do 82 godine, koje su ispunjavale slijedeće kriterije: izmjereni krvni tlak manji od 145/90 mmHg, bez znakova dijabetesa, uz odsustvo uzimanja lipolitika, antihipertenzivne i hormonske nadomjesne terapije, uz saznanje o izostanku simptoma moždane i/ili koronarne ishemije, a kojima je CD-ultrazvučnim pregledom arterija donjih ekstremiteta isključeno postojanje periferne arterijske bolesti.

Ispitanici i kontrolna skupina statistički su se značajno razlikovali ( $P < 0,05$ ) prema dobi, spolu, prisustvu hipertenzije, dijabetesa, uživanju duhana, terapiji lipoliticima i antihipertenzivima, te prisutnim simptomima cerebrovaskularne i koronarne bolesti. Istraživane skupine nisu se značajno razlikovale prema indeksu tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI), koji je izračunat iz biometrijskih podataka, kao omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima ( $\text{kg/m}^2$ ).

## **5.2 LIPIDNI STATUS I C-REAKIVNI PROTEIN**

Koncentracije triglicerida bile su statistički značajno više, a koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola bile su značajno niže u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. U ispitanika su nađene statistički značajno više vrijednosti indeksa ateroskleroze, kao i omjera ukupnog i HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu.

Pokazatelji lipidnog statusa nisu se statistički značajno razlikovali u ispitanika muškog i ženskog spola. U kontrolnoj skupini, žene su u odnosu na muškarce imale statistički značajno više koncentracije ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola, te značajno niže vrijednosti omjera koncentracije ukupnog i HDL-kolesterola. Koncentracije triglicerida i indeksa ateroskleroze, nisu se značajno razlikovali prema spolu u kontrolnoj skupini.

Hiperlipidemije, a osobito aterogene dislipidemije, odavno su poznati čimbenici rizika za perifernu arterijsku bolest (19, 20, 22, 107). Prema aktualnim smjernicama Transatlanskog konzorcija (20) neovisni čimbenici rizika za razvoj PAB uključuju povećanu koncentraciju kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i lipoproteina (a), dok povećane koncentracije HDL-kolesterola i apolipoproteina a-1 imaju zaštitnu ulogu.

Povećana koncentracija triglicerida u krvi, sama za sebe predstavlja čimbenik rizika za

perifernu arterijsku bolest (108), i povezana je sa progresijom i razvojem komplikacija (20). Hipertrigliceridemija je povezana s nekoliko aterogenih čimbenika, uključujući povišene koncentracije trigliceridima bogatih lipoproteina i aterogeni lipoproteinski fenotip, koji se sastoji od malih gustih LDL-čestica te niskog HDL-kolesterola. Čimbenici koji doprinose hipertrigliceridemiji u općoj populaciji obuhvaćaju pretilost, prekomjernu težinu, fizičku neaktivnost, pretjerani unos alkohola, prehranu bogatu ugljikohidratima, šećernu bolest tipa 2, te neke druge bolesti (109).

Framingtonsko istraživanje pokazalo je da je koncentracija kolesterola veća od 7 mmol/L povezana sa dvostrukom incidencijom intermitentne klaudikacije, pri čemu se omjer ukupnog i HDL kolesterola pokazao kao bolji prediktor pojavnosti bolesti (20). U Bazelskom ispitivanju uočeno je da osobe s povećanom koncentracijom kolesterola imaju dva puta veći rizik za perifernu arterijsku bolest u odnosu na osobe s normalnom koncentracijom kolesterola. Osim toga osobe s povećanom koncentracijom kolesterola i triglicerida imaju čak tri puta veći rizik. Kasnija su ispitivanja ukazala na povezanost između povećane koncentracije LDL-kolesterola i progresije periferne arterijske bolesti. U nekoliko ispitivanja uočeno je da bolesnici s perifernom arterijskom bolesti imaju povišenu koncentraciju aterogenih malih gustih LDL-čestica, a nisku koncentraciju HDL kolesterola (19). Premda su neka istraživanja ukazala da je ukupni kolesterol snažan čimbenik rizika za razvoj periferne arterijske bolesti druga istraživanja nisu to uspjela potvrditi. Smatra se da pušenje može povećati učinak hiperkolesteremije. Međutim evidentno je da liječenje hiperlipidemije smanjuje progresiju periferne arterijske bolesti i incidenciju intermitentne klaudikacije (20).

Aktualne smjernice za liječenje hiperlipidemija u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti prema Transatlantskom konzensusu odnose se na sniženje koncentracija LDL kolesterola i triglicerida te povećanje koncentracije HDL kolesterola (20). Preporuča se održavati koncentracije LDL-kolesterola ispod 2,59 mmol/L u svih bolesnika s perifernom arterijskom bolesti, a kod pacijenata visokog rizika (sa prisutnom aterosklerotskom bolešću u drugim vaskularnim teritorijima) čak ispod ispod 1,81 mmol/L. Optimalne doze statina uglavnom postižu ciljne vrijednosti LDL kolesterola i smanjuju kardiovaskularna događanja za 20-35%. Međutim statini ne mogu kontrolirati preostali rizik od 65-80%, ovisan o aterogenoj dislipidemiji, povišenim trigliceridima i sniženom HDL kolesterolu.

Niske koncentracije HDL-kolesterola povezane su s povećanim rizikom koronarne bolesti. Taj je odnos zapažen bez obzira na dob, vrijednost krvnog tlaka, pretilost, te koncentracije ukupnog ili LDL-kolesterola. Dugotrajno praćenje ispitanika s niskim HDL-

kolesterolom pokazalo je da je njihov rizik razvijanja koronarne bolesti sličan riziku u ispitanika s povišenim ukupnim ili LDL-kolesterolom. Postoji više uzroka niske koncentracije HDL kolesterola, od kojih je nekoliko povezano s inzulinskom rezistencijom, tj. povišenim trigliceridima, prekomjernom težinom i pretilošću, fizičkom neaktivnošću te tipom 2 šećerne bolesti (109). Niska koncentracija HDL-kolesterola, koja je čimbenik rizika u srednjoj životnoj dobi (110), posebno je važna u starijoj životnoj dobi. Uočeno je da HDL kolesterol manji od 0,9 u usporedbi s onim od 1,6 i višim četiri puta povećava rizik koronarne smrti u osoba starih između 71 i 80 godinu, a udvostručuje rizik od onih starijih od 80 godina. Niska koncentracija HDL kolesterola ( $<0,78$  mmol/L) osobito je povezana s koronarnom bolešću u starijih muškaraca (111).

Prema smjernicama Transatlantskog konsenzusa visoke koncentracije HDL kolesterola imaju protektivni značaj u pacijenata s perifernom arterijskom bolesti. HDL ima mnogostrukе učinke i može spriječiti aterogeni proces na nekoliko razina. Najpoznatije je sprječavanje nastanka pjenastih stanica. HDL također priječi oksidativnu modifikaciju LDL-a unutar intime. Za HDL je dokazano da koči citokinima pobuđeni izražaj adhezijskih proteina te inhibira MCP-1. HDL je također antitrombotičan i antiapoptičan. Opće je prihvaćeno da 1%-tni porast HDL-kolesterola pretkazuje 10%-tno smanjenje koronarnih događaja, i to neovisno o promjenama u koncentraciji LDL-kolesterola (109).

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su ulogu hipertrigliceridemije kao čimbenika rizika za perifernu arterijsku bolest. U našem istraživanju 58% ispitanika bilo je na terapiji lipoliticima, te se učinkom terapije mogu objasniti razlike u koncentraciji ukupnog i LDL-kolesterola čije su koncentracije značajno niže u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajno niže koncentracije HDL kolesterola u naših ispitanika mogle bi ukazivati na smanjenu zaštitnu ulogu HDL-kolesterola u perifernoj arterijskoj bolesti.

Koncentracije CRP-a bile su statistički značajno više u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, što je u skladu s našim prijašnjim rezultatima dobivenim kod pacijenata sa stenozom cerebralnih arterija (112). Podjela ispitanika prema koncentraciji CRP-a u tri skupine različitog kardiovaskularnog rizika, pokazala je da se udio ispitanika u pojedinim kategorijama rizika značajno razlikuje između ispitanika i kontrolne skupine. U skupini niskog rizika, uz koncentraciju CRP-a  $<1,0$  mg/L, nalazi se 10% ispitanika i 36% kontrolne skupine. U skupini umjerenog rizika, koncentracije CRP-a od 1,0 do 3,0 mg/L, nalazi se 33% ispitanika i 47% kontrolne skupine, a u skupini visokog rizika, koncentracije CRP  $>3,0$  mg/L nalazi se čak 57% ispitanika i 17%

kontrolne skupine. Ovi rezultati ukazuju da se povišene koncentracije C-reaktivnog proteina, koje su još unutar granica referentnog intervala mogu smatrati dodatnim diskriminirajućim biokemijskim pokazateljem periferne arterijske bolesti.

### **5.3 KATALITIČKE KONCENTRACIJE ENZIMA PON1 i PAF-AH**

PON1 i PAF-AH u serumu su vezane na lipoproteine. PON1 je najvećim dijelom vezana na HDL, za razliku od PAF-AH-a koji je kompleksno vezan na lipoproteine. U normolipemičnih osoba PAF-AH se primarno veže na LDL (70-80%) zbog specifičnih protein-protein interakcija između N-terminalnog dijela PAF-AH-a i C-terminalnog dijela apoB (72). Većina LDL vezane PAF-AH aktivnosti potječe od aterogenih malih gustih LDL čestica (73). Samo mali dio enzima vezan je na HDL. Premda čimbenici koji utječu na raspodjelu PAF-AH-a između HDL-a i LDL-a nisu jasno ustanovljeni, poznato je da je raspodjela PAF-AH-a između LDL i HDL-a promjenjena u različitim tipovima dislipidemija, te da je uloga PAF-AH u plazmi ovisna o vrsti lipoproteinske čestice na kojoj se prenosi u plazmi. Smatra se da PAF-AH vezan na LDL ima aterogeno djelovanje, dok PAF-AF vezan na HDL ima antiaterogeno djelovanje (74). Promjene u sastavu i koncentraciji lipoproteina i apoproteina mogu biti razlogom promjenjenih aktivnosti enzima. Stoga se klinički značaj PON1 i PAF-AH-a u razvoju stenotičko okluzivnih promjena perifernih arterija kod pacijenata s perifernom arterijskom bolesti ne može razmatrati bez lipidnog statusa. Kako bi se eliminirao mogući utjecaj koncentracije lipoproteinskih čestica na aktivnost enzima vezanih na lipoproteine provedena je standardizacija katalitičkih koncentracija enzima prema koncentraciji lipoproteinske čestice na koju su dominantno vezani. Katalitičke koncentracije PON1 standardizirane su prema HDL-kolesterolu, a katalitičke koncentracije PAF-AH-a standardizirane su prema LDL-kolesterolu.

Katalitičke koncentracije PAF-AH-a nisu se značajno razlikovale između ispitanika i kontrolne skupine, za razliku od njihovih standardiziranih katalitičkih koncentracija (PAF-AH/LDL) koje su bile statistički značajno veće ( $<0,001$ ) u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Katalitičke koncentracije PAF-AH-a značajno su se razlikovale po spolu u kontrolnoj skupini, pri čemu su žene ( $n=36$ ) imale niže vrijednosti od muškaraca ( $n=28$ ), što je u skladu s literaturnim podacima (113,114). Žene su imale i niže standardizirane katalitičke koncentracije PAF-AH-a u obje istraživane skupine. Promjene u katalitičkoj koncentraciji PAF-AH-a ovisne su o koncentraciji parametara lipidnog statusa, pri čemu statistički značajnu

pozitivnu korelaciju pokazuje katalitička koncentracija PAF-AH-a sa koncentracijom triglicerida, ukupnog i LDL kolesterola, indeksa ateroskleroze i omjera ukupnog i HDL kolesterola. Statistički značajna negativna povezanost nađena je između katalitičke koncentracije PAF-AH-a i koncentracije HDL-kolesterola u kontrolnoj skupini, što je u skladu s literaturnim podacima (113,115,116). Katalitičke koncentracije PAF-AH-a nisu korelirale sa koncentracijom CRP-a u obje istraživane skupine.

