

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanja Đ. Stanković

Prognostički značaj biohemijskih  
pokazatelja kod pacijenata sa infarktom  
miokarda sa ST elevacijom  
lečenih primarnom perkutanom  
koronarnom intervencijom

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Sanja Đ. Stanković

Prognostic significance of biomarkers in  
patients with ST-segment elevation  
myocardial infarction treated by primary  
percutaneous coronary intervention

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr Nada Majkić-Singh

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

Prof. dr Nada Majkić-Singh

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. Dr Svetlana Ignjatović

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. dr Zorana Vasiljević-Pokrajčić

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: 17. 07. 2012. god.

## **Zahvalnica**

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Nadi Majkić-Singh, koja me od studentskih dana do danas vodi u mom naučnom i stručnom sazrevanju i koja me zadužila svojim odnosom i nesebičnim savetima i podrškom.*

*Zahvaljujem se prof. dr Zorani Vasiljević koja me uključila u svoj naučno-istraživački tim i od koje sam naučila kako se u uslovima napornog rada u Urgentnom centru može negovati akademski i prijateljski odnos među kolegama.*

*Prof. dr Svetlani Ignjatović zahvaljujem se na podršci i doprinosu mojoj stručnoj karijeri.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svom dragom saradniku i prijatelju ass. dr Miliki Ašaninu na nesebičnoj pomoći u ovom istraživačkom izazovu.*

*Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Marinković na bezrezervnoj podršci i nesebično pruženim savetima tokom statističke obrade podataka.*

*Zahvaljujem se kolegama iz Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije, ass. mr sci. Danijeli Trifunović, dr med. Mirjani Mihailović, mr sci. Ivici Nikolajeviću, prof. dr Igoru Mrdoviću, dr sci. Lidiji Savić, na pomoći u prikupljanju kliničkih podataka ispitivanih bolesnika.*

*Veliku zahvalnost dugujem zaposlenima u Kolektivu Službe za urgentnu laboratorijsku dijagnostiku na iskrenoj podršci i spremnosti da pomognu u preanalitičkoj pripremi uzoraka. Posebnu zahvalnost dugujem glavnim laboratorijskim tehničarima Vesni Tanasković, Milki Janjić i Ljiljani Živojinović.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima koji mi celog života omogućavaju da ostvarujem svoje snove, a ovaj rad je jedan od beskonačno mnogo njih.*

*„Tempus omnia revelat“*

## Sažetak

Prognostički značaj biohemijskih pokazatelja kod pacijenata sa infarktom miokarda sa ST elevacijom lečenih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom

Akutni infarkt miokarda (AIM) je veliki zdravstveni problem. Karakteriše ga smrt miocita usled nekroze i apoptoze. U infarktu miokarda sa elevacijom ST-segmenta (STEMI) dolazi do ruptуре plaka praćenog formiranjem okluzivnog tromba koji je najčešće uzrok ishemije miokarda. Uprkos značajnom progresu, uvođenjem perkutane koronarne intervencije (PKI), AIM ostaje jedan od glavnih uzroka smrti i onesposobljenosti. Sa povećanjem broja i vrste dostupnih biomarkera, povećava se mogućnost da se ovi neinvazivni i pristupačni „alati“ koriste u postavljenju dijagnoze, stratifikaciji rizika i pri izboru terapije.

Glavni cilj ove studije bio je da se utvrdi prognostički značaj pojedinačnih laboratorijskih biomarkera ili njihove kombinacije u odnosu na smrtni ishod u bolnici i pojavu neželjenih kardiovaskularnih događaja (NKVD) (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, moždani udar, revaskularizacija ciljne lezije) tokom 30-dnevnog i 1-godišnjeg praćenja.

U ovu prospektivnu studiju je bilo uključeno 200 konsekutivnih bolesnika sa STEMI koji su lečeni pPCI i 100 konsekutivnih bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPCI (rezidualna stenoza <20% i TIMI protok 3). Bolesnicima uključenim u studiju uzeti su klinički i demografski podaci, urađena antropometrijska merenja i zabeleženi faktori rizika za kardiovaskularna oboljenja. Kongestivna srčana insuficijencija na prijemu definisana je kao prisustvo kliničkih znakova plućne venske kongestije i označena Kilip klasom. Bolesnici sa kardiogenim šokom su isključeni iz studije. Urađen je ehokardiografski pregled i ejectiona frakcija leve komore (LKEF) je izračunata prema Simpsonovom pravilu.

Uzorci krvi za analizu biomarkera uzeti su kod 200 bolesnika sa STEMI lečenih pPKI u 4 vremenska perioda od 0 do 7. dana, a uzorci krvi 100 bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenim pPKI u 8 vremenskih perioda od 0 do 7 dana. Osim rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara, određeni su biomarkeri koji pripadaju grupi markera nekroze, ishemije, inflamacije, hemodinamskog stresa, funkcije trombocita i hemostaze i dislipidemije. Koristeći tehnologiju biočipova određeno je 32

analita (citokini, citokinski receptori, faktori rasta, adhezione molecule, MMP-9) u pojedinačnim uzorcima koristeći 5 vrsta biočipova.

Analizom vremenskih profila tradicionalnih biomarkera nekroze (cTnI, masa CK-MB, mioglobin), inflamacije (CRP), hemodinamskog stresa (BNP, NT-proBNP) utvrđeno je podudaranje sa poznatim krivama promene koncentracija biomarkera u akutnom infarktu miokarda. Rezultati korelacione analize potvrđuju poznatu povezanost biomarkera nekroze (cTnI, mase CK-MB), markera inflamacije (CRP) i hemodinamskog stresa (NT-proBNP) sa oslabljenom srčanom funkcijom. Analiziranjem kinetike mijeloperoksidaze (MPO) kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI koji su uspešno lečeni pPKI utvrđena je bifazna kriva oslobađanja MPO, pri čemu je prvi pik odgovarao MPO uzetom 4h, a drugi pik MPO uzetom 24h nakon pPKI; utvrđena je statistički značajna korelacija između drugog pika vrednosti MPO i vrednosti troponina I, kao i srčane insuficijencije. Incidenca smrtnog ishoda u bolnici u bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI je bila 6%. MPO na 24h od pPKI je bio nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici. Incidenca pojave NKVD u prvih 30 dana nakon prvog prednjeg STEMI lečenog pPKI je bila 10,6%. Koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> određena pri prijemu bolesnika je bila nezavisan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana. Incidenca novonastale atrijske fibrilacije u bolesnika sa STEMI lečenih pPKI je bila 5,0%. BNP uzet 24h nakon pPKI je bio nezavisan prediktor pojave novonastale atrijske fibrilacije. Incidenca smrtnog ishoda u toku jednogodišnjeg praćenja u bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI je bila 5%, a incidenca pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja je bila 10%. Pored tradicionalnih prediktora udaljenog mortaliteta i pojave NKVD kao što su srčana insuficijencija i atrijska fibrilacija, u ovom istraživanju je kao prediktor utvrđena i masa CKMB. Dvanaest biomarkera je uključeno u eksploratornu faktorsku analizu na bazi metoda glavnih komponenta i ortogonalne "varimax" rotacije. Selektovano je četiri faktora: faktor 1-sTNFR1, sTNFR2, MMP-9; faktor 2- sICAM-1, sE-selektin i sL-selektin.; faktor-3 IL-6, IL-8 i MCP-1 i faktor 4-MIP-1 $\alpha$ , IL7 i IL15. Faktori 2 i 3 su bili nezavisni prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI. Bolesnici sa faktor 2 ili 3 skorom u najvišem tercilu imali su statistički značajno češće NKVD u prvih 30 dana u poređenju sa ostalim tercilima.

Bolje razumevanje biologije, tehnologije i kliničkih dokaza koji leži u osnovi upotrebe kako poznatih, tako i novih biomarkera u AIM, biće od velike koristi u kliničkoj medicini. Progres u korišćenju biomarkera trebalo bi da dobije još veći zamah u eri personalizovane medicine

Ključne reči: akutni infarkt miokarda, biomarkeri, perkutana koronarna intervencija, prognoza, STEMI.

Naučna oblast: Medicinska biohemija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.1:616.127-005.8



## **Abstract**

Prognostic significance of biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention

Acute myocardial infarction (AMI) is a major healthcare problem. It is characterized by myocardial cell death due to necrosis and apoptosis. In acute ST-segment elevation (STEMI), myocardial infarction plaque rupture with the formation of an occluding thrombus is usually the underlying cause of myocardial ischemia. Despite significant progress utilizing percutaneous coronary intervention (PCI), AMI remains one of the main causes of death and disability. With expansion of the number and types of biomarkers available, the opportunity to improve diagnosis, risk stratification, and selection of therapy using these noninvasive, affordable tools continues to grow.

The main aim of this study was to determine the prognostic value of laboratory biomarker or biomarkers combination in relation to in-hospital mortality and occurrence of major adverse coronary events (MACE) including death, reinfarction, target vessel revascularisation and stroke during 30 days and 1 year follow-up in STEMI patients treated by pPCI.

This prospective study consisted of 300 patients with STEMI who were treated by primary PCI. One hundred patients had first anterior STEMI and was successfully (< 20% of residual stenosis and TIMI flow 3) treated by primary PCI. The clinical and demographic characteristics, anthropometric parameters and cardiovascular risk factors were recorded. Congestive heart failure on admission was defined as the present clinical evidence of pulmonary venous congestion and it was designated as a Killip class. The patients with the cardiogenic shock were excluded from the study. Echocardiographic data were obtained by 2D echocardiographic examination and the left ventricular ejection fraction (LVEF) was estimated by Simpson's rule.

Blood samples from 200 patients hospitalized with STEMI treated by primary PCI were subsequently tested for biomarkers in 4 time points from day 0 to day 7, and blood samples from 100 patients with the first anterior STEMI successfully treated by primary PCI were subsequently tested for biomarkers in 8 time points from day 0 to day 7. The spectar of laboratory biomarkers has covered a major class of biomarkers (e.g.,

biomarkers of necrosis, ischemia, inflammation, hemodynamic stress, platelet function and hemostasis, and dyslipidemia), as routine biochemical and hematological analysis. Using Biochip Array Technology Quantitative determination of multiple (32) analytes (cytokine, cytokine receptors, growth factors, adhesion molecules and MMP-9) was performed in a single sample by 5 different sorts of biochips.

Analizys of time-dependent changes of traditional biomarker of necrosis (cTnI, CK-MB mass, myoglobin), inflammation (CRP), hemodinamic stress (BNP, NT-proBNP) confirmed kinetics well known in the literature data. The correlation analysis results confirm the association between biomarker of necrosis (cTnI, CK-MBmass), biomarker of inflammation (CRP) and hemodynamic stress (NT-proBNP) and low LVEF. Analyzing the plasma myeloperoxidase (MPO) kinetics in patients with the first anterior STEMI successfully treated by pPCI the followings were observed: MPO shows a biphasic pattern of release, where MPO concentrations attributed to the first peak at 4 h and the second one at 24 h after pPCI; there is a significant correlation between the second peak MPO and troponin I value as well as heart failure. In-hospital mortality was 6% in the first anterior STEMI patients undergoing pPCI. Plasma MPO levels at 24 h after pPCI was an independent predictor of in-hospital mortality. The 30-day MACE occurred in 10% of patients with the first anterior STEMI treated by pPCI. Plasma Lp-PLA<sub>2</sub> level was an independent predictor of 30-day MACE in patients with first anterior STEMI patients treated by primary PCI. Our study reports the usefulness of BNP, measured 24 h after symptom onset, in prediction of AF in patients with STEMI treated by primary PCI. The incidence of 1-year mortality and MACE in patients with first anterior STEMI treated by pPCI were 5% and 10%, respectively. This study demonstrate that except traditional predictors of long-term mortality and MACE such as heart failure and atrial fibrillation, CK-MBmass was an independent predictor, too. Twelve biomarkers were entered into exploratory factor analysis performed using principal components analysis and orthogonally rotated with the „varimax“ method. Four factors emerged: Factor 1-sTNFR1, sTNFR2, MMP-9; Factor 2- sICAM-1, sE-selektin i sL-selektin.; Factor-3 IL-6, IL-8 i MCP-1, and Factor 4-MIP-1 $\alpha$ , IL7 i IL15. Factor 2 and 3 were independent predictotrs of 30-days MACE. Subjects with Factor 2 and 3 scores within the upper tertile had significantly higher an event rate for 30-days MACE compared to patients in the mid and in the lower tertile.

The better understanding of the biology, technology, and clinical evidence underlying the use of established and novel biomarkers in AIM will be very helpful in clinical medicine. The progress in the use of biomarkers is likely to gain even greater momentum in the era of personalized medicine.

**Key words:** acute myocardial infarction, biomarkers, percutaneous coronary intervention, prognosis, STEMI.

**Academic Expertise:** Medical Biochemistry

**Major in:** Medical Biochemistry

**UDK N<sup>o</sup>:** 577.1:616.127-005.8

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Akutni koronarni sindrom.....	1
1.1.1. Definicija i klasifikacija.....	1
1.1.2. Epidemiologija i tok bolesti.....	1
1.1.3. Patofiziologija.....	2
1.1.4. Faktori rizika za razvoj akutnog koronarnog sindroma.....	2
1.2. Infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta.....	3
1.2.1. Lečenje akutnog infarkta miokarda sa elevacijom ST-segmenta.....	4
1.2.1.1. Primarna perkutana koronarna intervencija.....	5
1.3. Klasifikacija rizika i predviđanje ishoda lečenja.....	7
1.4. Biohemijski markeri u akutnom infarktu miokarda.....	11
1.4.1. Biomarkeri.....	11
1.4.2. Biomarkeri nekroze miokarda.....	14
1.4.3. Biomarkeri vulnerabilnosti, ruptur plaka i tromboze.....	17
1.4.4. Biomarkeri inflamacije.....	25
1.4.5. Biomarkeri hemodinamskog stresa.....	59
1.4.6. Biomarkeri funkcije trombocita i hemostaze.....	61
1.4.7. Biomarkeri dislipidemije i modifikacije lipida.....	63
<b>2. CILJ RADA</b> .....	71
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	72
3.1. Ispitivana populacija.....	72
3.2. Uzorci biološkog materijala i laboratorijska određivanja.....	75
3.3. Statistička analiza.....	86
<b>4. REZULTATI</b> .....	88
4.1. Karakteristike ispitivanih bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.....	88
4.2. Karakteristike ispitivanih bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI.....	95
4.3. Vremenski profili biomarkera kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI.....	103
4.4. Korelacija biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida sa demografskim karakteristikama, faktorima rizika i karakteristikama postinfarktne toka kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI.....	109
4.5. Povezanost biomarkera sa kratkoročnom prognozom u bolesnika sa STEMI, odnosno bolesnika sa prvim prednjim STEMI.....	112
4.6. Povezanost biomarkera sa udaljenom prognozom u bolesnika sa STEMI, odnosno bolesnika sa prvim prednjim STEMI.....	140
4.7. Grupisanje citokina, solubilnih citokinskih receptora, solubilnih adhezionih molekula i molekula funkcionalno povezanih sa citokinima eksploratornom faktorskom analizom kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI.....	145
4.8. Univarijantna, multivarijantna i ROC analiza povezanosti citokina, citokinskih receptora i adhezionih molekula sa kratkoročnom i jednogodišnjom prognozom kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI.....	152
4.9. Povezanost faktora dobijenih eksploratornom faktorskom analizom i kratkoročne prognoze kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI.....	164
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	168
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	214
<b>LITERATURA</b> .....	216
<b>BIOGRAFIJA</b> .....	328

## LISTA SKRAĆENICA

ACE	angiotenzin I-konvertujući enzim
AF	atrijalna fibrilacija
AIM	akutni infarkt miokarda
ak	aminokiseline
AKS	akutni koronarni sindrom
apo	apolipoprotein
ARB	antagonisti angiotenzinskih receptora
BMI	indeks telesne mase
BNP	B-tip natriuretičkog peptida
CD40L	CD40 ligand
CK-MB	MB izoforma kreatin kinaze
CRP	C-reaktivni protein
DAP	dijastolni arterijski pritisak
DM	dijabetes melitus
ECG	elektrokardiogram
EGF	epidermalni faktor rasta
eGFR	jačina glomerulske filtracije
ELISA	enzimsko imunoodređivanje
GM-CSF	faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga
HDL	lipoproteini velike gustine
hs	test velike osetljivosti
ICAM	intraćelijske adhezine molekule
IL	interleukin
INF	interferon
IRA	infarkt na arterija
LAD	leva prednja silazna koronarna arterija
LCX	cirkumfleksna grana leve koronarne arterije
LDL	lipoproteini male gustine
LKEDD	dijastolna dimenzija leve komore,
LKEF	ejekciona frakcija leve komore
LKESD	sistolna dimenzija leve komore
LM	glavno stablo leve koronarne arterije
NMH	niskomolekularni heparin
NFH	nefrakcionisani heparin
LP	leva pretkomora
Lp(a)	lipoprotein (a)
LpPLA <sub>2</sub>	lipoproteinska fosfolipaza A <sub>2</sub>
MCP	protein koji privlači monocite
MIP	makrofagni inflamatorni protein
MMP	metaloproteinaze matriksa
MPO	mijeloperoksidaza
NAP	nestabilna angina pektoris
NKVD	neželjeni kardiovaskularni događaji
NO	azot monoksid
NSTEMI	infarkt miokarda bez elevacije ST-segmenta
NT-proBNP	N-terminalni proBNP

oxLDL	oksidovani LDL
PAPP-A	sa trudnoćom udruženi protein plazme
PKI	perkutana koronarna intervencija
pPKI	primarna perkutana koronarna intervencija
RCA	desna koronarna arterija
ROC	receiver operating characteristics
s	solubilni
SAP	sistolni arterijski pritisak
sIL-R	solubilni IL- receptor
STEMI	infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta
sTNFR	solubilni receptor za faktor nekroze tumora
TG	trigliceridi
TIMI	tromboliza u infarktu miokarda
TNF	faktor nekroze tumora
Tn	srčani troponin
TVR	revaskularizacija ciljne lezije
UFH	nefrakcionisani heparin
VCAM	vaskularne ćelijske adhezine molekule
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

## **1. U V O D**

### **1.1. Akutni koronarni sindrom**

#### **1.1.1. Definicija i klasifikacija**

Akutni koronarni sindrom (AKS) predstavlja širok spektar kliničkih manifestacija koje nastaju kao posledica akutne ishemije i/ili nekroze miokarda čiji je uzrok najčešće akutna koronarna lezija, nastala rupturom nestabilnog aterosklerotičnog plaka u koronarnoj arteriji sa pratećom trombozom, inflamacijom, sa ili bez vazokonstrikcije i sa distalnom mikroembolizacijom (1, 2). AKS obuhvata infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta (STEMI), infarkt miokarda bez elevacije ST-segmenta (NSTEMI) i nestabilnu anginu pectoris (NAP) (1).

Različite prezentacije AKS dele isti patofiziološki supstrat. Glavni simptom koji inicira dijagnozu je bol u grudima, ali se klasifikacija bolesnika zasniva na elektrokardiogramu (EKG). U skladu sa tim, postoje dve kategorije bolesnika:

- a) bolesnici sa ishemijskim bolom ili njegovim ekvivalentima (najčešće dispnejom), kod kojih se elektrokardiogramski registruje perzistentna elevacija ST-segmenta ili novonastali blok leve grane. Kod ovih bolesnika se najčešće kasnije razvije akutni infarkt miokarda sa Q zupcem;
- b) bolesnici sa ishemijskim bolom ili njegovim ekvivalentima bez perzistentne elevacije ST-segmenta i bez novonastalog bloka leve grane. Kod njih se najčešće registruje trajna ili prolazna depresija ST segmenta, inverzija, apatiranost ili pseudonormalizacija T talasa, nespecifične promene ST-segmenta, a nekada i nema promena na elektrokardiogramu (1).

#### **1.1.2. Epidemiologija i tok bolesti**

Kao najteži oblik ishemijske bolesti srca, AKS je jedan od najčešćih uzroka urgentnog prijema u bolnicu i iznenadne smrti u razvijenim delovima sveta, a poslednjih nekoliko decenija i u zemljama u razvoju (3, 4). U Srbiji je ishemijska bolest srca veliki zdravstveni i socioekonomski problem. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović-Batut“ za 2010. godinu, kardiovaskularne bolesti su sa 54,7% vodeći uzrok smrtnosti. Ishemijska bolest srca čini 21,4%, a kao njen najteži

oblik AKS u toj grupi je zastupljen sa 54,6%. U Srbiji je tokom 2010. godine dijagnoza STEMI postavljena kod 52,9% bolesnika sa AKS. Prema istom izvoru, od 7887 bolesnika sa STEMI primljenih u koronarne jedinice u Srbiji u toku 2010. godine, smrtni ishod je zabeležen kod 9,2% obolelih osoba. Ovoj alarmantnoj slici treba dodati i visoku stopu prevalencije tradicionalnih faktora rizika: pušenje (32,1% populacije), hipertenzija (73,4 % populacije), gojaznost (19,5 % populacije), dislipidemija (50,7 % populacije) i šećerna bolest (28,1 % populacije) (5).

U srpskoj populaciji je STEMI češći nego NSTEMI. Analizom lokalizacije infarkta miokarda prema EKG utvrđeno je da se infarkt prednjeg zida javlja kod 37,6% bolesnika. Bolesnici sa STEMI imaju nešto veći bolnički mortalitet nego oni sa NSTEMI-AKS (7% prema 5%), ali posle 6 meseci vrednosti mortaliteta kod oba stanja su veoma slične (12% odnosno 13%) (6).

### **1.1.3. Patofiziologija**

Ateroskleroza je najčešće uzrok koronarne arterijske bolesti. Na manifestacije ateroskleroze opasne po život, kao što je AKS, nadovezuje se aterotromboza na rupturiranom ili erodiranom aterosklerotičnom plaku, sa ili bez prateće vazokonstrukcije uzrokujući iznenadnu i kritičnu redukciju koronarnog protoka. Inicijacija i progresija aterosklerotičnih lezija je kompleksan dugogodišnji proces u kome različiti faktori imaju važnu ulogu. Najraniji događaj u razvoju ateroskleroze je disfunkcija endotela, praćena adheriranjem monocita i T-limfocita na endotel i njihovom migracijom u subendotelni prostor. Adhezija i transmigracija monocita pokreće njihovu diferencijaciju u makrofage koje preuzimaju lipide putem receptora "čistača" formirajući penaste ćelije, koje su osnovno obeležje ranih lezija u obliku masnih pruga. Sledi migracija glatkih mišićnih ćelija u intimu, njihova proliferacija i formiranje fibrozne kape. Nastali aterosklerotični plak može biti stabilan ili nestabilan u zavisnosti od stabilnosti njegove strukture. Ruptura aterosklerotičnog plaka posledica je inflamatornih procesa koji imaju ključnu ulogu u transformaciji strukturno vulnerabilnog plaka u funkcionalno nestabilan plak praćen arterio-arterijskim tromboembolizmom (7).



#### **1.1.4. Faktori rizika za razvoj akutnog koronarnog sindroma**

Pojam faktora rizika se najčešće koristi u svrhu istraživanja učestalosti ishoda koji je posledica izloženosti nekom faktoru. Ukoliko se prilikom izloženosti nekom faktoru dešava određeni ishod, smatra se da faktor rizika označava izloženost koja je na neki način statistički povezana sa ishodom (8–10).

Ovom terminu danas se pripisuje nekoliko značenja: pokazatelj rizika–svojstvo ili izloženost koja je povezana sa većom verovatnoćom za nastanak određene bolesti, ali nije nužno i uzročni faktor; determinanta–neko svojstvo ili izloženost koja je povezana sa većom verovatnoćom za nastanak neke bolesti ili nekog ishoda; modifikator faktora rizika–determinanta koja se može modifikovati intervencijom i na taj način se može smanjiti verovatnoća pojave bolesti.

Faktorima rizika za koronarnu arterijsku bolest smatraju se oni faktori za koje je primenom statističkih metoda dokazano da su mnogo češći u grupi osoba sa koronarnom arterijskom bolešću nego u kontrolnoj grupi. U nepromenljive faktore rizika za koronarnu arterijsku bolest spadaju starosna dob, pol, rasa, pozitivna porodična istorija za ishemijsku bolest srca u ranijem životnom dobu (<55 kod muškaraca; <65 godina kod žena) i genetski faktori. Veliki deo do sada poznatih faktora rizika vezan je uz navike današnjeg čoveka i spada u promenljive faktore rizika: pušenje cigareta ili izloženost duvanskom dimu, gojaznost (posebno abdominalna gojaznost), povišen krvni pritisak, dijabetes melitus, hiperlipidemija, fizička neaktivnost, sedentarni način života. Osim navedenih faktora, danas se govori i o psihosocijalnim faktorima, socioekonomskom statusu, inflamatorni faktorima, poremećajima hemostaze itd. Razvoju koronarne arterijske bolesti posebno doprinosi istovremeno prisustvo više činilaca čiji se efekti multipliciraju.

#### **1.2. Infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta**

Infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta (STEMI) se definiše elevacijom ST-segmenta u trajanju dužem od 20 minuta koja je praćena povećanjem biomarkera nekroze miokarda. Gotovo svi slučajevi STEMI nastaju kao komplikacija ateroskleroze koronarnih arterija. Iako napredovanje aterosklerotičnog plaka često dovodi i do potpunog začepljenja koronarne arteije, ono po pravilu ne uzrokuje akutni infarkt

miokarda (AIM) zahvaljujući propratnom razvoju kolateralne koronarne cirkulacije. Suprotno, patofiziološku podlogu STEMI čini iznenadno nastali tromb koji okludira arteriju na mestu disrupcije do tada stabilnog i većinom hemodinamički neznačajnog aterosklerotičnog plaka.

Po prijemu pacijenta sa bolom u grudima procenjuje se hemodinamsko stanje bolesnika, a zatim ukoliko je hemodinamski stabilan uzima se kratka anamneza (prethodne bolesti, faktori rizika, provocirajući faktori, prethodna terapija), obavlja fizikalni pregled, utvrđuju elektrokardiografske promene i određuju vrednosti markera nekroze miokarda (11).

EKG dijagnoza STEMI podrazumeva novonastalu elevaciju ST segmenta najmanje 1 mm (0,1 mV) u standardnim odvodima, i najmanje 2 mm u najmanje 2 susedna odvoda (12, 13). Elevacija ST segmenta u određenim nivoima određuje veličinu i poziciju AIM: anteroseptalni (V1,V2,V<sub>3</sub> i moguće V4), anteriorni (V2-V4), anterolateralni zid (V4-V6 D1 aVL), lateralni zid (D1 aVL), inferiorni (D2D3 aVF), inferolateralni (D2 D3 aVF i V5 i V6), izolovani posteriorni (depresija ST V1-V2, elevacija ST u V7,V8, V9), desna komora (elevacija ST u V4 R). Prema odvodima u kojima je ST-elevacija prisutna može se pretpostaviti koja je koronarna arterija ili njena grana u pitanju.

### **1.2.1. Lečenje akutnog infarkta miokarda sa ST-elevacijom**

Zaustavljanje miokardne nekroze putem reperfuzije je osnovni cilj svih terapijskih postupaka u bolesnika sa AKS. Komplikacije koje mogu da dovedu i do letalnog ishoda su u korelaciji sa stepenom težine AKS, a u 50 % se javljaju u prva 4 h od početka simptoma (14–16). Najvažniji zadaci u lečenju bolesnika sa AKS su: rano prepoznavanje simptoma, brza aktivacija sistema urgentne medicine, rano postavljanje dijagnoze AKS, trijaža bolesnika koji zahtevaju ranu reperfuziju, rana reperfuzija, inicijalna medikamentna terapija, prevencija i terapija malignih poremećaja ritma.

Bolesnici sa STEMI, koji po pravilu imaju potpunu okluziju epikardne koronarne arterije trombom u praksi su kandidati za reperfuzionu terapiju (fibrinolizu ili perkutanu koronarnu intervenciju (PKI)). Vrsta reperfuzione strategije se određuje u zavisnosti od trajanja simptoma do prvog medicinskog kontakta, starosti bolesnika, veličine infarkta, telesne težine bolesnika, sklonosti ka hemoragičnim komplikacijama

kao i dostupnosti da se uradi PCI u roku od 90–120 min. U prehospitalnim uslovima bitno je proceniti koja je reperfuziona strategija primenljiva kod svakog pojedinačnog bolesnika.

### **1.2.1.1. Primarna perkutana koronarna intervencija**

Metoda izbora u lečenju bolesnika sa STEMI je primarna PKI (pPKI). Primarna PKI definiše se kao perkutana intervencija na koronarnom krvnom sudu odgovornom za infarkt unutar 12h od nastanka simptoma bez prethodne upotrebe trombolitika. Ova intervencija je metoda izbora za lečenje STEMI ukoliko bolesnik može da se transportuje u salu za kateterizaciju u roku od 90 min od dijagnostikovanja STEMI (klasa I preporuka, nivo dokaza A) (studije PAMI, GUSTO-IIb, C-PORT, DANAMI-2) (17–19). Ona se takođe preporučuje ako je bolesnik u kardiogenom šoku (klasa I preporuka, nivo dokaza B) ili se na EKG-u održava elevacija ST-segmenta (klasa IIa preporuka, nivo dokaza C). Primarna PKI se uspostavlja protok kroz okludiranu koronarnu arteriju koja je uzrok infarkta i istovremeno dobija uvid u stanje ostalih krvnih sudova.

Stanje perfuzije, kao i uspešnost rekanalizacije koronarne arterije odgovorne za infarkt postupcima fibrinolize/PKI može se opisati na osnovu angiografskog nalaza pomoću tzv. TIMI sistema bodovanja (prema sistemu bodovanja korišćenom u TIMI (Thrombolysis In Myocardial Infarction) studiji). TIMI stupanj 0 označava potpunu okluziju ciljne arterije, stupanj 1 označava delimični prolaz kontrasta iza mesta opstrukcije, ali bez perfuzije distalnih delova arterije, stupanj 2 označava potpunu penetraciju kontrasta do periferije krvnog suda ali je ista odložena u odnosu na normalne koronarne arterije i stupanj 3 označava prolaz kontrasta kao i u zdravim arterijama. Bolesnici sa TIMI0 i TIMI1 stupnjem protoka imaju značajno viši mortalitet u poređenju sa onima kod kojih se postigne TIMI2, a naročito TIMI3 protok. U oko 10–20% bolesnika sa STEMI na inicijalnom koronarogramu, pre pPKI, prezentuje se spontano otvorena arterija (TIMI2 ili TIMI3), a ovi bolesnici imaju dokazano bolju prognozu u smislu preživljavanja i nastanka srčanog popuštanja.

Treba imati u vidu da optimalna terapija AIM podrazumeva ne samo uspostavljanje adekvatnog protoka kroz infarktenu arteriju (kvantifikovano Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) protokom 3), već i obnavljanje adekvatnog protoka

krvi kroz koronarnu mikrocirkulaciju i ponovno uspostavljanje perfuzije miokarda. Ukoliko se reperfuzija uradi u toku prvog sata od nastanka simptoma kod bolesnika sa STEMI može da se “abortira” infarkt miokarda u oko 25% slučajeva (20–22).

Lečenje AIM prolazilo je kroz više faza. Šezdesetih godina prošlog veka počelo se sa davanjem malih doza streptokinaze u obliku intravenskih infuzija u toku 24h. Usledila je primena trombolitika (streptokinaza ili tkivni aktivator plazminogena) u velikim dozama intravenski u relativno kratkom vremenskom periodu od 60–90 minuta. Međutim, primena trombolize nije uvek bila 100% efikasna u restauraciji protoka kroz okludiranu arteriju (pogotovo normalnog protoka TIMI 3), postojala je mogućnosti pojave retromboza, mikroembolizacije distalne koronarne cirkulacije, kao i hemoragijskih komplikacija. Usledila je tehnika mehaničkog otvaranja za infarkt odgovorne arterije balonom i/ili stentom sa ili bez primene male doze trombolitika uz primenu antiagregacione terapije kojom bi se zaštitila mikrocirkulacija (23). Zahvaljujući brzom tehnološkom napretku, a posebno uvođenju intrakoronarnih stentova u rutinsku primenu, kako metalnih tako i stentova obloženih farmakološkom supstancom sa sporim oslobađanjem, s vrlo povoljnim kratkoročnim i dugoročnim rezultatima, znatno je prošireno indikacijsko područje primene i sigurnost intervencije.

Osim stentova u toku pPKI danas se koriste i druga dostignuća interventne kardiologije kao što su aspiracioni kateteri za aspiraciju tromba iz infarktne arterije (klasa IIa preporuka, nivo dokaza B), intrakoronarna primena adenzina i verapamila (klasa IIb preporuka, nivo dokaza C), postavljanje filtera distalno od mesta naduvavanja balona i/ili plasiranje stenta u svrhu zaštite mikrocirkulacije od mikroembolusa.

Bolesnici pre upućivanja na pPKI dobijaju dvojni antiagregacionu terapiju koja podrazumeva 300 mg acetilsalicilne kiseline (klasa I preporuka, nivo dokaza A) i 600 mg klopidogrela (klasa I preporuka, nivo dokaza B). U toku pPKI bolesnicima se daje intravenski heparin (klasa I preporuka, nivo dokaza B), a kod nekih bolesnika se u toku i nakon procedure daju blokatori trombocitnih glikoproteinskog IIb/IIIa receptora (klasa IIa preporuka, nivo dokaza A). U toku intervencije bolesnicima se umesto heparina može dati i bivalirudin kao alternativa heparinu uz blokator glikoproteinskog IIb/IIIa receptora na trombocitima. Nakon intervencije nastavlja se primena dvojne antiagregacione terapije (100–300 mg acetilsalicilne kiseline i 75 mg klopidogrela) u zavisnosti od vrste implantiranog stenta. Postoje izvesna mišljenja i preliminarni nalazi registara i studija da je tromboliza primenjena sa fibrin specifičnim trombolitikom koji

se daje u bolusu (Tenecteplase) brza i efikasna u reperfuziji miokarda i da vreme do PKI ne treba da bude duže od 60 min. Ta zapažanja i nalazi se sada proveravju u velikoj medjunarodnoj studiji STREAM.