Poznato je da na katalitičke koncentracije PAF-AH-a značajno utječe i terapija lipoliticima. Ispitanici na terapiji lipoliticima (42% od ukupnog broja naših ispitanika) imali su značajno niže katalitičke koncentracije PAF-AH-a ( $P=0,032$ ), što je u skladu sa literaturnim podacima (117-119).

Dobiveni rezultati su u skladu sa našim prijašnjim rezultatima dobivenim za bolesnike sa lezijama cerebralnih arterija (115, 120). Međutim u ovom istraživanju nismo potvrdili naše prijašnje rezultate dobivene kod 182 bolesnika sa perifernom arterijskom bolesti, čije su katalitičke koncentracije PAF-AH-a bile značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu (121). Razlike u dobivenim rezultatima mogu se tumačiti razlikama u broju bolesnika uključenih u ispitivanje i brojem bolesnika koji su uzimali lipolitike. Terapija lipoliticima, osim što utječe na koncentracije lipida, značajno smanjuje i katalitičke koncentracije PAF-AH-a. Osim toga katalitičke koncentracije PAF-AH-a su u značajnom pozitivnom odnosu sa koncentracijama triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola. Stoga promjene u aktivnosti enzima mogu biti odraz i promjenjenih koncentracija lipidnih parametara, osobito ako se promatraju standardizirane katalitičke koncentracije PAF-AH-a prema LDL kolesterolu. Nameće se zaključak kako katalitičke koncentracije PAF-AH-a ne predstavljaju značajan dijagnostički biokemijski pokazatelj u pacijenata sa perifernom arterijskom bolesti.

Katalitičke koncentracije PON1 bile su statistički značajno niže u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s literaturnim podacima (62) i našim prijašnjim rezultatima (122). Katalitičke koncentracije PON1, nisu se značajno razlikovale prema spolu u ispitanika i kontrolnoj skupini. U ispitanika nije nađena statistički značajna povezanost između katalitičkih koncentracija PON1 i parametara lipidnog statusa ili CRP-a. Katalitičke koncentracije PON1 nisu se značajno razlikovale između ispitanika sa i bez šećerne bolesti, pušača i nepušača, kao i kod onih na i bez terapije lipoliticima ili antihipertenzivima.

Da bi ispitali da li su promjene u katalitičkoj koncentraciji PON1 povezane sa promjenama u koncentraciji HDL-kolesterola, koji je bio statistički značajno niži u skupini ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike, standardizirali smo katalitičke koncentracije

prema HDL-kolesterolu. Standardizirane katalitičke koncentracije paraoksonaze, bazalne i stimulirane, nisu se razlikovale između istraživanih skupina, što ukazuje da je smanjenje katalitičkih koncentracija paraoksonaze proporcionalno smanjenju HDL kolesterola. Istraživanjem povezanosti katalitičkih koncentracija paraoksonaze i parametara lipidnog statusa nije uočena povezanost između katalitičkih koncentracija PON1 i NaCl-PON1 sa koncentracijama triglicerida, ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola u istraživanim skupinama. Nepostojanje povezanosti između katalitičkih koncentracija paraoksonaze i HDL kolesterola, ukazuje da snižene vrijednosti paraoksonaze nisu uzrokovane sniženim koncentracijama HDL kolesterola, već nekih drugih čimbenika.

Na aktivnost i koncentraciju paraoksonaze utječe niz genetskih, ali i negenetskih čimbenika, uključujući ishranu, životni stil i čimbenike okoliša. Enzim pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost, pri čemu serumske aktivnosti mogu varirati značajno više od serumskih koncentracija enzima (40 puta u odnosu na 13 puta). Pasqualini i suradnici (62) dokazali su da neovisno o genetskim i okolišnim čimbenicima, aktivnost paraoksonaze ima zaštitni učinak na endotelnu funkciju u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti, te da su niske aktivnosti paraoksonaze povezane sa endotelnom disfunkcijom u bolesnika sa simptomatskom perifernom arterijskom bolesti.

Naši rezultati ukazuju da periferna arterijska bolest može inducirati promjene u enzimskoj aktivnosti, koncentraciji enzima ili u vezanju enzima na HDL-kolesterol. Smanjena paraoksonazna aktivnost može biti uzrok smanjene zaštitne uloge HDL-kolesterola u perifernoj arterijskoj bolesti, te može pridonositi povećanom riziku od prijevremene ateroskleroze kod rizičnih skupina bolesnika.

#### **5.4 POLIMORFIZMI *pon1* I *pon2* GENA**

Razdioba genotipova i alela *pon1* i *pon2* gena u kontrolnoj skupini, sukladna je našim prijašnjim rezultatima (123,124) i frekvenciji alela određenoj za hrvatsku i ostale evropske populacije (tablica 5.1).

U kontrolnoj skupini najzastupljeniji genotip za Q192R polimorfizam *pon1* gena bio je QQ (49%), zatim QR (47%), a najmanje zastupljen je bio genotip RR (6%). Za polimorfizam L55M *pon1* gena najzastupljeniji genotip bio je LM (52%), zatim LL (38%), a najmanje zastupljen genotip bio je MM (10%). Za polimorfizam -108 C>T *pon1* gena najzastupljeniji genotip bio je CT (61%), zatim CC (26%), te TT (12%) kao najmanje zastupljen genotip.

Razdioba genotipova u polimorfizmu S311C *pon2* gena pokazala je da je najučestaliji SS (57%), zatim SC (41%), te CC (1%) kao najmanje zastupljen genotip.

Tablica 5.1: Frekvencija alela *pon1* i *pon2* gena u evropskim populacijama

Populacija	Q192R		L55M		-108C>T		S311C		Literatura
	Q	R	L	M	C	T	S	C	
Hrvatska (n=73)	0,73	0,27	0,64	0,36	0,57	0,43	0,78	0,22	Naši rezultati
Hrvatska (n=166)	0,77	0,23	0,66	0,34	0,54	0,46	-	-	125
Velika Britanija (n=47)	0,78	0,22	0,70	0,30	0,52	0,48	-	-	126
Velika Britanija (n=405)	0,71	0,29	0,63	0,37	-	-	0,74	0,26	127
Italija (n=273)	0,71	0,29	0,60	0,40	-	-	0,80	0,20	128
Španjolska (n=388)	0,70	0,30	0,63	0,37	-	-	-	-	129

Frekvencije genotipova Q192R i -108C>T polimorfizama *pon1* gena značajno se razlikuju između ispitanika i kontrolne skupine, pri čemu je u ispitanika nađena veća učestalost QQ genotipa za Q192R polimorfizam, odnosno CC genotipa za -108C>T polimorfizam. Omjer izgleda da bolesnici s perifernom arterijskom bolesti imaju QQ genotip u odnosu na QR i RR genotip iznosi 3,65 sa 95% intervalom pouzdanosti od 1,82 do 7,33. Stoga osobe sa QQ genotipom imaju 3,7 puta veću vjerojatnost razvoja periferne arterijske bolesti u odnosu na osobe s QR ili RR genotipom. Omjer izgleda da bolesnici s perifernom arterijskom bolesti imaju CC genotip u odnosu na CT i TT genotip iznosi 3,5 uz 95% interval pouzdanosti od 1,42 do 8,59. Međutim zbog malog broja ispitanika uključenih u istraživanje navedene rezultate potrebo je potvrditi na većim skupinama bolesnika s perifernom arterijskom bolesti. Frekvencije genotipova L55M *pon1* gena i S311C *pon2* gena ne razlikuju se značajno između istraživanih skupina.

Frekvencije alela Q192 R polimorfizma *pon1* gena značajno se razlikuju između ispitanika i kontrolne skupine, pri čemu ispitanici imaju veću učestalost Q alela ( $P<0,001$ ). Vjerojatnost da oboljeli od periferne arterijske bolesti imaju Q alel 2,3 puta veća u odnosu na R alel sa 95% intervalom pouzdanosti od 1,31-4,10. Frekvencije alela L55M i -108C>T

polimorfizama *pon1* gena i S311C polimorfizma *pon2* gena ne razlikuju se značajno između istraživanih skupina.

Naši rezultati su sukladni rezultatima Pasqualini i suradnika (62) koji su istraživali utjecaj Q192R polimorfizma *pon1* gena i aktivnosti paraoksonaze na endotelnu funkciju u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti. Od 37 istraživanih bolesnika, njih 49% imalo je QQ genotip, 40% je imalo QR genotip, a 11% RR genotip. Zbog malog broja bolesnika s RR genotipom, bolesnici s QR i RR genotipom su objedinjeni u istu skupinu. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da bolesnici s QQ genotipom i nižom aktivnosti paraoksonaze imaju značajno oštećenje endotelne funkcije, iskazano prema sposobnosti vazodilatacije brahijalne arterije u odnosu na bolesnike s QR/RR genotipom i višom aktivnošću paraoksonaze.

U dostupnoj literaturi nije bilo moguće pronaći podatke o frekvencijama i značaju ostalih istraživanih polimorfizama *pon1* i *pon2* gena u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti. Međutim na temelju brojnih istraživanja objavljenih o značaju genetskih polimorfizama za razvoj koronarne bolesti i moždanog udara, može se zaključiti da postoje složene interakcije između genetskih i okolišnih čimbenika u razvoju ateroskleroze. Nedosljedni rezultati o povezanosti polimorfizma paraoksonaze i rizika razvoja kardiovaskularnih bolesti mogu bar djelomično biti uvjetovani fiziološkom ulogom paraoksonaze, koja ima minornu ulogu u ranijim stadijima kardiovaskularnih bolesti, a mnogo snažniju ulogu u interakcijama s metabolizmom glukoze i lipida, te u razvoju makrovaskularnih promjena. Razlike u raspodjeli genotipova mogu biti povezane sa težim kardiovaskularnim promjenama u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima (130).

Bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze značajno se razlikuju ovisno o genotipovima *pon1* i *pon2* gena u obje skupine, što je u skladu s literaturnim podacima (62, 26). Ispitanici s QQ genotipom polimorfizma Q192R *pon1* gena imali su statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s QR ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ) i RR genotipom ( $P=0,001$ ;  $P=0,001$ ). U kontrolnoj skupini, osobe s QQ genotipom imale su statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s QR ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ) i RR genotipom ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ), kao i osobe s QR genotipom u odnosu na RR genotip ( $P=0,019$ ;  $P=0,017$ ).

Ispitanici s LL genotipom polimorfizma L55M *pon1* gena imali su statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s LM ( $P=0,016$ ;  $P=0,017$ ) i MM genotipom ( $P<0,001$ ;  $P<0,001$ ), kao i ispitanici s LM genotipom u odnosu na MM genotip ( $P=0,001$ ;  $P<0,001$ ). U kontrolnoj skupini, osobe s LL genotipom



imale su statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s LM (P=0,003; P=0,002) i MM genotipom (P<0,001; P<0,001), kao i osobe s LM genotipom u odnosu na MM genotip (P=0,003; P=0,002).

Ispitanici s CC genotipom polimorfizma -108C>T *pon1* gena imali su statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s TT genotipom (P=0,002; P=0,002, kao i ispitanici s CT genotipom u odnosu na TT genotip (P=0,011; P=0,020). U kontrolnoj skupini, osobe s CC genotipom imale su statistički značajno više katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na osobe s CT (P=0,009; P=0,015) i TT genotipom (P=0,009; P=0,009). Katalitičke koncentracije NaCl-PON1 u osoba s CT genotipom značajno su više u odnosu na osobe s TT genotipom, za razliku od katalitičkih koncentracija PON1, koje se ne razlikuju značajno između ispitanika s CT i TT genotipom (P=0,082).