Od početka široke primene pPKI izvedene su brojne randomizirane kontrolisane studije (19, 24–28) koje su pokazale da pPKI ima prednost nad intravenskom trombolizom: manja stopa mortaliteta i morbiditeta, efikasnije obnavljanje protoka u koronarnoj arteriji odgovornoj za infarkt, manja rekurentna miokardna ishemija, manja stopa ponovne okluzije i ponovnog infarkta, bolja funkcija leve komore i bolji klinički ishod, manji mortalitet u kratkoročnom i udaljenom praćenju. Mortalitet hospitalizovanih bolesnika lečenih pPKI kreće se između 0 i 13%, a stopa preživljavanja godinu dana po otpustu iz bolnice kreće se između 88 i 98%, tri godine nakon otpusta 87 do 90%.

Uvođenje pPKI kao rutinskog metoda u lečenju bolesnika sa STEMI od novembra 2005. godine je važna prekretnica u strategiji lečenja ovih bolesnika u Srbiji. U studiju čiji je osnovni cilj bio da stvori realnu sliku u tome kako se leče pacijenti sa STEMI u različitim evropskim zemljama bila je uključena i Srbija. Podaci iz ove studije za 2007. godinu pokazuju da je ukupan broj infarkta bio 866, od toga 6079 sa STEMI, a da je od toga samo 19% svih STEMI lečenih pPKI. Broj urađenih PKI u toku 2007. godine u Srbiji bio je 6395 u 9 centara, od kojih je samo jedan u Kliničkom centru Srbije radio 24h tokom cele godine. U bolesnika sa STEMI lečenih pPKI mortalitet u bolnici je bio 3,3%, dok je kod bolesnika sa STEMI koji su lečeni fibrinolitičkom terapijom bio 9,3% (29). Od 2007. godine do danas raste broj urađenih pPKI u salama za kateterizaciju Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije koje su otvorene 24h dnevno. I dok sama procedura spada u domen specijalno edukovanih interventnih kardiologa, preproceduralnu pripremu i postproceduralno lečenje sprovode neinvazivni kardiolozi.

Imajući u vidu značaj pPKI, kao i njenu prednost nad drugim vidovima reperfuzione terapije, danas postoji više preporuka, vodiča i algoritama za njeno sprovođenje

### 1.3. Klasifikacija rizika i predviđanje ishoda lečenja

Prognoza bolesnika sa AIM u najvećoj meri zavisi od veličine infarkta, funkcije leve komore, pojave srčanih aritmija, izloženosti opstruktivnih lezija koronarnih arterija (30–37). Već prilikom prvog pregleda bolesnika sa sumnjom na AIM, uzimanjem anamnestičkih podataka i kliničkog statusa, započinje klasifikacija rizika. Fizikalni nalaz na plućima u bolesnika s AIM u mnogome zavisi od veličine infarktom zahvaćenog područja miokarda. Nalaz na prvom urađenom EKG ne samo da pomaže u postavljanju dijagnoze AIM i odlučuje o indikaciji za lečenje u zavisnosti od trajanja simptoma bolesti i lokalnim mogućnostima, već sadrži i kritične prognostičke informacije. Ranu evaluaciju nakon postavljene dijagnoze AIM upotpunjuje identifikacija faktora rizika, kao i serijski tok elektrokardiografskih promena i markera srčane nekroze (38, 39).

Klasifikacija rizika u ranoj fazi lečenja AIM ima cilj da identifikuje bolesnike koji imaju visoki rizik za ponovljeni koronarni događaj i/ili iznenadnu smrt, a čiji se ishod može poboljšati pravovremenom primenom invazivnih terapijskih metoda. Uprkos primenjenoj reperfuzionoju terapiji, povezanost sa visokim mortalitetom rane faze lečenja utvrđena je kod starijih bolesnika, sa AIM prednjeg zida miokarda, tahikardijom, hipotenzijom i srčanim zatajivanjem. Visokorizičnu grupu bolesnika čine i oni sa simptomima postinfarktne ishemijske miokarda, ali i pojedini bolesnici nakon primene trombolitičke terapije sa uspešno postignutom rekanalizacijom infarktne koronarne arterije u kojih postoji povećana sklonost ka nastanku rane koronarne reokluzije. U kasnijoj fazi oporavka, obično 2. do 5. dana lečenja, vrši se dalja procena rizika upotrebom različitih neinvazivnih tehnika i testova opterećenja, kao i invazivnim tehnikama u ustanovama koje imaju tu mogućnost. Rezultati tih testiranja presudni su za procenu težine bolesti, ishoda, razvoja i lečenja akutnih i hroničnih komplikacija. Završna klasifikacija rizika u akutnoj fazi infarkta miokarda vrši se pre samog otpusta iz bolnice i cilj joj je da ponovno izdvoji kategorije visoko rizičnih bolesnika za ponovne koronarne događaje i/ili iznenadnu srčanu smrt kojima su potrebne intenzivnije mere sekundarne prevencije (38, 40).

Prognoza bolesnika lečenih pPKI je bolja u odnosu na one lečene trombolitičkom terapijom, ali je evidentno i da postoje razlike u kratkoročnom i dugoročnom preživaljavanju bolesnika lečenih pPKI, kao i u pojavi komplikacija. Ove

razlike su posledica različitih demografskih i kliničkih karakteristika bolesnika pri prijemu, razlike u ehokardiografskim parametrima (sistolna funkcija leve komore pre i posle pPKI), angiografskom nalazom, pridruženim komorbiditetima (terminalna hronična bubrežna insuficijencija, raniji hemoragijski moždani udar, maligniteti, itd.), pojavi komplikacija u toku pPKI, itd. Osim procene rizika za pojavu mortaliteta, od izuzetne važnosti su i rizik za pojavu reinfarkta, moždanog udara, potrebe za ponovljenom revaskularizacijom miokarda (PKI i/ili operacija aorto-koronarnog bajpasa) zbog rekurentne ishemije ili ponovljenih anginoznih bolova. Pojava smrtnog ishoda ili reinfarkta miokarda ili moždanog udara ili potreba za hitnom revaskularizacijom miokarda zbog ishemije označava se kao neželjeni kardiovaskularni događaj (NKVD). To je kompozitni događaj i u različitim studijama može da uključuje sve navedene neželjene kardiovaskularne događaje ili samo neke od njih. NKVD obavezno obuhvata smrtni ishod i reinfarkt miokarda. Rizik za pojavu NKVD najveći je u prvih mesec dana, a zatim opada, ali je i dalje prisutan, pa je zbog toga neophodna procena kako kratkoročnog, tako i dugoročnog rizika. Budući da oko 25% smrtnih ishoda tokom prve godine nakon AIM nastaje unutar prvih 48 sati lečenja (45% do 7. dana, a 57% do 30. dana bolesti) (38), sve se više pridaje značaj ranoj proceni rizika.

Procena rizika za pojavu NKVD bitna je u planiranju lečenja bolesnika, otpusta iz bolnice, rehabilitacije, personalizacije terapije lekovima, rešavanja lezija na ostalim obolelim arterijama, itd. Ona sa sobom nosi i ekonomsku komponentu, tj. smanjuje dužinu boravkabolesnika u bolnici i smanjuje cene lečenja.

Atrijalna fibrilacija (AF) predstavlja jednu od važnijih komplikacija AIM i udružena je sa nepovoljnim prognostičkim informacijama, povećanim bolničkim i udaljenim mortalitetom. Incidenca AF u toku anteriornog AIM može da bude i do 19% (41), a u toku inferiornog AIM i do 12% (42). Uzroci za nastanak AF u toku AIM mogu biti: ishemija ili infarkt pretkomora, infarkt miokarda komora sa hemodinamskom dekompenzacijom, perikarditis, izmenjen tonus autonomnog nervnog sistema, poremećaj elektrolita (hipokalemija, hipomagnezijemija) i acido-baznog statusa, hipoksija ili rezultat prateće terapije (43). Atrijalna fibrilacija u AIM je obično udružena sa srčanom insuficijencijom, komorskim aritmijama, povećanim rizikom od tromboembolijskih komplikacija (44–46). Starije životno doba i kongestivna srčana insuficijencija su dva glavna faktora udružena sa nastankom AF u AIM (44, 45, 47–50). Međutim, pošto je AF mnogo češća u bolesnika sa kliničkim i hemodinamskim

manifestacijama ekstenzivnog infarkta, koji i sami imaju lošiju prognozu, postojala je kontroverza da li je AF samo marker lošije prognoze (44, 51–54) ili ima nezavisnu prediktivnu vrednost za povećani mortalitet (45, 55–57).

Do iznenadne srčane smrti u bolesnika s AIM može doći usled ruptуре neke od srčanih struktura (slobodnog zida leve komore (LK), interventrikularnog septuma ili papilarnog mišića). Nastanak te komplikacije u većini slučajeva je nepredvidiv, a lečenje izbora predstavlja hitan kardiohirurški zahvat. Srčani zastoj s kardiogenim šokom takođe je značajan uzrok smrti u bolesnika s AIM. U većini slučajeva nastaje kao posledica gubitka > 40% mase miokarda. Starosna dob, pol i karakteristike infarkta u EKG zapisu su faktori na koje se ne može uticati lečenjem. Srčana frekvencija i hemodinamske vrijednosti mogu se meriti, ali i promeniti te stoga imaju karakterističnu prediktivnu vrednost koja zavisi od primenjene farmakološke terapije, intervencije i/ili kardiohirurškog lečenja (58).

U kliničkoj praksi najbolje je prihvaćena i najduže se koristi klinička klasifikacija po Killipu iz 1967. godine (59). Ova klasifikacija bolesnika sa AIM koji su lečeni u koronarnoj jedinici zasniva se na praćenju fizikalnog nalaza na plućima koji umnogome zavisi od veličine infarkta (60, 61). Jednostavna podela u četiri klase ne zavisi od starosne dobi, pola, komorbiditeta ili lokalizacije infarkta: Killip klasa I–pacijenti nemaju kliničke znakove srčane dekompenzacije niti srčane insuficijencije; klasa II–pojava srčane insuficijencije sa dijagnostičkim kriterijumima koji uključuju i plućnu hipertenziju, a znaci plućne kongestije se javljaju u oko polovinu plućnih krila; klasa III–izražena srčana insuficijencija uz znake plućnog edema koji obuhvataju oba plućna krila; klasa IV–kardiogeni šok sa kliničkim znacima hipotenzije ( $\leq 90$  mm Hg) i perifernom vazokonstrikcijom predstavljenom oligurijom, cijanozom i dijaforezom.

Veza između ranije hospitalizacije zbog srčanog oboljenja i lošije prognoze tih bolesnika je logična i bitna, budući da su to, najčešće, bolesnici sa već oštećenim srčanim mišićem i sledstveno, smanjenom adaptivnom sposobnošću srčanog mišića za nova oboljenja i opterećenja istog (62).

Doba primene modernih informatičkih tehnologija u kardiologiji dovela je do stvaranja velikog broja alata za predikciju rizika, od kvalitativnih, polukvantitativnih do kvantitativnih. Višestruke analize varijabli iz velikih kliničkih istraživanja, kao skorovi rizika, nisu rezultirale zadovoljavajućim modelom za rutinsku kliničku praksu koji bi optimalno razlikovao bolesnike s visokim od onih s niskim rizikom i mogao optimalno



da proceni rizik od neželjenog ishoda. Razlog verovatno leži u činjenici da bolesnici iz kliničkih istraživanja nemaju isti stepen rizika kao svakodnevni bolesnici iz kliničke prakse (63, 64).

## **1.4. Biohemijski markeri u akutnom infarktu miokarda**

### **1.4.1. Biomarkeri**

Biomarkeri su “alat” za bolju identifikaciju visoko-rizičnih bolesnika, za tačno i pravovremeno postavljanje dijagnoze, za efikasnu prognozu i lečenje bolesnika sa određenim oboljenjem. National Institutes of Health (NIH) radna grupa je 2001. god. standardizovala definiciju biomarkera (65) kao karakteristiku koja se objektivno može izmeriti i oceniti kao indikator normalnog biološkog procesa, patološkog procesa ili farmakološki odgovor na primenjenu terapiju i definisala tipove biomarkera: tip 0–prognostički marker, tip 1–marker biološke aktivnosti (odgovor na terapiju) i tip 2–surogat marker (marker koji substituiše klinički ishod, predviđa terapijsku efikasnost) (66).

Izrazom biomarker u medicini se označava najčešće protein izmeren u krvi čija koncentracija ukazuje na normalan ili patološki odgovor organizma, kao i na farmakološki odgovor na primenjenu terapiju. Šire gledano biomarker je bilo koji pokazatelj koji se koristi kako indikator intenziteta nekog oboljenja ili drugog fiziološkog stanja u organizmu. On može da se meri u biouzorku (uzorak krvi, urina ili tkiva), može da se dobija direktno od osobe (krvni pritisak, EKG ili Holter) ili može da se dobije snimanjem (ehokardiogram ili CT snimak).

Biomarkeri se dele na: 1) antecedentne biomarkere koji ukazuju na rizik od nastanka bolesti, 2) »screening« biomarkere kojima se utvrđuje subklinička forma bolesti, 3) dijagnostičke biomarkere koji otkrivaju postojeću bolest, 4) »staging« biomarkere koji definišu stadijum i težinu bolesti i 5) prognostičke biomarkere koji prognoziraju tok bolesti i odgovor na primenjenu terapiju.

Biomarkeri obezbeđuju važne informacije za kliničku procenu bolesnika sa sumnjom na AKS od ranih 1950-tih godina i njihovo korišćenje je značajno evoluiralo u poslednjih pola veka. Nasuprot tradicionalnoj definiciji infarkta miokarda koju je dala Svetska zdravstvena organizacija i u kojoj se navodi obavezno prisustvo dva od tri navedena kriterijuma uključujući i biohemijska određivanja, redefinisanjem definicije

infarkta miokarda već 2007. godine se uvodi obavezna biohemijska potvrda infarkta miokarda određivanjem markera nekroze (srčanog troponina), kao i 2010. god. donetoj novoj redefiniciji AIM (67, 68).

Karakteristike idealnog srčanog markera bi bile sledeće (69):

- veličina: manji markeri izlaze brže iz oštećenog tkiva,
- ćelijska lokalizacija: rastvorljivi citoplazmatski marker je bolji od strukturnog markera,
- apsolutna srčana tkivna specifičnost: marker ne treba da postoji u drugim tkivima u fiziološkim ili patološkim uslovima,
- visoka tkivna specifičnost: zastupljenost u srčanom tkivu i odsustvo u plazmi,
- specifičnost za ireverzibilno oštećenje: mora da ima sposobnost razlikovanja reverzibilnog (ishemija) od ireverzibilnog (nekroza) oštećenja,
- izlazak: izlazak iz miokarda mora da bude potpun nakon oštećenja i u direktnoj proporciji s veličinom oštećenja (veličina infarkta),
- stabilnost: marker mora da dostigne maksimalni nivo ubrzo nakon oštećenja i da se zadrži u cirkulaciji nekoliko sati kako bi omogućio pogodan dijagnostički okvir,
- klirens: marker mora da se uklanja brzo kako bi omogućio dijagnostikovanje ponovnog oštećenja,
- primena: mora da omogući praćenje reperfuzije, reokluzije ili oba procesa i to pri ranom i kasnom dijagnostikovanju srčanog oštećenja,
- pogodnost određivanja: treba da postoji mogućnost brzog, kvantitativnog i pristupačnog određivanja markera u punoj krvi.

Pedesetih godina prošlog veka kada je objavljeno prvo izdanje knjige Harrison's *Principles of Internal Medicine* jednog od najpoznatijih udžbenika interne medicine u poglavlju koje se odnosilo na diskusiju o infarktu miokarda nije bilo ni pomena o mestu laboratorije u dijagnostici i lečenju ovih bolesnika. Kada je trideset godina kasnije objavljeno prvo izdanje „Braunwald's Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine“, čak dve strane od ukupno 1943 teksta sadržale su diskusiju o laboratorijskim određivanjima u AIM. Narednih decenija svedoci smo dramatičnog porasta broja objavljenih radova u vodećim međunarodnim časopisima na temu korišćenja laboratorijskih određivanja srčanih markera u dijagnostici bolesnika sa AIM. Termini kao što su srčani enzimi zamenjeni su terminom srčani biomarkri. Broj dijagnostičkih

testova je rastao vrtoglavom brzinom, a karakteristike ovih testova značajno su se poboljšavane iz dana u dan. Danas se biomarkeri koriste za postavljanje dijagnoze kardiovaskularnih bolesti, procenu rizika i pri izboru terapije.

Glavne klase biomarkera su: biomarkeri ishemije miokarda, biomarkeri nekroze miokarda, markeri vulnerabilnosti, rupture plaka i tromboze, biomarkeri inflamacije, biomarkeri hemodinamskog stresa, biomarkeri funkcije trombocita i hemostaze, biomarkeri dislipidemije i modifikacije lipida, kao i proteomski i genetski biomarkeri.

Integracija biomarkera u kliničku praksu dramatično raste. Poznati markeri dobijaju novu primenu, broj novootkrivenih markera raste i značaj srčanih biomarkera u donošenju kliničke odluke dobija sve značajnije mesto. Ovaj progres u korišćenju biomarkera trebalo bi tek da dostigne svoj maksimum u eri personalizovane medicine. Sa ekspanzijom broja i vrste biomarkera, povećava se mogućnost da se pravovremeno postavi dijagnoza, proceni rizik od pojave NKVD, da se izabere odgovarajuća terapija koristeći relativno neinvazivne metode.

Za mnoge novootkrivene biomarkere postoji eksperimentalni dokaz koji podržava njihovu patofiziološku ulogu i preliminarnu korisnost za kliničku primenu. Kriterijumi koji novi srčani biomarker mora da ispuni za definitivnu kliničku implementaciju su (70):

- definisan analitički metod, ispitani preanalitički faktori koji mogu da utiču na rezultat određivanja–tip i stabilnost uzorka, analitički faktori–karakteristike kalibratora, specifičnost atitela, osetljivost i preciznost, interferencije);
- definisana osetljivost/specifičnost u specifičnom kontekstu (razmotriti prevalenciju bolesti): prediktivna vrednost;
- definisana optimalna/e "cut-off" vrednost/i (često zavise od metode);
- vreme merenja (kinetika oslobađanja biomarkera);
- evaluacija vrednosti markera u smislu postavljanja dijagnoze i procene rizika kod bolesnika sa AKS;
- uticaj na lečenje pacijenta i ishod bolesti i isplativost.

Biomarkeri koji su indikatori ateroskleroze često ne mogu da budu korisni u detekciji akutnih događaja (postavljanja dijagnoze). Neizbežno, postoji preklapanje između ove dve funkcije, obično jer će se pozitivnim testom identifikovati bolesnik koji ima bolest sa lošom prognozom, mada se upotreba srčanih markera za procenu rizika se razlikuje od korišćenja u postavljanju dijagnoze. Srčani biomarkeri se s toga mogu

podeliti u dijagnostičke biomarkere kojima se prepoznaje preklinička ili klinička bolest, kao što je ruptura plaka ili akutna ishemijska bolest srca, i prognostičke (predikcija rizika od budućih NKVD). Osim određivanja referentnih intervala koji daju jednostavnu deskriptivnu biološku informaciju bez direktne kliničke implikacije, korišćenje (i definicija) granica odlučivanja za rizik u potpunosti zavisi od vrednosti biomarkera i njegove predložene kliničke primene. Posebno, dijagnostički biomarkeri, kao što su markeri za detekciju rupture plaka i/ili ishemijske miokarda zahtevaju definisanje granice odlučivanja koja predstavlja optimalnu koncentraciju koja može da razdvoji zdrave od bolesnih. Dijagnostička vrednost biomarkera se obično prvo procenjuje određivanjem dijagnostičke osetljivosti i specifičnosti pomoću ROC (receiver operating characteristic) krive. Odgovarajuća evaluacija biomarkera zahteva korišćenje Bayes-ove metode, koja integriše pre-test verovatnoću (prevalenciju bolesti) sa tačnošću biomarkera (izraženu osetljivošću/specifičnošću) da bi izračunali prediktivnu vrednost biomarkera (post-test verovatnoću bolesti).

Svedoci smo pojave velikog broja srčanih biomarkera od kojih većinu čeka ključna analitička i klinička evaluacija i dug put do šire primene u kliničkoj praksi. Teorijski, multimarkerska strategija koja bi obuhvatala patobiološki različit set biomarkera, mogla bi značajno da pomogne u proceni bolesnika sa kardiovaskularnim oboljenjima. Marker destabilizacije plaka i/ili markeri ishemijske miokarda mogu biti pridodati postojećim biomarkerima nekroze miokarda ukoliko se pokaže da pružaju dodatne prognostičke informacije.

Od velikog značaja je izrada vodiča, uputstava za primenu biomarkera koji su zasnovani na dobro definisanim i sprovedenim procenama određivanja nekog biomarkera u AMI.

#### **1.4.2. Biomarkeri nekroze miokarda**

Od šezdesetih godina prošlog veka do danas svedoci smo ogromne transformacije u primeni biohemijskih markera za utvrđivanje nekroze miokarda. Prvi korišćeni marker bio je enzim aspartat aminotransferaza, a zatim su usledile laktat dehidrogenaze i kreatin kinaza (CK). Veoma rano je otkriveno da ovi testovi imaju malu osetljivost i specifičnost za detekciju nekroze miokarda. Uvođenjem elektroforetskog razdvajanja izoenzima kreatin kinaze i laktat dehidrogenaze povećana je specifičnost,

ali ovi testovi nisu bili prikladni za rutinsko određivanje zbog svoje dugotrajnosti i zametnosti. Usledilo je određivanje aktivnosti izoenzima CK-MB metodom imunoinhibicije. Razvojem imunoodređivanja omogućeno je određivanje koncentracije enzima, nezavisno od njihove aktivnosti. Princip određivanja „mase“ omogućio je i određivanje proteinskih markera koji ne poseduju enzimsku aktivnost.

Primenom radioimunoodređivanja određen je mioglobin kao prvi proteinski biomarker za detekciju nekroze miokarda. Mioglobin je mali hem protein molekulske mase 17,8 kDa koji se nalazi u citoplazmi srčanih i skeletnih mišića, ali ne i u glatkim mišićima. Nalazi se u skoro svim organima u telu (71). Njegova osnovna fiziološka uloga je transport intracelularnog kiseonika (72). Odnos mioglobina u tkivu i plazmi je veoma visok, tako da po nekrozi tkiva, koncentracija mioglobina u cirkulaciji naglo raste. Mioglobin je generalno prihvaćen kao najraniji marker koji se rutinski može odrediti za procenu bolesnika sa AKS. On se oslobađa odmah nakon nekroze, dostiže pik koncentracije između 6 i 12h i opada u toku 24h. Mioglobin je isključivo marker nekroze, ali ne i marker srčane ishemije (73). Povećanje koncentracije mioglobina može biti posledica oštećenja mnogih tkiva jer je sekvenca aminokiselina ista u srčanom i skeletnom mišiću. Mioglobin se eliminiše putem bubrega, pa bubrežna insuficijencija može biti uzrok povećanja koncentracije mioglobina u krvi u odsustvu akutnog oštećenja tkiva (74, 75). Određivanje mioglobina ima malu dijagnostičku osetljivost i specifičnost za nekrozu miokarda. Međutim, najkorisnija primena mioglobina je u isključivanju AIM sa negativnom prediktivnom vrednošću od oko 96% (73) imajući u vidu vremenski period od početka akutnog bola do prvog kontakta sa lekarom, kao i kinetiku mioglobina.

Značajan pomak u detekciji nekroze miokarda napravljen je 1985. godine kad je po prvi put opisano određivanje mase MB izoforme kreatin kinaze. Test je omogućavao bržu detekciju povišenih vrednosti i imao je veću kliničku osetljivost za AIM. Izoenzim kreatin kinaze, CK-MB, je heterodimer sastavljen iz dva tipa subjedinica označenih kao M-mišićna i B-moždana. Kod bolesnika sa stenozom aorte, koronarnom arterijskom bolešću, izoenzim CK-MB čini oko 20% ukupnog CK u ovom tkivu (76), dok CK-MB čini <3% CK u skeletnom mišiću (77). Miokard sadrži jednu izoformu proteina CK-MB. Nakon nekroze ćelije i oslobađanja u cirkulaciju M subjedinica CK-MB iz tkiva podleže posttranslacionoj modifikaciji cepanjem C-terminalnog lizina pomoću karboksipeptidaze N (78). Ova modifikacija stvara drugačije naelektrisanu formu CK-

MB, nazvanu CK-MB1, koja može da se razdvoji od tkivne forme CK-MB2 elektroforetski (78). Oslobođanje CK-MB u cirkulaciju javlja se nakon nekroze, ali ne i kod ishemije miokarda (79). U prošlosti se određivanje mase CK-MB smatralo zlatnim standardom za dijagnozu AIM (80). Prvi porast vrednosti CK-MB nakon AMI javlja se 4–6h nakon početka simptoma. Povećanje vrednosti mase CK-MB definiše se kao vrednost veća od 99-tog percentila. Vrednosti CK-MB su specifične za pol. Bolesnicima treba određivati masu CK-MB pri prijemu i 6–9h kasnije da bi se utvrdilo povišenje/sniženje vrednosti, kao i u dodatnom uzorku od 12–24 h ukoliko prethodne vrednosti nisu bile povišene, a kliničar sumnja na infarkt (81).

Prava revolucija na polju srčanih markera beleži se početkom devedesetih godina prošlog veka, sa otkrićem troponina. Srčani troponin (cTn) je u odnosu na sve poznate markere, biomarker izbora za dijagnozu nekroze miokarda zbog velike osetljivosti i specifičnosti ovog biohemijskog markera za oštećenje/nekrozu miokarda. Danas je troponin inkorporiran u univerzalnu definiciju dijagnostike infarkta. Dijagnoza AIM postavlja se detekcijom povećanja i/ili smanjenja srčanih biomarkera (naročito troponina) sa najmanje jednom koncentracijom većom od 99-tog percentila zdrave populacije i najmanje jednim simptomom ishemije (promene u EKG, pojava patološkog Q talasa u EKG ili dokaz novog gubitka vijabilnosti miokarda ili nove regionalne abnormalnosti u pokretljivosti zida). National Academy of Clinical Biochemistry je nedavno izdala skoro identične preporuke (81–83). Treba naglasiti da optimalna preciznost (%KV) na 99th percentilu za svaki korišćeni test za određivanje troponina treba bi da bude < 10%.

Troponin je proteinski kompleks na tankim filamentima sarkomere poprečno prugastih mišića i uključen je u regulaciju mišićne kontrakcije. Sastoji se od tri proteina koja su kodirana različitim genima. Srčani troponin I (cTnI, molekulske mase 23 kDa) inhibira intreakciju aktin-miozin inhibirajući  $Mg^{2+}$  ATP-azu i uslovljava relaksaciju mišića; troponin C (cTnC, 18 kDa) vezuje kalcijumov jon i troponin T (cTnT, 35 kDa) vezuje se za tropomiozin olakšavajući kontrakciju. Oko 6–8% cTnT i 3–4% cTnI od ukupnog troponina nalazi se slobodno u citozolu (84). Troponin se oslobađa u uslovima ireverzibilnog oštećenja miocita. Korišćenjem testova koji nisu visoko osetljivi za merenje Tn, merljivo oslobođanje Tn počinje između 4 i 6 h nakon ćelijske smrti, dostiže pik između 18 i 24 h, a može se detektovati u krvi i do 14 dana. Oslobođanje Tn u kontekstu reverzibilne nekroze miocita nije još uvek razjašnjeno. Pretpostavlja se da

oslobođanje citozolne komponente može da bude povezano sa povećanjem propustljivosti membrane miocita, kao što je to npr. u sepsi. Nasuprot cTnC, cTnT i cTnI su kodirani različitim genima u srčanom mišiću i sporim i brzim skeletnim mišićima. Kao posledica toga, u različitim skeletnim mišićima, eksprimiraju se skeletne ali ne i srčane izoforme. Zbog ekspresije njihove kardiospecifične izoforme, cTnT i cTnI po oslobođanju u cirkulaciju mogu da se koriste kao osetljivi i specifični markeri oštećenja miokarda. Fetalne izoforme cTnT mogu da se jave u skeletnim mišićima koji su oboleli ili se regenerišu. Usavršavanjem testova za određivanje Tn iz generacije u generaciju, eliminisan uticaj ovih izoformi (85–88). Iz oštećenih miocita cTnI se oslobađa kao slobodan i kao kompleks sa cTnC (dominantan oblik je kompleks cTnI–cTnC) i nešto manje kao kompleks sa cTnT (cTnT–cTnI–cTnC kompleks) (89–94). Srčani troponini se degradiraju delovanjem intracelularnih proteaza u miokardu (kalpain-I, kaspaze, matriks metaloproteinazom (MMP)-2) i u krvi (90, 94). Srčani TnI i TnT oslobađaju se iz nekrotičnog miokarda kao intaktni proteini i kao degradacioni produkti (94). Srčani TnT uglavnom cirkuliše kao slobodan, ali su opisani i imunoreaktivni fragmenti (91). Povećanje Tn u cirkulaciji može da bude posledica oštećenja miokarda, a ne samo ishemije, ali povišene vrednosti ne definišu uzrok oštećenja. Tako, koncentracije Tn mogu biti povišene kod oštećenja povezanih sa sekundarnom ishemijom miokarda (tahi- ili bradiaritmija, disekcija aorte i ozbiljna bolest aortnih zalistaka, hipo ili hipertenzija, hemoragijski šok, akutna ili hronična bubrežna insuficijencija, hipertrofična kardiomiopatija, disfunkcija srčanog endotela), kod oštećenja koje nije povezano sa ishemijom miokarda (kontuzija srca, primena radiofrekvencija ili krioablativne terapije, rbdomioloiza, miokarditis, kardiotoksični agensi, ozbiljne opekotine) ili sa nekim drugim oboljenjima kao što su plućna embolija ili plućna hipertenzija, sepsa, bubrežna insuficijencija, amiloidoza, sarkoidoza itd.

Određivanje Tn ne samo da ima dijagnostičku vrednost, već je i odličan prognostički marker o čemu svedoče brojne studije. Uvođenje nove generacije visoko osetljivih testova u laboratorijsku praksu moglo bi da unapredi kliničku praksu u smislu ranijeg postavljanja dijagnoze AIM ili isključivanja istog, procene rizika od pojave NKVD u budućnosti i praćenju terapije lekovima koji su potencijalno kardiotoksični.

### 1.4.3. Biomarkeri vulnerabilnosti, rupture plaka i tromboze

#### *CD40 ligand*

CD40 ligand (CD40L) poznat pod nazivom CD154 je 33 kDa tip II proteina membrane koji pripada familiji faktora nekroze tumora (TNF). Uglavnom se eksprimira na aktiviranim T ćelijama i trombocitima, ali i u endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama, makrofagama, dendritičnim ćelijama i epitelnim ćelijama (95–101). Kao i većina drugih članova TNF familije, CD40L može da se detektuje u solubilnoj formi (sCD40L). Solubilni CD40L uglavnom nastaje delovanjem proteaza (metaloproteinaza) na CD40L na membrani trombocita (102, 103).

CD40L (CD154) gen nalazi se na hromozomu X, region q26.3–q27.1, obuhvata 13 kb, a sastoji se od pet egzona i četiri introna. CD154 gen kodira protein od 261 aminokiseline (ak). Na karboksiterminalnom kraju nalazi se cisteinom bogat ekstracelularni domen sastavljen od 215 ak, transmembranski domen od 24 ak i N-treminalni intracelularni domen sastavljen od 22 ak koji nema signalni peptid (104, 105). Svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za receptore i to za njegov glavni receptor CD40, kao i za novootkrivene  $\alpha$ IIB  $\beta$ 3,  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 i  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1) integrine. CD40 receptor pripada tipu I proteina membrane, takođe TNF superfamiliji, a njegov gen lociran je na hromozomu 20 (q12-q13.2) i eksprimira se na monocitima/makrofagama, endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama i trombocitima (106). Konstitutivno se eksprimira na mnogim tipovima ćelija uključujući endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije i trombocite. Transkripcija gena rezultira proteinom sastavljenim od 277 ak od čega ekstracelularni domen sadrži 171, transmembranski 22, a citoplazmatični 62 ak. Osim uloge u timus-zavisnom humoralnom imunom odgovoru CD40L ostvaruje niz uloga u humanom organizmu (105,107).

Za membranu vezani ili solubilni CD40L je u obliku trimera. Nakon vezivanja CD40L za CD40 receptor, dolazi do oligomerizacije receptora, stvaranja dimera između cisteinskih ostataka 238 lociranih u intracelularnom domenu CD40. Ova homodimerizacija je preduslov za dalju signalizaciju koja uključuje aktivaciju PI-3K i ekspresiju B7-2 na B ćelijama. CD40L, vezan za membranu ili solubilni trimer, vezuje se i za  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrin, član superfamilije integrina koji je eksprimiran na trombocitima i megakariocitima. Vezivanje CD40L za aktivni ili neaktivni  $\alpha$ IIB  $\beta$ 3 integrin rezultira agregacijom trombocita, kao i stabilizacijom arterijskog tromba (108–110). CD40L



takođe se vezuje i za neaktivnu formu  $\alpha 5 \beta 1$  integrinskog receptora, što uslovljava fosforilaciju ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1/2 (ERK 1/2) i ekspresijom interleukina (IL)-8 iRNK u ćelijama koje ga eksprimiraju (111). Četvrti receptor za CD40L je  $\alpha M \beta 2$  integrin poznat i kao Mac-1 koji se eksprimira na neutrofilima, kao i monocitima/makrofagama. Interakcijom trimera CD40L sa aktivnom formom ovog receptora, stimuliše se adheziju i migraciju monocita i oslobađanje njihove mijeloperoksidaze (MPO) *in vitro*. CD40L takođe povećava ekspresiju Mac-1 receptora, posredujući tako u komunikaciji sa aktiviranim trombocitima na mestu povrede (112).

CD40L indukuje mnoge biološke uloge u vaskularnim ćelijama. CD40L stimuliše endotelne ćelije da povećano eksprimiraju adhezione molekule (E-selektin, VCAM-1, ICAM-1) i tkivni faktor, kao i povećanu produkciju proinflammatoryh citokina (IL-8, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , RANTES, IL-6, IL-15), metaloproteinaza (MT1-MMP, MMP-1, MMP-2, MMP-9) i vazoaktivnih faktora (endotelin-1, superoksidni anjon), smanjenu sintezu kardioprotektivnih faktora (apelin, endotelna NO sintaza). U trombocitima je pokazano da CD40L reaguje sa najmanje dva receptora, CD40 i  $\alpha IIb \beta 3$ . Vezivanjem za  $\alpha IIb \beta 3$  integrin CD40L podstiče aktivaciju trombocita. Vezivanjem CD40L za CD40 trombocita indukuje se sinteza P-selektina i aktivaciju trombocita, kao i oslobađanje sadržaja njihovih  $\alpha$ -granula i gustih granula, što vodi agregaciji trombocita, produkciju proinflammatoryh citokina (MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8) i metaloproteinaza (MMP-1,-2, -3,-9) i povećanju ekspresiju tkivnog faktora (113–121).

Poslednjih godina je pokazano da je interakcija CD40L/CD40 uključena u svaku fazu ateroskleroze, od inicijacije do nastanka rupturi sklonog plaka. Inicijalno, CD40L eksprimiran na aktiviranim T-ćelijama interaguje sa CD40 eksprimiranim na aktiviranim endotelnim ćelijama što indukuje oslobađanje citokina kao i ekspresiju adhezionih molekula, povećavajući infiltraciju subendotelnog prostora leukocitima. Za membranu vezan ili solubilan CD40L iz infiltriranih T ćelija interaguje sa CD40 na makrofagama u leziji (uključujući i penaste ćelije) i na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koje migriraju iz medije u intimu. Ova interakcija će indukovati dalje oslobađanje citokina, kao i produkciju MMP prevodeći leziju u nestabilno stanje sklono rupturi. U tom trenutku, lezija je bogata trombotičkim komponentama kao što je tkivni faktor koji će aktivirati spoljašnji put koagulacije i sam CD40L koji će aktivirati trombocite. Ako dođe do rupture plaka, sledi aterotrombotički proces. Inhibicija vezivanja CD40L i

specifičnog receptora moglo bi da promeni CD40L-indukovani ćelijski odgovor bez uticaja na ostale efekte CD40L i da se primeni u terapijske svrhe.

Veza između CD40/CD40L i kardiovaskularnih oboljenja ispitivana je u brojnim studijama koje su pokazale povećanu ekspresiju CD40 u nestabilnom, aterosklerotičnom plaku sklonom rupturi (122). Povećane vrednosti CD40L utvrđene su kod bolesnika sa asimptomatskom hiperholesterolemijom, nestabilnom anginom i AIM. Povećane vrednosti sCD40L povećavaju rizik od neželjenih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa AKS (123, 124). Mada ove studije ukazuju da sCD40L ima značajnu ulogu u patogenezi, njegova uloga u prognozi bolesnika sa AKS ostaje kontroverzna. CD40/CD40L koekspresija na trombocitima povezuje se sa restenozom, tako da CD40L može da se koristi i kao marker za procenu rizika od restenoze pre planiranja intervencija na arterijama u bolesnika sa vasularnim patologijama.

### *Mijeloperoksidaza*

Mijeloperoksidaza (MPO), donor, vodonik peroksid oksidoreduktaza, EC 1.11.1.7) pripada familiji peroksidaza, koja obuhvata i laktoperoksidazu, eozinofilnu peroksidazu i tiroidnu peroksidazu. MPO je jedan od najzastupljenijih proteina u humanim polimorfonuklearnim neutrofilima, a nešto manje u monocitima i tkivnim makrofagama (125, 126). MPO se čuva u azurofilnim granulama polimorfonuklearnih neutrofila i monocita. MPO se sintetiše tokom mijeloidne diferencijacije u koštanoj srži. Samo promijelociti i promijelomonociti aktivno sintetišu MPO. Njena sinteza počinje u endoplazmatičnom retikulumu iz prekursora preproMPO (80 kDa) koji se sastoji od velike subjedinice  $\alpha$  (55–64 kDa, 466 ak) i male subjedinice  $\beta$  (10–15 kDa, 108 minokiselina). Nakon cepanja signalnog peptida i inkorporiranja manoznih oligosaharinih lanaca nastaje 90 kDa apoproMPO. On se udružuje sa čaperonima CRT, a kasnije i sa CLN i hemom formirajući aktivan enzim proMPO koji se transportuje u Goldži aparat. Nakon izlaska iz Goldži aparata propeptid se uklanja iz proMPO. Finalna obrada odvija se u azurofilnim granulama, gde se formira simetrični homodimer MPO (144 kDa) u kome su monomeri povezani disulfidnom vezom (127). MPO je katjonski protein; optimalni pH za dejstvo je 5.5, ali je enzim aktivan u širokom opsegu pH. MPO je kodirana genom na 17 hromozomu (17q23.1) sastavljena od 12 egzona i 11 introna (128).

Mijeloperoksidaza se povezuje sa inflamacijom i oksidativnim stresom. U inflamaciji, MPO se oslobađa iz azurofilnih granula aktiviranih leukocita, uglavnom neutrofila i monocita. Oslobađanje MPO i formiranje reaktivnih vrsta može biti indukovano sledećim mehanizmima: inflamacija indukuje privlačenje i aktivaciju leukocita, neutrofilu u cirkulaciji se vezuju za oštećeni endotel i minimalno modifikovane LDL čestice u intimi mogu da pokrenu ulaz monocita koji sazrevaju u makrofage (neke od njih eksprimiraju MPO).

MPO je jedini humani enzim koji katalizuje reakciju stvaranje hipohloritne kiseline i drugih reaktivnih vrsta koje imaju antimikrobnu aktivnost. Hipohlorit prevodi slobodne i za protein vezane tirozinske ostatke u 3-hlor tirozin (129, 130). U reakciji oksidacije NO formiraju se nitriti; nitriti se sa vodonik peroksidom pod dejstvom MPO prevode u azotdioksidni radikal (131, 132). Visoki nivoi 3-hlor tirozina i 3-nitro tirozina u LDL detektovani su u humanim aterosklerotičnim plakovima (133, 134). Nastali proizvodi indukuju oksidativno oštećenje tkiva koje utiče na endotelnu disfunkciju, razvoj ateroskleroze, destabilizaciju plaka itd. MPO je takođe katalizator za oksidativnu modifikaciju lipoproteina, on oksiduje i nitrira LDL *in vivo*, čineći LDL veoma potentnim ligandom za makrofagni receptor čistač ("scavenger" receptor). Sistem MPO-vodonik peroksid-nitrit ( $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-NO}_2^-$ ) identifikovan je kao potencijalni mehanizam za konverziju LDL u azotdioksid-LDL koji se vezuje za CD36 receptor u makrofagama i dovodi do formiranja penastih ćelija (135). Ovi podaci ukazuju da je MPO uključen u oksidativnu modifikaciju LDL u intimi krvnog suda, što rezultira konverzijom LDL u njegovu aterogenu formu.

Osim LDL, HDL je takođe osetljiv na oksidativnu modifikaciju kojom nastaje disfunkcionalni HDL kod ljudi. Nastali hipohlorit u reakciji katalizovanoj MPO modifikuje Tyr (Tyr192) i Met ostatke u apo AI nitriranjem ili halogenovanjem. Oksidacija apo AI sa MPO inhibira dva stupnja reverznog transporta holesterola: oksidaciju apo AI koji nije vezan za lipide sa MPO inhibira efluks holesterola u ABCA1 putu i oksidacija apo AI vezanog za lipide sa MPO sprečava aktivaciju LCAT. Ovi procesi kao posledicu imaju povećano formiranje penastih ćelija i aterogenezu (136).

Mijeloperoksidaza utiče i na funkciju endotela. NO je vrlo značajan faktor u održavanju antiaterosklerotičnih osobina endotela. NO deluje na adheziju monocita i leukocita za endotel i interakciju trombocita i zida krvnog suda, smanjenje permeabilnosti endotela i smanjenje tonusa krvnog suda, koji inhibiraju aktivnost NO

sintaze ili redukcionih kofaktora kao što je NADPH. Ovo uzrokuje poremećaj u vazodilataciji, agregaciji trombocita, privlačenju i aktivaciji leukocita i disfunkciju endotela (137).

MPO aktivira matriks metaloproteinaze (MMP). Matriks metaloproteinaze utiču na remodelovanje i stabilnost aterosklerotičnog plaka. Hipohlorit nastao delovanjem MPO ubrzava degradaciju ekstracelularnog matriksa fibroznog sloja degradacijom kolagena i proteoglikana (138).

MPO može da posreduje u degradaciji proteoglikana, što je povezano sa smanjenom adhezijom endotelne ćelije za subendotelni ekstracelularni matriks, ubrzava površinske erozije i može da uzrokuje AKS, posebno u slučaju fibroznog plaka (139).

MPO inaktivira inhibitore proteaza kao što su  $\alpha$ 1-antitripsin, tkivni inhibitori metaloproteinaza i inhibitor aktivatora plazminogena-1. Kao jako bazni protein, MPO se vezuje za negativno naelektrisane glukozaminglikane ekstracelularnog matriksa i površinu endotelne ćelije (140). Ovo doprinosi akumulaciji MPO u aterosklerotičnom plaku. S druge strane davanje heparina može da uslovi oslobađanje vezanog MPO. MPO je povezan sa aktivacijom proapoptotičkih puteva, indukuje aktivaciju i agregaciju trombocita i mogućnost stvaranja intrakoronarnog tromba (141).

Literaturni podaci pokazuju da su povećane koncentracije MPO nezavisan prediktor za budući rizik od nefatalnog AIM ili hospitalizacije kod zdravih osoba (142) i da mogu biti prediktor razvoja koronarnih događaja kod osoba sa dokazanim subkliničkim aterosklerotičnim plakom (143). Brojne studije su se bavile ispitivanjem vrednosti MPO kod bolesnika sa nestabilnom anginom, AKS, AIM kako u smislu dijagnoze tako i prognoze.

#### *Plazma protein A povezan sa trudnoćom*

Plazma protein A povezan sa trudnoćom (PAPP-A, papalizin-1, EC 3.4.24.79) pripada familiji metcincina (144,145) i inicijalno je otkrivena u plazmi trudnica. Humani gen za PAPP-A nalazi se na hromozomu 9q33.1 i sadrži 22 egzona dužine od 72-1063 nukleotida i 21 introna (146). Primarni transkripcioni produkt sastoji se od 1626 aminokisline, uključujući i signalni peptid od 22 ak, proprotein od 58 i zreo protein od 1546 ak (147, 148). PAPP-A ima pet domena: lamininu G sličan domen, proteolitički domen koga karakteriše prisustvo dva Lin-12/Notch ponovka, centralni

domen, domen koji je definisan CCP („complement control protein”) modulima i kratak C-terminalni domen. Enzimski aktivan PAPP-A se sastoji od dve disulfidnom vezom povezane identične subjedinice i formira homodimer od 400 kDa (149). Iako je placenta glavno mesto njene sinteze, ekspresija PAPP-A i njegove iRNK utvrđena je u različitim reproduktivnim i nereproduktivnim tkivima uključujući jajnike, endometrijum, testise, bubrege i debelo crevo (150). In vitro studija je pokazala da se sintetiše i u humanim i svinjskim glatkim mišićnim ćelijama koronarne arterije (151). Najznačajniji stimulatori ekspresije PAPP-A u humanim fibroblastima i glatkim mišićnim i endotelnim ćelijama su proinflamatorni citokini faktor nekroze tumora  $\alpha$ , inteleukin-1 $\beta$  (152). IL-6 deluje stimulatorno u glatkim mišićima humanih koronarnih arterija (149), a transformišući faktor rasta  $\beta$  u humanim osteoblastima (153).

Evidentno je da se PAPP-A koji se sintetiše tokom trudnoće razlikuje od one prisutne u erodiranom ili rupturiranom aterosklerotičnom plaku. PAPP-A koja se sintetiše u trudnoći u trofoblastima placente stvara kompleks sa inhibitorom, uglavnom eozinofilnim proMBP (glavnim baznim proteinom) i sa njim gradi proteolitički neaktivan heterotetramer od 500 kDa, dok se PAPP-A u plaku ne vezuje za inhibitor. Ova slobodna (“free”) PAPP-A oslobađa IGF-1 iz kompleksa sa inhibitorima IGFBP-2, -4 i -5, vršeći proteolizu inhibitornih proteina (IGFBP), i onemogućavajući njihovo vezivanje za IGF-1. Na ovaj način ostaje slobodan IGF-1. Jedan od glavnih zadataka PAPP-A je da omogući interakciju IGF-1 sa receptorima na membranama ćelija (154–160). IGF-1 može da deluje proaterogeno indukcijom migracije makrofaga, hemotakse, preuzimanjem LDL-holesterola u makrofage i oslobađanjem proinflamatornih citokina i hemotaksu. Međutim, on može da deluje i antiaterogeno tako što štiti endotelnu funkciju, stabilizuje plak i pokazuje antiinflamatorne i antioksidativne efekte (158–169).

Literaturni podaci ukazuju na potencijalnu korisnost PAPP-A kao dijagnostičkog i prognostičkog markera kod pacijenta sa koronarnom arterijskom bolešću (154, 170), veću osetljivost za ranu dijagnozu AKS u odnosu na troponin T ili CK-MB (155, 171), kao i to da je bolji prediktor neželjenih događaja od CRP. PAPP-A nije samo marker nestabilnosti plaka već je i indikator lošije prognoze čak i nakon pojave akutnog ishemijskog događaja uzrokovanog nestabilnošću plaka (170). Implantacija stenta i reperfuziona terapija u STEMI uzrokuje povećanje PAPP-A i do nekoliko puta odmah nakon intervencije u poređenju sa bazalnim vrednostima pre početka lečenja (172, 173).

Razvoj novih testova kojima će se omogućiti određivanje slobodnog PAPP-A doprineće ispitivanju patofiziologije PAPP-A na molekularnom i ćelijskom nivou.

### *Matriks metaloproteinaza-9*

Matriks metaloproteinaze (MMPs) su grupa endopeptidaza koje mogu da cepaju nekoliko komponenata ekstracelularnog matriksa u zidu krvnog suda, potencijalno menjajući sastav aterosklerotičnog plaka. Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9) ili gelatinaza B, pripada grupi gelatinaza (174). Humani gen za MMP-9 nalazi se na 20. hromozomu. Matriks metaloproteinaza-9, molekulske mase 92 kDa pripada tipu kolagenaza i ima sposobnost da degradira različite supstrate matriksa i to kolagen tip I, IV i V, koji čine značajnu komponentu humane aterosklerotične lezije (175, 176). Matriks metaloproteinaza-9 se sintetiše kao pre-pro-enzim koji sadrži signalni peptid, prodomen, katalitički domen i hemopeksinu sličan domen. Aktivirana MMP-9, plazmin ili druge proteaze uklanjaju prodomen što rezultira prevođenjem pro-MMP-9 u njen aktivni oblik. Matriks metaloproteinaza-9 se razlikuje od drugih MMP insercijom tri cisteinom bogata ponovka u katalitičkom domenu čija je sekvenca slična fibronektinu tipa II i koji su neophodni za vezivanje i cepanje ekstracelularnog matriksa (177, 178). U fiziološkim uslovima sekretuju je osteoklasti, neutrofilni, makrofage, trofoblasti, neuroni hipokampusa i keratinociti (177), dok je u humanim aterosklerotičnim plakovima uglavnom ekspimirana na makrofagama i glatkim mišićni ćelijama (179). Matriks metaloproteinaza-9 je u aterosklerotičnoj leziji lokalizovana u fibroznoj kapi i „ramenom“ regionu (180, 181). Vezivanjem TIMP-1 koji reverzibilno inhibira MMP-9, menja se kinetika aktivacije enzima, ali se ne inhibira katalitičku aktivnost MMP-9.

Matriks metaloproteinaza-9 ima proaterotrombotičnu ulogu. Međutim nekoliko studija pokazuje da MMP-9 osim što je uljučena u formiranje i destabilizaciju plaka, može da učestvuje i u stabilizaciji plaka i u „zacementiranju“ infarkta. U MMP-9 i *apoe* dvostrukih „knockout“ miševa nađeni su značajno veći plakovi u odnosu na kontrole (182), dok su u drugoj studiji uprkos zapažanju da deficit MMP-9 dovodi do smanjenja hiperplazije intime, na „knockout“ miševima utvrdili smanjenu migratornu aktivnost glatkih mišićnih ćelija i kapacitet delovanja na kolagen, ukazujući da MMP-9 ne deluje samo na degradaciju ekstracelularnog matriksa, već i na reorganizaciju ekstracelularnog matriksa i remodeliranje arterija (183). Na C57BL/6 miševima koristeći odstranjivanje

dela zajedničke karotidne arterije do bifurkacije pokazano je da povećanje aktivnosti MMP-9 prethodi pozitivnom geometrijskom remodelovanju arterija, što ukazuje na njenu potencijalnu korisnost (184).

Povišene vrednosti MMP-9 utvrđene su kod bolesnika sa AKS (185, 186), stabilnom koronarnom arterijskom bolešću (187, 188), hipertenzijom (189), perifernom arterijskom bolešću (187, 188), stenozom karotidne arterije (190), dijabetes melitusom (191) i restenozom nakon PKI sa metalnim stentovima (192), a mogu biti i prediktor reinfarkta u bolesnika sa preležanim AIM (193).

#### **1.4.4. Biomarkeri inflamacije**

##### *C-reaktivni protein*

C-reaktivni protein (CRP) je neglikozilirani protein akutne faze, molekulske mase 115 kDa sa homopentamernom strukturom (194). On je pentaksin, sastavljen od 5 jednakih subjedinica od 206 aa koje su kombinovane u trodimenzionalnu strukturu. Svaki protomer CRP sadrži po dva kalcijumova jona koja su esencijalna za vezivanje liganada i značajno stabilizuju strukturu protomera (195). Glavno mesto sinteze CRP su hepatociti jetre. Sinteza CRP je pod izrazito osetljivom regulacijom transkripcije preko proinflamatornih citokina interleukina (IL)-6, IL-1 i TNF- $\alpha$  (194, 196). Postoje pretpostavke da monomer CRP nastao disocijacijom CRP pentamera ostvaruje proaterosklerotične efekte (197). Utvrđena je i ekstrahepatična sinteza CRP u epitelu i makrofagama respiratornog trakta, bubregu i neuronima (198, 199). Kolokalizacija CRP sa komplementom u aterosklerotičnoj leziji ukazuje na lokalnu sintezu CRP (200). Smatra se da CRP u aterosklerotičnim lezijama sintetišu glatke mišićne ćelije i makrofage; koncentracija mRNA CRP je i do deset puta veća u plaku u poređenju sa normalnom arterijom. Lokalna sinteza i sekrecija CRP u aterosklerotičnoj leziji parakrinom/autokrinom stimulacijom može da uslovi visoku lokalnu koncentraciju CRP u plaku koja može da doprinese proinflamatornim proaterogenim efektima. Ćelije zida krvnog suda, glatke mišićne ćelije, humani zreli adipociti takođe sintetišu CRP. C-reaktivni protein se kataboliše u hepatocitima (201) i poluvreme života kod ljudi je isto i iznosi 19 h bez obzira na prisustvo bolesti ili koncentraciju CRP u cirkulaciji. Zato je jedina determinanta koncentracije CRP u plazmi stepen njegove sinteze (202).

C-reaktivni protein se vezuje za različite ligande. Fosfolipid je prirodni ligand za koji se CRP vezuje najvećim afinitetom i ovaj ključni ligand je prisutan na polarnim grupama fosfatidil holina u ćelijskim membranama i lipoproteinima plazme i kao konstituent mnogih bakterija, gljivica i biljaka. C-reaktivni protein se osim za pneumokokne polisaharide, fosfolipide, vezuje i za modifikovani LDL, faktor aktivacije trombocita, apoptotične ćelije, ribonukleoproteinske čestice i faktore komplementa (203, 204). Takođe, C-reaktivni protein se vezuje za FC $\gamma$  receptore (FC $\gamma$ RIIa/CD32, FC $\gamma$ RI/CD68) što je preduslov za proces opsonizacije. C-reaktivni protein ostvaruje efekte kroz nekoliko signalnih puteva: aktivaciju ekstracelularnim signalom regulisane kinaze (ERK) 1/2, koja je uključena u indukciju ekspresije MMP u endotelnim ćelijama i makrofagama, sintezu IL-8, sintezu vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u makrofagama i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija (205–210). Ova signalna kaskada je uključena u procese proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze i sledi FC $\gamma$ R ukršteno vezivanje sa CRP. Rho/Rho-kinazni put, uključujući aktivaciju nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) doprinosi vaskularnom remodelovanju i aterosklerozi (211, 212). Poznato je da NF $\kappa$ B ima značajnu ulogu u inflamaciji i nestabilnosti plaka, povećavajući ekspresiju kaskade prokoagulantnih i proinflamatornih gena. Aktivacijom NF $\kappa$ B CRP amplifikuje inflamatorne stimuluse (213, 214). CRP takođe indukuje i ekspresiju tkivnog inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1).

Vrednosti CRP u plazmi zavise od brojnih faktora kao što su pušenje, gojaznost, fizička aktivnost, sociodemografski faktori (starost, obrazovanje, rasa), način života i primena hormonske terapije, pušenje, unos alkohola), dijabetes melitus, genetski faktori (215–219).

CRP je veoma osetljiv marker inflamacije i uključen je u patofiziologiju ateroskleroze. CRP deluje na svakom stupnju aterogeneze, od inicijalnog privlačanja leukocita i endotelne disfunkcije do kliničkih događaja. Povećane koncentracije indukuju disfunkciju endotela. C-reaktivni protein povećava ekspresiju adhezionih molekula (ICAM, VCAM, E-selektin, protein-1 koji privlači monocite (MCP-1)) što povećava adheziju monocita za endotelne ćelije. Osim toga, on smanjuje aktivnost endotelne NOS. Takođe, CRP indukuje sintezu endotelnog receptora za oksidovani LDL (LOX-1), što povećava adheziju humanih monocita za endotelne ćelije i uslovljava povećano preuzimanje oksLDL od strane tih ćelija i povećano formiranje penastih ćelija. U penastim ćelijama u aterosklerotični lezijama, CRP aktivira



komplement. U procesu prevođenja masnih pruga u fibrozni aterom dominantnu ulogu imaju glatke mišićne ćelije koje migriraju u intimu, gde proliferišu stvarajući fibroznu kapu. C-reaktivni protein povećava proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija, stimuliše inducibilnu NO sintazu, povećava produkciju reaktivnih oblika kiseonika (ROS), MMP, MCP-1. CRP može da stimuliše apoptozu glatkih mišićnih ćelija što je ključni korak u stvaranju nestabilnog plaka. CRP modulira inflamaciju uticajem na interakciju CD40/CD40L, povećavajući ekspresiju obe komponente (220).

Danas su na tržištu dostupni i visoko osetljivi testovi za određivanje CRP. Ovo označava merenje CRP u uzorcima seruma ili plazme imunoodređivanjima sa dovoljnom osetljivošću da kvantifikuju CRP u njegovom normalnom opsegu nasuprot starijim testovima koji su imali veći detekcioni limit i koji su bili pogodni za određivanje CRP kao proteina akutne faze. Čak i umereno povećane bazalne koncentracije CRP povezane su sa rizikom od ateroskleroze i koronarne bolesti u opštoj populaciji i pokazuju prediktivnu vrednost. CRP se može određivati i u smislu sekundarne prevencije, kako kod bolesnika sa hroničnom stabilnom anginom, tako i kod bolesnika sa AKS. CRP je ispitivan i kao prognostički marker za pojavu NKVD po preležanom AIM.

## *Citokini*

### *Klasifikacija citokina*

Citokini su grupa kratko-delujućih proteina, glikoproteina i peptida koji se sintetišu u različitim ćelijama imunog sistema i vaskularnim ćelijama i deluju u pikomolarnim ili nanomolarnim koncentracijama, tako što aktiviraju specifične receptore i moduliraju funkcije mnogih ćelija i tkiva. Neki citokini mogu biti vezani za membranu ili udruženi sa ekstracelularnim matriksom i prelaz između solubilne i membranske forme može biti značajan regulatorni događaj. Različiti tipovi ćelija mogu da sintetišu iste citokine i jedan citokin može delovati na više tipova ćelija (plejotropija) i ispoljavati različite biološke aktivnosti u zavisnosti od tipa ćelije, vremena i konteksta (221). Slične funkcije mogu biti regulisane različitim citokinima („cross-talk“) (222). Zbog funkcionalnog preklapanja citokina, teško je ponekad proceniti njihovu patofiziološku ulogu. Takođe citokini se nekad sintetišu u kaskadama, pošto jedan citokin može da stimuliše ciljne ćelije da sintetišu druge citokine. Citokini mogu da

deluju sinergistički ili antagonistički. Generalno citokini se mogu podeliti u nekoliko grupa:

- Faktori nekroze tumora (TNF),
- Interleukini (IL), citokini koje sintetiše jedna vrsta leukocita, a deluju na drugu vrstu leukocita,
- Limfokini, inicijalno se smatralo da ih sintetišu samo limfociti,
- Monokini, inicijalno se smatralo da ih sintetišu samo monociti,
- Interferoni (IFN), mislilo se da su uključeni u antivirusni odgovor i obuhvataju IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ,
- Faktor stimulacije kolonija (CSF), inicijalno se smatralo da podržavaju rast ćelija u polučvrstim medijima i obuhvata granulocitni G-CSF, monocitni M-CSF, i granulocitno-monocitni faktor GM-CSF,
- Transformišući faktori rasta (TGF) uključuju TGF- $\beta$ 1, 2, i 3, koštane morfogene proteine (BMPs), aktivine i inhibine,
- Hemokini, smatralo se da su uključeni u hemotaksu. Superfamilija hemokina obuhvata četiri podfamilije (XC, CC, CXC, i CX3C). Podela se zasniva na prisustvu konzerviranih cisteinskih ostataka na amino-terminalnom kraju i varijabilnog regiona X. Podfamilija XC obuhvata XCL1 i XCL2, koji privlače limfocite. Hemokini CC dominantno privlače mononuklearne ćelije. Hemokini CXC podeljeni su na bazi prisustva sekvence glutaminska kiselina-leucin-arginin (ELR motiv) u blizini amino-terminalnog kraja. ELR+ CXC hemokini su hemoatraktanti za neutrofile sa angiogenim osobinama. ELR-CXC su hemoatraktanti za limfocite sa angiostatičkim osobinama. Podfamilija CX3C obuhvata CX3CL1 (fraktalkine). Hemokini mogu imati različita imena npr. IL-8 (CXCL8), trombocitni faktor-4 (PF-4/CXCL4), makrofagni inflamatorni protein (MIP)-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$ (CCL4), RANTES (regulisan aktivacijom, normalnom T-ekspresijom i sekrecijom, CCL5), i hemoatraktantni proteini monocita (MCP)-1 (CCL2), -2(CCL8), -3, i -4,
- Drugi proteini (223).

U zavisnosti od ćelije koja ih sintetiše, citokini se mogu podeliti u dva tipa: tip 1 citokina koga sintetišu Th1 T-pomoćne („helper“) ćelije i obuhvataju IL-2, IL-12, IFN-

$\gamma$ , i TNF- $\beta$ ; i tip 2 citokina koji sintetišu Th2 T-pomoćne („helper“) ćelije i obuhvataju IL-4, -5, -6, -10, i -13. Th1 citokini pokreću ćelijski imuni odgovor uključujući aktivaciju makrofaga. Th2 citokini imaju ulogu u različitim inflamatornim procesima uključujući alergijske reakcije, astmu i atopični dermatitis i mogu inhibirati određene oblike autoimunosti (224). Citokini mogu takođe da se podele na proinflamatorne i anti-inflamatorne citokine. Proinflamatorne citokine sintetišu uglavnom aktivirane makrofage uključene u ushodnu regulaciju infalamtornih reakcija i mogu delovati kao:

- endogeni pirogeni (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6),
- ushodni regulatori inflamatornih reakcija (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-19, IFN- $\beta$ ),
- stimulatori reaktanata akutne faze (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-11, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ),
- hemoatraktanti (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, PF-4, MCP-1, -2, -3),
- stimulatori proinflamatornih citokina (IL-12).

Anti-inflamatorni citokini su uključeni u nishodnu regulaciju inflamatornih reakcija i obuhvataju IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  i TGF- $\beta$ . Međutim, jasna klasifikacija citokina u proinflamatorne ili antiinflamatorne nije jednostavna, jer inflamatorni odgovor ne određuje samo ravnoteža između pro- i anti-inflamatornih citokina, već i vreme njihovog oslobađanja, sredina u koju se oslobađaju, prisustvo sinergističkih ili kompetitivnih faktora, gustina receptora za citokine i odgovor tkiva na citokine.

#### *Izvori citokina*

Citokini se sintetišu kao odgovor na inflamatorne stimuluse u makrofagama, T ćelijama i monocitima, kao i trombocitima, endotelnim ćelijama i glatkim mišićnim ćelijama krvnog suda i adipocitima. Makrofage su ipak glavna mesta sinteze citokina. One sintetišu proinflamatorne citokine TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -12, -15, -18, i -32, kao i anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- $\beta$ . Autokrina aktivacija IL-12 i IL-18 može uticati na sintezu IFN- $\gamma$ . Makrofage takođe ekspimiraju i brojne hemokine MCP-1/CCL2, MCP-4/CCL13 i IL-8/CXCL8 (225). T ćelije sekretuju brojne citokine uključujući IFN- $\gamma$  i IL-4. Trombociti su takođe veoma značajan izvor citokina, hemokina i faktora rasta. Oni su uskladišteni u  $\alpha$ -granulama i oslobađaju se tokom aktivacije trombocita. Trombociti takođe sekretuju CXC hemokine kao što su PF4/CXCL4 i CC hemokini (MIP-1 (CCL3), RANTES (CCL5)) (226). Ćelije zida krvnog suda su istovremeno i mesto oslobađanja i mesto delovanja citokina. Endotelne ćelije sintetišu IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , dok glatke mišićne ćelije sintetišu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ .

### *Receptori za citokine*

Citokini ostvaruju svoje biološke efekte vezivanjem za specifične receptore na površini ciljnih ćelija. Superfamilija receptora za citokine uključuje nekoliko proteina koji dele iste ekstracelularne motive, ali imaju ograničenu sličnost u njihovim citoplazmatskim domenima.

1. Hematopoietinski receptori su najbolje okarakterisani receptori. Oni su dimeri ili trimeri sa konzervisanim cisteinima u njihovim ekstracelularnim domenima i konzervisanom Trp-Ser-X-Trp-Ser sekvencom. Primeri su receptori za IL-2, IL-7 i GM-CSF. Oni imaju generalno dve subjedinice, jednu specifičnu za citokin i jednu za provođenje signala. Npr. subfamilija GM-CSF ima jedinstvenu subjedinicu koja specifično vezuje ili GM-CSF, IL-3 ili IL-5 malim afinitetom, i subjedinicu  $\beta$  koja provodi signal koji povećava afinitet vezivanja citokina. Vezivanje citokina uslovljava dimerizaciju  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica, koje se zatim udružuju sa citoplazmatskim tirozin-kinazama i fosforilišu proteine koji aktiviraju transkripciju iRNA. GM-CSF i IL-3 deluju na hematopoetske stem ćelije i progenitorne ćelije i aktiviraju monocite. GM-CSF, IL-3 i IL-5 takođe mogu stimulisati proliferaciju eozinofila i degranulaciju bazofila. Sva tri receptora fosforilišu isti citoplazmatski protein i antagonistička aktivnost GM-CSF i IL-3 može da se objasni njihovom kompeticijom za ograničenu količinu  $\beta$  subjedinice. Podfamilija IL-2R receptora za IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 i IL-15 ima jedinstveni citokin-specifičan  $\alpha$  lanac, ali svi imaju uobičajeni prenosnik signala  $\gamma$  lanac. IL-2 i IL-15 su trimeri i dele IL-2R  $\beta$  lanac. Monomerni IL-2R  $\alpha$  ima mali afinitet za IL-2, dimer IL-2R  $\beta\gamma$  ima srednji afinitet, a trimer IL-2R  $\alpha\beta\gamma$  vezuje IL-2 sa velikim afinitetom. IL-2R  $\alpha$  lanac se eksprimira u aktiviranim T ćelijama. Neaktivirane T-ćelije i NK ćelije (ćelije „ubice“) konstitutivno ekspimiraju mali broj IL-2R  $\beta\gamma$  (227)

2. IFN receptori: Ovi receptori imaju konzervisane cisteinske ostatke, ali ne Trp-Ser-X-Trp-Ser sekvencu i uključuju receptore za IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  i IFN $\gamma$  (228).