Ispitanici s SS genotipom polimorfizma S311C *pon2* gena imali su statistički značajno niže katalitičke koncentracije PON1 i NaCl-PON1 u odnosu na ispitanike s SC genotipom (P=0,010; P=0,010), kao i osobe s SS genotipom u odnosu na osobe s SC genotipom u kontrolnoj skupini (P=0,002; P=0,001).

Zaključno, naši rezultati ukazuju da su polimorfizmi Q192R i - 108C>T *pon1* gena povezani sa perifernom arterijskom bolesti. Razlika u frekvenciji Q i R alela između bolesnika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnih ispitanika može biti jedan od uzroka sniženih aktivnosti paraoksonaze kod ovih bolesnika.

## **5.5 KONCENTRACIJE BIOMARKERA ANGIOGENEZE**

Endotelna disfunkcija presudna je poveznica rizičnih čimbenika i ateroskleroze, te ima važnu ulogu u patofiziologiji periferne arterijske bolesti (32). Vaskularno remodeliranje, kao adaptivni odgovor na hemodinamske i biokemijske stresore, obilježeno je progresivnim strukturnim i funkcionalnim promjenama stijenke krvnih žila, te prethodi razvoju kardiovaskularnih bolesti. Novija istraživanja ukazuju da u regulaciji vaskularne homeostaze angiopoietin Tie ligand receptor sistem ima ključnu ulogu. Manje kliničke studije su pokazale da su koncentracije Ang-2, Tie-2 ili oba nađene u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti (87), u bolesnika sa kongestivnim zatajenjem srca (131), u bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom (85), u bolesnika sa hipertenzijom (90), te da imaju prediktivnu ulogu u infarktu miokarda (132).

U našem istraživanju koncentracije Ang-2, te njegovog tirozin kinaznog receptora Tie-2 u serumu ispitanika bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s rezultatima Findley-a i suradnika (87). Međutim za razliku od rezultata Findley-a i suradnika, koncentracije VEGF-a nisu se statistički značajno razlikovale između istraživanih skupina. Navedene razlike u rezultatima mogu se objasniti njegovom velikom biološkom varijabilnošću. Naime poznato je da se interindividualna i intraindividualna varijabilnost VEGF-a značajno razlikuju ovisno o vrsti uzorka. Kao uzorci za analizu koriste se serum, puna krv i plazma. Intraindividualna varijacija VEGF-a u serumu iznosi 10,7%, u plazmi 14,1%, a u punoj krvi 14,1%. Interindividualna varijacija VEGF-a u serumu iznosi 47,6%, u punoj krvi 28,8%, a u plazmi 18,1% (133). Veća intraindividualna varijabilnost u punoj krvi posljedica je oslobađanja VEGF-a iz limfocita, granulocita, monocita i megakariocita, a varijabilnost ovisi i o postupku lize leukocita, neovisno o primjeni standardiziranih postupaka (133). Obzirom na potencijalnu kliničku primjenu VEGF-a u prognozi, izboru bolesnika i praćenju učinkovitosti anti-VEGF terapije Kong S-Y i suradnici (134) odredili su referentne intervale VEGF-a u serumu i plazmi za populaciju Republike Sjeverne Koreje ELISA metodom, uz korištenje reagensa tvrtke R&D Systems. Referentni intervale određeni su kod 131 osobe dobi od 20 do 78 godina (68 muškaraca i 49 žena). Referentni intervale značajno se razlikuju u serumu i plazmi, pri čemu su vrijednosti u serumu deset do dvadest osam puta veće od vrijednosti u plazmi (tablica 5.2. ).

Tablica 5.2. Referentni intervale VEGF-a, određeni za populaciju Sjeverne Koreje, ELISA metodom, uz primjenu reagensa tvrtke R&D Systems, prema Kong S-Y i sur (135).

Pretraga (jedinica)	Uzorak	Spol	Dob, godine	Referentni interval
VEGF (ng/L)	serum	muškarci	20-78	99,1-1010, 1
		žene	27-65	82,8-971,6
		muškarci, žene	20-78	88,7-1048,7
	EDTA plazma	muškarci	20-78	4,5-78,8
		žene	27-65	2,9-93,6
		muškarci, žene	20-78	3,0-84,9

Osim toga vrijednosti VEGF-a u plazmi ovise i o vrsti antikoagulansa, pri čemu su vrijednosti određene uz upotrebu EDTA, kao antikoagulansa značajno više u odnosu na heparin kao antikoagulans (tablica 5.3). Osim VEGF-a i koncentracije Ang-2 i Tie-2

receptora, statistički se značajno razlikuju prema spolu (tablica 5.4 ) i vrsti uzorka (tablica 5.5. i 5.6.).

Od istraživanih parametara, jedino je VEGF pokazao statistički značajnu negativnu korelaciju s dobi u kontrolnih ispitanika. Koncentracije Ang-2 bile su statistički značajno više u žena kontrolne skupine. Ostali parametri nisu se statistički značajno razlikovali između ispitanika muškog i ženskog spola u istraživanim skupinama.

Tablica 5.3. Vrijednosti VEGF-a u različitim uzorcima kod 37 zdravih osoba, koje je odredio proizvođač reagensa, R&D Systems, u svrhu analitičke evaluacije testa Quantikine, Human VEGF Immunoassay, Kat. br. DVE00, SVE00, PDVE00.

Uzorak	Srednja vrijednost detektiranih uzoraka VEGF (ng/L)	% Detektiranih uzoraka	Raspon vrijednosti VEGF (ng/L)
serum	220	100	62-707
EDTA-plazma	61	24	ND*-115
Heparin-plazma	41	22	ND-55

\*ND=nije određeno (engl. Non-detectable)

Tablica 5.4. Koncentracije Ang-2 i Tie-2 određene u serumu 3778 osoba srednje životne dobi, 2018 muškaraca i 1760 žena u populaciji Sjedinjenih Američkih država, treće generacije Framingham Hearth Study, ELISA metodom, uz primjenu reagensa tvrtke R&D Systems, (136).

Pretraga (jedinica)	Spol	Dob, godine (X±SD)	Vrijednosti	
			median	interkvantilni raspon
Ang-2 (ng/L)	muškarci	40±9	1710	1340-2230
	žene	40±9	2010	1520-2720
Tie-2 (µg/L)	muškarci	40±9	15,02	12,71-18,29
	žene	40±9	14,35	12,02-17,42

Koncentracije VEGF, Ang-2 i Tie-2 određeni u serumu kontrolne skupine bile su u okviru raspona vrijednosti zdravih osoba koje je odredio proizvođač i drugi autori primjenom iste metode i reagensa istog proizvođača (135, 136).

Tablica 5.5. Vrijednosti Ang-2 u različitim uzorcima (serum, EDTA-plazma, heparin- plazma) u zdravih osoba, koje je odredio proizvođač reagensa, R&D Systems, u svrhu analitičke evaluacije testa Quantikine, Human Angiopoietin-2, Kat. br. DANG20, SANG20, PDANG20.

Uzorak	n	Ang-2 (ng/L)		
		Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Raspon vrijednosti
serum	60	2494	1341	1065-8907
EDTA-plazma	35	1964	808	1071-4389
Heparin-plazma	35	2049	913	1009-4973

Tablica 5.6: Vrijednosti Tie-2 u različitim uzorcima (serum, EDTA-plazma, heparin- plazma) u zdravih osoba, koje je odredio proizvođač reagensa, R&D Systems, u svrhu analitičke evaluacije testa Quantikine, Human Tie-2 Immunoassay, Kat. br. DTE200.

Uzorak	n	Tie-2 ( $\mu\text{g/L}$ )		
		Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Raspon vrijednosti
serum	60	27,4	8,69	18,6-75,3
EDTA-plazma	35	23,9	4,18	16,5-35,7
Heparin-plazma	35	23,4	4,04	17,9-34,2

Značajna razlika u koncentracijama VEGF-a nađena je između ispitanika s dijabetesom u odnosu na ispitanike bez dijabetesa, pri čemu je medijan koncentracija VEGF-a kod dijabetičara bio viši od medijana koncentracija VEGF-a u ispitanika bez dijabetesa. Nije bilo razlike u koncentracijama VEGF-a, kao ni Ang-2 i Tie-2 receptora između pušača i nepušača, kao ni između ispitanika na terapiji i bez terapije lipoliticima i antihipertenzivima.

U kontrolnoj skupini nađena je statistički značajna povezanost između koncentracije Tie-2 receptora i koncentracije ukupnog kolesterola ( $r = -0,32$ ,  $P=0,034$ ), te bazalne ( $r = -0,32$ ,  $P=0,042$ ) i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze ( $r = -0,31$ ,  $P=0,044$ ). U skupini ispitanika VEGF značajno je korelirao sa CRP-om ( $r=0,45$ ,  $P<0,001$ ) i HDL-kolesterolom ( $r=-0,26$ ,  $P=0,006$ ). Angiopoietin-2 je značajno korelirao sa CRP-om ( $r=0,36$ ,  $P<0,001$ ), kao i Tie-2 koji je pokazao slabu ali značajnu povezanost sa CRP-om ( $r=0,25$ ,  $P=0,008$ ).

Obzirom da su u skupini ispitanika, za razliku od kontrolnih ispitanika, sva tri biljega angiogeneze korelirali sa koncentracijom CRP-a, te da je nađena korelacija koncentracija VEGF-a i HDL-kolesterola, ispitali smo da li se koncentracije istraživanih biokemijskih parametara razlikuju ovisno o koncentraciji CRP-a, kao čimbeniku kardiovaskularnog rizika. Koncentracije HDL kolesterola, VEGF, Ang-2 i Tie-2, statistički su se značajno razlikovale između ispitanika različitog kardiovaskularnog rizika, pri čemu su koncentracije HDL-kolesterola bile značajno više kod ispitanika niskog rizika u odnosu na ispitanike umjerenog ( $P=0,004$ ) i visokog rizika ( $P=0,011$ ). Skupine ispitanika umjerenog i visokog kardiovaskularnog rizika nisu se značajno razlikovale u koncentraciji HDL kolesterola ( $P=0,666$ ). Statistički značajna razlika nađena između ispitanika niskog i visokog rizika u koncentraciji VEGF-a ( $P=0,011$ ), Ang-2 ( $P<0,001$ ) i Tie-2 receptora ( $P=0,005$ ), kao i između ispitanika umjerenog i visokog kardiovaskularnog rizika u koncentraciji VEGF-a ( $P=0,012$ ), Ang-2 ( $P<0,001$ ) i Tie-2 receptora ( $P=0,02$ ), dok između skupina ispitanika niskog i umjerenog kardiovaskularnog rizika nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji VEGF-a ( $P=0,377$ ), Ang-2 ( $P=0,438$ ) i Tie-2 receptora ( $p=0,673$ ). Navedeni rezultati ukazuju na povezanost upale i angiogeneze u perifernoj arterijskoj bolesti.

## **5.6 ODNOS ISTRAŽIVANIH BIOKEMIJSKIH PRETRAGA I STUPNJA ANGIOGRAFSKIH PROMJENA PERIFERNIH ARTERIJA**

U ovom istraživanju nije se utvrdila povezanost između istraživanih biokemijskih parametara: triglicerida, ukupnog, HDL-, LDL-kolesterola, CRP-a, te novih biomarkera upale (PAF-AH-a i PON1) i angiogeneze (VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora) sa angiografskim *scorom*, kao mjerom anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija. Od tradicionalnih čimbenika rizika jedino je životna dob ispitanika značajno korelirala sa angiografskim *scorom* ( $r=0,33$ ;  $P<0,001$ ). Ispitanici sa šećernom bolesti imali su statistički značajno veći score u odnosu na ispitanike bez šećerne bolesti ( $13,77 \pm 6,67$  u odnosu na  $11,02 \pm 5,50$ ;  $P= 0,023$ ).