3. TNF receptori imaju četiri ekstracelularna domena i uključuju receptore za solubilni TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  kao i za membranu vezani CD40 i Fas. Opisana su dva TNF receptora, TNFR1 i TNFR2. TNF receptori CD40 i Fas vezuju ligie CD40L i FasL na efektornim T ćelijama. CD40 je ekspimiran na plazma membranama B ćelija i makrofaga. T ćelijski CD40L vezuje se za B ćelijski CD40 i stimuliše proliferaciju B ćelija i izotipski „switching“. Vezivanje T ćelijskog CD40L za makrofagni CD40 stimuliše makrofage da sekretuju TNF $\alpha$  i postanu mnogo senzitivnije na IFN $\gamma$ .

Vezivanje T ćelijskog FasL za Fas vodi aktivaciji kaspaznih proteaza koje iniciraju apoptozu ćelija koje eksprimiraju Fas (229).

4. Hemokinski receptori: Ovi receptori imaju sedam transmembranskih heliksa i kuplovani su sa proteinom G. Ova familija obuhvata receptore za IL-8 (CXCR2), MIP-1, MCP-1 (CCR2), fraktalkin/CX3CR1 i RANTES (230).

#### *Solubilni receptori citokina*

Osim receptora koji su vezani za membranu, mnogi lanci receptora za citokine javljaju se u solubilnoj (s) formi i nastaju ili proteolizom ekstracelularnog domena za membranu vezanog receptora ili skraćenog receptora iz alternativnog transkripta. Sinteza solubilnih receptora pomoću oba mehanizma se obično povećava sa aktivacijom ćelija. Solubilni receptori mogu imati različite fiziološke uloge: desenzitizacija ćelija koje imaju ovaj receptor, inhibicija delovanja citokina kompeticijom sa receptorima vezanim za membranu, zaštita solubilnih citokina od degradacije, transport citokina i učešće u formiranju funkcionalnog receptora. Relativna koncentracija solubilnih receptora za citokine, relativan afinitet za solubilni receptor i mogućnost interakcije sa drugim molekulama. Najbolje proučeni solubilni receptori za citokine su sIL-6 $\alpha$ , sIL-2R, sTNFR1 i sTNFR2 (230, 231).

#### *Citokinima indukovana ćelijska signallizacija*

Mada su broj i uloge citokina različite, većina njih ima isti mehanizam delovanja. Mnogi citokini se sintetišu u neaktivnoj formi a nakon cepanja postaju aktivni. Interakcija citokina sa specifičnim receptorima na različitim tipovima ćelija, praćena je aktivacijom intracelularnih signalnih puteva koji aktiviraju transkripcione faktore kao što su prenosici signala i aktivatora transkripcije (STAT), NF- $\kappa$ B, sa sma- i mad-povezanim proteinima (Smad) i na taj način deluju kao gen-regulatorni protein (225, 233). Rezultat ove interakcije uključuje adheziju ćelija, promenu permeabilnosti i apoptozu. Većina citokina stimuliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija imunog sistema. Citokini takođe indukuju rast i migraciju ćelija zida krvnog suda. Citokini mogu da povećaju produkciju reaktivnih kiseoničnih radikala i u endotelnim ćelijama modifikuju sintezu/aktivnost vazodilatornih medijatora kao što su NO, prostaciklin, bradikinin, kao i vazoaktivni medijatori endotelin i angiotenzin II. Citokini takođe mogu da interaguju sa glatkim mišićnim ćelijama i aktiviraju Ca<sup>2+</sup>, protein kinazu C, Rho kinaze,

MAPK puteve, koji dovode do rasta i migracije ćelija. Citokini takođe mogu da interaguju sa integrinima i MMP i modifikuju sastav ekstracelularnog matriksa. Perzistentno povećanje citokina praćeno je vaskularnom disfunkcijom i aterosklerozom.

### *Interleukin 1*

Članovi IL-1 familije citokina su proinflamatorni citokini koji su eksprimirani u gotovo svim tipovima ćelija uključenim u proces ateroskleroze i predstavljaju prve citokine koji su izučavani na polju inflamacije zida krvnog suda. IL-1 familija se sastoji od pet proteina koji pokazuju značajnu homologiju sekvence (234, 235): IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-18 (IFN $\gamma$ -indukujući faktor), ligand ST2L receptora i IL-33. IL-1 je primarni proinflamatorni citokin (236, 237) koji se javlja u dva glavna biološki aktivna oblika: IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . I IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  se sintetišu kao veliki prekurzorni proteini. Pro IL-1 $\alpha$  je biološki aktivan i cepanjem pod dejstvom kalpaina nastaje zreo protein IL-1 $\alpha$ . Obe forme ostaju unutar ćelije sve dok ne dođe do smrti ćelija. Pro-IL-1 $\beta$  nije biološki aktivan i proteteolitičkim cepanjem pomoću intracelularnog IL-1 $\beta$ -konvertujućeg enzima (ICE ili kaspaze-1) nastaje zreo protein (238). Mada je većina IL-1 $\beta$  prekurzora lokalizovana u citozolu, jedan deo se pomera u sekretorni lizozom gde se kolokalizuje sa prokaspazom-1 (239).

IL-1 $\beta$  je dominantna izoforma u cirkulaciji kod ljudi. IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  vezuju se za dva IL-1 receptora (IL-1R): tip I i tip II. Kada se IL-1 (IL-1 $\alpha$  ili IL-1 $\beta$ ) veže za IL-1 tip I receptora (IL-1RI), za kompleks IL-1/IL-1RI formira kompleks sa IL-1 receptor pomoćnim proteinom (IL-1RAcP). Ovo rezultira prenosom signala koji je odgovoran za većinu dejstava posredovanih IL-1. Signalizacija je izazvana p38 mitogenom-aktiviranom protein kinazom (MAPK)-aktiviranom fosforilacionom kaskadom. Ovo rezultira aktivacijom transkripcionog NF- $\kappa$ B i aktivirajućeg proteina-1 (AP-1) i ekspresijom različitih proinflamatornih gena, uključujući IL-1 (240–243). Tip II receptora (IL-1RII), poznat kao „mamac“ receptor, deluje kao plivajući receptor, nema intracelularni signalni domen i ne provodi signal. Pretpostavlja se da deluje kao unutrašnji put koji negativno reguliše aktivnost IL-1 (244–246).

Ćelijske komponente zida krvnog suda imaju dvojaku ulogu: da generišu IL-1 signalizaciju i da budu „mete“ dejstva IL-1 signalizacije. IL-1 je jedan od prvih citokina

koji su uključeni u razvoj i progresiju vaskularne inflamacije u aterosklerozi. IL-1 stimuliše ekspresiju adhezionih molekula na vaskularnim endotelnim ćelijama, povećavajući vaskularnu permeabilnost, indukujući proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, indukujući prokoagulantnu aktivnost i sekreciju citokina u endotelnim glatkim mišićnim ćelijama i monocitima/makrofagama zida krvnog suda (247–249). Sve ove ćelijske komponente imaju sposobnost da sintetišu IL-1 (250).

IL-1 je uključen u sve faze ateroskleroze od ranog formiranja plaka do destabilizacije i ruptur lezije. U procesu aterogeneze, IL-1 povećava adheziju leukocita na endotelne ćelije (251) i posreduje u transmigraciji leukocita u intimu zida krvnog suda (252). Lokalno sintetisan IL-1 može dalje da podržava održavanje inflamatornog mikro-okruženja uticajem na ekspresiju citokina i adhezionih molekula. U uznapredovalom plaku, IL-1-indukovana ushodna regulacija MMP može destabilizovati fibroznu kapu lezije i doprineti rupturi plaka (253). Hipoteza o značajnoj ulozi IL-1 u svakom aspektu aterogeneze je i klinički potkrepljena brojnim studijama. Povećane koncentracije IL-1 $\beta$  u serumu izmerene su kod bolesnika sa koronarnom srčanom bolešću (254). Povećane koncentracije IL-1 $\beta$  takođe su utvrđene u perikardnoj tečnosti bolesnika sa nestabilnom anginom pectoris (255). U populacionoj genetičkoj studiji, Momiyama i sar. (256) su utvrdili značajnu asocijaciju polimorfizma IL-1 $\beta$  gena i incidence infarkta miokarda kod bolesnika seropozitivnih na hlamidiju pneumoniae. Klinička ispitivanja su takođe pokazala da su koncentracije IL-1 $\beta$  u serumu povećane kod bolesnika sa AIM unutar prvih nekoliko sati od početka bola (257). Međutim, druge studije nisu pokazale povećanje koncentracije IL-1 $\beta$  u bolesnika sa AIM; one nisu bile povećane ni u jednoj maloj grupi bolesnika sa komplikovanim infarktima (Killip klasa 3 i 4) i kod bolesnika koji su primili fibrinolitičku terapiju (258). Uprkos značajnoj lokalnoj ushodnoj regulaciji IL-1 $\beta$  u infarktom zahvaćenom miokardu, povećanje u serumu se teško detektuje jer se citokini vezuju za velike proteine kao što je  $\alpha$ 2 makroglobulin, komponente komplementa ili solubilni tip II IL-1 receptora (236).

Nakon infarkta miokarda, IL-1 reguliše inflamatorni odgovor i uključen je u razvoj nepoželjnog remodelovanja povećavajući ekspresiju MMP. IL-1 signalizacija može da bude osnovni medijator u patogenezi srčane insuficijencije, suprimiranjem kontraktilnosti srčanog mišića, ubrzanjem hipertrofije miokarda i indukovanjem apoptoze kardiomiocita (259).

### *Interleukin-2*

Interleukin-2 (IL-2) je proinflamatorni citokin molekulske mase 15,5 kDa, sastavljen iz 133 aa i četverostrukog  $\alpha$ -heliksa. Gen za IL-2 lokalizovan je na 4q26 i sastavljen od četiri egzona. Mehanizam regulacije ekspresije obuhvata regulaciju transkripcije i stabilizaciju mRNA. Njegova osnovna funkcija je proliferacija i diferencijacija NK ćelija, kao i T i B ćelija, eliminacija auto-reaktivnih T-ćelija i stvaranju i homeostazi regulatornih T ćelija (Treg) koje imaju ulogu u patogenezi autoimunih oboljenja (260, 261). Svoje efekte ostvaruje vezivanjem za visoko-afinitetni receptor koji se sastoji iz tri subjedinice IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) i  $\gamma_c$  (CD132) koje su koekspimirane na Treg ćelijama i na antigenom aktiviranim T limfocitima. Nakon vezivanja IL-2 za receptor transdukcija signala se odvija preko puta koji uključuje JAK1 (Janus kinase 1), JAK3 i STAT5. Interakcija IL-2 sa  $\beta$ - i  $\gamma$ -lancem vodi fosforilaciji receptora i JAK1 i JAK3 koje su povezane sa  $\beta$ - i  $\gamma$ -lancem. Zatim se STAT5 vezuje za fosforilisani receptor i sam se fosforiliše na ključnom tirozinskom ostatku, nakon čega se odvaja od receptora i dimerizuje. Fosforilisani STAT5 dimeri se translociraju u nukleus i deluju na transkripciju ciljnih gena (262–264). Kvaternarni kompleks IL-2-IL2R se brzo internalizuje, a IL-2, IL-2R $\beta$ , i  $\gamma_c$  se brzo degradiraju, ali se IL-2R $\alpha$  reciklira na površinu ćelije (265, 266).

### *Interleukin-3*

Interleukin-3 (IL-3) je glikoprotein sastavljen od 152 aa, molekulske mase 17 kDa. Humani gen lociran je na 5q31 hromozomu samo 9kb od gena za GM-CSF u klasteru sa GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 (267, 268). Svoje dejstvo ostvaruje preko visoko afinitetnog receptora koji je heterodimer i sastoji se iz  $\alpha$ -subjedinice koja je specifična za IL-3 i  $\beta$ -subjedinice koja je odgovorna za transdukciju signala i koju dele receptori za IL-3, faktor 2 stimulacije rasta kolonija (CSF2/GM-CSF) i IL5. Beta subjedinica se aktivira vezivanjem liganda i neophodna je za biološku aktivnost IL3. Transdukcija signala obavlja se sistemom JAK2/STAT5, a indukcija c-myc (progresija ćelijskog ciklusa i sinteza DNK) i aktivacija Ras puta (supresija apoptoze) (269–272). Sintetišu ga aktivirane T-ćelije, monociti/makrofage i stroma ćelije. Ovaj citokin je multipotentni hematopoetski faktor rasta, indukuje proliferaciju, sazrevanje i verovatno i samo-obnavljanje pluripotentne hematopoetske stem ćelije i ćelija mijeloidne, eritrocitne i megakariocitne loze. IL-3 ima važnu ulogu na bazofilima i mast ćelijama.



IL-3, eksprimiran aktiviranim T-limfocitima u ranoj fazi i u uznapredovalom aterosklerotičnom plaku može da deluje direktno na proces ateroskleroze ili aktivacijom migracije glatkih mišićnih ćelija i proliferacije ili indirektno sintezom VEGF (273). Uloga IL-3 u patofiziologiji ateroskleroze dokazana je u nekoliko studija. U endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene IL-3 stimuliše ekspresiju P-selektina, proaterogene molekule koja posreduje u adheziji i transmigraciji leukocita i monocita (274). U glatkim mišićnim ćelijama krvnog suda, utvrđeno je da IL-3, koga sintetišu aktivirane T-ćelije iz aterosklerotične lezije, pokreće sintezu DNK i transkripciju gena za VEGF u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (272, 273, 275). IL-3 dovodi se u vezu i sa restenozom posle urađene PKI kod bolesnika sa koronarnom arterijskom bolešću (276).

#### *Interleukin-4*

Interleukin-4 (IL-4) je plejotropni imunomodulatorni citokin koga sekretuju Th2 ćelije i koji je tradicionalno smatran anti-inflamatornim citokinom (277–279). Eozinofili, bazofili i mast ćelije takođe mogu da sintetišu IL-4 (280, 281). Međutim, danas je jasno opisana njegova proaterogena uloga. Studije su pokazale da IL-4 indukuje proinflamatorni odgovor u vaskularnim endotelnim ćelijama stimulišući ekspresiju VCAM-1, E-selektina, MCP-1 i IL-6 (282–291). Humani gen za IL-4 lociran je na 5q31 hromozomu. IL-4 deluje preko IL-4 receptora (IL-4R) koji se sastoji iz dve subjedinice,  $\alpha$  lanca (IL-4R $\alpha$ ) i  $\gamma$  lanca ( $\gamma$ c). IL-4R $\alpha$  je komponenta i IL-4 i IL-13 receptorskog kompleksa. Gen za ovaj receptor, *IL4RA* gen, lociran je na 16. hromozomu (16p12.1). Signalizacija obuhvata sledeće puteve: insulin receptor supstrat-1 (IRS-1), fosfoinozimid-kinazni put, Ras/MAPK put, JAK1,3/STAT6 (292–294). Utvrđeno je da vrednosti IL-4 pre i nakon PKI koreliraju sa disfunkcijom leve komore (295).

#### *Interleukin-5*

Interleukin-5 (IL-5) je homodimerni glikoprotein molekulske mase 45–60kDa. Varijacije u molekulskoj masi su posledica dodavanja heterogenih ugljenohidratnih lanaca. Uklanjanje ugljenih hidrata iz IL-5 uzrokuje gubitak termostabilnosti, ali ne utiče na biološku aktivnost *in vitro*. Uglavnom ga stvaraju Th2 ćelije nakon stimulacije antigenima (*Mycobacterium tuberculosis*, *Toxocara canis*) ili alergenima i mast ćelije nakon stimulacije sa alergen/IgE kompleksom. IL-5 gen je lociran na 11. hromozomu u blizini gena koji kodiraju IL-3, IL-4, GM-CSF (296) koji su često koeksprimirani u Th2

ćelijama. IL-5 deluje na ciljnu ćeliju vezivanjem za receptor (IL-5R) koji se sastoji od  $\alpha$ -lanca (IL-5R $\alpha$ ) i  $\beta$  lanca ( $\beta$ c). IL-5 se specifično vezuje za  $\alpha$ -lanac, a  $\beta$ c je odgovoran za transdukciju signala koju deli sa IL-3R i GM-CSFR. Proksimalna sekvenca citoplazmatskog domena bogata prolinom (PPXP motiv) i IL-5R $\alpha$  i  $\beta$ c su neophodne za IL-5 indukovanu transdukciju signala. IL-5 aktivira tri različita signalna puta i to JAK2/STAT5, Btk i Ras/ERK (297–299). Većina B1-limfocita konstitutivno eksprimira IL-5R $\alpha$  i odgovara na IL-5 za proliferaciju i diferencijaciju u plazma ćelije koje sekretuju antitela. Glavna mesta sinteze IL-5 su Th2, Tc2, mast ćelije, eozinofili,  $\gamma\delta$ T ćelije, NK T-ćelije i epitelne ćelije (300–302).

IL-5 ima značajnu ulogu u patogenezi astme, hipereozinofilnim sindromima, i sa eozinofilima povezanim infalamtornim oboljenjima. Osim toga smatra se da je IL-5 veza između urođenog i stečenog imuniteta specifičnog za epitope oksLDL i da ima ateroprotektivna svojstva, delimično stimulišući sintezu ateroprotektivnih IgM antitela specifična za oksidovani LDL (303).

#### *Interleukin-6*

IL-6 je multifunkcionalni proinflamatorni citokin IL-6 familije citokina. Ekspimiran je u maloj koncentraciji kod zdravih osoba, ali su povećane koncentracije IL-6 utvrđene kod osoba koje imaju neku infekciju ili traumu, u različitim hroničnim oboljenjima kao što su ateroskleroza, infarkt miokarda, tip II dijabetesa i gojaznost (304, 305). Gen za IL-6 lociran na 7. hromozomu kodira protein molekulske mase 21 kDa sastavljen od 185 ak. Sintetišu ga brojne ćelije kao što su fibroblasti, endotelne ćelije, mononuklearni fagociti, neutrofilni, hepatociti, T i B limfociti, neuroni, astrociti i glija ćelije (306,307). IL-6 se na ciljnim ćelijama vezuje za receptor IL-6R koji se sastoji od dve subjedinice, tj. dva različita udaljena glikoproteina. Subjedinica  $\alpha$  (80kDa) vezuje ligand IL-6, dok subjedinica  $\beta$  (130kDa) ima funkciju transduktora signala i naziva se gp130. Za razliku od  $\alpha$ -subjedinie koja je prisutna dominantno u hepatocitima i monocitima,  $\beta$ -subjedinica je prisutna u skoro svim tkivima. IL-6 alternativno može da se veže i za sIL-6R. U ovom alternativnom putu-transsignalizaciji, IL-6 se vezuje za sIL-6R, a zatim se nastali kompleks IL-6/sIL-6R vezuje za gp130 molekul na ciljnim ćelijama koje ne poseduju IL-6R. Vezivanjem IL-6 kompleksa za gp130 subjedinicu nastaje heksamerni kompleks koji rezultira signalizacijom u ciljnim ćelijama vodeći aktivaciji transkripcionog faktora C/EBP preko

Ras-ERK-MAPK kaskade. Dalje se aktivira transkripcioni faktor STAT3 koga aktiviraju janus kinase (JAK), što vodi indukciji STAT3 ciljnih gena (308–313).

IL-6 ima nekoliko važnih uloga u organizmu: indukuje sintezu CRP; učestvuje u regulaciji diferencijacije i aktivacije T-ćelija; kontroliše proliferaciju i rezistenciju T-ćelija na apoptozu indukujući sintezu IL-2 i aktivaciju STAT3 (314–316). Takođe, IL-6 aktivira sintezu Th2 citokina u CD4+ T limfocitima preko transkripcionog faktora C/EBP (317). IL-6 je glavni regulator ravnoteže između regulatornih T-ćelija (Treg) i efektornih Th17 ćelija (318). Njegovo specifično dejstvo je da indukuje sintezu Th17 ćelija zajedno sa TGF $\beta$  (319–322), kao i da inhibira diferencijaciju regulatornih T ćelija (323–326). Kao rezultat, IL-6 deluje proinflamatorno i suprimira odgovor T reg ćelija. IL-6 trans-signalizacija je odgovorna za sekreciju IL-17 u T limfocitima u inflamacijom zahvaćenom tkivu (327). IL-6 reguliše i akutnu inflamaciju *in vivo* (328, 329).

#### *Interleukin-7*

Humani gen za interleukin-7 (IL-7) lociran je na hromozomu 8q12-13 i sastoji se od 6 egzona. Kodira protein od 177 aa uključujući i signalni peptid od 25 aa, a nakon glikozilacije njegova molekulska masa je 25kDa. IL-7 pripada tipu 1 kratkolančanih citokina hematopoetinske familije, grupi kojoj pripadaju IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF i faktor stem ćelija (SCF) (330, 331). Ćelije brojnih tkiva sintetišu IL-7; prvenstveno stromalne i epitelne ćelije, a nešto manje i koštana srž (332–340). IL-7 ostvaruje svoje dejstvo vezivanjem za receptor IL-7R. Receptor je heterodimer i sastoji se iz  $\alpha$  i  $\gamma$  lanaca. Vezivanjem IL-7 za IL-7R $\alpha$  lanac (CD127) i  $\gamma$  dovodi do heterodimerizacije ovih komponenti i do jukstapozicioniranja intracelularnih signalnih molekula JAK3 i 1. Fosforilacijom tirozinskih ostataka u citoplazmatičnom domenu IL-7R $\alpha$  lanca i JAK1 molekule rezultira aktivacijom signalnih puteva koji uključuju STAT5a i STAT5b, PI3-kinaze (PI3K), Src kinaze. Dodatno, IL-7 signalizacija utiše na ekspresiju i lokalizaciju Bcl-2 familije faktora. Osnovna uloga IL-7 je modulacija razvoja T i B ćelija i homeostaza T ćelija (341, 342).

#### *Interleukin-8*

Interleukin-8 (IL-8) je identifikovan kao hemotaksični faktor za neutrofile u supernatantu aktiviranih humanih monocita. Interleukin-8 pripada familiji

proinflamatornih CXC hemokina. Transkripcijom IL-8 gena lociranog na 4q hromozomu, nastaje protein sastavljen od 99 ak, a nakon cepanja signalnog peptida protein sastavljen od 77 ak (u neimunim ćelijama) ili od 72 ak u monocitima i makrofagama. IL-8 sekretuju brojne normalne i tumorske humane ćelije. Uglavnom ga sekretuju monociti i endotelne ćelije. Ekspresija IL-8 je primarno regulisana proteinom aktivatorom i/ili NF- $\kappa$ B posredovanom transkripcionom aktivnošću. Osim toga, ekspresija IL-8 je regulisana brojnim drugim stimulusima koji obuhvataju inflamatorne signale (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), hemijske ili faktore sredine (izlaganje hemioterapijskim agensima i hipoksiji), steroidnim hormonima (pirogeni, estrogeni, deksametazon) (343). Biološke efekte IL-8 ostvaruje vezivanjem za dva površinska receptora kuplovana sa proteinom G- CXCR1 i CXCR2. Geni za CXCR1 i CXCR2 locirani su na 2q35 hromozomu. Receptori pokazuju veliku sličnost u sekvencama (77%). CXCR1 receptor se aktivira samo vezivanjem IL-8 ili granulocitnog hemoatraktantnog proteina 2, dok CXCR2 ima brojne ligande (344–348). Nakon stimulacije receptora sa IL-8, aktivira se mali heterotrimerni protein G koji dalje aktivira kaskadno primarne efekte fosfatidilinozitol-3 kinazu ili fosfolipazu C, a zatim i Akt, PKC, uslovljava mobilizaciju kalcijuma i/ili aktivira MAPK signalne kaskade. Ovi signalni putevi kao posledicu imaju translaciju proteina i regulaciju aktivnosti spektra transkripcionih faktora. IL-8 signalizacija takođe aktivira familiju RhoGTPaza i brojne tirozin kinaze (Src familija kinaza i FAK) koje regulišu arhitekturu ćelijskog citoskeleta i njegovu interakciju sa ekstracelularnim prostorom. IL-8 signalizacija dovodi do angiogenog odgovora u endotelnim ćelijama, povećava proliferaciju i preživljavanje endotelnih i ćelija kancera i potencija migraciju kancerogenih ćelija, endotelnih ćelija i infiltraciju neutrofila u tumor (349–354).

### *Interleukin-10*

Interleukin-10 (IL-10) je jedan od najznačajnijih antiinflamatornih citokina. Pre više od 20 godina prvi put je opisan kao novi medijator koga sekretuju mišiji Th2 ćelijski klonovi i koji inhibira sintezu IL-2 i IFN- $\gamma$  u Th1 ćelijskim klonovima. Nazvan je inhibitorni faktor sinteze citokina, a kasnije preimenovan u IL-10. Od njegovog otkrića do danas brojne grupe su ispitivale biologiju IL-10 (355). Gen koji kodira humani IL-10 lociran je na 1. hromozomu i sastavljen je od 5 egzona (356). IL-10 gen kodira protein od 178 ak, koji se sekretuje nakon cepanja signalnog peptida od 18 ak.

Struktura IL-10 vrlo je slična strukturi IFN- $\gamma$  (357). Humani IL-10 je 35 kDa homodimer sastavljen iz dva nekovalentno povezana monomera. Nedavno je identifikovana nova familija humanih molekula sličnih IL-10, nazvana IL-10 familija koju čine IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 (358). Njihova sličnost u sekvenci ne rezultira i istim biološkim funkcijama. Danas je poznato da mogućnost sinteze IL-10 osim T-limfocita imaju i skoro svi leukociti (359). Veoma značajan izvor sinteze *in vivo* su monociti, makrofage i Th ćelije (360–363). Ali i dendritične ćelije, B ćelije, citotoksične T ćelije, regT ćelije, NK ćelije, mast ćelije, kao i neutrofil i eozinofili takođe sintetišu IL-10 (364–372).

Plejotropna dejstva IL-10 se ostvaruju vezivanjem IL-10 za specifičan receptorski kompleks. IL-10 receptor (IL-10R) sastoji se iz dva različita lanca IL-10R1 i IL-10R2. Oba lanca pripadaju klasi II familije receptora za citokine (CRF2). CRF2 su obično transmembranski glikoproteini čiji se ekstracelularni domeni sastoje od 210 ak, formirajući dva fibronektin tip III domena i imaju nekoliko konzerviranih pozicija ak što je od značaja za njihovu sekundarnu strukturu. IL-10R1 je glikozilirani protein molekulske mase 90–110 kD, kodiran genom na hromozomu 11 (373, 374). Nedavno je protein koji je poznat još od 1993. godine kao CRF2-4 identifikovan kao IL-10R2 (375). Gen koji kodira ovaj lanac nalazi se na 21. hromozomu. Dok je IL-10R1 specifičan za IL-10 receptorski kompleks, IL-10R2 je dodatni deo receptorskih kompleksa drugih liganada: IL-22, IL-26, IL-28a, IL-28b i IL-29. Afinitet IL-10 za IL-10R kompleks je značajno veći u odnosu na izolovan IL-10R1. Vezivanje IL-10 za njegov receptorski kompleks je dvostepeni proces. Prvo se IL-10 vezuje za IL-10R1. IL-10/IL-10R1 interakcija menja konformaciju citokina omogućavajući asocijaciju IL-10/IL-10R1 kompleksa sa IL-10R2 (376–378). IL-10R2 sam nema mogućnost da veže IL-10 (377, 379). Blizina ove dve komponente receptorskog kompleksa vodi recipročnoj aktivaciji sa receptorom udružene Jak1 (udružena sa IL-10R1) i Tyk2 (udružena sa IL-10R2). Nakon fosforilacije tirozina u citoplazmatičnom delu IL-10R1, STAT3 molekule se vezuju i fosforilišu janus kinazama. Dodatno se aktiviraju STAT1, a u nekim ćelijama i STAT. STAT homo- ili heterodimeri ulaze u nukleus gde se vezuju za STAT vezujuće elemente različitih promotora u cilju indukcije transkripcije odgovarajućih gena.

IL-10 kao jedan od najznačajnijih antiinflamatornih i imunosupresivnih citokina glavne efekte ostvaruje na monocitima (380). IL-10 deluje na tri glavne funkcije

monocita/makrofaga: prezentaciju antigena, oslobađanje imunih medijatora i fagocitozu. On suprimira sve funkcije monocita/makrofaga koje su odgovorne za njihovu efektornu funkciju u specifičnom i nespecifičnom imunom odgovoru. IL-10 inhibira ekspresiju MHC klasa II i kostimulatorne molekule i produkciju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , medijatora sa najznačajnijim inflamatornim karakteristikama (381–383). Istovremeno, on omogućava inhibiciju, indukuje toleranciju i „scavenger“ funkcije ovih ćelija (380). U bolestima u kojima je evidentna prekomerna sinteza IL-10, mogu se registrovati neželjeni imunosupresivni efekti IL-10 i rast nekih tumora. Kod oboljenja sa relativnim ili absolutnim deficitom IL-10 kao što su Kronova bolest, psorijaza, reumatoidni artritis, nakon transplantacije organa, javlja se stalna aktivacija imunskog sistema (384).

### *Interleukin-12*

Interleukin-12 (IL-12) je heterodimer molekulske mase 70 kD sastavljen od kovalentno vezanih p40 i p35 subjedinica (385). Subjedinica p40 je homolog citokinskih receptora gde je p35 subjedinica slična IL-6 i G-CSF (386). Geni koji kodiraju humani p35 i p40 locirani su na različitim hromozomima (hromozom 3 i 5 kod ljudi) i ekspresija proteina je s toga nezavisno regulisana. Kada se koeksprimiraju u istoj ćeliji, ove subjedinice formiraju biološki aktivan heterodimer p70 (387). IL-12p40 može da se sintetiše kao slobodan monomer ili homodimer (p40<sub>2</sub>) u velikom višku u odnosu na IL-12p70 heterodimer *in vitro* i *in vivo*. Fiziološka uloga IL-12p40 je hemoatraktant makrofaga. Za razliku od p40, p35 se ne sekretuje kao monomer. Antigen-prezentujuće ćelije i fagocitne ćelije, uključujući monocite i makrofage, dendritične ćelije i neutrofile su primarna mesta sinteze IL-12. IL-12 indukuje proliferaciju, sintezu IFN- $\gamma$  u NK i T ćelijama, povećava citotoksičnu aktivnost ovih ćelija i indukuje polarizaciju CD4<sup>+</sup> T ćelija u Th1 fenotip. IL-12 u kombinaciji sa IL-18, takođe deluje na makrofage i dendritične ćelije i indukuje sintezu IFN- $\gamma$  čak i u antigen prezentujućim ćelijama (388–391). Nasuprot tome, IL-12 i IFN- $\gamma$  antagonizuju Th2 diferencijaciju i sintezu IL-4, IL-5 i IL-13. IL-12 svoje efekte ostvaruje preko IL-12 receptora (IL-12R) koji se eksprimira na T-ćelijama, NK ćelijama i dendritičnim ćelijama (392). IL-12R se sastoji iz dve subjedinice,  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2, koje su strukturno povezane sa tipom I superfamilije citokinskih receptora i homologe su sa gp130 (393–395). Geni za  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 nalaze se na hromozomima 19p13.1 i 1p31.2. Afinitet IL-12 za samu  $\beta$ 1 ili  $\beta$ 2 subjedinicu je mali,

tako da je koekspresija obe  $\beta$  subjedinice neophodna za vezivanje IL-12 (395). IL-12p40 subjedinica vezuje se za  $\beta 1$  subjedinicu receptora, a p35 uglavnom sa  $\beta 2$  subjedinicom.  $\beta 2$  jedinica je odgovorna za prenos signala. Mehanizam signalizacije IL-12 uključuje aktiviranje JAK/STAT puta. IL-12p40 vezuje se za IL-12R $\beta 1$  i IL-12p35 za IL-12R $\beta 2$ . Vezivanje liganda rezultira transfosforilacijom JAK (JAK2 i TYK2) i daljom fosforilacijom receptorskih lanaca pomoću aktiviranih JAKova. IL-12R $\beta 2$  je fosforilisan i služi kao mesto za vezivanje STAT4. Nakon vezivanja za receptorski lanac, STAT4 će se fosforilisati. Homodimeri STAT4 ulaze u nukleus gde se vezuju za STAT vezujuća mesta u promotorskom regionu IFN- $\gamma$  i indukuju transkripciju gena za IFN- $\gamma$  (396–402). Uz IL-23, IL-12 predstavlja jedan od osnovnih regulatora urođenog i stečenog imuniteta.

### *Interleukin-13*

Interleukin-13 (IL-13) je glikoprotein molekulske mase 17 kD. Humani IL-13 gen nalazi se na 5q31 hromozomu u klasteru sa genima za IL-4, IL-3, IL-5, IL-9 i GM-CSF i sastoji se iz 4 egzona. Humani IL-13 sastoji se od 132 aa od čega signalni peptid ima 20 aa. IL-13 ekspimiraju CD4<sup>+</sup> T ćelije, CD8<sup>+</sup> T ćelije, mast ćelije, bazofili, eozinofili i NK T ćelije (403–406). IL-13 svoje delovanje ostvaruje nakon reakcije sa IL-13 receptorom (IL-13R). IL-13R je funkcionalni heterodimer sastavljen od IL-13Ra1 lanca (IL-13Ra1) i IL-4Ra lanca (IL-4Ra), i deluje takođe i kao tip II IL-4R (292, 407). Kada IL-13 indukuje heterodimerizaciju IL-4Ra i IL-13Ra1, dolazi do fosforilacije i aktivacije JAK. Aktivirani JAK fosforiliše tirozinske ostatke IL-4R. Supstrat za insulinski receptor (IRS) i STAT6 fosforilišu se JAKom. Fosforilisani IRS1/2 se udružuje sa signalnim molekulama koje kaskadno dovode do rasta i proliferacije ćelija. Fosforilisani STAT6 proteini se dimerizuju i translociraju u jedro gde se vezuju za specifične sekvence DNK. IL-13R (IL-4R/IL-13Ra1) se ekspimirira na hematopoetskim i nehematopoetskim ćelijama, kao što su B ćelije, monociti/makrofage, dendritične ćelije, eozinofili, bazofili, fibroblasti, endotelne ćelije (408). Drugi IL-13R receptor koji je izolovan je identifikovan i nazvan IL-13R $\alpha 2$ . Smatralo se da je to „plutajući receptor“ zbog njegovog kratkog citoplazmatičnog domena i njegovog velikog afiniteta za IL-13, ali ne i za IL-4. Nedavno je otkriveno da on sadrži motiv koji kaskadno aktivira TGF- $\beta$

promotor i sintezu kolagena. IL-13R $\alpha$ 2 može fizički da se spoji sa IL-4R $\alpha$  subjedinicom i da na taj način blokira njenu aktivnost i utiče na ispoljavanje efekata IL-4 (409).

### *Interleukin-15*

Interleukin-15 (IL-15) je plejotropni citokin i pripada istoj porodici citokina kao i IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 i IL-21. U strukturi ima četiri  $\alpha$ -heliksa. Humani IL-15 gen nalazi se na hromozomu 4q25–35 (410). IL-15 iRNK se konstitutivno eksprimira u velikom broju ćelija i tkiva uključujući monocite/makrofage, dendritične ćelije, keratinocite, ćelije epiderma kože, fibroblaste i epitelne ćelije različitog porekla, neurone, bubreg, placentu, srce i skeletne mišiće (411). IL-15 ima molekulska masa 14-15 kDa. sastavljen je od 114 aa, a sadrži dve disulfidne veze i dva mesta za N-glikozilaciju na C-terminalnom kraju (412). Za ostvarivanje svojih bioloških efekata IL-15 koristi subjedinice receptorskog kompleksa IL-2 ( $\beta$  (IL-2/IL-15R $\beta$ ) i  $\gamma$ -lanac) ali se takođe vezuje i za jedinstveni receptor IL-15R $\alpha$ , koji se javlja kako vezan za membranu tako i u solubilnoj formi (411, 413). IL-15R kompleks se eksprimira na monocitima, dendritičnim ćelijama, NK ćelijama, T ćelijama i fibroblastima (414). Karakteristika IL-15 i IL-15R $\alpha$  je sposobnost da stimulišu susedne ćelije mehanizmom trans-penetracije (415). Vezivanje IL-15 za IL-15R kompleks indukuje aktivaciju različitih signalnih puteva u zavisnosti od tipa ćelije (411). Sintaza IL-15 je kontrolisana na više nivoa, uključujući transkripciju, translaciju i intracelularni transport. Opisane su dve izoforme iRNK za IL-15 od kojih nastaje IL-15 prekursori protein sa dugačkim signalnim peptidom od 48 aa i kraćim signalnim peptidom od 21 aa (411). Obe izoforme IL-15 daju u procesu translacije isti protein veličine 114 aa. Signalni peptidi određuju sudbinu nastalog IL-15. Duži signalni peptid je udružen sa sekretovanim IL-15, a kraći signalni peptid se čuva u ćeliji (411). Poznato je da je IL-15 u velikoj meri eksprimiran u makrofagama aterosklerotičnog plaka, te se s toga može smatrati veoma značajnim induktorom funkcije IL-15 u aterosklerozi (416–417). Najnovija studija ukazuje da IL-15 i njegov receptorski kompleks mogu da doprinose integritetu aterosklerotičnog plaka moduliranjem glatkih mišićnih ćelija posredstvom trombocitnog faktora rasta (418).

### *Interleukin-23*

Interleukin-23 (IL-23), proinflamatorni citokin, pripada tipu 1 heterodimera, IL-12 je sličan citokin i sastoji od 19 kD  $\alpha$  subjedinice (IL-23p19) koja je disulfidnom vezom povezana za 40kD  $\beta$  subjedinicom (IL-12p40). Formiranje biološki aktivnog IL-



IL-23 zahteva sintezu obe subjedinice p40 i p19 u istoj ćeliji (419, 420). Subjedinice IL-23, p40 i p19, kodirane su IL-12B genom na hromozomu 5 i IL-23A na hromozomu 12 (421). IL-23 i IL-12 dele subjedinicu u njihovom receptorskom kompleksu zbog prisutne subjedinice p40. Ovaj receptorski kompleks je heterodimer sastavljen od dve subjedinice, IL-23R i IL-12 $\beta$ 1 (419, 422). IL-23R koji se sastoji od ekstracelularnog N-terminalnog imunoglobulinu sličnom domenu i dva citokinska receptorska domena, vezuje IL-23p19, dok IL-12 $\beta$ 1 subjedinica sadrži tri membranska-proksimalna fibronektina tipa III i dva citokinska receptorska domena koja interaguju sa IL-12/23p40 (419, 420). Tip 1 makrofaga i dendritične ćelije perifernih tkiva (kože, intestinalne mukoze i pluća) (423) odgovorne su za ekspresiju IL-23 i njegovog receptora. Produkcija IL-23 je stimulirana aktivacijom „toll-like” receptora njegovim ligandima (lipopolisaharidima, peptidoglikanima, CpG DNA i poly I:C). Ove interakcije rezultiraju povećanom ekspresijom p40 i p19, što povećava i stvaranje IL-23 (424). Aktivacija dendritičnih ćelija preko TLR2 indukuje sintezu IL-23 mnogo više u odnosu na IL-12 (425, 426). Drugi faktori kao što su prostaglandin E2 i GM-CSF mogu modulirati sintezu IL-23 antigen prezentujućih ćelija. Međutim, ova stimulacija je dozno i vremenski zavisna (420). Dodatno sinteza IL-23 može da se poveća interakcijom CD40-CD40L, što aktivira mehanizam pozitivne povratne sprege i dovodi do povećanja sinteze IL-23 u antigen-prezentujućim ćelijama. (420, 424). Kod ljudi, visoke koncentracije IL-23 receptora su detektovane na aktiviranim/memorijskim T ćelijama, NK ćelijama, makrofagama, dendritičnim ćelijama (poreklom iz koštane srži) i monocitima.

Stimulacija receptorskog kompleksa aktivira JAK2 i TYK2, rezultirajući fosforilacijom receptorskog kompleksa i formiranju mesta za vezivanje STAT-ova (1, 3, 4 i 5). Sledi dimerizacija STAT-ova, fosforilacija i translokacija u nukleus, što dovodi do aktivacije ciljnih gena (426). Značajno je da je fosforilacija STAT4 esencijalna za povećanje sinteze INF- $\gamma$  i dalju diferencijaciju Th1 ćelija (427) pošto je STAT3 značajan za stvaranje Th17 ćelija (428). IL-23 je ključni citokin koji povezuje urođeni i stečeni imuni odgovor (420). Njegova sinteza je odgovorna za rani lokalni imuni odgovor (423). Utvrđen je i značaj IL-23 u aktivaciji NK ćelija, povećanju proliferacije T-ćelija i regulaciji produkcije antitela (422). IL-23 takođe reguliše proinflamatorne citokine, npr. IFN $\gamma$ , koji su značajni u Th 1 odgovoru i ćelijskom imunom odgovoru na intraćelijske patogene. (420). IL-23 se povezuje sa inflamatornim oboljenjima kao što

su reumatoidni artritis, gastritis udružen sa infekcijom *Helicobacter pylori* itd., uglavnom zbog velikog kapaciteta da indukuje jak Th1 tip imunog odgovora. IL-23 je takođe povezan sa Th17 odgovorima i citokinima koje proizvode antigen prezentujuće ćelije, tj. odnos IL-12 i IL-23 determiniše delimično da li je odgovor Th1 ili Th17 (419, 420, 422, 424–429).

Iako je u literaturi poznata je povezanost polimorfizma u 3' netranslatiranom regionu IL-12B gena (rs3212227) sa tipom 1 dijabetesa (430, 431), multiplom sklerozom (432) i psorijazom (429), malo je podataka o povezanosti sa kardiovaskularnim oboljenjima. Mala japanska studija nije detektovala asocijaciju ovog polimorfizma sa koronarnom arterijskom bolešću (433).

Poznata je činjenica da ateroskleroza kao hronično inflamatorno oboljenje uključuje i T limfocite (434–436). Ushodna regulacija T helper (Th) 1 odgovora urvrđena je u lokalnim aterosklerotičnim lezijama i cirkulišućim limfocitima u animalnom modelu ateroskleroze, kao i kod bolesnika sa AKS, ukazujući da odnos Th1/Th2 ima značajnu ulogu u rupturi plaka i nastanku AKS (437–440).

Nedavno je utvrđeno da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne T (Treg) ćelije i Th17 ćelije dva različita podtipa Th1 i Th2 ćelija. Treg ćelije eksprimiraju Foxp3 transkripcioni faktor i imaju antiinflamatornu ulogu i mogu imati značajnu ulogu u patogenezi destabilizacije plaka i početka AKS. Kod bolesnika sa AKS utvrđeno je značajno povećanje broja perifernih Th17 kao i sa Th17 povezanih citokina (IL-17, IL-6 i IL-23) i transkripcionog faktora (ROR $\gamma$ t) kao i značajno smanjenje broja Treg, sa Treg-om povezanih citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ 1) i transkripcionog faktora Foxp3 u poređenju sa zdravim osobama ili osobama sa stabilnom anginom (441).

#### *Protein-1 koji privlači monocite*

Protein-1 koji privlači monocite (MCP-1, CCL2) je prvo identifikovan kao protein koji ima mogućnost da privlači monocite *in vitro* (442–444). Gen za MCP-1 nalazi se na hromozomu 17q11.2-q21.1 (445) i kodira polipeptid od 76 aa koji je član familije CC hemokina, malih proteina koji vezuju heparin. Poznato je da članovi CC familije hemokina imaju ulogu u privlačenju monocita/makrofaga i ulasku u zid krvnog suda na mestima zahvaćenim aterosklerozom (223, 446). MCP-1 svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za hemokinski receptor CCR2 i igra značajnu ulogu u formiranju hiperplazije intime nakon povrede arterije (223, 446, 447) i uključen je u rani stadijum

razvoja ateroskleroze (448). MCP-1 sekretuju endotelne ćelije kao što su glatke mišićne ćelije i njegova ekspresija je ushodno regulisana oksLDL *in vitro* (449). U eksperimentalnim životinjskim modelima, kao i kod ljudi pokazana je najveća ekspresija MCP-1 u oblastima aterosklerotičnih lezija bogatim makrofagama (450).

Na MCP-1/CCR2-deficijentnim miševima je pokazana značajna supresija Th2 i Th1 odgovora (451). Njegova značajna uloga u patogenezi aterosklerozi potvrđena je u studiji na apolipoprotein E „knockout“ miševima, kod kojih je intramuskularnim transferom mutiranog MPC-1 gena blokiran MCP-1/CCR2 signalni put i razvoj ateroskleroze (452).

Kliničke studije su utvrdile povezanost MCP-1 sa faktorima rizika za kardiovaskularne bolesti, kao što su hiperlipidemija (453) i povećani cirkulišući nivoi MCP-1 kod bolesnika sa AIM u poređenju sa bolesnicima sa stabilnom anginom (454).

Takođe, koncentracije MCP-1 u plazmi bile su više kod bolesnika sa AKS nego kod bolesnika sa stabilnom anginom (455), kao i kod bolesnika sa nestabilnom anginom u poređenju sa bolesnicima sa stabilnom anginom, dok su obe grupe imale više vrednosti MCP-1u cirkulaciju u odnosu na ispitanike sa normalnim angiografskim nalazom koronarnih arterija (456). Bolesnici sa perifernom arterijskom bolešću takođe su imali povišene vrednosti MCP-1, dok je rizik od ishemijske bolesti srca značajno rastao sa povećanjem koncentracije MCP-1 za jednu standardnu devijaciju nezavisno od drugih faktora rizika, uključujući i inflamatorne markere (457). Kliničke studije su pokazale da statini smanjuju nivo MCP-1u cirkulaciji (458, 459). MCP-1 je evidentno nezavisan prognostički faktor u akutnoj i hroničnoj fazi AKS, ali je neophodna dalja evaluacija kao prognostičkog markera i potencijalnog terapijskog cilja (460, 461) kako bi se MCP-1 uvrstio u red klinički relevantnih markera.

#### *Makrofagni inflamatorni protein-1 $\alpha$*

Makrofagni inflamatorni protein-1 (MIP-1) je proinflamatorni citokin CC subfamilije hemokina. Izolovan je kao prvi od četiri člana MIP familije koju čine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL9/10 (MIP-1 $\delta$ ) i CCL15 (MIP-1 $\gamma$ ). Utvrđena su tri humana *MIP-1 $\alpha$*  gena (*LD78 $\alpha$* , *LD78 $\beta$* , *LD78 $\gamma$* ) locirana na 17. hromozomu (q21.1–q21.3) koji se sastoje iz tri egzona i dva introna. CCL3 se sintetiše kao prekurzor od 92 aa, a cepanjem hidrofobnog signalnog peptida nastaje zreo protein sastavljen od 69 aa. Sintetiše ga većina hematopoetskih ćelija, ćelije direktno uključene u imuni odgovor,

makrofage, T i B limfociti, neutrofilni, dendritične ćelije, mast i NK ćelije. Sekretuju ga još i trombociti, osteoblasti, astrociti i mikroglije, epitelne ćelije, fibroblasti, glatke mišićne ćelije. MIP-1 $\alpha$  svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za dva tipa hemokinskih receptora CC-CCR1 i CCR5 koji pripadaju superfamiliji receptora kuplovanih sa G proteinom. Vezivanje za receptor uključuje visokoafinitetne interakcije i dalju kaskadu intracelularnih događaja koji dovode do hemotakse, degranulacije, fagocitoze i sinteze medijatora. Transdukcija signala je inicirana kompleksom sa G proteinom što vodi indukciji fosfoinozitol kinaze 3 i fosfolipaze C. U signalizaciju su uključeni MAP kinazni put i JAK/STAT put. MIP-1 proteini su važni činioci u patogenezi brojnih inflamatornih stanja i oboljenja uključujući astmu, formiranje granuloma, artritis, pneumoniju, psorijazu, itd. (462, 463).

#### *Faktor stimulacije kolonija makrofaga*

Faktori stimulacije kolonija (CSF) su hematopoetski citokini, koji imaju ključnu ulogu u preživljavanju, proliferaciji i diferencijaciji mijeloidnih progenitornih ćelija kao i u funkcionalnoj aktivaciji zrelih mijeloidnih ćelija. Četiri faktora ove familije su klonirana i okarakterisana: multi-CSF/IL-3 (stvaraju ga Th1 i Th2 ćelije), granulocitno makrofagni-CSF (GM-CSF), makrofagni CSF (M-CSF, CSF-1) i granulocitni CSF (G-CSF) (464). Gen za GM-CSF nalazi se na hromozomu 5q22-31. GM-CSF je glikoprotein koji se sintetiše kao prekursor sastavljen od 144 ak, a nakon cepanja hidrofobnog signalnog petida nastaje protein od 127 ak, molekulske mase 22kDa, sastavljen od četiri  $\alpha$  heliksa. U hematopoetskim ćelijama, GM-CSF ostvaruje svoje efekte vezivanjem za visoko afinitetni, heterodimerni receptorski kompleks na ciljnim ćelijama. Receptor se sastoji iz  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice. Alfa subjedinica-GM-R $\alpha$  je receptor za GM-CSF i vezuje ligand malim afinitetom. Beta subjedinicu ( $\beta$ c) deli sa IL-5R i IL-3R (270). Signalni putevi uključuju JAK/STAT, MAPK i fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3-K) (465). Biološka dejstva CSF se značajno preklapaju. G-CSF i M-CSF učestvuju u donošenju odluke da ćelije uđu u specifičan put sazrevanja (prekursori neutrofila i makrofaga), dok GM-CSF i IL-3 takođe mogu da stimulišu druge tipove ćelija. Postoji niz dokaza da CSF-ovi mogu da deluju u kardiovaskularnim bolestima i u aterosklerozi (466, 467).

Osim njegovog dejstva na hematopoetske progenitorne ćelije u koštanoj srži, GM-CSF može efektivno da modulira proliferaciju, migraciju i druge biološke

karakteristike brojnih nehematoloških ćelija, uključujući i fibroblaste koštane srži, tumorske ćelijske linije i endotelne ćelije (468–470). GM-CSF-indukovana sinteza adhezionih molekula povećava ulaz cirkulišućih leukocita, posebno monocita u endotelne ćelije (471, 472). GM-CSF takođe povećava broj cirkulišućih monocita koji su uključeni u angiogenezu i remodelovanje leve komore (473–475), a nivo GM-CSF u cirkulaciji je povećan i kod bolesnika sa ishemijskom dilatacionom kardiomiopatijom (476).

GM-CSF ima ključnu ulogu u aterosklerozi. On selektivno reguliše rast i preživljavanje mononuklearnih fagocita (477). Oksidovani LDL indukuje ekspresiju ovog faktora u makrofagama (478–481). Humane aterosklerotične lezije sadrže povećane nivoe imunoreaktivnog GM-CSF, koga eksprimiraju endotelne, glatke mišićne ćelije i makrofage (480, 481). Proliferaciju makrofaga u leziji, prati i povećana ekspresija GM-CSF (482). GM-CSF reguliše sintezu tipa VIII kolagena u aterosklerotičnim lezijama (483) i stimuliše makrofage da produkuju MPO (139) i ROS (481), povećava MMP (484) i redukuje sekreciju apoE u makrofagama (485).

GM-CSF takođe poseduje i potencijalne anti-aterosklerotične osobine. Farmakološke doze smanjuju koncentraciju holesterola u plazmi, smanjuju sintezu holesterola u jetri (486), povećavaju ekspresiju VLDL receptora (487) i smanjuju ekspresiju receptora čistača u kulturi humanih monocita, što vodi redukciji akumulacije estara holesterola (488). Monociti stimulisani sa GM-CSF produkuju visoke nivoe antagonista IL-1 receptora (489, 490), povećavajući ekspresiju PPAR- $\gamma$  (491, 492) i suprimiraju dejstvo INF- $\gamma$  (493). GM-CSF takođe indukuje monocite da sekretuju solubilni VEGF receptor-1, sprečavajući VEGF-A signalizaciju i angiogenezu (494). Davanje suprafizioloških koncentracija GM-CSF redukuje aterosklerozu, broj glatkih mišićnih ćelija i sadržaj kolagena (495). Kratkotrajna primena GM-CSF kod bolesnika sa hroničnom ishemijom miokarda poboljšava kolateralni protok (496). Primena GM-CSF u bolesnika sa kancerom prolazno povećava LVES dimenzije i smanjuje kontraktilnost miokarda (497). Uticaj i uloga fizioloških nivoa endogenog GM-CSF na formiranje aterosklerotične lezije nisu još poznati.

### *Interferon- $\gamma$*

Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) identifikovan je kao antivirusni faktor, mnogo pre nego što je prepoznat kao interleukin. Humani gen za INF- $\gamma$  nalazi se na hromozomu 12q24

dužine 6kb. Sintetiše se kao prekurzor od 166 ak uključujući sekretorni signalni peptid od 23 ak. INF- $\gamma$  je dimer, sastavljen od dve subjedinice od 146 ak. Sintetiše se u CD4+ Th1 i CD8+, citotoksičnim T limfocitima, NK i NKT ćelijama, makrofagama, dendritičnim ćelijam i B-limfocitima (498). Smatra se da su IL-12 i IL-18 primarni induktori sinteze INF- $\gamma$  u inflamatornim reakcijama (385, 388, 499–502).

INF- $\gamma$  receptori su eksprimirani na skoro svim ćelijama koje imaju jedro i sastavljeni su od dva 90 kDa INF $\gamma$ R1 proteina i dva 62 kDa INF $\gamma$ R2 proteina (503). Humani IFNGR1 gen sadrži sedam egzona i nalazi se na 6. hromozomu (504). Ekstracelularni domen INF $\gamma$ R1 sadrži domen koji vezuje ligand, dok intracelularni deo sadrži domen koji je neophodan za transdukciju signala i recikliranje receptora (503, 505). Humani IFNGR2 gen takođe sadrži sedam egzona i nalazi se na 21. hromozomu (506, 507). Ekstracelularni domen INF $\gamma$ R2 interaguje sa INF $\gamma$ R1/INF $\gamma$  kompleksom, ali sam nema mogućnost da vezuje ligand (503). Intracelularni domen INF $\gamma$ R2 je neophodan za transdukciju signala (508). Interakcijom INF- $\gamma$  sa receptorom pokreće se signalni kaskadni odgovor koji uključuje JAK/STAT put i JAK1 i 2, kao i STAT1 (509, 510). INF- $\gamma$  stimuliše niz ćelijskih odgovora uključujući regulaciju prezentacije natigena, kontrolu stečenog imunog odgovora T limfocita Th1 i Th2, sekreciju hemokina i aktivaciju imunih ćelija, kao i proliferaciju i stimulaciju apoptoze koji zajedno učestvuju u aterogenezi (511). S obzirom da INF- $\gamma$  ima i proinflamatorne i inflamatorne karakteristike on u aterosklerozi ispoljava obe svoje funkcije (512). Ova suprotna dejstva mogu biti gen-specifična pošto je poznato da je četvrtina svih gena u transkriptomu makrofaga, ključnih ćelija uključenih u aterosklerozu, osetljiva na INF- $\gamma$  (513). INF- $\gamma$  reguliše imuni odgovor na aterosklerozu oslobađanjem hemokina i stečenim Th1 odgovorom. INF- $\gamma$  indukuje oslobađanje MCP-1, CXCL16 i CXCL9-11 hemokina koji privlače monocite i CD4+ T limfocite u aterosklerotičnu leziju. CXCR6 receptor takođe doprinosi ovome i takođe stimuliše sintezu INF- $\gamma$  u CD4+ T limfocitima. INF- $\gamma$  povećava ekspresiju adhezionih molekula npr. VCAM-1 što pomaže infiltraciju monocita. CD4+ T limfociti prepoznaju penaste ćelije i aktiviraju se što dovodi do ekspanzije Th1 T limfocita. INF- $\gamma$  ubrzava formiranje penastih ćelija povećavajući preuzimanje modifikovanog LDL od strane receptora CD36 i SRA, i smanjujući odliv holesterola. IL-12 i IL-18, koje sekretuju glatke mišićne ćelije i makrofage stimulišu Th1 odgovor indirektno, povećavanjem broja Th1 ćelija. INF- $\gamma$

takođe doprinosi aterosklerozi inhibicijom proliferacije glatkih mišićnih ćelija. Drugi tipovi ćelija u aterosklerotičnoj leziji kao što su NKT ćelije, dendritične ćelije i mast ćelije takođe mogu da sintetizuju INF- $\gamma$ . Međutim, nastali regulatorni T limfociti mogu da inhibiraju stećeni Th1 imuni odgovor negirajući dejstvo CD4<sup>+</sup> T limfocita (514).

#### *Faktori nekroze tumora*

Faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), moćan proinflamatorni citokin, otkriven je kao cirkulišući faktor koji može da uzrokuje nekrozu tumora (515). Humani gen za TNF- $\alpha$  nalazi se na hromozomu 6p21.3. TNF- $\alpha$  se sintetizuje kao protein tip II sastavljen od 212 aminoakidske mase 26 kDa i formira stabilan homotrimer kao transmembranski TNF- $\alpha$  (tmTNF $\alpha$ ). Proteolitičkim cepanjem pod dejstvom MMP TNF- $\alpha$  konvertujućeg enzima (TACE, ADAM17) (516) iz membranske forme oslobađa se solubilni homotrimer TNF- $\alpha$  (sTNF $\alpha$ ). Biosinteza TNF- $\alpha$  je vrlo precizno regulisana i on se jedva može detektovati kod nestimuliranih ćelija ili u plazmi zdravih osoba. Inflamatorni stimulusi kao što su lipopolisaharidi i drugi produkti bakterija, virusne ili parazitarne infekcije, akutna povreda kao što je ishemija, može da dovede do oslobađanja velikih količina sTNF- $\alpha$  iz makrofaga, limfoidnih ćelija, mast ćelija, endotelnih ćelija, fibroblasta i nervnog tkiva unutar nekoliko minuta (517–520). Subakutna I/R miokarda takođe rezultira prolongiranim autokrinom ushodnom regulacijom formiranja TNF- $\alpha$  i njegovog oslobađanja iz srca (521–524). Povećanje koncentracije TNF- $\alpha$  u miokardu nakon mikroembolizacije posredovano je delovanjem NO nastalog dejstvom NO sintaze.

TNF- $\alpha$  ostvaruje svoje dejstvo preko dva receptora TNF $\alpha$  receptor tip 1 (TNFR1; CD120a; p55/60) i TNF $\alpha$  receptor tip 2 (TNFR2; CD120b; p75/80). TNFR1 i TNFR2 pripadaju transmembranskim glikoproteinima tip I i eksprimiraju se kao trimeri. Ovi receptori sastoje iz ekstracelularnog, transmembranskog i intracelularnog domena. Dok su njihovi ekstracelularni domeni veoma slični i sadrže četiri cisteinom bogata domena i pre-ligand vezujući domen, njihovi intracelularni domeni se razlikuju što objašnjava različitu signalizaciju nakon stimulacije TNF (525). Vezivanje TNF za TNFR1 koji sadrži „smrtonosni domen“ u intracelularnom domenu vodi brzom privlačenju molekula adaptera TRADD, RIP1 i TRAF2, što rezultira stvaranjem kompleksa-I. On inicira fosforilaciju i aktivaciju MAPK i NF- $\kappa$ B, koji uzrokuju ushodnu regulaciju proinflamatornih molekula i anti-apoptičkih gena za

preživljavanje. Sledi formiranje kompleksa-II, za koji se vezuju FADD, TRADD i RIP1 koji aktivira kaspazu-8. Ovaj drugi signal je proapoptički, ali se u većini ćelija prevazilazi ranom indukcijom anti-apoptičkih gena za preživljavanje (526). Za razliku od TNFR1, TNFR2 ne privlači TRADD zato što nema "smrtonosni" domen u intracelularnom domenu. Međutim, TNFR2 može da privlači TRAF2 i na taj način da aktivira NF- $\kappa$ B put i MAPK. TNFR2 može takođe da senzitivise ćelije za apoptozu kompeticijom sa TNFR1 za TRAF2 i Ciap molekule, koji su značajni za formiranje kompleksa-I (527). Ovo može da vodi smanjenju ekspresije gena za preživljavanje i omogućava kompleksu-II da indukuje apoptozu. Koji od faktora odlučuje o ishodu u ćelijama koje eksprimiraju oba receptora nije u potpunosti jasno; smatra se da bi odnos TNFR1/TNFR2 mogao da bude uključen u ovu odluku (528).

TNF sam može da deluje kao receptor i da prenosi signale u ćeliju koja ga eksprimira. Ovaj signalni mehanizam poznat je kao reverzna signalizacija i može da indukuje značajne signale (529). Utvrđeno je da ovaj mehanizam *in vitro* modulira funkciju makrofaga i T-ćelija, a značajan je i za aktivaciju NK ćelija (530). TNFR1 se eksprimira konstitutivno u gotovo svim ćelijama/organima uključujući vaskularne ćelije i ćelije miokarda (531), osim eritrocita, dok je ekspresija TNFR2 inducibilna i ograničena na ćelije imunog sistema, endotelne ćelije i neurone. Oba TNFR mogu da se prevedu u solubilne oblike receptora—sTNFR1 i sTNFR2. Ovo stvara dvostruki sistem povratne sprege. S jedne strane, solubilni receptori mogu da vežu svoj ligand u cirkulaciji, što ograničava količinu liganda koji može da produkuju biološki signal, a s druge strane skraćuje receptora smanjuje količinu signalnih komponenti receptora koje su još uvek vezane za membranu. Dok se TNFR1 aktivira i sa solubilnom i transmembranskom formom TNF, dotle se TNFR2 aktivira uglavnom transmembranskom formom, tmTNF (532).

Vaskularni efekti TNF- $\alpha$  obuhvataju promene metabolizma i funkcije endotela, agregaciju trombocita i interakciju endotelnih ćelija i ćelija krvi, funkciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija (533). TNF- $\alpha$  deluje na vaskularni endotel povećavajući ekspresiju proinflamatorni citokina, prokoagulantnih, proliferativnih i proapoptičkih gena (534). Uobičajeni inicijalni korak za ove promene je smanjenje bioraspoloživosti NO (535, 536), sekundarno povećanom preuzimanju NO ROS-om i/ili smanjenjem aktivnosti NO-sintaze (535, 536). TNF- $\alpha$  takođe može da promeni fiziološke karakteristike interakcije endotelne ćelije-ćelije krvi, indukujući sintezu ćelijskih



adhezionih molekula na površini endotelnih ćelija delovanjem na TNFR1. TNF- $\alpha$  utiče primarno na spoljašnji put koagulacije sa njegovom centralnom komponentom tkivnim faktorom (537) i suprimira fibrinolizu (538). TNF- $\alpha$  deluje i na vaskularne strukture: TNF $\alpha$  destabilizuje endotelni citosklet fosforilacijom tirozina u kadherinu i povećava permeabilnost endotela (539). TNF- $\alpha$  indukuje apoptozu endotelnih ćelija, kao i angiogenezu, migraciju, proliferaciju i apoptozu glatkih mišićnih ćelija. TNF osim proinflamatornih karakteristika deluje i imunomodulatorno, tj. interaguje sa antigen prezentujućim ćelijama i T ćelijama. Interakcija TNF sa TNFR1 na antigen prezentujućim ćelijama inhibira sintezu IL12/IL23 p40 i IL10. TNFR2 je uključen u aktivaciju regulatornih T ćelija.

Koncentracije TNF $\alpha$  povezane su sa stepenom rane ateroskleroze i koreliraju sa metaboličkim i ćelijskim promenama koje mogu biti od značaja za proces ateroskleroze. Ovo podržava pretpostavku da je povećana sinteza TNF- $\alpha$  rani i centralni događaj u aterogenezi (540). Brojne studije su pokazale da su koncentracije TNF- $\alpha$  povezane sa prognozom nakon ishemijskog moždanog udara i pokazalo se da su koncentracije TNF- $\alpha$  u plazmi različite kod različitih podtipova ishemijskog moždanog udara i da mogu da posluže za postavljanje dijagnoze pri prijemu pacijenta (541–543). Povećane koncentracije TNF- $\alpha$  mogu da ukažu na ozbiljnost lezija u perforiranim arterijama i mogu biti prediktor prognoze ishoda lakunarnih infarkta (544).

Dodatno, povećane koncentracije TNF- $\alpha$  u plazmi mogu biti nezavisan prediktor koronarne endotelne disfunkcije kod hipertenzivnih bolesnika. TNF $\alpha$  može biti koristan za identifikaciju visokorizične grupe hipertenzivnih bolesnika sa koronarnom endotelnom disfunkcijom i mogu da daju značajne indicije o povezanosti sistemske inflamacije sa razvojem koronarne ateroskleroze (543, 545). U mnogim formama kardiomiopatije utvrđena je brza ekspresija proinflamatornih citokina kao što je TNF- $\alpha$  koji posreduju u različitim procesima kao što su ekspresija gena, rast ćelije ili apoptoza. U početnim stadijumima miokarditisa, ekspresija proinflamatornih citokina u miokardu je deo inflamatornog procesa (543) i može da se koristi kao sistemski kardiovaskularni marker. Inflamacija ima značajnu ulogu u razvoju posledica metaboličkog sindroma uključujući dislipidemiju i promenenu toleranciju na glukozu. Ove metaboličke promene čine supstrat za dalji razvoj aterosklerotičnog plaka i insulinsku rezistenciju.

Hronična inflamacija, a naročito TNF- $\alpha$  izgleda da predstavljaju pokretača reumatoidnog artritisa, ateroskleroze i poremećene osetljivosti na insulin koje mogu da

se jave simultano kod obolelih (543, 546). Među inflamatornim markerima, izgleda da je TNF- $\alpha$  ključni element u patogenezi dislipidemije i poremećene tolerancije na glukozu. Iako su promene koncentracije lipida korisne za bolesnika u slučaju akutnih stanja sa povišenim TNF- $\alpha$ , produžene TNF- $\alpha$ -indukovane modifikacije lipida povećaće kardiovaskularni rizik, morbiditet i mortalitet (546). Evidentno je da TNF- $\alpha$  ima ključnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih oboljenja i istovremeno može da se koristi kao marker za detekciju promena koje mogu biti povezane sa kardiovaskularnim oboljenjima i kao terapijski cilj u borbi protiv razvoja i progresije posledica metaboličkog sindroma. Terapija atorvastatinom kod hiperholesterolemičnih bolesnika značajno smanjuje koncentracije proinflamatornih citokina sličnih TNF- $\alpha$  (IL-1 i IL-6) kao i sICAM-1 i CRP, ukazujući na značaj farmakološke i kliničke uloge statina u kardiovaskularnim oboljenjima (546). Iz svega navedenog, može se zaključiti da TNF- $\alpha$  može biti biomarker za koronarnu arterijsku bolest, marker prognoze NKVD, akutnog ishemijskog moždanog udara i koronarne endotelne disfunkcije.