Nedvojbeno je dokazano da upala sudjeluje u svim fazama razvoja aterosklerotskog procesa. Uloga CRP-a, kao nespecifičnog biljega upale i čimbenika kardiovaskularnog rizika u razvoju i progresiji ateroskleroze predmet je brojnih istraživanja. Tzoulaki I. i suradnici su u velikom prospektivnom istraživanju u općoj populaciji u okviru Edinburg Artery Study dokazali ulogu CRP-a, IL-6 i ICAM u progresiji periferne arterijske bolesti. Istraživanje je

obuhvatilo 1582 osoba, dobi od 55 do 75 godina, a progresija bolesti definirana je kao smanjenje pedobrahijalnog indeksa u razdoblju od 5 i 12 godina (53). U istraživanju bolesnika s perifernom arterijskom bolesti koji su imali  $ABI < 0,90$ , vrijednosti CRP-a veće od 3,0 mg/L imale su dodatnu prediktivnu vrijednost za procjenu rizika od neželjnih kardiovaskularnih događanja (39). Iako se u kliničkoj praksi određivanje pedobrahijalnog indeksa smatra se jednostavnim pokazateljem progresije periferne arterijske bolesti, te vrijednosti ABI-a dobro koreliraju sa stupnjem aterosklerotskih promjena perifernih arterija određenih metodom digitalne suptrakcijske angiografije, ove dvije metode predstavljaju različite aspekte procjene težine periferne arterijske bolesti i ne mogu se direktno uspoređivati (136). Nylaende M. i suradnici (136) istraživali su povezanost biljega upale sa težinom periferne arterijske bolesti procjenjene na osnovu angiografskog scorea i pedobrahijalnog indeksa određenog sa i bez opterećenja na pokretnoj traci (Treadmill test). Istraživanje je provedeno na 127 bolesnika dobi 45 do 79 godina sa simptomima intermitentne klaudikacije kojima je angiografski score određen temeljem angiografskih kriterija hemodinamske značajnosti stenoze. Rezultati njihova istraživanja pokazali su značajnu povezanost između MCP-1, CD40L, IL-6 i TNF-alfa sa angiografskim scorom, za razliku od koncentracija CRP-a, IL-10, E-selektina, P-selektina, ICAM-1 i VCAM-1 za koje nije utvrđena značajna povezanost sa angiografskim scorom. ICAM-1 i IL-6 pokazali su statistički značajnu povezanost sa maksimalnom duljinom hodne pruge u Treadmill testu, a nijedan od istraživanih biljega nije korelirao sa pedobrahijalnim indeksom. Prema dostupnim podacima, ovo je jedino istraživanje o povezanosti biljega upale sa stupnjem angiografski utvrđenih aterosklerotskih promjena u bolesnika s perifernom aterosklerozom. Znatno već broj istraživanja ispitivao je povezanost biljega upale sa stupnjem angiografski utvrđenih aterosklerotskih promjena u cerebralnoj i koronarnoj aterosklerozi. Flegar-Meštrić Z. i suradnici u istraživanju 119 bolesnika dobi 43-80 godina sa stenozom ekstrakranijalnih moždanih arterija pokazali značajnu povezanost koncentracije CRP-a sa stupnjem stenoze većim od 70% u odnosu na kontrolnu skupinu s normalnim moždanim arterijama prema ultrazvučnom nalazu (112). Povezanost CRP-a sa angiografski potvrđenom koronarnom aterosklerozom je oprečna. Smatra se da koronarna bolest i CRP neovisno i aditivno pridonose riziku od neželjnih kardiovaskularnih događanja. Angiografskim prikazom otkrivaju se stabilni i nestabilni plakovi, dok CRP ima vrijednost u predviđanju infarkta miokarda ili smrtnog ishoda neovisno o angiografskom nalazu (137, 138). Niccoli G. i suradnici (137) u istraživanju 97 bolesnika sa nestabilnom angiom nisu našli povezanost između bazalnih vrijednosti CRP i težine angiografskih promjena. U

prospektivnom istraživanju koje je obuhvatilo 8139 osoba bez prisustva koronarne arterijske bolesti u okviru Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease (PREVEND) Geluk i suradnici (138) našli su slabu korelaciju između bazalnih koncentracija CRP-a i stupnja angiografskih promjena kod 216 osoba koje su razvile koronarnu bolest tijekom petogodišnjeg razdoblja.

U našem istraživanju nije dokazana povezanost između koncentracije CRP-a i stupnja angiografskih promjena perifernih arterija, što je u skladu s rezultatima Nylaende M. i suradnika. Poznato je da terapija lipoliticima utječe na koncentracije CRP-a, pa nepostojanje povezanosti između koncentracije CRP-a i stupnja angiografskih promjena može biti posljedica terapije lipoliticima ili utjecaja drugih čimbenika koji pridonose intraindividualnoj varijaciji koncentracije CRP-a u naših ispitanika. Moguće je i da neki od biomarkera za koje je utvrđena razlika u koncentracijama između ispitivanih skupina sudjeluju u drugim mehanizmima regulacije vaskularne homeostaze, te imaju značaj u ranijim faza razvoja aterosklerotskih promjena perifernih arterija, koje se ne mogu otkriti metodom digitalne suptrakcijske angiografije.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Skupinu ispitanika činilo je 110 osoba (91 muškarac i 19 žena), dobi od 40 do 84 godine, kojima je dijagnoza periferne arterijske bolesti potvrđena klinički i angiografski metodom digitalne suptrakcijske angiografije, a stupanj aterosklerotskih promjena perifernih arterija određen prema kriterijima hemodinamske značajnosti stenoze i izražen kao angiografski "Merkur" *score*.
2. Za kontrolnu skupinu odabrano je 118 osoba (57 muškaraca i 61 žena), dobi od 43 do 82 godine, a kojima je CD-ultrazvučnim pregledom arterija donjih ekstremiteta isključeno postojanje periferne arterijske bolesti.
3. Ispitivane skupine razlikovale su se prema spolu, dobi, uživanju duhana, prisustvu hipertenzije, dijabetesa, terapiji lipoliticima i antihipertenzivima, te prisutnim simptomima cerebrovaskularne i koronarne bolesti.
4. Koncentracije triglicerida, indeksa ateroskleroze, te omjera ukupnog i HDL-kolesterola bile su statistički značajno više, a koncentracije ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola značajno niže u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Niža vrijednost HDL-kolesterola i viša vrijednost triglicerida kod oboljelih u odnosu na ispitanike kontrolne skupine mogla bi biti pokazatelj i čimbenik rizika za perifernu arterijsku bolest. Razlike u koncentracijama ukupnog i LDL-kolesterola mogli bismo objasniti uzimanjem lipolitika koje je povezano s nižim vrijednostima ovih parametara.
5. Koncentracije CRP-a bile su statistički značajno više u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Udio ispitanika u tri kategorije različitog kardiovaskularnog rizika, prema koncentraciji CRP-a, značajno se razlikuje između istraživanih skupina, što upućuje da bi male promjene u koncentraciji CRP-a koje su još unutar granica referentnog intervala mogle imati značaj u razvoju periferne arterijske bolesti.
6. Katalitičke koncentracije PAF-AH-a ne razlikuju se značajno između istraživanih skupina. Međutim u obje skupine postoji statistički značajna povezanost između katalitičkih koncentracija enzima i pokazatelja lipidnog statusa.. Terapija lipoliticima, osim što utječe na koncentracije lipida, značajno smanjuje i katalitičke koncentracije PAF-AH-a, pa promjene u aktivnosti enzima mogu biti odraz i promjenjenih



koncentracija lipidnih parametara.

7. Bazalne (PON1) i stimulirane katalitičke koncentracije paraoksonaze (NaCl-PON1) značajno su niže u ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije nađena statistički značajna povezanost između katalitičkih koncentracija paraoksonaze i pokazatelja lipidnog stausa, što upućuje da snižene katalitičke koncentracije paraoksonaze nisu uzrokovane sniženom koncentracijom HDL kolesterola, već nekih drugih čimbenika.
8. Frekvencije genotipova Q192R i -108C>T *pon1* gena značajno se razlikuju između ispitanika i kontrolne skupine, pri čemu je u skupini bolesnika s perifernom arterijskom bolesti veća učestalost QQ genotipa za Q192R polimorfizam, odnosno CC genotipa za -108C>T polimorfizam. Frekvencije genotipova L55M *pon1* gena i S311C *pon2* gena ne razlikuju se značajno između istraživanih skupina. Frekvencije alela Q192 R polimorfizma *pon1* gena značajno se razlikuju između ispitanika i kontrolne skupine, pri čemu ispitanici imaju veća frekvenciju Q alela. Frekvencije alela L55M i -108C>T polimorfizama *pon1* gena i S311C polimorfizma *pon2* gena ne razlikuju se značajno između istraživanih skupina
9. Bazalne i stimulirane katalitičke koncentracije PON1 značajno se razlikuju ovisno o genotipovima *pon1* i *pon2* gena u obje skupine. Genotipovi QQ, MM i TT *pon1* gena, te genotip SS *pon2* gena imaju najniže katalitičke koncentracije u obje istraživane skupine. Naši rezultati ukazuju da su polimorfizmi Q192R i -108C>T *pon1* gena povezani sa perifernom arterijskom bolesti. Razlika u frekvenciji Q i R alela između bolesnika s perifernom arterijskom bolesti i kontrolnih ispitanika može biti jedan od uzroka sniženih katalitičkih koncentracija paraoksonaze kod ovih bolesnika.
10. Koncentracije Ang-2 i njegovog tirozin kinaznog receptora Tie-2 statistički su značajno veće u ispitanika s perifernom arterijskom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu.
11. Koncentracija VEGF-a ne razlikuje se značajno između istraživanih skupina, što se može tumačiti njegovom velikom biološkom varijabilnošću.
12. U ispitanika, sva tri biomarkera angiogeneze koreliraju sa koncentracijom CRP-a, što ukazuje na povezanost upale i angiogeneze u perifernoj arterijskoj bolesti.

13. U ovom istraživanju nije utvrđena povezanost između katalitičkih koncentracija PON1 i PAF-AH, kao novih biomarkera upale te koncentracija VEGF, Ang-2 i Tie-2 receptora kao novih biomarkera angiogeneze sa stupnjem angiografskih promjena perifernih arterija. Moguće je i da neki od biomarkera za koje je utvrđena razlika u koncentracijama između ispitivanih skupina sudjeluju u drugim mehanizmima regulacije vaskularne homeostaze, te imaju značaj u ranijim faza razvoja aterosklerotskih promjena perifernih arterija, koje se ne mogu otkriti metodom digitalne suptrakcijske angiografije. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju doprinos u razumjevanju složenih patofizioloških mehanizama uključenih u razvoj i progresiju periferne arterijske bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. i sur. Patofiziologija, peto izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
2. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007;10:149–66.
3. Freund A, Orjalo A, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Molec Med* 2010; 16: 238-48.
4. Al Sabti H. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *J Cardiothorac Surg* 2007, 2:49.
5. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 586–603.
6. van Oostrom MC, van Oostrom O, Quax PHA, Verhaar MC, Hoefe IE. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *J Leukoc Biol* 2008; 84:1379–91.
7. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-60.
8. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* 1999; 14: 121-5.
9. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47: 149-61.
10. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39: 212–20.
11. Cai W, Schaper W. Mechanism of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; 40 (8): 681-92.
12. Cao Y. Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Disorders: What Is Missing for Clinical Benefits?. *Discovery Medicine* 2010; 9:179-84.
13. Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38.
14. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation*. 2005; 112:1813-24.
15. Chen CH, Walterscheid JP. Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis. *Circ Res* 2006; 99: 787–89.

16. Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2073-80.
17. Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1948-57
18. Bochkov VN, Philippova M, Oskolkova O, Kadl A, Furnkranz A, Karabeg A et al. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2006; 99:900-8.
19. Reiner Ž, Tedeschi-Reiner E. Patofiziologija i čimbenici rizika za perifernu arterijsku opstruktivnu bolest. U: *Prevenција ateroskleroze - Periferna vaskularna bolest* (Ur. Reiner Ž.), HAZU, Zagreb, 2003, str. 15-24.
20. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR on behalf of the TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 33: S1-S70.
21. Hrvatsko kardiološko društvo, Radna skupina za angiologiju, Dijagnostika i liječenje obliterirajuće aterosklerotske bolesti donjih ekstremiteta, Hrvatsko izdanje, (Ur. Banfić Lj.), Zagreb, 2007.
22. Banfić Lj. Periferna arterijska bolest - nedovoljno prepoznat čimbenik ukupnog kardiovaskularnog rizika. *Medix* 2010; 87/88 (5/6): 133-139.
23. De Syo D. Akutna ishemiija ekstremiteta prema Transatlantskom konsenzusu (TASC). U: *Prevenција ateroskleroze - Periferna vaskularna bolest* (Ur. Ž. Reiner), HAZU, Zagreb, 2003, str. 49-71.
24. Fowkes FRG, Housley E, Cawood EHH, Macintyre CAA, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: Prevalence of Asymptomatic and Symptomatic Peripheral Arterial Disease in the General Population. *Int J Epidemiol* 1991; 20:384-92.
25. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Peripheral Arterial Disease in the Elderly The Rotterdam Study. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 1998;18:185-92.
26. Diehna C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis* 2004; 172: 95–105.
27. Ramos R, Quesada M, Solanas P, Subirana I, Sala J, Vila J et al. Prevalence of Symptomatic and Asymptomatic Peripheral disease and the Ankle-brachial index to

- Startify Cardiovascular Risk. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:305-11.
28. Kownator S, Cambou JP, Cacoub P, Léger P, Luizy F, Herrmann MA et al. Prevalence of unknown peripheral arterial disease in patients with coronary artery disease: Data in primary care from the IPSILON study. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102:625-31.
  29. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference Writing Group III: Pathophysiology. *Circulation* 2004;109: 2617-25.
  30. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes - a review. *Diabet Med* 2010; 27: 4–14.
  31. Bennett PC, Silverman SH, Gill PS, Lip GYH. Peripheral arterial disease and Virchow's triad. *Thromb Haemost* 2009; 101: 1032–40.
  32. Brevetti G, Guigliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2010; 122:1862-75.
  33. Palmer-Kazen U, Religa P, Wahlberg E. Exercise in Patients with Intermittent Claudication Elicits Signs of Inflammation and Angiogenesis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 38: 689-96.
  34. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *J Vasc Surg* 2003; 38:198-201.
  35. Cooke JP. Critical Determinants of Limb Ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 394-6.
  36. Tisi PV, Shearman CP. Biochemical and inflammatory changes in the exercising claudicat. *Vasc Med* 1998; 3:189-98.
  37. Li J, Li JJ, Li Q, Li Z, Qian HY. A rational connection of inflammation with peripheral arterial disease. *Med Hypotheses* 2007; 69: 1190-95.
  38. McDermott MM, Lloyd-Jones DM. The role of Biomarkers and Genetics in Peripheral Arterial Disease. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54 (14):1228-37.
  39. Khawaja FJ, Kullo IJ. Novel markers of peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2009; 14: 381:92.
  40. Moreno V, Gonzalo P, Arroyo AG. Inflammation-driven angiogenesis: cellular and molecular players. *Nat Rev Cardiol (cnic Edition)* 2010; 7:23-8.
  41. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependance of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997; 11:457-65.
  42. Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Lévy BI. Post-ischaemic neovaskularization and inflammation. *Cardiovasc Res* 2008;78:242-9.

43. Koulouris SN. HDL-cholesterol: pro-inflammatory and antiinflammatory effects. *Hellenic J Cardiol* 2004; 45: 324-30.
44. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial Protection by High-Density Lipoproteins From Bench to Bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1724-31.
45. Vidjak V, Hebrang A, Januš D, Odak D, Brnić Z, Novačić K. Neinvazivna i invazivna dijagnostika aterosklerotske bolesti donjih udova. U: *Prevenција ateroskleroze - Periferna vaskularna bolest* (Ur Reiner Ž.), HAZU, Zagreb, 2003., str. 25-35.
46. Gerhard-Herman M, Gardin JM, Jaff M, Mohler E, Roman M, Naqvi TZ. Guidelines for Noninvasive Vascular Laboratory Testing: A Report from the American Society of Echocardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr* 2006;19:955-72.
47. Ridker PM 2009. C-Reactive Protein: Eighty Years from Discovery to Emergence as a Major Risk Marker for Cardiovascular Disease. *Clin Chem* 2009; 55 (2): 209-15.
48. Verma S, Szmitko PE, Yeh ETH. C-Reactive Protein: Structure Affects Function. *Circulation* 2004;109: 1914-7.
49. Filep GJ. Platelets Affect the Structure and Function of C-Reactive Protein. *Circ Res* 2009;105:109-11.
50. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein. How conformational changes influence inflammatory properties. *Cell Cycle* 2009; 8: 3885-92.
51. Verma S, Yeh ETH. C-reactive protein and atherothrombosis—Beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R1253–6.
52. Ridker PM, Rifai N, Rose K, Burgin JE, Cook NR. Comparison of C reactive protein low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347:1557-65.
53. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes GR. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Soluble Adhesion Molecules as Predictors of Progressive Peripheral Atherosclerosis in the General Population. *Circulation* 2005; 112:976-83.
54. Abdellaoui A, Al-Khaffaf H, C-Reactive Protein (CRP) as a Marker in Peripheral Vascular Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34:18-22.
55. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:153–63.

56. Sorenson RC, Bisgaierr CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2214-25.
57. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase secretions, stability and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1986-94.
58. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrofage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-16.
59. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-omocysteinylation in humans. *FASEB J* 2010; 24: 931-6.
60. Otocka-Kmiecik A, Orłowska-Majdak M. Role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function paraoxonase. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009; 63: 668-77.
61. Costa LC, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 541-50.
62. Pasqualini L, Cortese C, Marchesi S, Siepi D, Pirro M, Vaudo G, et al. Paraoxonase-1 activity modulates endothelial function in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2005; 183: 349-54.
63. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paroxonase polymorphisam (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes melitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2257-2260.
64. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonase: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian Med Res.* 2009; 130: 361-8.
65. James RW, Leviev I, Ruiz J, Pass P, Frguel P, Blatter Garin MC. Promoter Polymorphism T(-107)C of the Paraoxonase PON1 Gene is a Risk Factor for Coronary Heart Disease in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 2000; 49: 1390-3.
66. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM et al. A Common Mutation in Paraoxonase-2 Results in Impaired Lactonase Activity. *J Biol Chem* 2009; 284: 35564-71.
67. Wang M, Lang X, Zou L, Huang Sh, Xu Z. Four genetic polymorphism of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis based on 88 case-control studies. *Atherosclerosis* 2011; 214: 377-85.
68. Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, et al.

- Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest*, 1996; 97(12): 2784-91.
69. Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val<sup>279</sup> - Phe) is a genetic risk factor for stroke. *Stroke* 1997; 28: 2417–20.
  70. Yamada Y, Yoshida H, Ichihara S, Imaizumi T, Satoh K, Yokota M. Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population. *Atherosclerosis* 2000; 150: 209–16.
  71. Karabina SA, Gora S, Atout R, Ninio E. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. *Biochimie* 2010; 92: 594-600.
  72. Zalewski A, Macphee C. Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Atherosclerosis: Biology, Epidemiology, and Possible Therapeutic Target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:923-31.
  73. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 Activity Is a Marker of Small, Dense LDL Particles in Human Plasma. *Clin Chem*. 2005; 51: 2264-73.
  74. Srinivasan P, Bahnson BJ. Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association: Insights from the Structure. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 541-57.
  75. Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD. New Insights Into the Role of Lipoprotein (a)-Associated Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:2094-9.
  76. Münzel T, Gori T. Lipoprotein-associated phospholipase A2, a marker of vascular inflammation and systemic vulnerability. *Eur Heart J* 2009; 28:29-31.
  77. Ballantyne C, Cushman M, Psaty B, Furberg C, Khaw KT, Sandhu M, et al. Collaborative meta-analysis of individual participant data from observational studies of Lp-PLA(2) and cardiovascular diseases. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:3–11.
  78. Daniels LB, Laughlin GA, Sarno MJ, Bettencourt R, Wolfert RL, Barrett-Connor E. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent predictor of incident coronary heart disease in an apparently healthy older population: the Rancho



- Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:913–9.
79. Garza CA, Montori VM, McConnell JP, Somers K, Kullo IJ, Lopez-Jimenez F. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 2007;82:159–65.
  80. Koenig W, Khuseyinova N, Löwel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* 2004; 110:1903–8.
  81. Hoeben A, Landuy TB, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56:549–80.
  82. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and Function of VEGF Receptors. *IUBMB Life* 2009; 61: 915-22.
  83. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:359-71.
  84. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GH. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 7614-20.
  85. Lee KW, Lip GY, Blann AD: Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor Tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;110:2355-60.
  86. Blann AD , Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GYH. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 102, 187–94.
  87. Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:387-393.
  88. Stehr A, Töpel I, Müller S, Unverdorben K, Geissler EK, Kasprzak PM, et. al. VEGF: A Surrogate Marker for Peripheral Vascular Disease. *Eur J Vasc Endovasc*

- Surg. 2010; 39:330-2.
90. Lim HS, Blann AD, Chong AY, Freestone B, Lip GYH. Plasma Vascular Endothelial Growth Factor, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2 in Diabetes Implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care* 2004; 27: 2918-24.
  90. Nadar SK, Blann A, Beevers DG, Lip GYH: Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]. *J Intern Med* 2005; 258:336-43.
  91. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research*. 2006; 312: 630– 41.
  92. Loughna S, Sato TN. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* 2001; 20:319-25.
  93. Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, et al. Functional Significance of Tie2 Signaling in the Adult Vasculature. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:51-71.
  94. Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, Kolev MV, Rajashankar KR, Himanen JP, et al. Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2–Tie2 complex. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13, 524-32.
  95. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10: 165-77.
  96. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:552-8.
  97. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol* 2010; 25:387-96.
  98. Trollope AF, Golledge J. Angiopoietins, abdominal aortic aneurism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011; 214:237-43.
  99. Tressel SL, Kim H, Ni CW, Chang K, Velasquez-Castano JC, Taylor WR, et. al. Angiopoietin-2 Stimulates Blood Flow Recovery After Femoral Artery Occlusion by Inducing Inflammation and Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28;