Gen za TNF- $\beta$  (limfotoksin A) lociran je na hromozomu 6p23-6q12 i sastoji se od četiri egzona udaljen samo 1,2 kb od TNF- $\alpha$  gena. TNF- $\beta$  je N-glikozilirani protein koji se sastoji od 171 ak, molekulske mase 25 kDa. TNF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  pokazuju oko 30% homologije u sekvenci. Sintetišu ga T-limfociti, fibroblasti, astrociti, endotelne ćelije, epitelne ćelije, a sintezu stimulišu interfereni i IL2, a inhibira IL10. TNF- $\beta$  indukuje sintezu GM-CSF, G-CSF, IL1, kolagenaze, i prostaglandina E<sub>2</sub> u fibroblastima, indukuje sintezu G-CSF u monocitima, mitogen je za B limfocite, u neutrofilima indukuje produkciju ROS. TNF- $\beta$  deluje preko TNFR2 receptora (547, 548).

### *Epidermalni faktor rasta*

Epidermalni faktor rasta (EGF) je mitogeni faktor i pripada EGF familiji u kojoj se osim EGF nalaze i transformišući faktor rasta  $\beta$ , amfiregulin, EGF sličan faktor rasta koji vezuje heparin, betacelulin, epiregulin i heregulin (549–551). Gen za EGF nalazi se na 4q25. EGF je polipeptid sastavljen od 53 ak od kojih su 6 cisteini (552–554). Ovi cisteini formiraju tri intramolekulske disulfidne veze (555) koje su značajne za održavanje biološke aktivnosti EGF. Epidermalni faktor rasta se sintetše kao prekurzor, tip-I transmembranskog proteina sastavljen od 1217 ak. Ovaj protein ima ekstracelularni domen koji sadrži sekvencu faktora rasta, hidrofobni transmembranski domen i citoplazmatični domen. U plazma membrani on podleže proteolizi sa članom familije

disintegrina i metaloproteinaza ADAM 10, pri čemu nastaje rastvorljivi, biološki aktivan faktor rasta (550, 556). Prekurzor EGF je glikozilirani transmembranski protein molekulske mase 140–150 kDa. Ovaj prekurzor se takmiči sa zrelim EGF za vezivanje za EGF receptor. Interakcija između EGF prekurzora u jednoj ćeliji i EGF receptora susedne ćelije može da utiče na migraciju ćelija, rast ćelija itd. (557). Receptor za EGF (EGFR) je glikoprotein molekulske mase 170 kDa sa tirozin kinaznom aktivnošću. Sastavljen je od jednog polipeptidnog lanca od 1186 aminokiselina koji nastaje cepanjem prekurzora od 1210 ak. Kodiran je genom koji se nalazi na 7p11.2 hromozomu, ima 28 egzona i dugačak je oko 200 kbp (558). Familiju EGFR čine četiri člana: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2, p185, ili *neu*), ErbB3 (HER3 ili p160) i ErbB4 (HER4). Epidermalni faktor rasta se vezuje za ErbB1 receptor. EGFR se dimerizuje, aktivira, autofosforiliše na ostacima tirozina, a zatim se za njega vezuje EGF (559). Sledi vezivanje različitih signalnih molekula, kao što su adaptorni protein GRB2 i Nck, PLC- $\gamma$ , SHC, STATs itd. Aktivirani EGFR se uklanjaju sa površine ćelije endocitozom i dalje degradiraju u lizozomima što rezultira manjom aktivnošću i manjom količinom. Ligand se degradira u lizozomima, dok se receptor ili degradira ili reciklira nazad na površinu ćelije.

EGF je mitogen glatkih mišićnih ćelija intime (560). Epidermalnim faktorom rasta stimulisan EGFR u glatkim mišićnim ćelijama aktivira MAPK put i inhibira delovanje angiotenzina II (561, 562). Mada su trombociti glavni izvor EGF tokom aterogeneze, oni nemaju sposobnost biosinteze proteina i uključuju se kasnije u aterogeni proces. Postoji mogućnost da se EGF sintetiše u megakariocitima i čuva u trombocitima, ili da ga trombociti preuzimaju iz nekog drugog izvora. Pretpostavlja se i da EGF potiče iz koštane srži, a da se oslobađa u plazmu tokom procesa koagulacije (563).

#### *Vaskularni endotelni faktor rasta*

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) inicijalno je otkriven kao vaskularni permeabilni faktor čija je osnovna uloga da deluje na ekstravazaciju proteina iz tumorom zahvaćenog krvnog suda. Kasnije je otkrivena njegova osobina vezivanja za heparin i specifično mitogeno dejstvo na endotelne ćelije. Familija VEGF obuhvata grupu faktora i to VEGF (VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (virusni), i dodatni član nazvan placentarni faktor rasta (564–567).

Gen za humani VEGF lociran je na 6p21.3 hromosomu, a čine ga osam egzona i sedam introna (568). Ekspresija VEGF pozitivno je regulisana tkivnom i lokalnom hipoksijom, acidozom, slobodnim radikalima, faktorima rasta, citokinima i aktivacijom različitim onkogenima (569). Nastali protein nakon sinteze podleže daljim post-translacionim modifikacijama. Alternativnim spajanjem različitih delova sintetisanih delova lanaca stvara se nekoliko varijanti VEGF sa dužinama lanaca 121, 145, 165, 183, 189 i 206 ak. Različite izoforme VEGF proteina imaju različit afinitet za heparin i heparin sulfat. Većina ćelija eksprimira različite varijante VEGF, dominantno VEGF121 i VEGF165 (570). VEGF (VEGFA) ostvaruje svoje dejstvo vezivanjem za dva receptora na površini ćelije i to za tirozin kinazne receptore VEGFR-1, VEGFR-2 i neuropiline 1 i 2 (receptori za semaforine, molekule uključene u razvoj aksona). Gen za VEGFR-1 lociran je na hromozomu 13q12-q13, a gen za VEGFR-2 na hromozomu 4q11-q12. Molekulske mase ovih receptora su VEGFR-1 180 kDa, a VEGFR-2 195 kDa. Aktivne forme VEGF-su koje se vezuju za ove receptore su uglavnom homodimeri molekulske mase 45 kDa (571). Nakon vezivanja homodimera za receptor VEGF inicira kaskadnu signalizaciju koja počinje dimerizacijom receptora, autofosforilacijom i formiranjem aktivnog receptora. Signalizacija u ćeliji obuhvata više puteva i to fosfolipaza C- $\gamma$ /protein kinaza C, Ras put, fosfatidil inozitol-3 kinazni put, MAPK put i druge (572–574) što za posledicu ima njegova dejstva ne permeabilnost krvnog suda, preživljavanje ćelija i proliferaciju i migraciju (572).

Osnovne uloge VEGF su: antiapoptotička aktivnost, limfangiogeneza (575, 576), imunosupresija (577), a s druge strane stimulacija i privlačenje endotelnih i hematopoetskih prekurzornih ćelija koštane srži u angiogenezi (578, 579), i regulaciju preživljavanja hematopoetskih stem ćelija. Sekundarni efekti VEGF odnose se na indukciju brojnih supstanci, npr. NO, aktivatora plazminogena, itd. (580, 581).

Od izuzetnog značaja je uloga VEGF u hipoksijom i inflamacijom indukovanim odgovorima koji su kritični osim u kanceru i u kardiovaskularnim oboljenjima. VEGF je važan za očuvanje integriteta endotela, a samim tim i za vaskularnu funkciju. S druge strane, VEGF može da deluje na formiranje plaka i njegovu destabilizaciju kao inflamatorni citokin (582). Neovaskularizacija ima protektivnu ulogu u ishemijskoj bolesti srca poboljšavajući njegovu perfuziju i funkciju leve komore. Faktori rasta mogu da posreduju u procesu angiogeneze i arteriogeneze. Koncentracija VEGF značajno raste u prva 24h nakon hipoksije i vraća se na bazalne vrednosti nakon 24h od

uspostavljanja adekvatne oksigenacije miokarda (583). S druge strane, neovaskularizacija je prepoznata kao značajan proces u progresiji i destabilizaciji aterosklerotičnog plaka. Nastala mreža krvnih sudova je važan izvor inflamatornih ćelija koje doprinose nestabilnosti plaka. Hemoragija unutar plaka može da dovede do akumulacije fosfolipidima i slobodnim holesterolom bogatim membranama eritrocita utičući na nestabilnost velikog nekrotičnog jezgra. Poznato je da je progresija plaka povezana sa privlačenjem inflamatornih ćelija i oksLDL. Oksidovani LDL povećava sintezu i sekreciju VEGF in vitro (584), a broj VEGF pozitivnih ćelija korelira sa stepenom vaskularizacije aterosklerotičnog plaka (585). Destabilizacija aterosklerotičnog plaka vodi rupturi plaka, intravaskularnoj trombozi i posledično infarktu miokarda.

#### *Adhezione molekule*

Ćelijske adhezione molekule su prema definiciji Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>) “molekule koje su eksprimirane na površini ćelije i posreduju u adheziji ćelije na druge ćelije ili ili ekstracelularni matriks”. One imaju brojne funkcije na površini ćelije i u njenom okruženju-drugoj sličnoj ili različitoj ćeliji, ekstracelularnom matriksu ili ponekad rastvorljivim elementima. Adhezione molekule su široko distribuirane i praktično svaka ćelija eksprimira ćelijske adhezione molekule. Opisane su četiri grupe adhezionih molekula: imunoglobulini, selektini, integrini i kadherini. Samo su prve tri grupe značajne u regulisanju transporta leukocita, kadherini su odgovorni za interakciju ćelija-ćelija i pomažu održavanje integriteta tkiva.

Superfamilija imunoglobulina uključuje intercelularne adhezione molekule (ICAMs) i vaskularne ćelijske adhezione molekule (VCAMs); selektini obuhvataju endotel-leukocit adhezionu molekulu (E-selektin), P-selektin i leukocitnu adhezionu molekulu (L-selektin);

#### *Selektini*

Selektini su kalcijum zavisni tip-I transmembranskih glikoproteina koji se vezuju za sijalinizirane ugljenohidratne komponente (ligande) na ciljnim proteinima (586). Ovi proteini sadrže N-terminalni C-tip lektinski domen ili domen koji prepoznaje ugljene hidrate, zatim epidermalnom faktoru rasta sličan domen, varijabilni broj kratkih

konsenzus ponovaka sličnih onima kod komplement-regulatornih proteina, kratki transmembranski deo i mali citoplazmatični domen.

Tri člana familije selektina dobila su naziv prema njihovim glavnim mestima ekspresije: L-selektin se eksprimira u leukocitima, E-selektin je specifičan za endotelne ćelije i P-selektin je uglavnom nađen na trombocitima, ali ga ekspimiraju i endotelne ćelije. Geni za selektine P, E i L locirani su na hromozomu lq23-25. Svaka od molekula selektina ima specifičan model ekspresije. L-selektin (CD62L, LAM-1, LECAM-1, gp90MEL, DREG), molekulske mase 80 kDa, se konstitutivno eksprimira na većini leukocita, na nekim T i B ćelijama i nekim NK ćelijama u zavisnosti od mesta aktivacije. U nekim modelima inflamacije, L-selektin posreduje u privlačenju neutrofila u kasnijoj fazi imunog odgovora (587, 588). P-selektin (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3), molekulske mase 140 kDa, se čuva u  $\alpha$ -granulama trombocita i Vajbel-Paladovim telašcima endotelnih ćelija i eksprimira se na površini aktiviranih ćelija u roku od nekoliko minuta. On često posreduje u ranom privlačenju leukocita tokom imunih odgovora (588, 589). Transkripciju P-selektina indukuju IL-4, IL-13 ili onkostatin (590–592), dok  $\text{TNF}\alpha$ , LPS, IL-1 ne povećavaju sintezu iRNK u humanim ćelijama, verovatno zbog nedostatka vezujućeg mesta za NF- $\kappa$ B u promotoru humanog gena za P-selektin (593). E-selektin (CD62E, ELAM-1, LECAM-2), molekulske mase 115kDa koji je prisutan samo u endotelnim ćelijama; njegova transkripcija je regulisana LPS, IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  ili  $\text{INF}\gamma$  pod kontrolom redoks-regulisanih transkripcionih faktora kao što su NF- $\kappa$ B i AP-1. Ova indukcija traje nekoliko sati i značajno se smanjuje po dostizanju optimalne ekspresije (586, 594, 595)

Nakon aktivacije ćelije, selektini se brzo uklanjaju sa površine ćelije mehanizmima internalizacije i lizosomalne degradacije (P- i E-selektin) ili proteolitičkim cepanjem (L-, E-selektin). Solubilne izoforme E- i L-selektina, koje mogu da se izmere u krvi su rezultat ovog procesa (596, 597). Ove molekule nisu samo degradacioni produkti, one mogu imati odgovarajuće funkcije, potencijalno kao inhibitori ili kao agonisti. Selektini su uključeni u najraniju fazu privlačenja leukocita u inflamatorne lezije, i neophodni su za privlačenje i kotrljanje leukocita duž endotela na mestima inflamacije (P, E i L selektini) i adheriranje na endotelne ćelije (E-selektin).

### *Solubilni P-selektin*

Cirkulišući solubilni P-selektin (sP-selektin) detektovan je u plazmi kako zdravih tako i obolelih od različitih oboljenja (598, 599). Njegovi nivoi su značajno veći kod bolesnika sa jednosudovnom bolešću nego kod zdravih osoba (600, 601). Koncentracije sP-selektina u plazmi zdravih osoba su niske (30–60 ng/mL) (602). Međutim u bolesnika sa vaskularnim oboljenjima kao što su hipertenzija (603), hiperholesterolemija (604) ili nestabilna angina (605) nivoi sP-selektina su oko 120–200 ng/mL, a ekstremno mogu da se nađu i vrednosti do 1000 ng/mL (599). Tako, sP-selektin može da se svrsta u grupu kliničkih biomarkera bolesti. Animalni modeli pokazuju da je ekspresija P-selektina bez citoplazmatskog domena povezana sa prokoagulantnim statusom (607–609). Utvrđeno je da nivoi sP-selektina u krvi potiču uglavnom iz trombocita i koreliraju sa progresijom ateroskleroze kod ljudi (610, 611), ukazujući da sP-selektin može da predstavlja dodatni faktor u aterogenezi. Direktna uloga sP-selektina u aterosklerozi je takođe opisana (598, 612), kao i potencijalno značajna uloga povećanih nivoa sP-selektina u regulaciji adhezije leukocita u bolesnika sa uznapredovalom aterosklerozom (598). P-selektin se može smatrati značajnim biomarkerom za prognozu ateroskleroze, nestabilne angine, hipertenzije i hiperholesterolemije.

### *Solubilni E-selektin*

Malo je podataka o funkciji sE-selektina kod zdravih osoba ili u inflamatornim stanjima. Studije su pokazale da su koncentracije sE-selektina povećane u serumu bolesnika sa dijabetes melitusom ili hipertenzijom u poređenju sa zdravim osobama. Takođe, povećane koncentracije sE-selektina utvrđene su i kod tipa 2 dijabetes u poređenju sa zdravim osobama (613, 614). Klinička ispitivanja su pokazala da se povećane koncentracije sE-selektina javljaju u tipu-2 dijabetesa rano u asimptomatskoj perifernoj arterijskoj okluzivnoj bolesti, što može da ukaže na esencijalnu ulogu u patogenezi aterosklerotične vaskularne bolesti u dijabetesu (615). Nije utvrđena razlika u koncentraciji sE-selektina između

### *Superfamilija imunoglobulina*

Članovi superfamilije imunoglobulina (Ig) su glikoproteinski receptori membrane koji sadrže varijabilan broj ekstracelularnih Ig domena. Ovi domeni sadrže

od 70–100 kDa i sastavljeni su od dve  $\beta$  presavijene površine i prouzrokuju uvijanje Ig koje im omogućava delovanje na mestu adhezije. Alternativno spajanje je česta pojava u genima ove familije i omogućava stvaranje različitih izoformi.

Intercelularne adhezione molekule (ICAM) pripadaju subfamiliji od pet članova ICAM-1,2,3,4, i 5. ICAM-1(CD54) je eksprimiran na bazalnom nivou i može biti ushodno regulisan proinflamatornim citokinima u leukocitima i endotelnim ćelijama, dok je ekspresija ICAM-2 (CD102) prisutnog na leukocitima, trombocitima i endotelu inhibirana inflamatorni medijatori. ICAM-3(CD50) se detektuje na endotelnim ćelijama i leukocitima i jedini je ICAM molekul na neutrofilima. Solubilne forme ICAM-1 i ICAM-3 nastaju cepanjem. ICAM-4 se eksprimira u eritroidnim ćelijama, a ICAM-5 u mozgu. Gen za ICAM 1 i 3 locirani su na hromozomu 19p13, za ICAM-2 na 17q23-25. Ligandi za ove ICAM molekule su specifični  $\beta$ 2-integrini leukocita i svaka od ovih molekula ima mogućnost da se vezuje za više liganada koristeći različite domene. Dimerizacija ili stvaranje većih multimera doprinosi povećava afinitet vezivanja za ligande. ICAM-1,2 i 3 posreduju u adheziji leukocita na aktivirani endotel stvaranjem čvrstih veza sa integrinima i indukujući čvrsto vezivanje inflamatornih ćelija za endotel i posreduju u ekstravazaciji leukocita (597, 616–618).

Vaskularni ćelijski adhezioni molekul 1 (VCAM-1, CD106), marker endotelne aktivacije, eksprimira se na endotelnim ćelijama, ali ga mogu eksprimirati i drugi tipovi ćelija kao što su makrofage, mioblasti, dendritične ćelije. Gen za VCAM-1 nalazi se na hromozomu 1p31-32. VCAM-1 deluje vezivanjem integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, poznatim kao veoma kasni antigen 4 (VLA-4), proteina membrane koga eksprimiraju monociti, limfociti i eozinofili (619). Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 je drugi ligand za VCAM-1 i uključen je privlačenje limfocita. Nakon ekspresije VCAM-1, ćelije sa receptorima za VCAM-1 adheriraju prevashodno na mesta i dalje stimulišu migraciju u subendotelni prostor. Finalnu fazu migracije leukocita između endotelnih ćelija uključuje i PECAM-1 (trombocitnoendotelni ćelijski adhezioni molekul) koji se nalazi na spojevima endotelnih ćelija i olakšava dijapedezu leukocita (620).

Endotelne („cell-selective“) adhezione molekule, nedavno otkriven član superfamilije imunoglobulina, koji se nalazi na spoju endotelnih ćelija i na aktiviranim trombocitima takođe posreduje u dijapedezi neutrofila i monocita kroz endotel (621).

Solubilne forme adhezionih molekula mogu se detektovati u cirkulaciji u različitim stanjima uz adhezione molekule vezane za membranu reflektujući aktivaciju



endotela i oštećenje (622, 623). Povišenje nivoa solubilnih formi VCAM-1 i ICAM-1 je rezultat ili povećane ekspresije u aktiviranim endotelnim ćelijama ili povećane proteolize za endotel vezanih adhezionih molekula koje su posledica oštećenja endotelne ćelije (624).

Veliki broj studija ispitivao je povezanost posebno P-selektin, VCAM-1 i ICAM-1 sa različitim patološkim stanjima, posebno sa aterosklerozom i vaskularnim oboljenjima.

#### **1.4.5. Biomarkeri hemodinamskog stresa**

*B-tip natriuretičkog peptida (BNP) i N-terminalni proB-tip natriuretičkog peptida (NT-proBNP)*

Humana familija natriuretičkih peptida sastoji se od atrijalnog (ANP), B-tipa natriuretičkog peptida (BNP) i C-tipa natriuretičkog peptida (CNP) i tri receptora: natriuretičkiog receptora -A (NPR-A ili guaninil ciklaza-A), -B (NPR-B ili guaninil ciklaza-B) i -C (NPR-C ili klirens receptor). Gen za BNP nalazi se na hromozomu 1p36.2. BNP iRNK se translacijom prevodi u preproBNP sastavljen od 134 ak. Nakon uklanjanja signalnog peptida od 26 ak nastaje proBNP-108 sastavljen od 108 ak. U Goldži aparatu proBNP-108 podleže posttranslacionoj glikozilaciji na N-terminalnom kraju (Ser36, Thr37, Thr44, Thr48, Thr53, Ser58 i Thr71). Ako ne dođe do O-glikozilacije na poziciji Thr-71, proBNP-108 se u trans-Goldži aparatu pod dejstvom furina, korina i sličnih peptidaza cepa u BNP-32 (mali ciklični peptid molekulske mase 3,5 kDa) i NT-proBNP-76. BNP-32 i NT-proBNP-76 se zatim sekretuju u ekvimolarnim količinama. Njihova sekrecija je konstitutivna, bez čuvanja u sekretornim granulama. Ako je proBNP O-glikoziliran na poziciji Thr-71, ne dolazi do cepanja i glikozilirani proBNP-108 se kao takav sekretuje u cirkulaciju (625–627). Atrijalno i ventrikularno tkivo sadrže dva osnovna oblika proBNP-108 i BNP-32. BNP-32 je dominantan (~60%) u atrijalnom tkivu, dok je proBNP-108 dominantan (~60%) u ventrikularnom tkivu (628). BNP, srčani hormone, dominantno sintetišu i sekretuju ventrikularni miociti (629), povećan pritisak i zapremina punjenja („overload“), ishemiju miokarda, neurohumoralne faktore i citokine (630–632). U ljudskom mozgu nije detektovan BNP, što ukazuje na to da se tkivna distribucija BNP razlikuje između vrsta. Zahvaljujući prisustvu konzervisane sekvence ponovaka AUUUA u 3’-

netranslatiranom regionu, BNP iRNK se brzo degradira slično limfokinim genima i onkogenima. Ekspresija gena za BNP se dinamički menja u zavisnosti od fizioloških i patofizioloških uslova.

BNP ostvaruje svoju aktivnost vezivanjem za NPR-A ili guaninil ciklazu-A. Gen za humani NPR-A nalazi se na hromozomu 1q21-q22, sastavljen je od 22 egzona i kodira protein sastavljen od 1061 aa. Strukturno je organizovan u ekstracelularni domen (450 aa), transmembranski domen (21 aa) i intracelularni domen (566 aa) koga čine jukstamembranski domen, kinazi sličan domen, „hinge“ domen i katalitički domen (guanilat ciklaze). NPR-A je ekspimiran u brojnim tkivima: adipoznom tkivu, nadbubrežnoj žlezdi, bubregu, placenti, ileumu, cerebelumu, srcu, hipofizi, timusu, ovarijumu. NPR-A je oligomer koji je u osnovnom stanju fosforilisan na šest poznatih mesta u kinazi sličnim domenima. BNP se vezuje za receptor, signal se prenosi kroz membranu, sledi dimerizacija guanilat ciklaznog domena i sinteza cGMP koji aktivira cGMP protein zavisne kinaze, deluje na fosfodiesteraze i utiče na cGMP regulisane jonske kanale (633). Produžena ekspozicija ligandom stimuliše defosforilaciju receptora, što rezultira smanjenom aktivnošću kroz proces homologne desenzitizacije. Defosforilacija primarno rezultira inhibicijom procesa fosforilacije. Oslobođanje liganda i refosforilacija vraćaju enzim u njegovo osnovno stanje (634).

Na ovaj način BNP ostvaruje brojne fiziološke funkcije vezane prvenstveno za bubrežnu i funkciju kardiovaskularnog sistema i obuhvata vazodilataciju, stimulaciju natriureze i diureze, inhibiciju simpatičkog nervnog sistema, sistema renin-angiotenzin-aldosteron, antifibrotičke efekte, kao i inhibitorne i korisne efekte na fiziološke mehanizme vezane za kardiovaskularni sistem (635–638).

Glavni mehanizam klirensa BNP je endocitoza preko klirens receptora-NPR-C koji nema enzimsku aktivnost i kontroliše lokalnu koncentraciju BNP endocitozom i lizosomalnom degradacijom. NPR-C se ekspimirira u glomerularnim i vaskularnim strukturama bubrega, nadbubrežnoj žlezdi, srcu, plućima, mozgu (639, 640, 641). Drugi mehanizam klirensa BNP je enzimska degradacija neutralnom endopeptidazom 24.11. koja je ekspimirana u tubulima bubrega, vaskularnom endotelu, srcu i plućima (642). Klirens NT-proBNP obavlja se na nivou bubrega ili preko retikuloendotelnog sistema. Poluvreme života BNP je 22 minuta, a NT-proBNP 120 minuta (643). NT-proBNP pokazuje manju intraindividualnu varijabilnost u odnosu na BNP, ali na BNP manje utiče starosna dob i bubrežna funkcija (644).

Koncentracije BNP su povećane u različitim patološkim stanjima kao što su srčana insuficijencija, infarkt miokarda, hipertenzija, hipertrofija leve komore i akutna plućna embolija. Tokom poslednjih godina ovi hormoni su duboko promenili lečenje bolesnika sa srčanom insuficijencijom i preporučuju se za dijagnozu, procenu rizika i podešavanje terapije.

#### **1.4.6. Biomarkeri funkcije trombocita i hemostaze**

##### *Fibrinogen*

Fibrinogen je solubilni glikoprotein molekulske mase 340 kDa, sastavljen od dve identične subjedinice koje sadrže tri polipeptidna lanca  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ -lanca koji su povezani disulfidnim vezama. U procesu koagulacije krvi (treća faza) dolazi do pretvaranja fibrinogena u fibrin. Trombin cepa fibrinopeptide A i B iz fibrinogena pri čemu nastaje monomer fibrina koji se zatim polimerizuju stvarajući fibrinski, nestabilan koagulum. Nastali koagulum se stabilizuje delovanjem transglutaminaze (faktora koagulacije XIII). Poznato je da se fibrinogen vezuje za  $\alpha IIb\beta 3$  receptor na trombocitima preko C-terminalnog kraja  $\gamma$ -lanca, indukujući adheziju i agregaciju trombocita, što stimuliše proces koagulacije krvi (645–647).

Međutim, nezavisno od njegove uloge u procesu koagulacije, fibrinogen se smatra i molekulom sa širokim spektrom funkcija vezanih za inflamatorne reakcije. Često označavan kao protein akutne faze, fibrinogen je značajno povećan u inflamatornim stanjima (648, 649). On se sintetiše u hepatocitima jetre i sekretuje u cirkulaciju. U fiziološkim uslovima, fibrinogen se nalazi u cirkulaciji u koncentraciji od 2–4 g/L, ali nakon oštećenja tkiva ili inflamacije njegove koncentracije se mogu povećati i nekoliko puta (648), što ga svrstava u faktore rizika za kardiovaskularna oboljenja (650, 651), moždani udar (652) i Alzheimer–ovu bolest (653). Fibrinogen ostvaruje svoje različite biološke efekte vezivanjem za integrinske i neintegrinske receptore eksprimirane na različitim tipovima ćelija. Fibrinogen se vezuje za integrin  $\alpha IIb\beta 3$  na trombocitima, što vodi agregaciji trombocita koja je neophodna za proces koagulacije krvi. Fibrinogen se vezuje za integrine CD11b/CD18 (Mac-1, CR3,  $\alpha M\beta 2$ ), CD11c/CD18 uslovljavajući ekspresiju makrofaga, a vezivanjem za neintegrinski TLR-4 i ekspresiju hemokina (654, 655). Vezivanjem fibrinogena za integrin  $\alpha V\beta 3$  i ICAM-1 na endotelnim ćelijama dovodi do adhezije, dok vezivanjem za neintegrinski VE-

kadherin reguliše druge funkcije endotelnih ćelija, kao što su migracija i formiranje kapilarne tube (656, 657). Interakcijom sa  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  na mastocitima reguliše njihovu adheziju i aktivaciju (658).

Fibrinogen ima značajnu ulogu u bakterijskim infekcijama vezivanjem za specifične proteine zida bakterija koji regulišu adheziju i preživljavanje bakterija u telu domaćina. Fibrinogen učestvuje u ranim fazama formiranja aterosklerotičnog plaka, pošto se direktno inkorporira u zid arterija i pretvara u fibrin i njegove produkte razgradnje. Dodatno, vezuje se za HDL i stvara čak i veće količine istog (659). Fibrinogen i njegovi produkti razgradnje posreduju u transportu adhezionih molekula na površinu endotela i njihovu dalju migraciju u intimu i pokreću proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija (660, 661). Što se tiče inflamatornih aspekata fibrinogena, inflamatorni proces je uglavnom posredovan interakcijom fibrinogena sa leukocitima koja je posredovana integrinima. Dva glavna receptora za fibrinogen na površini leukocita su MAC-1 i  $\alpha\text{X}\beta\text{2}$ . Monociti indukuju povezivanje fibrinogena za receptor MAC-1 (662, 663). Fibrinogen može da se vezuje za ICAM i da povećava interakciju monocita i endotelnih ćelija (664–666). Fibrinogen povećava koncentraciju ICAM-1 na površini endotelnih ćelija što vodi povećanju leukocita na površini endotelnih ćelija, čak i u uslovima koji su okarakterisani prisustvom povećanog stresa (667). Vezivanje fibrinogena za ICAM-1 posreduje u adheziji trombocita. Interakcijom fibrinogena sa ćelijama koje ekspimiraju ICAM-1 je povezano sa povećanjem ćelijske proliferacije (668). Vezivanjem fibrinogena za receptore na leukocitima, fibrinogen povećava hemotaktički odgovor igrajući na taj način značajnu ulogu u inflamatornom procesu (669). Jedan od predloženih mehanizama kojima fibrinogen indukuje inflamatorne promene u leukocitima uključuje povećanje intracelularnog kalcijuma i povećanje ekspresije faktora aktivacije neutrofila, što rezultira povećanjem fagocitoze, toksičnosti leukocita koja je posredovana antitelima i odlaganjem apoptoze (670).

U infarktu uloga fibrinogena je u stimulaciji inflamatornog odgovora, interakcijom sa brojnim receptorima na različitim ćelijama. Fibrinogen se vezuje za endotelni receptor vaskularni endotelni kadherin, što povećava infiltraciju leukocita i veličinu infarkta nakon reperfuzije (656). Vezivanjem fibrinogena preko N-terminalnog dela  $\beta$  lanca za vaskularni endotelni kadherin (657) takođe reguliše druge funkcije endotela kao što su migracija i formiranje kapilarne tube (657, 671). Fibrinogen se dodatno vezuje za preko udaljene RGD sekvence u C-terminalnom delu  $\text{A}\alpha$  lanca za

integrin  $\alpha v\beta 3$  (672–674) i preko sekvence u  $\gamma$  lancu za ICAM-1 (675) posredujući u adheziji endotelnih ćelija.

Ipitivane su uloge nivoa fibrinogena u prediksiji ateroskleroze i budućih kardiovaskularnih događaja, predikcija kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa i bez kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da on može da pruži dodatne prognostičke informacije u odnosu na lipidne parametre. Studije ukazuju da modifikacija nivoa fibrinogena lekovima može da smanji rizik od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta. Određivanje fibrinogena u multimarkerskom pristupu proceni kardiovaskularnih faktora rizika takođe je značajno da bi fibrinogen mogao da se svrsta u klinički značajne rutinske markere.

#### **1.4.7. Biomarkeri dislipidemije i modifikacije lipida**

##### *Lipidi i apolipoproteini*

Poslednjih nekoliko decenija, veliki broj kliničkih studija pokazao je da dislipidemija može da bude prediktor kardiovaskularnih oboljenja. Istorijski gledano, sadržaj holesterola u lipoproteinima, a posebno LDL-holesterola je prototipski marker koronarne arterijske bolesti. Sadržaj holesterola u lipoproteinima, služio je kao pogodni, mada neadekvatni surogat marker za kvantifikaciju koncentracije specifičnih lipoproteina. Kasnije je kod bolesnika sa familijarnom hiperholesterolemijom čije su koncentracije LDL-holesterola bile veće od 500 mg/dL i koji su imali infarkt i od njega umirali već u prvoj deceniji života, utvrđeno da su povišene koncentracije LDL-holesterola uzrok u patogenezi koronarne arterijske bolesti. LDL je bez svake sumnje smatran glavnim atrogenim proteinom, a redukcija LDL-holesterola davanjem statina smanjuje kardiovaskularna oboljenja kao što su AIM i moždani udar kako u primarnoj tako i u sekundarnoj prevenciji. Zbog toga sve nacionalne i internacionalne preporuke definišu LDL kao primarni lipidni faktor rizika i terapijski supstrat za terapiju statinima. Poznato je da je HDL jedna od glavnih klasa lipoproteina koja prenosi holesterol u krvi. Poznat je kao antiaterogena čestica čija je prva opisana funkcija učešće u reverznom transportu holesterola, a koja pokazuje i antioksidantnu i antiinflamatornu aktivnost.

Kliničari su zbog navedenih osobina uvek najviše pažnje obraćali na ova dva glavna lipidna faktora rizika. Međutim, ne treba zanemarivati ni trigliceride, koji iako su u negativnoj korelaciji sa nivoima HDL-holesterola, predstavljaju nezavisan faktor

rizika. Mnoge osobe sa hipertrigliceridemijom takođe imaju i male guste LDL čestice. Ove osobe takođe imaju povećane koncentracije non-HDL-holesterola, drugog markera kardiovaskularnog rizika. Osim njega, visoke vrednosti odnosa ukupan holesterol/HDL-holesterol LDL-/HDL-holesterol, i non-HDL-/HDL-holesterol takođe su povezane sa povećanim kardiovaskularnim rizikom. I mada je LDL-holesterol primarni fokus evaluacije rizika i terapije, treba imati u vidu i druge lipidne frakcije, kao što predlažu brojne preporuke. Međutim, ono što uvek ostaje kao otvoreno pitanje je da li kliničari mogu da koriste sve ove parametre u kliničkoj praksi, i da li evaluacija bolesnika može da se uradi na lakši način? Tu na scenu stupaju apolipoproteini, među njima svakako najeksploatisaniji apolipoprotein (apo) B koji odražava aterogene i apo AI koji odražava antiaterogene lipoproteine pokazali su se superiornijim u odnosu na konvencionalne lipide u predviđanju rizika i redukciji neželjenih događaja u studijama koje su ispitivale statine. Odnos apo B/apo AI koji reflektuje holesterolski balans loših i dobrih lipida, pokazao se mnogo boljim u odnosu na LDL i druge lipide kao marker rizika i terapijski cilj. ApoB je glavni apolipoprotein u svim potencijalno aterogenim česticama, kao što su VLDL, IDL, LDL čestice. Svaka čestica sadrži samo jedan apoB, pa se zbog toga smatra da nivoi apoB u plazmi reflektuju holesterolom i delimično trigliceridima bogate čestice. Čestica koja sadrži najviše apoB je mala gusta LDL čestica, koja čini 90% svih apoB-čestica. ApoAI je glavni protein HDL čestica, on je glavni inicijator i pokretač reverznog transporta holesterola. ApoAI pokazuje antiaterogene efekte; deluje antioksidantno i antiinflamatorno efekte, stimuliše endotelnu sintezu NO kao i oslobađanje prostaciklina iz endotela. Međutim novije studije ukazuju da apo AI može da bude oksidativno modifikovan i da doprinese aterogenim osobinama HDL koje do sada nisu bile poznate. Metode za određivanje apolipoproteina su davno standardizovane, pacijenti ne moraju da gladuju pre uzimanja krvi, visoke koncentracije triglicerida ne interferiraju, odnos apo B i apo AI identifikuje broj LDL čestica velike gustine, sumiraju rizik povezan sa neravnotežom aterogenih i antiaterogenih lipoproteina, dobar prediktor za kardiovaskularna oboljenja, predviđa ishod u studijama koje ispituju dejstvo statina itd.

Jedan od lipoproteina koji ni do danas nije izgubio na aktuelnosti je lipoprotein (a). Lp(a) čestica sadrži glikoproteinsku komponentu apo (a) koja je disulfidnom vezom vezana za apoB-100 na LDL česticama. Apo(a) je sastavljen od kringlova IV i V i inaktivnog proteaznog domena koji pokazuje veliku homologiju (75% do 98%) sa

plazminogenom. Kringl IV je sastavljen od 10 podtipova, od kojih su ponovci kringl IV-tip 2 veoma polimorfni i mogu se javiti u 2 do 43 kopije, dok je drugih 9 kringlova podtipa IV-2 prisutno samo u jednoj kopiji. Nivoi u plazmi su determinisani stepenom apo(a) u jetri, pri čemu se manje izoforme (sa manje ponovaka kringl IV-2) sekretuju brže od velikih izoformi što rezultira višom koncentracijom u plazmi. Broj ponovaka kringl IV-2 je umereno inverzno povezan sa koncentracijom Lp(a) u plazmi. Od sedamdesetih godina prošlog veka je poznato da su povišene koncentracije Lp(a) u plazmi nezavisni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti. Sličnost u strukturi Lp(a) i plazminogena vodilo je spekulacijama o ulozi Lp(a) u aterotrombotičnim oboljenjima zasnovanoj na dvojnjoj strukturi ovog lipoproteina. U ovom scenariju, LDL doprinosi proaterogenim osobinama ove čestice, dok apo(a) interferira sa fibrinolitičkom funkcijom plazminogena, inicirajući razlaganje tromba prisutnog u krvnom sudu. Mnoge studije su ukazale na protrombotičku ulogu Lp(a) koja se pripisuje komponenti apo(a). Međutim postoje brojne karakteristike kojima apo(a) doprinosi delovanju Lp(a), a koje su potpuno nezavisne od njegove sličnosti sa plazminogenom. One uključuju mogućnost apo(a)/Lp(a) da deluje na funkciju trombocita, na disfunkciju endotela, kao i na to da inhibira klirens hilomikronskih ostataka u transgenim mišijim modelima. Nedavno je otkrivena i potencijalna uloga Lp(a) u vezivanju oksidovanih fosfolipidnih adukta za jedan od kringl motiva apo(a). Veličina apo(a) izoformi dovodi se u vezu sa rizikom od kardiovaskularnih bolesti, nezavisno od koncentracije Lp(a) u plazmi (676–686).

### *Oksidovani LDL*

Primarni događaj u patogenezi ateroskleroze je akumulacija i dalja modifikacija LDL u subendotelnom matriksu. Da bi postale aterogene, native LDL čestice podležu modifikacijama, uključujući lipolizu, proteolizu, glikozilaciju ili agregaciju. Mnoge komponente u LDL česticama uključujući apoB, fosfolipide, holesterol i nezasićene amsne kiseline mogu da se oksiduju (687).

Hipoteza oksidativne modifikacije predlaže da je najznačajniji događaj u formiranju rane lezije oksidacija lipida, stavljajući oksLDL na centralno mesto u aterogenezi. Oksidovani LDL (oksLDL) ima značajnu ulogu u formiranju aterotrombotičnog plaka i progresiji ateroskleroze (688, 689). Nativni LDL se oksiduje u subendotelnom prostoru različitim reaktivnim vrstama superoksidom, MPO, 15-

lipooksigenazom i peroksinitritom (690). U zavisnosti od stepena oksidacije formiraju se minimalno modifikovani LDL (mm-LDL) ili potpuno modifikovani LDL. Mm-LDL koga nativni LDL-receptori još uvek prepoznaju stimuliše endotelne ćelije da produkuju ćelijske adhezione molekule kao što su ICAM-1, VCAM-1, E-selektin, MCP-1 i M-CSF (691, 692), rezultirajući adhezijom monocita za endotel i daljom dijapedezom u zid krvnog suda. Oslobođanjem M-CSF iz endotelnih ćelija, mmLDLs takođe favorizuje proliferaciju monocita i diferencijaciju u tkivne makrofage, kritičan korak koji bi mogao biti odgovoran za konverziju mmLDL u potpuno modifikovan oksLDL. Dalja oksidacija uključuje nekoliko enzima kao što su lipooksigenaze, MPO, sekretorna fosfolipaza i lipooksigenaze.

Međutim, nativni LDL receptori ne prepoznaju potpuno modifikovani LDL (negativnije naelektrisan u odnosu na nativni LDL i gubi afinitet za LDL receptor). Potpuno modifikovani LDL vezuje se za receptore „čistače“ -CD-36 i SR-A na makrofagama. Makrofage postaju bogate lipidima i smanjuje im se pokretljivost. Ovo rezultira formiranjem aktivirane penaste ćelije koja doprinosi stvaranju masnih pruga. Sledi progresija lezije sa migracijom glatkih mišićnih ćelija u intimu ili subendotelni prostor. Glatke mišićne ćelije prolifериšu i preuzimaju modifikovane lipoproteine koji doprinose procesu ateroskleroze (689). Potpuno oksidovani LDL se brzo uklanja iz plazme; preuzimaju ga ćelije retikuloendotelnog sistema, posebno Kupferove ćelije i sinusoidalne endotelne ćelije ili se uklanja postojećim cirkulišućim autoantitelima. (687, 693). Za razliku od njega minimalno modifikovani LDL ima duži poluživot, može se naći u cirkulaciji i preuzeti u arterijsku leziju doprinoseći daljoj progresiji ateroskleroze (687).

Povećanje oksLDL u plazmi zdravih osoba može biti povezano sa starosnom dobi, gojaznošću, hipertenzijom, hiperholesterolemijom, hipertrigliceridemijom, inflamacijom, dijabetes melitusom, hiperurikemijom, hiperhomociteinemijom, pušenjem, povećanim unosom alkohola, smanjenom fizičkom aktivnošću (694).

Proaterogena dejstva oksLDL uključuju brojna biološka dejstva i njihove posledice: oksLDL favorizuje formiranje penastih ćelija u subendotelnom prostoru (direktno preuzimanje holesterola receptorima „čistačima“ makrofaga-CD36 i SR-A koji nisu nishodno regulisani kada se sadržaj holesterola u ćelijama povećava); deluje hemotaktički na monocite i T-limfocite (povećanjem ekspresije MCP-1 i direktnim hemostatskim efektom), „zarobljavanjem „makrofaga u intimi (inhibicija pokretljivosti



makrofaga), vazokonstriktorni efekat (inhibicija oslobađanja ili funkcije NO), adhezija monocita za endotel (povećana ekspresija adhezionih molekula), ruptura plaka (povećano stvaranje MMP-1,-3,-9), proliferacija ćelija (indukcija faktora rasta), trombogeneza (stimulacija agregacije trombocita i povećanje tkivnog faktora), indukcija ćelijske smrti (indukcija Fas-posredovane apoptoze), indukcija proinflamatornih gena (aktivacija NF- $\kappa$ B, povećana antigenost indukcijom formiranja autoantitela) (695).

Oksidovani LDL se ne nalazi u normalnim arterijama ili ga ima u vrlo malim količinama u fibrotičnim ili lezijama koje su podlegle regresiji (696). Nalazi se u skoro svim tipovima lezija uključujući veoma rane lezije aorte fetusa čije su majke bile hiperholesterolemične tokom trudnoće čak pre nego što monociti uđu u zid krvnog suda, ukazujući da je oksidacija LDL uključena apriori u razvoj aterosklerotične lezije (697). Humane karotidne i koronarne arterije su značajno bogatije oksLDL, a nestabilan plak je prvenstveno bogat oksLDL (698,699). Kod životinja, OxLDL u plaku se smanjuje nakon regresione/antioksidantne dijeta (700–702), a kod ljudi nakon terapije statinima (703). Oksidovani LDL nije homogeni entitet, već podrazumeva višestruke hemijske i imunogene modifikacije lipida i apoB na LDL. Termin oksLDL koristi se u generičkom smislu da se opišu različiti tipovi oksLDL. Da bi mogli da se tumače i upoređuju rezultati dobijeni u različitim studijama treba imati u vidu koja su antitela korišćena za određivanje oksLDL (npr. OxLDL-E06 meri OxPL epitope na apoB koristeći mišija antitela E06) (704, 705).

Danas, postoje tri glavna ELISA testa za određivanje oxLDL i oni koriste različita mišija monoklonska antitela DLH3, 4E6 i E06 koja prepoznaju različite epitope oksLDL. Antitela DLH3 detektuju oksidovane fosfatidilholin epitope na LDL i koristi se izolovani LDL, što nije pogodno za rutinsko analiziranje (OxLDL-DLH3) (706). Antitelo 4E6 vezuje se za derivatizirani apoB kada je najmanje 60 Lys grupa modifikovano, ali vezuje i Cu oksLDL i malondialdehid-LDL (OxLDL-4E6). Oksidovani LDL-4E6 je dostupan komercijalno u istraživačke svrhe kao sendvič ELISA. U nekoliko studija utvrđena je dobra korelacija oksLDL- 4E6 i LDL-holesterola (707–710). Prirodno mišije antitelo E06 specifično se vezuje za fosforilholin grupu oksidovanog, ali ne i nativnih fosfolipida (704, 705, 711, 712) da bi se izmerio oksLDL-E06.

Jasno je da oksLDL može da posluži kao atraktivan biomarker koji bio povezao poremećaje lipoproteina i inflamaciju. Brojne studije su poslednjih godina, ispitivale

ulogu oksLDL u prekliničkoj aterosklerozi, endotelnoj disfunkciji, stabilnoj koronarnoj arterijskoj bolesti, AKS, PKI i odgovoru na statine. Samo nekoliko studija bavilo se prognostičkim značajem ovog markera u razvoju koronarne bolesti, progresiji zadebljanja karotidne intime-medije.

#### *Lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>*

Lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub> (LpPLA<sub>2</sub>) je član superfamilije fosfolipaza A<sub>2</sub>, enzima koji hidrolizuju fosfolipide (713). Opisane su dve izoforme ovog enzima, intracelularna i ekstracelularna (sekretorna) forma (714, 715). One se sintetišu uglavnom u monocitima, makrofagama, T-limfocitima, jetri i mastocitima (715–717). Lp-PLA<sub>2</sub> je 45-kDa protein sastavljen od 441 aa (718). Enzimi imaju kanoničnu terciarnu uvijenu strukturu i formiraju paralelne beta površine sa heliksnim konekcijama. Strukturno ovi enzimi su mnogo sličniji neutralnim lipazama i serin esterazama nego drugim članovima superfamilije fosfolipaza A<sub>2</sub> (719). Gen za Lp-PLA<sub>2</sub> (PLA2G7) sastoji se od 12 egzona i lociran je na hromozomu 6p21.2-12 (720, 721). Tri aa, Y205, W115 i L116, su ključne za vezivanje Lp-PLA<sub>2</sub> za LDL (722). Identifikovane su genetske varijante PLA2G7 i pokazano je da one utiču na aktivnost Lp-PLA<sub>2</sub>, ali njihov klinički značaj još uvek nije utvrđen (723–725). Aktivnost Lp-PLA<sub>2</sub> je povezana sa makrofagama i utvrđeno je da je ushodno regulisana u aterosklerotičnim lezijama, posebno u kompleksnim plakovima (726), kao i u fibroznoj kapi koronarne lezije sklone rupturi (727). Dok se Lp-PLA<sub>2</sub> vezuje za lipoproteine koji sadrže apolipoprotein (apo) B-100 (722), uključujući HDL, Lp(a) i ostatke lipoproteina, većina Lp-PLA<sub>2</sub> vezuje se za cirkulišući LDL (728). Nedavno je utvrđeno da su nosači za Lp-PLA<sub>2</sub> u humanoj plazmi i trombocitne mikročestice (729, 730). Lp-PLA<sub>2</sub> ima značajnu ulogu u aterosklerozi (731). Smatra se da je enzim povezan sa HDL protektivan za aterosklerozu, dok je Lp-PLA<sub>2</sub> vezan za LDL verovatno proaterogen. Zapravo, Lp-PLA<sub>2</sub> je inicijalno otkrivena kao faktor aktivacije trombocita acetil hidrolaza (PAF-AH), reflektujući njegovu antiaterogenu aktivnost: hidrolizu i inaktivaciju proinflamatornog fosfolipida PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfoholin) (da katalizuje degradaciju PAF) (732) i sprečavajući dalju oksidativnu modifikaciju LDL (718, 733, 734). Dodatno, frakcija Lp-PLA<sub>2</sub> udružena sa HDL može takođe da inhibira formiranje penastih ćelija i poveća efluks holesterola iz makrofaga.

S druge strane, Lp-PLA<sub>2</sub> može da doprinosi oksidaciji LDL (731, 735, 736). Oko 70% Lp-PLA<sub>2</sub> u krvi nalazi se na LDL. Međutim, oni se ne sekretuju zajedno već se po ulasku u cirkulaciju, Lp-PLA<sub>2</sub> vezuje za LDL preko karboksiterminalnog kraja apo B. LDL tako obezbeđuje cirkulišući rezervoar u kome Lp-PLA<sub>2</sub> ostaje neaktivna sve dok ne dođe do oksidativne modifikacije. Nakon oksidacije LDL u zidu arterije, kratka acil grupa na sn-2 poziciji fosfolipida podleže hidrolitičkom delovanju Lp-PLA<sub>2</sub> koja cepa oksidovani fosfatidil holin lipoproteinske čestice, stvarajući dva potentna proinflamatorna i proaterogena medijatora: lizofosfatidilholin i oksidovane masne kiseline. Od posebnog je značaja naglasiti da Lp-PLA<sub>2</sub> deluje samo na oksidativno modifikovani LDL i da hidroliza oksidovanog LDL može da se vrši isključivo sa Lp-PLA<sub>2</sub> (737, 738). Proinflamatorna delovanja lizofosfatidilholina, kao i oksidovanih masnih kiselina pokreću kaskadu događaja koji mogu direktno da utiču na aterogenezu. Lizofosfatidilholin stimuliše ekspresiju adhezivnih molekula, ushodno reguliše citokine i CD40L u T-ćelijama, citotoksičan je pri koncentracijama većim od 30–50 μmol/L, stimuliše proliferaciju makrofaga, stimuliše migraciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, hemoatraktant je za monocite, makrofage i T-ćelije, indukuje apoptozu u glatkim mišićnim ćelijama i makrofagama, potentni hemoatraktant za T-ćelije i monocite, stimuliše disfunkciju endotelnih ćelija, stimuliše proliferaciju makrofaga i indukuje apoptozu u glatkim mišićnim ćelijama, deluje na oslobađanje arahidonske kiseline iz endotelnih ćelija, uključen je u antigenost oksidovanog LDL, indukuje MCP-1 i gene za faktore rasta, inhibira stvaranje endotelnog NO (737, 739–741). Na ovaj način, dolazi do privlačenja monocita u intimu krvnog suda, gde oni diferenciraju u makrofage, a zatim i penaste ćelije dok se istovremeno lokalno produkuje više Lp-PLA<sub>2</sub>. Lizofosfatidil holin je citotoksičan za vaskularne glatke mišićne ćelije i može da indukuje lokalnu sintezu MMP, koje mogu da istanje fibroznu kapu i da destabilizuju ateromatozni plak, povećavajući njegovu sklonost ka rupturi (742, 743). Inflamatorne ćelije u aterosklerotičnom plaku dalje produkuju više Lp-PLA<sub>2</sub>, što rezultira ushodnom regulacijom Lp-PLA<sub>2</sub> i daljom progresijom ateroma (744). Lp-PLA<sub>2</sub> je raskrsnica metabolizma lipida i inflamatornog odgovora. Tako Lp-PLA<sub>2</sub> može predstavljati značajnu vezu između oksidativne modifikacije LDL u intimi arterijskog zida i inflamatornog procesa u aterosklerotičnom plaku.

Utvrđeno je da oksLDL stimuliše ekspresiju Lp-PLA<sub>2</sub> u monocitima. Ova ushodna regulacija je zbog oksidovanih fosfolipida (pravih supstrata Lp-PLA<sub>2</sub>), ali ne i

produkta hidrolize lizofosfatidil holina. OksLDL indukuje efekte preko PI3K i p38 MAPK puta. Koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> pokazuju konzistentne nivoe kod osoba i nasuprot CRP nisu pod uticajem sistemske infekcije ili inflamacije (745). Koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> mogu da se procenjuju kao enzimaska aktivnost ili kao merenje mase enzima i njihova korelacija je dobra. Utvrđeno je povećanje koncentracije sa godinama (746, 747), statistički veći nivoi kod žena u odnosu na muškarce (746, 747), rasno-etničke razlike (747).

Određivanje koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> predloženo je kao dopuna tradicionalnim faktorima rizika za predikciju kardiovaskularnog rizika kako kod zdravih osoba, tako za primarnu tako i za sekundarnu prevenciju. Iz dana u dan raste broj studija koje povezuju koncentraciju ovog parametra sa AKS i moždanim udarom.

## 2. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Određivanje vremenskog profila biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.
2. Utvrđivanje korelacije biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida sa demografskim karakteristikama, faktorima rizika i karakteristikama postinfarktne toka kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.
3. Određivanje prognostičkog značaja biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida u odnosu na smrtni ishod u bolnici i pojavu neželjenih kardiovaskularnih događaja u 30-dnevnom i jednogodišnjem praćenju kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.
4. Utvrđivanje faktorske strukture citokina, solubilnih citokinskih receptora, solubilnih adhezionih molekula i molekula funkcionalno povezanih sa citokinima i ispitivanje povezanosti dobijenih faktora i kratkoročne prognoze kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ispitivana populacija

U ispitivanje je bilo uključeno 300 bolesnika sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta lečenih primarnom PKI u Koronarnoj jedinici Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije. Primarna PKI je izvođena u Sali za kateterizaciju srca Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije. Laboratorijska dijagnostika bolesnika urađena je u Službi za urgentnu laboratorijsku dijagnostiku Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije.

U studiju je bilo uključeno 200 konsekutivnih bolesnika sa STEMI koji su lečeni pPKI. Od 200 bolesnika sa STEMI u statističku analizu uključeno je 189 bolesnika. Četiri bolesnika je „izgubljeno“ u praćenju, a za sedam bolesnika nije bilo dovoljno biološkog materijala za određivanje svih laboratorijskih biomarkera ili su u uzorcima biološkog materijala utvrđene interferencije („jaka“ hemoliza ili lipemija) koje bi značajno uticale na rezultate određivanja nekih biomarkera. Drugu grupu bolesnika činilo je 100 bolesnika sa prvim prednjim STEMI koji su uspešno lečeni pPKI (< 20% rezidualne stenoze i TIMI protok 3).

Kriterijumi za uključivanje bolesnika u ispitivanje bili su: prijem u Urgentni centar u prvih 12h od početka infarktne bola (za prvu grupu bolesnika) ili u prvih 6h (za drugu grupu bolesnika). EKG dijagnoza STEMI podrazumeva novonastalu elevaciju ST segmenta najmanje 1mm (0,1mV) u standardnim odvodima, i najmanje 2mm u najmanje dva susedna prekordijalna odvoda ili pojavu novonastalog bloka leve grane, kao i povišene vrednosti TnI.

Kriterijumi za neuključivanje bolesnika u ispitivanje bili su: operacija ili trauma u protekla 2 meseca, istorija febrilnih stanja, akutna ili hronična inflamacija pri prijemu, istorija autoimunih oboljenja sa ili bez imunosupresivne terapije, prethodni infarkt miokarda u proteklih 6 meseci, značajna krvarenja koja zahtevaju transfuziju tokom PKI ili neposredno nakon nje, prehodna renalna ili hepatična disfunkcija, malignitet, ili izostanak saglasnosti bolesnika da učestvuje u ispitivanju.

Pri prijemu u Urgentni centar bolesnicima je uzeta detaljna anamneza i urađen klinički pregled.

Anamnezom su uzeti:

a) demografski podaci (pol, starost, telesna visina i težina na osnovu kojih je izračunat indeks telesne mase),

b) podaci o prethodnoj koronarnoj bolesti (prehodna angina pektoris, prehodni infarkt miokarda, prehodna revaskularizacija miokarda (PKI ili CABG)),

c) podaci o faktorima rizika za koronarnu bolest (hipertenzija, dijabetes, pušenje, nasleđe, hipelipoproteinemija).

Hipertenzija je definisana kao vrednosti arterijskog krvnog pritiska  $\geq 140/90$  mmHg ili uzimanje antihipertenziva. Dijabetes mellitus definisan je kao glukoza na tašte  $\geq 7$  mmol/L ili uzimanje insulina ili oralnih antidijabetika. Hiperholesterolemija je dijagnostikovana merenjem koncentracije ukupnog holesterola i definisana cut-off  $\geq 5,2$  mmol/L ili uzimanjem statina i sl. Pacijenti su smatrani pušačima ukoliko su pušili  $\geq 1$  cigarete/dan u vreme prijema ili prethodnih 12 meseci.

d) podaci o prethodnoj medikamentnoj terapiji (ACE inhibitori ili blokatori AT-II receptora, diuretici, beta-blokatori, statini).

Kliničkim pregledom pri prijemu verifikovani su klinički parametri kao što su srčana insuficijencija označena Killip klasom, srčana frekvencija. U toku hospitalizacije praćena je pojava srčane insuficijencije označena Killip klasom, pojava srčanih aritmija (pretkomorskih i komorskih), kao i poremećaj provođenja (atrioventrikularni blok). Svim bolesnicima je slikan EKG.

Prema zakonskoj obavezi, svi bolesnici koji su imali indikaciju za pPKI dali su pismenu saglasnost za njeno izvođenje na standardnom formularu Klinike. Nakon toga bolesnici su dobijali preporučenu premedikaciju dvojnomo agregacionom terapijom (300 mg aspirina i 600 mg klopidogrela per os).

Analizirani su i parametri vezani za samu intervenciju, tj. pPKI:

a) Preproceduralni parametri–vreme od početka bola do pPKI;

b) Proceduralni parametri

Koronarografski nalaz uključivao je: broj obolelih koronarnih arterija sa značajnim suženjem (jedno-, dvo- ili trosudovna bolest), infarktnu arteriju (LAD, Cx, RCA), stenozu glavnog stabla leve koronarne arterije (LM), TIMI protok kroz infarktnu arteriju pre intervencije, vrstu implantiranog stenta, dužinu i dijametar stenta, upotrebu glikoprotein IIb/IIIa inhibitora;

c) Postproceduralni parametri–TIMI protok po postavljanju stenta.

Ehokardiografski pregled urađen je posle pPKI i uključivao je merenje end-dijastolne i end-sistolne dimenzije leve komore, dimenzije leve pretkomore i desne komore, kao i određivanje ukupne ejsione frakcije leve komore po Simpsonovoj metodi.

Terapija bolesnika po završenoj pPKI sastojala se iz dvojne ili trojne antiagregacione terapije koja je podrazumevala 100 mg aspirina/dan, 75 mg klopidogrela/dan i kod nekih bolesnika primenu blokatora glikoproteinskog IIb/IIIa receptora u kontinuiranoj i.v. infuziji sledeća 24h. Indikaciju za primenu blokatora glikoproteinskog IIb/IIIa receptora postavljao je interventni kardiolog i infuzija je započeta u toku pPKI. Bolesnici su u toku boravka u bolnici dobijali i ostalu terapiju koja se koristi u lečenju AIM i to  $\beta$ -blokatore, ACE inhibitore, blokatore AT-II receptora, statine, nitrate, antikoagulantnu terapiju. Odluku o primeni ove terapije donosio je ordinirajući lekar. Pojava komplikacija (aritmije, srčana insuficijencija, mehaničke komplikacije, rekurentna ishemija) tretirane su u skladu sa preporukama.

Kratkoročna prognoza je definisana kao smrtni ishod u bolnici (bolnički mortalitet), odnosno pojava NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, revaskularizacija ciljne lezije, moždani udar). Urađeno je jednogodišnje praćenje bolesnika tokom kog perioda je registrovana pojava novih NKVD (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, revaskularizacija ciljne lezije, moždani udar).



### 3.2. Uzorci biološkog materijala i laboratorijska određivanja

Po dolasku u bolnicu pre pPKI, a zatim 24h, 48h, 72h i 7. dana po završenoj intervenciji bolesnicima sa STEMI je uzeta krv za biohemijske analize. Bolesnicima sa prvim prednjim infarktombiohemijske analize su urađene pre pPKI, a zatim 4, 8, 12, 18, 24, 48, i 7 dana po završenoj pPKI. Analiziranje citokina, citokinskih receptora, faktora rasta, adhezionih molekula, sCD40L, i insulina urađeno je u 4 uzorka (pre PKI, nakon 24h, 48h i 7 dana), koncentracija Lp PLA<sub>2</sub> pre i posle pPKI, dok je HbA1c određen kod bolesnika samo na prijemu.

Za uzimanje biološkog materijala korišćeni su zatvoreni sistemi (Vacutainer tubes, BD Vacutainer Systems, Franklin Lakes, New Jersey).

U tabeli 1 je prikazan spisak parametara, vrsta biološkog materijala u kome je parameter određivan, kao i metod određivanja.

Tabela 1. Spisak parametara, vrsta biološkog materijala i metod određivanja parametara

Parametar	Biološki materijal	Metod
Hemoglobin	venska krv sa EDTA	spektrofotometrija
Hematokritna vrednost	venska krv sa EDTA	izračunavanje
Broj eritrocita	venska krv sa EDTA	Impedanca, VCS
Eritrocitni parametri	venska krv sa EDTA	
Srednji volumen eritrocita-MCV	venska krv sa EDTA	Impedanca, VCS
Srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu-MCH	venska krv sa EDTA	izračunavanje
Srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu-MCHC	venska krv sa EDTA	izračunavanje
Koeficijent varijacije distribucije volumena eritrocita-RDW	venska krv sa EDTA	izračunavanje
Broj trombocita	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Trombocitni parametri	venska krv sa EDTA	
Srednji volumen trombocita-MPV	venska krv sa EDTA	izračunavanje
Širina distribucije volumena	venska krv sa EDTA	izračunavanje

trombocita-PDW		
Leukociti	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Limfociti	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Mononuklearne ćelije	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Granulociti	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Eozinofili	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Bazofili	venska krv sa EDTA	impedanca, VCS
Glukoza	serum	GOD/PAP, enzimska sa heksokinazom
Urea	serum	ureaza/GLDH, kinetički
Kretinin	serum	IDMS
Mokraćna kiselina	serum	urikaza/peroksidaza
Ukupni proteini	serum	biuret
Albumin	serum	bromkrezol zeleno, brom krezol crveno
Ukupan bilirubin	serum	diazo sa sulfanilnom kiselinom
AST	serum	IFCC metod, Tris pufer, sa/bez PP
ALT	serum	IFCC metod, Tris pufer, sa/bez PP
CK	serum	enzimska, HK/G-6PDH
CK-MB	serum	enzimska imunoinhibicija
LDH	serum	enzimska, piruvat
ALP	serum	p-NPP, AMP pufer
GGT	serum	L- $\gamma$ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid
Natrijum	serum	jon-selektivna elektroda, indirektna IMT
Kalijum	serum	jon-selektivna elektroda, indirektna IMT
Gvožđe	serum	kolorimetrijsko sa deproteinizacije
TIBC	serum	Gvožđe + UIBC
Feritin	serum	imunoturbidimetrija

Holesterol	serum	holesterol-oksidaža
HDL-holesterol	serum	enzimska kolorimetrijska (CHE i CHO)
Trigliceridi	serum	lipaza/GK/GPO/POD
Apo AI	serum	imunoturbidimetrija
Apo B	serum	imunoturbidimetrija
Lp(a)	serum	imunoturbidimetrija
hsCRP	serum	imunoturbidimetrija
Troponin I	serum	CMIA
masa CKMB	serum	CMIA
Mioglobin	serum	CMIA
MPO	EDTA plazma	CMIA
BNP	EDTA plazma	CMIA
NT-proBNP	serum	ECLIA
PAPP-A	serum	ECLIA
Lp-PLA	EDTA plazma	imunoturbidimetrija
oksLDL	EDTA plazma	ELISA
CD40L	citratna plazma	ELISA
oksLDL	EDTA plazma	ELISA
Lp-PLA <sub>2</sub>	EDTA plazma	imunoturbidimetrija
MMP-9	serum	imunoodređivanje
IL-1 $\alpha$	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-1 $\beta$	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-2	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-3	serum	imunoodređivanje
IL-4	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-5	serum	imunoodređivanje
IL-6	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-7	serum	imunoodređivanje
IL-8	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL-10	EDTA plazma	imunoodređivanje
IL12 p70	serum	imunoodređivanje

IL-13	serum	imunoodređivanje
IL-15	serum	imunoodređivanje
IL-23	serum	imunoodređivanje
INF- $\gamma$	EDTA plazma	imunoodređivanje
MCP-1	EDTA plazma	imunoodređivanje
TNF- $\alpha$	EDTA plazma	imunoodređivanje
TNF- $\beta$	serum	imunoodređivanje
GM-CSF	serum	imunoodređivanje
MIP-1 $\alpha$	serum	imunoodređivanje
sIL-2R $\alpha$	serum	imunoodređivanje
sIL-6R	serum	imunoodređivanje
sTNFRI	serum	imunoodređivanje
sTNFRII	serum	imunoodređivanje
EGF	EDTA plazma	imunoodređivanje
VEGF	EDTA plazma	imunoodređivanje
P-selektin	EDTA plazma	imunoodređivanje
E-selektin	EDTA plazma	imunoodređivanje
L-selektin	EDTA plazma	imunoodređivanje
VCAM-1	EDTA plazma	imunoodređivanje
ICAM-1	EDTA plazma	imunoodređivanje

U tabeli 2 je prikazan spisak parametara, analizatori na kojima je određivanje izvršeno, kao i proizvođač/proizvođači komercijalnih reagenasa/analizatora.