- 1989-95.
100. Cooke JP. Critical Determinants of Limb Ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52; 394-6.
  101. Kosaka T, Yamaguchi M, Soda Y, Kishimoto T, Tago A, Toyosato M, et al. Spectrophotometric assay for serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Clin Chim Acta* 2000; 296:151-61.
  102. Juretić D, Tadijanović M, Rekić B, Simeon Rudolf V, Reiner E, Baričić M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: Cohort study. *Croatian Medical Journal* 2001; 42: 146-50.
  103. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-73.
  104. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA Polymorphisms in Two Paraoxonase Genes (PON1 and PON2) Are Associated with the Risk of Coronary Heart Disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62:36-44.
  105. Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Fontana L, Castaldo M, et al. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol* 2004; 39:1089-94.
  106. Ružić A, Miletić B, Nola AI, Perišić V, Ražov Raads M, Včev A. Endotelna disfunkcija u "enigmatskoj slagalici" kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas* 2009; 6: 2-15.
  107. Bernies K, Rizzo M, Spinass GA, Di Lorenzo G, Di Ferde G, Pepe I, et al. The predictive role of atherogenic dyslipidemia in subjects with non-coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2009; 406:36-40.
  108. Rasoul F, Richter V, Janke C, Purschwitz K, Klötzer B, Geisel J, et al. Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Angiology* 2000; 51: 189-196.
  109. Blaton VH, Korita I, Bulo A. Kako je metabolički sindrom povezan s dislipidemijom. *Biochem Med* 2008; 18:14-24.
  110. Toth PP. High-Density Lipoprotein and Cardiovascular Risk. *Circulation* 2004;109:1809-12.
  111. Zimetbaum P, Frishman WH, Ooi WL, Derman MP, Aronson M, Gidez LI, et al. Plasma lipids and lipoproteins and the incidence of cardiovascular disease in the very

- elderly. The Bronx Aging Study. *Arterioscler Thromb* 1992;12:416-23.
112. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Preden-Kereković V, Perkov S, Hebrang A, Grga A, et al. C-Reactive Protein Level in Severe Stenosis of Cerebral Arteries. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23:430-4.
  113. Winkler K, Winkelmann BR, Scharnagl H, Hoffmann MM, Busse Grawitz A, Nauck M, et al. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity Indicates Angiographic Coronary Artery Disease Independently of Systemic Inflammation and Other Risk Factors: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2005;111:980-7.
  114. Iribarren C. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and C-Reactive Protein for Measurement of Inflammatory Risk: Independent or Complementary? *Curr Cardio Risk Rep* 2010; 4:57:67.
  115. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden Kereković V, Hebrang A, et al. Serum Platelet-Activating Factor Acetyl-Hydrolase Activity in Patients with Angiographically Established Cerebrovascular Stenosis. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: Special Suppl, ppS1-S608.
  116. Kamisako T, Takeuchi K, Ito T, Tamaki S, Kosaka T, Adachi Y. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in patients with hyperbilirubinemic hepatobiliary disease. *Hepatol Res* 2003; 26:23-7.
  117. Tsimihodimos V, Kakafika A, Tambaki R, Bairaktari E, Chapman MJ, Elisaf M, et al. Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuate enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 2003; 44:927-34.
  118. Eisaf M, Tselepis AD. Effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated platelet activating factor acetylhydrolase. Implication for atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2069-73.
  119. Tamabaki AP, Rizos E, Tsimihodimos V, Tselepis AD, Eisaf M. Effects of antihypertensive and hypolipidemic drugs on plasma and high-density lipoprotein-associated platelet activating factor-acetylhydrolase activity. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004; 9:91-5.
  120. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Šiftar Z, Vidjak V, Grga A, et al. Serum Paraoxonase and Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity in Severe Stenosis of Cerebral Arteries. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: Special Suppl, ppS1-S859.

121. Perkov S, Kardum Paro MM, Šiftar Z, Grga A, Vidjak V, Novačić K, et al. Biomarkers of inflammation in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisbon, Portugal, October 13-16, 2010, P16-5, p. 149.
122. Perkov S, Kardum Paro MM, Vidjak V, Novačić K, Flegar-Meštrić Z. Paraoxonase-1 activity in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease (abstract). The 78th EAS Congress, Hamburg, Germany, June 20-23, 2010. *Atherosclerosis supplements* 2010;11, no.2:220; MS 550.
123. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Vrhovski-Hebrang D, Vidjak V, Grdić M, et al. Polymorphisms in two paraoxonase genes *pon1* and *pon2* in angiographically assessed cerebrovascular stenosis (abstract). 77<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, April 26-29, 2008; Istanbul, Turkey. *Atherosclerosis supplements* 2008; 9/1:127, (p. 245).
124. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Vidjak V, Novačić K, Grdić M, et al. Polymorphisms of paraoxonase genes as a genetic risk factor in peripheral atherosclerosis (abstract). *Euromedlab Innsbruck 2009*; 18<sup>th</sup> IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-A174. *Clin Chem Lab Med* 2009;47, Special Suppl., S304
125. Grdić Rajković M, Barišić K, Rumora L, Salamunić I, Tadijanović M, Žanić-Grubišić T, et al. Genetic Frequencies of Paraoxonase 1 Gene Polymorphism in Croatian Population. *Croat Chem Acta* 2008; 81:105-11.
126. O'Leary KA, Edwards RJ, Town MM, Boobis AR. Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 51–60.
127. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Med Genet.* 2006; 7:28.
128. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Cavallari U, Biscuola M, Trabetti E, et al. Interaction between metabolic syndrome and PON1 polymorphisms as a determinant of the risk of coronary artery disease. *Clin Exp Med* 2005; 5:20–30.
129. Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003;49:1491–7.

130. Superko HR. Cardiovascular Event Risk. High-Density Lipoprotein and Paraoxonase. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54:1246-8.
131. Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Blann AD, Lip GYH. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive hearth failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:423-8.
132. Patel JV, Lim HS, Varughese GI, Hughes EA, Lip GYH. Angiopoietin-2 levels as a biomarker of cardiovascular risk in patients with hypertension. *Ann Med* 2008; 40:215–22.
133. Meo S, Dittadi R, Gion M. Biological variation of vascular endotelial growth factor. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 342-3.
134. Kong ASY, Lee HL, Eom HS, Park WS, Yun T, Kim HJ, et al. Reference intervals for circulating angiogenic cytokines. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46: 545–50.
135. Lieb W, Zachariah JP, Xanthakis V, Safa R, Chen MH, Sullivan LM, et al. Clinical and genetic correlates of circulating angiopoietin-2 and soluble Tie-2 in the community. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3: 300-6.
136. Nylaende M, Kroese A, Stranden E, Morken B, Sandbaek G, Lindahl AK, et al. Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 2006; 11:21-8.
137. Niccoli G, Biasucci LM, Biscione C, Fusco B, Porto I, Leone AM, et al. Independent prognostic value of C-reactive protein and coronary artery disease extent in patients affected by unstable angina. *Atherosclerosis* 2008; 196:779–85.
138. Geluk CA, Post WA, Hillege HL, Tio RA, Tijssen JGP, van Dijk RB, et al. C-reactive protein and angiographic characteristics of stable and unstable coronary artery disease: data from the prospective PREVEND cohort. *Atherosclerosis* 2008; 196:372–82.

## **8. PRILOZI**

Prilog 1. Suglasnost za medicinske intervencije

Prilog 2. Upitnik za bolesnike

Prilog 3. Merkur *score*

Prilog 4. Upitnik za kontrolnu skupinu

## 9. ŽIVOTOPIS

Sonja Perkov rođena je 18.02.1963. u Šibeniku. Na Farmaceutsko biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1985. godine. Iste godine upisala je poslijediplomski studij iz Zdravstvene ekologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i zaposlila se u Centru za istraživanje mora, Zagreb, Instituta "Ruđer Bošković" kao asistent postdiplomand, pripravnik. 1988. godine upisala je poslijediplomski studij iz Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i zaposlila se kao inženjer medicinske biokemije, pripravnik u Općoj bolnici "Dr. Josip Kajfeš". 1989. godine položila je stručni ispit iz medicinske biokemije i zaposlila se u Kliničkoj bolnici "Mercur", u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, gdje radi i danas, kao voditelj Jedinice za kliničku kemiju. Magistarski rad pod nazivom "Istraživanje unosa polikloriranih bifenila u stanovništvo na području Petrinje i Siska" obranila je 1991. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i stekla znanstveni stupanj magistra znanosti iz područja medicine. 2000. godine završila je specijalizaciju iz medicinske biokemije i izabrana je u istraživačko zvanje asistenta u znanstvenom području biomedicine i zdravstva. Od 2002-2009 sudjelovala je kao suradnik na dva projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: "Biokemijski čimbenici rizika kod ateroskleroze moždanih arterija i "Novi biokemijski biljezi ateroskleroze u krvožilnim bolestima". Objavila je 7 originalnih znanstvenih radova zastupljenih u Current Contentsu, 2 poglavlja u knjizi, te aktivno sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima. Član je Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

### POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Znanstveni radovi zastupljeni u Current Contentsu

1. Picer M, Perkov S, Picer N. Contamination of bela krajina, Slovenia with polychlorinated biphenyls 1. Levels of some high molecular chlorinated hydrocarbons in the water and fish of the Kupa River in Croatia. *Water, Air and Soil Pollution* 1995;82: 559-81.
2. Vrhovski-Hebrang D, Flegar-Meštrić Z, Preden-Kereković V, Perkov S, Hebrang A, Januš D, Grga A. Biochemical risk factors in angiographically established stenosis of cerebral arteries. *Croat Med J* 2002;43(6):696-701.
3. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V,



- Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A, Kosaka T. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity in patients with angiographically established cerebrovascular stenosis. Proceedings of 15<sup>th</sup> IFCC – FESCC European Congress of Clin. Chemistry, EUROMEDLAB Barcelona 2003; 2003 June 1-5; Barcelona, Spain. Monduzzi Editore; International Proceedings Division, p. 369-72.
4. Flegar-Meštrić Z, Perkov S. Comparability of point-of-care whole-blood electrolyte and substrate testing using a Stat Profile Critical Care Xpress analyzer and standard laboratory methods. Clin Chem Lab Med 2006; 44(7):898-903.
  5. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Preden-Kereković V, Perkov S, Hebrang A, Grga A, Januš D, Vidjak V. C-Reactive protein level in severe stenosis of cerebral arteries. Cerebrovasc Dis 2007; 23:430-4.
  6. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Šimonović B, Juretić D. Applicability of common reference intervals for serum creatinine concentrations to the Croatian population. Clin Chem Lab Med 2010; 48(2): 231-5.
  7. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Perkov S, Šurina B, Kardum-Paro MM, Šiftar Z, Sikirica M, Sokolić I, Ožvald I, Vidas Ž. Accreditation of medical laboratories in Croatia – experiences of the Institute of clinical chemistry, University Hospital Merkur, Zagreb. Coll Antropol 2010;34,1:181-6.

#### Ostali znanstveni radovi

1. Perkov S, Juretić D, Flegar-Meštrić Z. Mjerenje pH i plinova u krvi – ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj. 19<sup>th</sup> International Metrology Symposium; 2005 September 26-28; Opatija, Hrvatska. Proceedings. Zagreb: Metrology Consulting; 2005, p.171-5.
2. Juretić D, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Vanjska procjena kvalitete rada u medicinsko-biokemijskim laboratorijima Republike Hrvatske. 19<sup>th</sup> International Metrology Symposium; 2005 September 26.
3. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Šeper I. Biološka varijacija elektrolita i esencijalnih mikroelemenata u serumu zdrave novorođenčadi i njihovih majki. Liječn vjes 1998;120:145-50.
4. Flegar-Meštrić Z, Jagarinec N, Šurina B, Vrhovski-Hebrang D, Preden-Kereković V, Perkov S, Smuđ-Makalouš B. Referentne vrijednosti biokemijskih sastojaka seruma školske djece i adolescenata s područja grada Zagreba. Biochemia Medica 1996;6,

4:277-88.

5. Lorentz K. Metode za mjerenje katalitičke koncentracije enzima preporučene od IFCC; dio 9: IFCC metoda za  $\alpha$ -amilazu (1,4- $\alpha$ -D-glukan: 4-glukanohidrolaza, EC 3.2.1.1). Preporuke. Prijevod: Juretić D, Perkov S, Šurina B. *Biochemia Medica* 1998;8;3-4,91-6.

#### Poglavlja u knjizi

1. Perkov S. Mikroelementi u serumu. U: Flegar-Meštrić Z, Jagarinec N, izdavači. Referentne vrijednosti biokemijskih i hematoloških sastojaka krvi u školske djece i adolescenata grada Zagreba. Zagreb:Medicinska naklada; 1997. p. 69-81.
2. Perkov S. Porfirije. U: Topić E, Primorac D, Janković S, izdavači. Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb:Medicinska naklada; 2004. p. 149-155.

#### Stručni radovi

1. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Banjanac M, Tešija A, Vrkić N, Topić E, Dukić L. Analitička procjena analizatora Express plus tvrtke Chiron. *Biochemia Medica* 1998;8,3-4:77-89.
2. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. Ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj. *Biochemia Medica* 2005;15,1-2:15-25.
3. Perkov S. Odnos referentnih intervala za metabolite i elektrolite u venskoj i arterijskoj krvi u dijagnostici uz bolesnika. U priručniku: Laboratorijske pretrage uz bolesnika. Zagreb:Medicinska naklada; 2005. p. 97-109.
4. Juretić D, Nazor A, Perkov S, Sikirica M, Vučić Lovrenčić M, Đurić K, Flegar-Meštrić Z: Vanjska procjena kvalitete u poslijeanalitičkoj fazi – izgled nalaza. U priručniku za trajno usavršavanje medicinskih biokemičara S.Galjanić, I.Vukasović, Z. Flegar-Meštrić: Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara, Zagreb, Medicinska naklada i Hrvatska komora medicinskih biokemičara, 2010, p. 151-60.
5. Perkov S. Utvrđivanje nesukladnosti (4.9). Kriteriji za prihvaćanje I odbijanje primarnih uzoraka (5.4.8). U priručniku za trajno usavršavanje medicinskih biokemičara S.Galjanić, I. Vukasović, Z. Flegar-Meštrić: Akreditacija medicinsko-

biokemijskog laboratorija. Tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara, Zagreb, Medicinska naklada i Hrvatska komora medicinskih biokemičara, 2010, p. 77-84.

#### Sudjelovanje na međunarodnim skupovima

1. Picer M, Picer N, Perkov S. Investigation of the extraction efficiency of polyaromatic hydrocarbons from river water particulate matter by using two extraction procedures (abstract). 16th Annual Symposium on the Analytical Chemistry of Pollutants; 1986 March; Lausanne, Švicarska. Abstracts 1986; p.207.
2. Flegar Meštrić Z, Perkov S, Šeper I. Serum concentrations of total calcium, magnesium, iron, copper and zinc in maternal and umbilical cord blood in normal pregnancies (abstract). Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry; 1996 July 8-12; London, UK. Abstracts; p. 433.
3. Flegar-Meštrić Z, Jagarinec N, Perkov S, Smuđ-Makalouš B. Age and sex specific reference intervals for biochemistry analytes in children and adolescents produced for the population of Zagreb – Croatia (abstract). Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry; 1996 July 8-12; London, UK. Abstracts; p. 338.
4. Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Urinary porphyrins monitoring in patients with acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda (abstract). MEDLAB, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry; 1997 August 17-22; Basel, Švicarska. Abstracts (The official publication of Medlab 97); p. 150.
5. Tešija A, Perkov S, Vrkić N, Topić E, Flegar-Meštrić Z, Banjanac M, Dukić L. Multicentre evaluation of the Express Plus clinical chemistry analyzer (abstract). Proceedings of the 5th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Alps-Adria '98; 1998 September 24-26; Karlovy Vary, Češka. Labor Aktuell, CS, Supplementum:P 69, p. 33.
6. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Hofman B, Patrlj L, Kocman B, Mašinović D, Šoša T. Significance of whole blood analytes monitoring during livertransplantation (abstract). IFCC WorldLab, 17th International and 13th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1st International Congress of Clinical Molecular Biology (CMB), 31st National Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology; 1999 June 6-11; Firenze, Italy. Clin Chem Lab Med1999;37:W045.
7. Bobetić-Vranić T, Flegar-Meštrić Z, Kunović B, Perkov S, Perković M. Comparison

- of automated urine teststrip measurement with microscopic examination and quantitative determination of glucose and protein (abstract). 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2000 June 15-17; Opatija, Croatia. *Biochemia Medica* 2000;10;1-2:87, P1/S05-8.
8. Flegar-Meštrić Z, Sabljar-Matovinović M, Perkov S, Prkačin I, Barišin A. Correlation between serum cystatin C and serum creatinine and creatinine clearance in various renal diseases (abstract). 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2000 June 15-17; Opatija, Croatia. *Biochemia Medica* 2000;10;1-2:94, P1/07-5.
  9. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Šeper I, Nazor A. Physiological variation of the iron status in maternal and umbilical cord blood at the time of delivery (abstract). 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2000 June 15-17; Opatija, Croatia. *Biochemia Medica* 2000;10;1-2:81, P1/S04-3.
  10. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Perkov S, Hebrang A, Januš D, Grga A. Copper, zinc, calcium and magnesium concentrations and total antioxidant status in the serum of patients with the cerebral atherosclerosis (abstract). *Euromedlab 2001; 14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2001 May 26-31; Prag, Češka. Clin Chem Lab Med* 2001;39,Special supplement: S 113, PO-B007.
  11. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Papa B. Erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in the diagnosis of acute intermittent porphyria (abstract). *Euromedlab 2001; 14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2001 May 26-31; Prag, Češka. Clin Chem Lab Med* 2001;39,Special supplement:S 199, PO-H003.
  12. Flegar-Meštrić Z, Perkov S. Značaj određivanja slobodnog bakra u Wilsonovoj bolesti. 15. međunarodni simpozij Laboratorijska dijagnostika neuroloških bolesti; 9.-10.11.2001.; Trakošćan.
  13. Flegar-Meštrić Z, Šurina B, Perkov S, Matleković D, Hofman B, Mašinović D, Patrlj L, Kocman B. Biochemical monitoring after liver transplantation (abstract). *International Congress for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 7th Alps-Adria Congress; 2002 April 20-22; Regensburg, Njemačka. Abstracts, p. 117.*
  14. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A, Kosaka T. Serum platelet-activating factor

- acetyl-hydrolase activity in patients with angiographically established cerebrovascular stenosis abstract). EUROMEDLAB Barcelona 2003; 15<sup>th</sup> IFCC – FESCC European Congress of Clin. Chemistry; 2003 June 1-5; Barcelona, Spain. Clin Chem Lab Med 2003;41,special supplement :W-104.
15. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A. Serum paraoxonase activity as a risk marker for cerebrovascular stenosis (abstract). 4<sup>th</sup> International Central European vascular forum congress; 2004 April 28 – May 2; Cavtat, Croatia. Abstract book, p. 50.
  16. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. External quality assessment of acid/base analysis in Croatia (abstract). International Swiss Medlab 2004 and 8<sup>th</sup> Alps Adria Congress Laboratory Medicine; 2004 October 5 – 9; Lucerne, Switzerland. Clin Chem Lab Med 2004;42(9):A74.
  17. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak A, Odak D, Grga A. Decreased human serum paraoxonase activity in cerebrovascular stenosis (abstract). International Swiss Medlab 2004 and 8<sup>th</sup> Alps Adria Congress Laboratory Medicine; 2004 October 5-9; Lucerne, Switzerland. Clin Chem Lab Med 2004;42(9):A86.
  18. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Juretić D. External Quality Assessment in acid base analysis in Croatia – first year's experience (abstract). Abstracts for EQALM Symposium; 2004 September 6-8; Vienna, Austria. EQA news 2004;15,2:22-3.
  19. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Šiftar Z. Evaluation of immunoturbidimetric full-range method for C-reactive protein (abstract). 2. slovenski kongres klinične kemije z mednarodno udeležbo in 16. mednarodni simpozij Slovenskega združenja za klinično kemijo in Hrvatskog društva medicinskih biokemičara; 15.-16.10.2004.; Maribor, Slovenia. Farmaceutski vestnik 2004; 55:372-3.
  20. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Juretić D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A. The association of serum gamma glutamyltransferase and antioxidant parameters in cerebrovascular disease (abstract). 16<sup>th</sup> IFCC – FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine – EUROMEDLAB 2005 May 8-12; Glasgow , Scotland. Clin Chim Acta 2005;355,Supplement:S 98, MP2.47.
  21. Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Comparison of arterial whole blood metabolite determinations in Stat Profile Critical Care Xpress Analyzer with standard laboratory

- methods (abstract). 16<sup>th</sup> IFCC – FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine – EUROMEDLAB 2005; 2005 May 8-12; Glasgow, Scotland. Clin Chim Acta 2005;355, Supplement:S 390, VP12.05.
22. Perkov S, Juretić D, Flegar-Meštrić Z. Mjerenje pH i plinova u krvi – ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj (abstract). 19<sup>th</sup> International Metrology Symposium; 2005 September 26-28; Opatija; Hrvatska, prikazano i kao poster.
23. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Perkov S, Preden-Kereković V, Hebrang A, Vidjak V, Odak D, Grga A. Relationship between C-reactive proteins and cerebrovascular stenosis (abstract). XIV International Symposium on Atherosclerosis, June 18-22, 2006, Rome, Italy. Abstracts; Atherosclerosis 2006;7,3, Supplements:282, Tu-P10:446.
24. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Šurina B, Preden-Kereković V, Vrhovski-Hebrang D, Šiftar Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Parag G, Sikirica M, Vidas Ž. Accreditation of the medical-biochemistry laboratory in Croatia According to ISO 15189 standard (abstract). 17<sup>th</sup> IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EUROMEDLAB Amsterdam 2007, June 3-7, 2007.; Amsterdam, The Netherlands. CCLM 2007;45, special supplement:W368.
25. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Vrhovski-Hebrang D, Vidjak V, Grdić M, Juretić D, Barišić K. Polymorphisms in two paraoxonase genes pon1 and pon2 in angiographically assessed cerebrovascular stenosis (abstract). 77<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, April 26-29, 2008.; Istanbul, Turkey. Atherosclerosis supplements 2008;9/1:127, (p. 245).
26. Flegar Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Šiftar Z, Vidjak V, Grga A, Grdić M, Barišić K, Juretić D. Serum paraoxonase and platelet activating factor acetylhydrolase activity in severe stenosis of cerebral arteries (abstract). IFCC – WorldLab Fortaleza 28 Sept-2 Oct 2008, S 485. Clin Chem Lab Med 2008;46, Special Suppl., T167.
27. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. External Quality Assessment Scheme and Accreditation of Medical Biochemical Laboratories in Croatia (abstract). EQALM Symposium, 11-12 September 2008; Austin Court, Birmingham, United Kingdom.
28. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. The external quality assessment schemes for medical biochemical laboratories in Croatia (abstract). 3<sup>rd</sup>

- Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, Slovenia, Nov.13-15, 2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46(10): A249.
29. Perkov S, Ožvald I, Flegar-Meštrić Z. Assuring quality of examination procedures in medical-biochemical laboratory according the ISO 15189:2003 (abstract). 3<sup>rd</sup> Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, Slovenia, Nov.13-15, 2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46(10): A248.
30. Flegar-Meštrić Z., Perkov S, Kardum Paro MM, Sikirica M, Ožvald I, Šimonović B, Šurina B. Applicability of the recommended reference intervals for serum creatinine concentrations (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18<sup>th</sup> IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-C025. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S376.
31. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Šiftar Z, Perkov S, Sikirica M, Ožvald I, Sokolić I, Nazor A, Šurina B, Vidas Ž. The impact of an electronic information system on clinical laboratory efficiency and prevention of identification errors (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18<sup>th</sup> IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-C034. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S257.
32. Ožvald I, Šurina B, Perkov S, Šimonović B, Čolić-Cvrlje V, Naumovski-Mihalić S, Kocman B, Vidas Ž, Flegar-Meštrić Z. Effect of primary immunotherapy on post transplantation outcome in HCV-infected liver transplant recipients (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18<sup>th</sup> IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-A140. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S292.
33. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Vidjak V, Novačić K, Grdić M, Juretić D, Barišić K. Polymorphisms of paraoxonase genes as a genetic risk factor in peripheral atherosclerosis (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18<sup>th</sup> IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-A174. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S304.
34. Perkov S, Kardum Paro MM, Vidjak V, Novačić K, Flegar-Meštrić Z. Paraoxonase-1 activity in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease. (abstract). The 78th EAS Congress, Hamburg, Germany, June 20-23, 2010. Atherosclerosis supplements 2010;11, no.2:220; MS 550.

35. Galović R, Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Vidjak V, Barišić K. Serum concentrations of HSP60 and HSP70 in patients with cerebral atherosclerosis. (abstract). The 78th EAS Congress, Hamburg, Germany, June 20-23, 2010. Atherosclerosis supplements 2010;11, no.2:218; MS 539.
36. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Nazor A, Sikirica M, Juretić D. Long-term evaluation of EQA data in Croatia (abstract), EQALM Symposium 2010, Lisabon, 8.-13.10.2010. EQAnews 2010, No1:16-17
37. Šurina B, Čolić-Cvrlje V, Mrzljak A, Kocman B, Šiftar Z, Perkov S, Vidas Ž, Ožvald I, Flegar-Meštrić Z. Therapeutic drug monitoring in transplant patients (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P09-2, p. 84.
38. Perkov S, Kardum Paro MM, Šiftar Z, Grga A, Vidjak V, Novačić K, Flegar-Meštrić Z. Biomarkers of inflammation in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P16-5, p. 149.
39. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Perkov S, Šurina B, Kardum Paro MM, Šiftar Z, Sikirica M, Sokolić I, Ožvald I, Šimonović B, Vidas Ž. The role of laboratory diagnostics in liver transplantation (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P09-1, p. 83.

#### Sudjelovanje na domaćim skupovima

1. Picer N, Picer M, Perkov S. Poliklorirani bifenili i klorirani insekticidi u vodi i ribama Kupe. Konferencija o aktuelnim problemima zaštite voda - Zaštita voda · 86; 1986. svibanj 28-30.; Kragujevac. p. 291-6.
2. Flegar-Meštrić Z, Perkov S. Usporedba enzimске metode za mjerenje koncentracije ukupnog bilirubina u serumu s diazo metodama (sažetak). Prvi hrvatski kongres medicinske biokemije; 1993 rujun 29. – listopad 1. Bioch Med 1993;4,4:184.
3. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Šeper I. Utjecaj gestacijske dobi i antropometrijskih pokazatelja rasta i razvoja na koncentracije željeza, cinka, bakra, ukupnog kalcija i magnezija u serumu zdrave novorođenčadi (sažetak). 2. Hrvatski kongres medicinske biokemije; 1996 rujun 25-28.; Pula. Bioch Med 1996;6/1:158.
4. Bešenić R, Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Sabljarić Matovinović M. Mogućnost



- određivanja stupnja bubrežne funkcije mjerenjem koncentracije kreatinina u serumu (sažetak). 2. Hrvatski kongres medicinske biokemije; 1996 rujan 25-28.; Pula. Bioch Med 1996; 6/1:171.
5. Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Usklađivanje rezultata intralaboratorijske procjene kakvoće rada na plinskom analizatoru Ciba Corning. Seminar: Procjena učinka 1. hrvatskog projekta zdravstva - podprojekta Primarna zdravstvena zaštita na kakvoću rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u primarnoj zdravstvenoj zaštiti; Zagreb, Hotel "Panorama", u organizaciji Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske, Hrvatskoga zavoda za zdravstveno osiguranje i Hrvatskoga društva medicinskih biokemičara.
  6. Perkov S, Flegar-Meštrić Z, Šeper I. Referentni intervali elektrolita u novorođenčadi određeni iz pune krvi metodom direktne potenciometrije (sažetak). III Hrvatski kongres medicinskih biokemičara; 1999. rujan 22.-25.; Vukovar. Bioch Med 1999;9,1-2:82; 08-11/P5.
  7. Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Osiguranje kvalitete pretraga uz bolesnika (sažetak). 4. hrvatski kongres medicinskih biokemičara; 24-28-9-2003.; Zadar, Hrvatska. Bioch Med 2003;13,supplement 1-2:42; S6-2.
  8. Flegar-Meštrić Z, Vrhovski-Hebrang D, Preden-Kereković V, Perkov S, Bobetić-Vranić T, Grga A, Vidjak V, Hebrang A. C-reaktivni protein kao biomarker visokog stupnja stenozne moždanih arterija (sažetak). 5. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem; 18.-22.10.2006.; Poreč, Hrvatska. Bioch Med 2006;16, supplement 1:S146, P10-3.
  9. Kardum Paro MM, Šurina B, Vrhovski-Hebrang D, Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Dugoročna procjena vanjske procjene kvalitete rada za srčane biljege (sažetak). 5. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem; 18.-22.10.2006.; Poreč, Hrvatska. Bioch Med 2006;16, supplement 1:S219, P22-3.
  10. Perkov S, Flegar-Meštrić Z. Procjena rezultata vanjske procjene kvalitete pH, plinova u krvi i ioniziranih elektrolita (sažetak). 5. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem; 18.-22.10.2006.; Poreč, Hrvatska. Bioch Med 2006;16, supplement 1:S224, P22-8.
  11. Flegar-Meštrić Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Vrhovski-Hebrang D, Hebrang A, Barišić K. Polimorfizam paraoksonaze (PON) u bolesnika s visokim stupnjem stenozne moždanih arterija (sažetak). Šesti hrvatski kongres o aterosklerozi s

- međunarodnim sudjelovanjem; 9.-12.5.2007.; Rovinj, Hrvatska. Liječnički vjesnik 2007;129, suplement 1:69:61.
12. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Šurina B, Preden-Kereković V, Vrhovski-Hebrang D, Šiftar Z, Kardum Paro MM, Perkov S, Parag G, Sikirica M, Vidas Z. Uvođenje međunarodnih standarda kvalitete u klinički medicinsko-biokemijski laboratorij (sažetak). 4. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem, 16.-20.5.2007.; Opatija, Hrvatska. Liječnički vjesnik 2007;129, suplement 3:86:HP-34
13. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Kardum Paro MM, Ožvald i, Šimonović B, Sikirica M. Harmonizacija referentnih intervala za koncentraciju kreatinina u serumu. 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. Bioch Med 2009;19, suplement 1:S177.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## ZNAČAJ NOVIH BIOMARKERA UPALE I ANGIOGENEZE U PERIFERNOJ ARTERIJSKOJ BOLESTI

SONJA PERKOV

KLINIČKA BOLNICA "MERKUR"

### **S a ž e t a k**

Periferna arterijska bolest klinička je manifestacija ateroskleroze sa značajnim morbiditetom i mortalitetom. Upala i angiogeneza imaju značajnu ulogu u njenom razvoju, progresiji i komplikacijama. Cilj rada bio je ispitati postoji li povezanost između katalitičkih koncentracija i genetskog polimorfizma paraoksonaze (PON1), katalitičkih koncentracija acetil hidrolaze trombocitnog čimbenika aktivacije (PAF-AH), te koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), angiopoietina 2 (Ang-2) i njegovog Tie-2 receptora, kao novih biomarkera u procesu upale i angiogeneze, sa pojavnošću i stupnjem stenotično/okluzivnih promjena perifernih arterija. Snižene katalitičke koncentracije PON1 i polimorfizmi Q192R i -108C>T *pon1* gena mogli bi imati ulogu u razvoju periferne arterijske bolesti. Razlike u frekvenciji Q i R alela između ispitanika i kontrolne skupine mogu biti jedan od uzroka sniženih katalitičkih koncentracija PON1, što može doprinosti smanjenoj zaštitnoj ulozi HDL-kolesterola i povećanom riziku od prijevremene ateroskleroze kod rizičnih skupina bolesnika. Povećane koncentracije Ang-2 i Tie-2 receptora mogle bi ukazivati na povećano vaskularno remodeliranje kao odgovor na prisutne čimbenike rizika, te bi se mogli smatrati novim biomarkerima angiogeneze koji ukazuju na prisustvo periferne arterijske bolesti. Nepostojanje povezanosti između koncentracija istraživanih biokemijskih parametara i angiografskog sustava bodovanja, kao mjere anatomske proširenosti aterosklerotskih promjena perifernih arterija ukazuje na važnost drugih čimbenika u progresiji bolesti.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.  
(154 stranice, 52 slike, 50 tablica, 138 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: acetil hidrolaza trombocitnog čimbenika aktivacije, paraoksonaza, polimorfizam, vaskularni endotelni čimbenik rasta, angiopoietin-2, Tie-2 receptor, periferna arterijska bolest.

Voditelji: Dr. sc. Zlata Flegar-Meštrić, doc.

Dr. sc. Vinko Vidjak, doc.

Ocjenjivači: Dr. sc. Dunja Rogić, doc.

Dr. sc. Ana-Maria Šimundić, doc.

Dr. sc. József Petrik, izv. prof.

Dr. sc. Zlata Flegar-Meštrić, doc.

Dr. sc. Vinko Vidjak, doc.

Datum prihvatanja rada: 21. ožujak 2012.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

### THE IMPORTANCE OF NEW BIOMARKERS OF INFLAMMATION AND ANGIOGENESIS IN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE

SONJA PERKOV

"MERKUR" UNIVERSITY HOSPITAL

#### ***S u m m a r y***

Peripheral artery disease is a clinical manifestation of atherosclerosis with significant morbidity and mortality. Inflammation and angiogenesis play an important role in its development, progression and complications. The aim of this thesis was to investigate the association of the catalytic concentrations and genetic polymorphism of paraoxonase (PON1), the catalytic concentrations of platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), the concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin 2 (Ang-2) and its receptor Tie-2, as novel biomarkers of inflammation and angiogenesis with the appearance and degree of stenotic-occlusive changes in the peripheral arteries. Lower catalytic concentrations of PON1 and polymorphisms Q192R and -108C>T *pon1* gene could play a role in the development of peripheral arterial disease. Differences in the frequency of Q and R alleles between patient and control groups may be one of the causes of the reduced catalytic concentrations of PON1, which may contribute to a reduced protective role of HDL-cholesterol and increased risk of early atherosclerosis in the risk group of patients. An increased concentration of Ang-2 and Tie-2 receptor could indicate increased vascular remodeling in response to the presence of risk factors and could be considered new biomarkers of angiogenesis which indicate the presence of peripheral arterial disease. The absence of significant correlation between the concentrations of the biochemical parameters investigated and the angiographic score as a measure of the anatomic extent of atherosclerotic lesions to the peripheral arteries, suggests that other factors are more important in the progression of the disease.

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and University Library  
(154 pages, 52 figures, 50 tables, 138 references, original in Croatian language)

Key words: platelet-activating factor acetylhydrolase, paraoxonase, polymorphism, vascular endothelial growth factor, angiopoietin-2, Tie-2 receptor, peripheral arterial disease.

Supervisors: Zlata Flegar-Meštrić, Ph.D. Assistant Professor  
Vinko Vidjak, Ph.D. Assistant Professor

Reviewers: Dunja Rogić, Ph.D. Assistant Professor  
Ana-Maria Šimundić, Ph.D. Assistant Professor  
József Petrik, Ph.D. Associate Professor  
Zlata Flegar-Meštrić, Ph.D. Assistant Professor  
Vinko Vidjak, Ph.D. Assistant Professor

Thesis accepted: March 21, 2012.