Tabela 2. Spisak parametara, analizatori na kojima je izvršeno određivanje i proizvođač/proizvođači komercijalnih reagenasa/analizatora

Parametar	Analizator	Proizvođač testa/analizatora
Hemoglobin	HmX	Beckman-Coulter
Hematokritna vrednost	HmX	Beckman-Coulter
Broj eritrocita	HmX	Beckman-Coulter
Eritrocitni parametri	HmX	Beckman-Coulter

Srednji volumen eritrocita-MCV	HmX	Beckman-Coulter
Srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu-MCH	HmX	Beckman-Coulter
Srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu-MCHC	HmX	Beckman-Coulter
Koeficijent varijacije distribucije volumena eritrocita-RDW	HmX	Beckman-Coulter
Broj trombocita	HmX	Beckman-Coulter
Trombocitni parametri	HmX	Beckman-Coulter
Srednji volumen trombocita-MPV	HmX	Beckman-Coulter
Širina distribucije volumena trombocita-PDW	HmX	Beckman-Coulter
Leukociti	HmX	Beckman-Coulter
Limfociti	HmX	Beckman-Coulter
Mononuklearne ćelije	HmX	Beckman-Coulter
Granulociti	HmX	Beckman-Coulter
Eozinofili	HmX	Beckman-Coulter
Bazofili	HmX	Beckman-Coulter
Glukoza	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Urea	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Kretinin	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Mokraćna kiselina	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Ukupni proteini	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Albumin	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens
Ukupan bilirubin	Olympus AU400, Dimension RxL max	Olympus, Siemens

AST	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
ALT	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
CK	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
CK-MB	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
LDH	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
ALP	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
GGT	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
Natrijum	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
Kalijum	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
Gvožđe	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
TIBC	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
Feritin	Olympus AU400, Dimension R <sub>x</sub> L max	Olympus, Siemens
Holesterol	Cobas 6000	Roche
HDL-holesterol	Cobas 6000	Roche
Trigliceridi	Cobas 6000	Roche
Apo AI	Cobas 6000	Roche
Apo B	Cobas 6000	Roche
Lp(a)	Cobas 6000	Roche
hsCRP	Cobas 6000	Roche
Troponin I	Architect i2000	Abbott

masa CKMB	Architect i2000	Abbott
Mioglobin	Architect i2000	Abbott
MPO	Architect i2000	Abbott
BNP	Architect i2000	Abbott
NT-proBNP	Cobas 6000	Roche
PAPP-A	Cobas 6000	Roche
Lp-PLA	Cobas 6000	Roche
oksLDL	BNII	Behring
CD40L	BNII	Behring
oksLDL	BNII	Mercodia AB
Lp-PLA <sub>2</sub>	Cobas 6000	Diadexus/Roche
MMP-9	Evidence investigator	Randox
IL-1 $\alpha$	Evidence investigator	Randox
IL-1 $\beta$	Evidence investigator	Randox
IL-2	Evidence investigator	Randox
IL-3	Evidence investigator	Randox
IL-4	Evidence investigator	Randox
IL-5	Evidence investigator	Randox
IL-6	Evidence investigator	Randox
IL-7	Evidence investigator	Randox
IL-8	Evidence investigator	Randox
IL-10	Evidence investigator	Randox
IL12 p70	Evidence investigator	Randox
IL-13	Evidence investigator	Randox
IL-15	Evidence investigator	Randox
IL-23	Evidence investigator	Randox
INF- $\gamma$	Evidence investigator	Randox
MCP-1	Evidence investigator	Randox
TNF- $\alpha$	Evidence investigator	Randox
TNF- $\beta$	Evidence investigator	Randox
GM-CSF	Evidence investigator	Randox
MIP-1 $\alpha$	Evidence investigator	Randox

sIL-2R $\alpha$	Evidence investigator	Randox
sIL-6R	Evidence investigator	Randox
sTNFR1	Evidence investigator	Randox
sTNFR2	Evidence investigator	Randox
EGF	Evidence investigator	Randox
VEGF	Evidence investigator	Randox
P-selektin	Evidence investigator	Randox
E-selektin	Evidence investigator	Randox
L-selektin	Evidence investigator	Randox
VCAM-1	Evidence investigator	Randox
ICAM-1	Evidence investigator	Randox

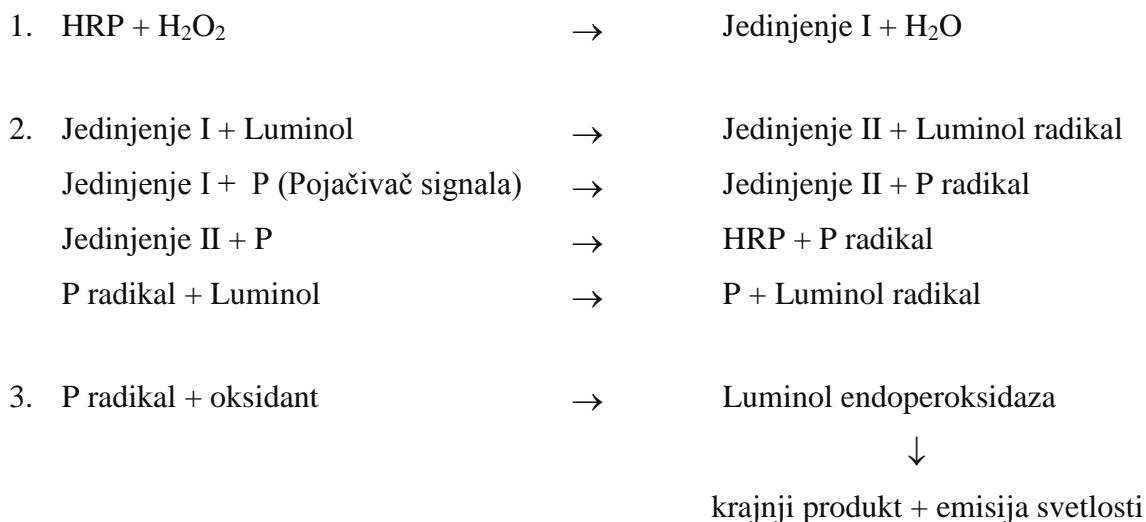
Koncentracija LDL-holesterola izračunata je korišćenjem Friedewaldove formule (748) za uzorke u kojima je koncentracija triglicerida  $<4,5$  mmol/L. U uzorcima u kojima je koncentracija triglicerida bili  $\geq 4,5$  mmol/L koncentracija LDL-holesterola određena je direktnom metodom. Kao indikator bubrežne funkcije korišćena je izračunata jačina glomerularne filtracije (eGFR) prema MDRD (Modification of Diet in Renal Disease study) formuli (749).

#### *Tehnologija biočipova*

Tehnologija biočipova („biochip array technology“) se koristi za istovremeno kvantitativno određivanje više analita iz jednog uzorka bolesnika. Određivanje se zasniva na hemiluminiscentnom imunoodređivanju. Osnova tehnologije je Randox-ov biočip veličine  $9 \text{ mm}^2$  koji sadrži imobilizovana antitela specifična za različite citokine, citokinske receptore, faktore rasta ili adhezione molekule u nizovima diskretnih test regiona. Po dodavanju uzorka bolesnika, analiti iz uzorka se vezuju za antitela na površini biočipa. Zatim se dodaju multianalit konjugati (antitela obeležena enzimom-peroksidazom rena) koja se vezuje za drugu funkcionalnu grupu analita. Po dodavanju signalnog reagensa (rastvor luminol/pojačivač i rastvor peroksida u odnosu 1:1), produkuje se svetlosni signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku bolesnika.



Mehanizam reakcije:



Svetlosni signal koji generiše svaki od ovih test regiona na biočipu se detektuje koristeći digitalnu tehnologiju snimanja (CCD kamera) i upoređuje se sa standardnom krivom. Koncentracija analita prisutnog u uzorku se računa iz sačuvane standardne krive. Za detekciju i kvantifikaciju svetlosnog signala, tj. kvantitativno određivanje različitih biomarkera korišćen je Randox-ov „banchtop“ analizator Evidence investigator<sup>TM</sup>.

Na jednom nosaču nalazi se devet biočipova u formatu 3x3, a pakovanja regenasa sadrže 6 biočipova. Omogućeno je određivanje nekoliko panela citokina, citokinskih receptora i faktora rasta, kao i adhezionih molekula. Za simultano određivanje više analita u 1 uzorku potrebno je samo 100 µL uzorka (25 uzorka µL za adhezione molekule). Uz svaku seriju određivanja, kao i za svaku kutiju reagensa potrebno je uraditi kalibraciju u 9 tačaka i odrediti koncentracije ispitivanih biomarkera u tri kontrolna uzorka.

Za određivanje koncentracije citokina, citokinskih receptora i faktora rasta u ovoj disertaciji korišćemo je četiri testa (četiri vrste čipova) i to Evidence investigator<sup>TM</sup> Cytokine & Growth Factors array (CTK) (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, EGF, IFN-γ, MCP-1, TNF-α, VEGF), Evidence investigator<sup>TM</sup> Cytokine Array III (IL-5, IL-15, GM-CSF, MIP-1α, TNF-β), Evidence investigator<sup>TM</sup> Cytokine Array IV (MMP-9, sIL-2Rα, sIL-6R, sTNFR1, sTNFR2) i Evidence investigator<sup>TM</sup> Cytokine Array V (IL-3, IL-7, IL-13, IL-12 p70, IL-23). Za određivanje koncentracije adhezionih

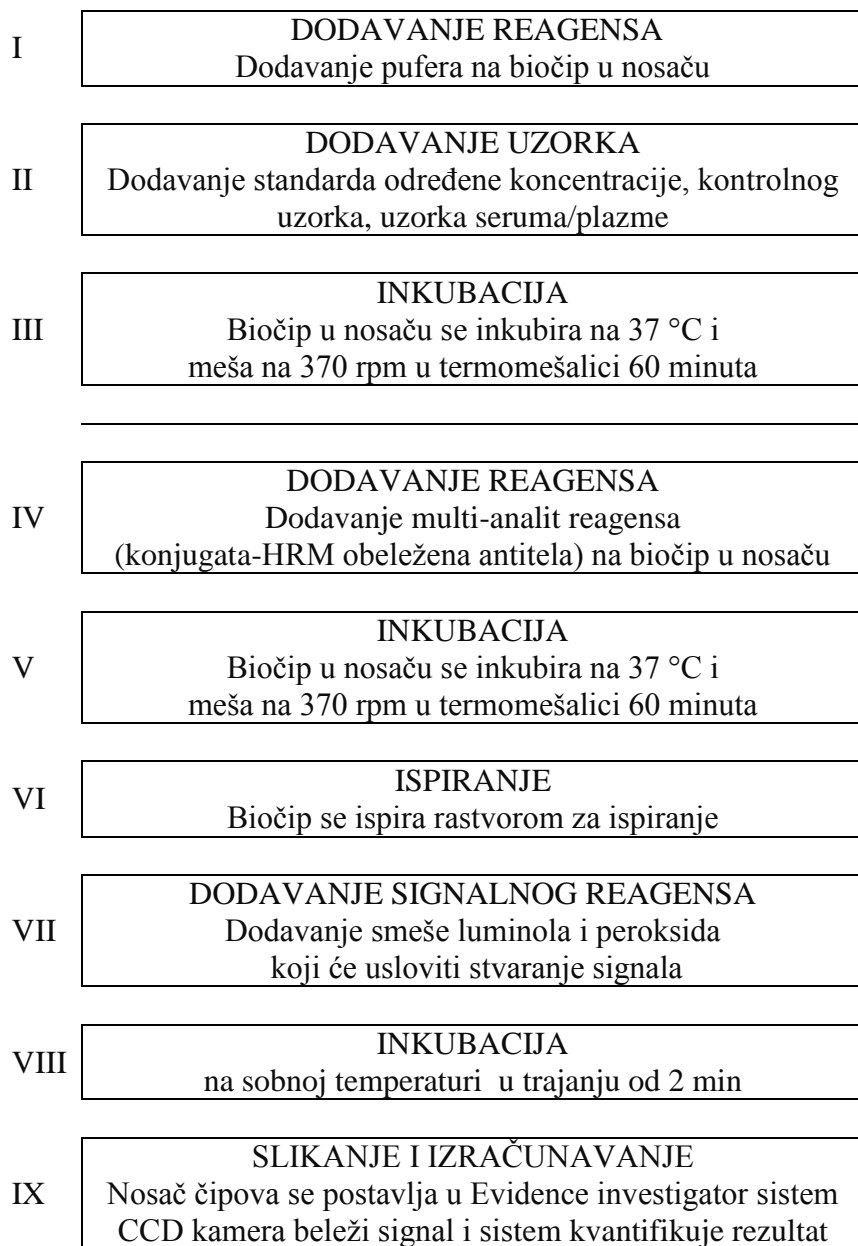
molekula korišćen je test Evidence investigator <sup>TM</sup> Adhesion molecules array (ADM) (E-, L-, P-selektin, sVCAM-1, sICAM-1).

Shematski prikaz postupaka za određivanje citokina, citokinskih receptora i faktora rasta koje sprovodi korisnik:

I	<b>DODAVANJE REAGENSA</b> Dodavanje pufera na biočip u nosaču
II	<b>DODAVANJE UZORKA</b> Dodavanje standarda određene koncentracije, kontrolnog uzorka, uzorka seruma/plazme
III	<b>INKUBACIJA</b> Biočip u nosaču se inkubira na 37 °C i meša na 370 rpm u termomešalici 60 minuta
IV	<b>ISPIRANJE</b> Biočip se ispira rastvorom za ispiranje
V	<b>DODAVANJE REAGENSA</b> Dodavanje multi-analit reagensa (konjugata-HRM obeležena antitela) na biočip u nosaču
VI	<b>INKUBACIJA</b> Biočip u nosaču se inkubira na 37 °C i meša na 370 rpm u termomešalici 60 minuta
VII	<b>ISPIRANJE</b> Biočip se ispira rastvorom za ispiranje
VIII	<b>DODAVANJE SIGNALNOG REAGENSA</b> Dodavanje smeše luminola i peroksida koji će usloviti stvaranje signala
IX	<b>INKUBACIJA</b> na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 min
X	<b>SLIKANJE I IZRAČUNAVANJE</b> Nosač čipova se postavlja u Evidence investigator sistem CCD kamera beleži signal i sistem kvantifikuje rezultat

Slika 1. Shematski prikaz postupaka za određivanje citokina, citokinskih receptora i faktora rasta

Shematski prikaz postupaka za određivanje adhezionih molekula koje sprovodi korisnik (slika 2):



Slika 2. Shematski prikaz postupaka za određivanje adhezionih molekula

### 3.3. Statistička analiza

Normalnost raspodele numeričkih obeležja testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. Deskripcija numeričkih obeležja sa normalnom raspodelom urađena je metodama deskriptivne statistike i to aritmetičkom sredinom od srednjih vrednosti, a od mera varijabiliteta standardnom devijacijom i rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Numeričke varijable koje nisu imale normalnu raspodelu prikazane su kao medijana i interkvartilni opseg (25-ti i 75-ti percentil). Atributivne varijable merene nominalnom skalom merenja prikazane su kao relativni (procenat) brojevi. U zavisnosti od toga da li su podaci normalno distribuirani ili ne za poređenje između dve grupe podataka korišćeni su Student-ov t-test, odnosno Mann-Whitney U-test. Poređenje kategorijalnih varijabli između grupa urađeno je Pearsonovim  $\chi^2$  testom. S obzirom na eksperimentalni dizajn studije koji podrazumeva ponovljena merenja biomarkera, kod poređenja numeričkih obeležja (koja nisu imala normalnu raspodelu) između dve grupe podataka korišćen je Wilcoxon-ov test ekvivalentnih parova, a za više od dve grupe podataka korišćena je neparametarska analiza varijanse jednog faktora varijabiliteta-Fridman-ov test. Korelacija između ispitivanih varijabli urađeno je Pearson-ovom korelacijom za normalno distribuirane varijable i Spearman-ovom korelacijom za varijable koje nisu normalno distribuirane.

Regresioni modeli su korišćeni za ispitivanje odnosa nezavisnih varijabli u odnosu na definisane ishode. U analize su bili uključeni logistički regresioni model i Cox-ov regresioni model.

Na početku ispitivanja korišćena je univarijantna logistička regresiona analiza (enter model) za izdvajanje varijabli koje su statistički značajno povezane sa ishodom. Zatim su varijable koje su bile statistički značajno povezane sa ispitivanim ishodom ( $P < 0,05$ ) bile uključene u multivarijantnu logističku regresionu analizu, sa „korak po korak („stepwise“) formiranjem završnog modela. U prikazu rezultata univarijantne i multivarijantne regresione analize navedeni su unakrsni odnos šansi-OR (skraćenica od engleskog naziva „odds ratio“) ili OR za promenu jedne standardne devijacije ispitivane varijable, i njegov 95% interval poverenja (CI) (skraćenica od engleskog naziva „confidence interval“) i verovatnoća (P).

Za identifikaciju nezavisnih prediktora za pojavu ispitivanih ishoda u toku jednogodišnjeg praćenja korišćen je Cox-ov proporcionalni hazardni model (univarijantni i multivarijantni), po principu »korak po korak« („stepwise“) do formiranja završnog multivarijantnog modela. U prikazu rezultata navedeni su koeficijent rizika-HR (po engleskom nazivu „hazard ratio“), 95% interval poverenja (CI) i verovatnoća (P).

Za analizu vremenskog intervala do pojave ispitivanog ishoda korišćena je Kaplan-Meier-ova ocena funkcije preživljavanja. Poređenje pojave NKVD ispitivanih grupa urađeno je Log-rank testom.

Analiza ROC (Receiver Operating Characteristics) krive korišćena je za određivanje granične vrednosti (engl. „cut-off“) biomarkera za predikciju ispitivanog ishoda. Takođe su izračunate i upoređene površine ispod kriva čija je mera c-statistika. DeLongh algoritam je korišćen za određivanje statističke značajnosti.

Za redukciju broja varijabli odnosno dimenzija prostora, urađena je eksploratorna faktorska analiza pri čemu je kao metod korišćena analiza glavnih komponentata i ortogonalna „varimax“ rotacija sa Kaiser-ovom normalizacijom. Odluka o broju faktora za ekstrakciju doneta je na osnovu Kaiserov-og kriterijuma (kriterijum latentnog korena), kriterijuma procenta varijanse i Cattell-ovog dijagrama (kriterijuma skri testa). Izračunate su varijanse zajedničkih faktora, komunaliteti varijabli, matrica faktorske strukture i faktorski rezultati. Za kvantifikovanje stepena interkorelacija među varijablama i podesnosti faktorske analize određena je mera adekvatnosti uzorkovanja (MSA). Primenom Bartletovog testa sferičnosti testirana je nulta hipoteza da je matrica interkorelacija varijabli uključenih u proceduru matrica identiteta. Faktorska opterećenja nakon rotacije veća od 0,5 smatrana su značajnim.

Dobijeni podaci su obrađeni i prikazani tabelarno i grafički. Nivo verovatnoće (P) manji ili jednak 0,05 ukazivao je na odbacivanje odgovarajuće nulte hipoteze, tj. postojanje statistički značajne razlike. Za statističku analizu korišćeni su sledeći statistički programi: SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SAD) for Windows ver.20.0, Power Analysis and Sample Size Software (PASS, NCSS, SAD) i MedCalc (MedCalc Inc, Mariakerke, Belgija).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitivanih bolesnika sa STEMI lečenih pPKI

U tabeli 3 su prikazane demografske karakteristike i faktori rizika u grupi bolesnika sa STEMI.

Tabela 3. Demografske karakteristike i faktori rizika ispitivane grupe bolesnika sa STEMI

Starost (godine)	58,31 ± 10,06
Muški pol (%)	70,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,05 ± 3,79
Hipertenzija (%)	65,1
Diabetes mellitus (%)	16,1
Pušenje (%)	67,6
Hiperholesterolemija (%)	42,0
Nasleđe (%)	27,8

BMI-indeks telesne mase

U tabeli 4 su prikazane prethodne bolesti/intervencije ispitivane grupe bolesnika sa STEMI.

Tabela 4. Prethodne bolesti/intervencije ispitivane grupe bolesnika sa STEMI

AIM (%)	7,5
PKI (%)	0,5
Moždani udar (%)	5,4

AIM-akutni infarkt miokarda, PKI-perkutana koronarna intervencija

U tabeli 5 su prikazane kliničke karakterisitike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI pri prijemu.

Tabela 5. Kliničke karakteristike bolesnika sa STEMI pri prijemu

Vreme od početka bola (h)	2,6 (1,6–4,5)
Killip klasa >1 na prijemu (%)	8,5
Prednji AIM (%)	35,1
SAP (mm Hg)	135,94 ± 27,33
DAP (mm Hg)	84,80 ± 19,65
Srčana frekvencija (otkucaj/min)	76,81 ± 17,52

AIM-akutni infarkt miokarda, SAP-sistolni arterijski pritisak, DAP-dijastolni arterijski pritisak

U tabeli 6 su prikazane vrednosti hematoloških parametara kod bolesnika sa STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 6. Vrednosti hematoloških parametara kod bolesnika sa STEMI

Hemoglobin (g/L)	145,85 ± 15,95
Hematokritna vrednost	0,42 ± 0,04
Broj eritrocita ( $\times 10^{12}/L$ )	4,60 ± 0,55
Eritrocitni parametri	
MCV (fL)	91,97 ± 3,70
MCH (pg)	31,35 ± 1,89
MCHC (g/L)	347,07 ± 12,91
RDW (%)	13,0 (12,80–14,00)
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	246,00 (210,00–296,00)
Trombocitni parametri	
MPV (fL)	8,56 ± 1,83
PDW	16,79 ± 0,73
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	11,35 ± 2,87
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	2,26 (1,44–3,70)
Mononuklearne ćelije ( $\times 10^9/L$ )	0,49 (0,28–0,70)
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	7,39 ± 2,73

Eozinofili ( $\times 10^9/L$ )	0,20 (0,10–0,30)
Bazofili ( $\times 10^9/L$ )	0,05 (0,00–0,10)

MCV- srednji volumen eritrocita, MCH-srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC-srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu, RDW- koeficijent varijacije distribucije volumena eritrocita, MPV-srednji volumen trombocita, PDW-širina distribucije volumena trombocita

U tabeli 7 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 7. Vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa STEMI

Glukoza (mmol/L)	8,98 $\pm$ 4,40
Urea (mmol/L)	5,98 $\pm$ 1,77
Kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	98,09 $\pm$ 25,77
eGFR (mL/min)	69,79 $\pm$ 14,85
Mokraćna kiselina ( $\mu\text{mol/L}$ )	319,90 $\pm$ 91,62
Ukupni proteini (g/L)	67,15 $\pm$ 8,13
Albumin (g/L)	45,43 $\pm$ 7,26
Fibrinogen (g/L)	3,95 (3,40–4,48)
Ukupan bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	10,10 $\pm$ 2,31
AST (U/L)	26,00 (20,00–41,50)
ALT (U/L)	24,00 (18,00–39,50)
CK (U/L)	154,00 (93,00–585,00)
CK-MB (U/L)	4,00 (1,90–9,60)
LDH (U/L)	393,50 (306,75–468,50)
ALP (U/L)	101,08 $\pm$ 16,89
GGT (U/L)	26,00 (16,00–43,00)
Natrijum (mmol/L)	139,85 $\pm$ 3,11
Kalijum (mmol/L)	4,23 $\pm$ 0,44
Gvožđe ( $\mu\text{mol/L}$ )	16,30 $\pm$ 3,71
TIBC ( $\mu\text{mol/L}$ )	64,6 $\pm$ 8,89



Feritin (µg/L)	93,3 (47,0–107,5)
Holesterol (mmol/L)	6,03 ± 1,49
HDL-holesterol (mmol/L)	1,24 ± 0,45
LDL-holesterol (mmol/L)	4,00 ± 1,34
Trigliceridi (mmol/L)	1,63 (1,18–2,40)
Apo AI (g/L)	1,54 ± 0,30
Apo B (g/L)	1,04 ± 0,34
Lp(a) (mg/L)	220,00 (210,00–440,00)
HbA1c (%)	6,20 (5,50–6,45)
Insulin (µIU/L)	11,29 (7,38–21,79)

eGFR-jačina glomerularne filtracije, AST-aspartat aminotransferaza, ALT-alanin aminotransferaza, CK-kreatin kinaza, CK-MB izoenzim kreatin kinaze, LDH-laktat dehidrogenaza, ALP-alkalna fosfataza, GGT-γ-glutamil transferaza, TIBC-ukupan kapacitet vezivanja gvožđa, HDL-lipoproteini velike gustine, LDL-lipoproteini male gustine, Apo-apolipoprotein, Lp-lipoprotein, HbA1c-glikozilirani hemoglobin

U tabeli 8 su prikazane vrednosti markera nekroze, vulnerabilnosti plaka i tromboze, hemodinamskog stresa, markera dislipidemije i modifikacije lipida kod bolesnika sa STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 8. Vrednosti markera nekroze, vulnerabilnosti plaka i tromboze, hemodinamskog stresa, markera dislipidemije i modifikacije lipida kod bolesnika sa STEMI

TnI (µg/L)	0,16 (0,08–1,43)
CK-MB (µg/L)	4,80 (2,10–13,75)
Mioglobin (µg/L)	616,00 (496,50–1437,50)
hsCRP (mg/L)	6,55 (2,80–9,57)
MPO (pmol/L)	746,00 (320,00–2086,00)
PAPP-A (mU/L)	11,83 (10,82–14,88)
CD40L (ng/mL)	3,97 ± 1,19
BNP (pg/mL)	114,25 (43,58–201,25)
NT-proBNP (pg/mL)	232,95 (113,25–504,60)

oksLDL (U/L)	73,68 ± 27,04
--------------	---------------

TnI-troponin I, CK-MB-izoenzim kreatin kinase, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osjetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, PAPP-A-protein udružen sa trudnoćom, L-ligand, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, oks-oksidovani

U tabeli 9 su prikazane ehokardiografske karakterisitike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI.

Tabela 9. Ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI

LP (mm)	37,61 ± 7,28
LK EDD (mm)	53,45 ± 6,65
LK ESD (mm)	38,38 ± 6,50
LKEF (%)	47,28 ± 9,86
Mitralna regurgitacija (ne/1+/2+/3+)	19/54/22,6/4,2

LP-leva pretkomora, LK EDD-dijastolna dimenzija leve komore, LK ESD-sistolna dimenzija leve komore, EF-ejekciona frakcija leve komore

U tabeli 10 su prikazane angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI.

Tabela 10. Angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI

Infarkt na arterija (%)	
LAD (%)	39,2
RCA (%)	40,6
Cx (%)	19,6
Jednosudovna koronarna bolest (%)	21,1
Dvosudovna koronarna bolest (%)	23,7
Trosudovna koronarna bolest (%)	26,3
TIMI 0 pre intervencije (%)	83,5

LAD-leva prednja silazna koronarna arterija, RCA-desna koronarna arterija, Cx-leva cirkufleksna koronarna arterija, TIMI- trombolize u infarktu miokarda

U tabeli 11 su prikazane proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Tabela 11. Proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI

Broj implantiranih stentova	1 (1–2)
Metalni stent (%)	94,2
Stent sa oslobađanjem leka (%)	5,8
Maksimalna širina stenta (mm)	3,5 (3,0–3,5)
Maksimalna dužina stenta (mm)	20 (18–23)
Disekcija koronarke (%)	3,2
Finalni protok TIMI 3 (%)	88,9

TIMI- trombolize u infarktu miokarda

U tabeli 12 je prikazana terapija koju su bolesnici dobijali tokom hospitalizacije.

Tabela 12. Primenjena terapija kod bolesnika sa STEMI u toku hospitalizacije

NFH/NMH (%)	93,6
ACE inhibitori/ARB (%)	76,2
Diuretici (%)	24,9
Statini (%)	92,1
β-blokatori (%)	90,5

NFH-nefrakcionisani heparin, NMH-niskomolekularni heparin, ACE-angiotenzin konvertujući enzim, ARB-antagonisti AT-II receptora

U tabeli 13 su prikazane intrahospitalne komplikacije kod bolesnika sa STEMI.

Tabela 13. Intrahospitalne komplikacije kod bolesnika sa STEMI

Aritmije	
AV blok III stepena (%)	4,5
VT/VF (%)	14,7
Atrijalna fibrilacija (%)	4,8
Srčana insuficijencija	
Kilip klasa>1	20,8
Smrtni ishod (%)	5,8

AV-atrioventrikularni, VT-komorska tahikardija, VF-komorska fibrilacija

U tabeli 14 prikazani su neželjeni kardiovaskularni događaji kod bolesnika sa STEMI u prvih 30 dana nakon infarkta.

Tabela 14. Neželjeni kardiovaskularni događaji kod bolesnika sa STEMI u prvih 30 dana nakon infarkta

Smrtni ishod (%)	5,8
Reinfarkt (%)	1,6
Moždani udar (%)	0,0
Revaskularizacija ciljne lezije (%)	7,9
NKVD (%)	15,8

NKVD-neželjeni kardiovaskularni događaji

U tabeli 15 prikazani su neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa STEMI u toku jednogodišnjeg praćenja.

Tabela 15. Neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa STEMI u toku jednogodišnjeg praćenja

Smrtni ishod (%)	1,0
Reinfarkt (%)	2,7
Moždani udar (%)	0,5
Revaskularizacija ciljne lezije (%)	7,9
NKVD (%)	10,6

NKVD-neželjeni kardiovaskularni događaji

## 4.2. Karakteristike ispitivanih bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI

U tabeli 16 su prikazane demografske karakteristike i faktori rizika u grupi bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Tabela 16. Demografske karakteristike i faktori rizika ispitivane grupe bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Starost (godine)	60,36 ± 11,99
Muški pol (%)	68,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,68 ± 3,31
Hipertenzija (%)	77,2
Diabetes mellitus (%)	22,8
Pušenje (%)	37,2
Hiperholesterolemija (%)	55,1
Nasleđe (%)	30,8

BMI-indeks telesne mase

U tabeli 17 su prikazane kliničke karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu.

Tabela 17. Kliničke karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu

Vreme od početka bola (h)	2 (2–4)
Killip klasa >1 na prijemu (%)	27,1
Prednji AIM (%)	100,0
SAP (mm Hg)	137,37 ± 24,83
DAP (mm Hg)	84,47 ± 15,41
Srčana frekvencija (otkucaj/min)	82,16 ± 16,42

AIM-akutni infarkt miokarda, SAP-sistolni arterijski pritisak, DAP-dijastolni arterijski pritisak

U tabeli 18 su prikazane vrednosti hematoloških parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 18. Vrednosti hematoloških parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Hemoglobin (g/L)	143,74 ± 14,46
Hematokritna vrednost	0,43 ± 0,04
Broj eritrocita (x10 <sup>12</sup> /L)	4,67 ± 0,50
Eritrocitni parametri	
MCV (fL)	93,08 ± 3,82
MCH (pg)	30,83 ± 1,58
MCHC (g/L)	331,47 ± 8,04
RDW (%)	13,04 ± 0,95
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	222,00 (190,00–252,50)
Trombocitni parametri	
MPV (fL)	8,45 ± 1,01
PDW	16,49 ± 0,59
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	12,44 ± 3,69
Limfociti (x10 <sup>9</sup> /L)	1,70 (1,25–2,30)
Mononuklearne ćelije (x10 <sup>9</sup> /L)	0,60 (0,50–0,80)
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	9,81 ± 3,32
Eozinofili (x10 <sup>9</sup> /L)	0,10 (0,00–0,10)
Bazofili (x10 <sup>9</sup> /L)	0,10 (0,00–0,10)

MCV- srednji volumen eritrocita, MCH-srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu, MCHC-srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu, RDW- koeficijent varijacije distribucije volumena eritrocita, MPV-srednji volumen trombocita, PDW-širina distribucije volumena trombocita

U tabeli 19 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 19. Vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Glukoza (mmol/L)	8,91 ± 3,18
Urea (mmol/L)	6,44 ± 2,27
Kreatinin (μmol/L)	83,24 ± 25,06
eGFR (mL/min)	88,53 ± 27,89
Mokraćna kiselina (μmol/L)	288,93 ± 77,28
Ukupni proteini (g/L)	71,33 ± 6,25
Albumin (g/L)	42,63 ± 5,17
Fibrinogen (g/L)	3,80 (3,20–4,60)
Ukupan bilirubin (μmol/L)	9,43 ± 4,95
AST (U/L)	35,00 (24,00–64,00)
ALT (U/L)	27,00 (17,00–46,00)
CK (U/L)	229,00 (131,00–523,00)
CK-MB (U/L)	35,00 (22,00–66,00)
LDH (U/L)	476,00 (394,00–736,25)
ALP (U/L)	71,73 ± 20,15
GGT (U/L)	22,00 (15,00–35,00)
Natrijum (mmol/L)	138,39 ± 3,27
Kalijum (mmol/L)	4,18 ± 0,57
Gvožđe (μmol/L)	13,13 ± 6,61
TIBC (μmol/L)	56,16 ± 10,94
Feritin (μg/L)	163,96 ± 109,80
Holesterol (mmol/L)	6,15 ± 1,18
HDL-holesterol (mmol/L)	1,19 ± 0,39
LDL-holesterol (mmol/L)	4,08 ± 1,06
Trigliceridi (mmol/L)	1,53 (1,12–2,22)
Apo AI (g/L)	1,44 ± 0,26
Apo B (g/L)	1,13 ± 0,28
Lp(a) (mg/L)	174,00 (61,00–426,00)

HbA1c (%)	5,75 (5,40–6,20)
HbA1c (mmol/mol)	39,50 (36,00–44,00)
Insulin (μIU/L)	10,66 (7,24–21,35)

eGFR-jačina glomerularne filtracije, AST-aspartat aminotransferaza, ALT-alanin aminotransferaza, CK-kreatin kinaza, CK-MB-izoenzim kreatin kinaze, LDH-laktat dehidrogenaza, ALP-alkalna fosfataza, GGT-γ-glutamil transferaza, TIBC-ukupan kapacitet vezivanja gvožđa, HDL-lipoproteini velike gustine, LDL-lipoproteini male gustine, Apo-apolipoprotein, Lp-lipoprotein, HbA1c-glikozilirani hemoglobin

U tabeli 20 su prikazane vrednosti markera nekroze, vulnerabilnosti plaka i tromboze, hemodinamskog stresa, markera dislipidemije i modifikacije lipida kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 20. Vrednosti markera nekroze, vulnerabilnosti plaka i tromboze, hemodinamskog stresa, markera dislipidemije i modifikacije lipida kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

TnI (μg/L)	0,61 (0,11–4,71)
CK-MB (μg/L)	8,70 (3,80–37,10)
Mioglobin (μg/L)	459,70 (173,80–1326,70)
hsCRP (mg/L)	3,31 (1,40–8,35)
MPO (pmol/L)	301,35 (192,36–579,12)
PAPP-A (mU/L)	12,47 (11,00–16,56)
CD40L (ng/mL)	4,45 ± 0,87
BNP (pg/mL)	320,04 (158,76–487,62)
NT-proBNP (pg/mL)	276,25 (126,30–825,05)
Lp PLA <sub>2</sub> (ng/mL)	413,94 ± 112,61
oksLDL (U/L)	96,39 ± 21,02
MMP-9 (ng/mL)	213,26 ± 154,85

TnI-troponin I, CK-MB- izoenzim kreatin kinaze, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, PAPP-A-protein udružen sa trudnoćom, L-ligand, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, oks-oksidovani, MMP-matriks metaloproteinaza



U tabeli 21 su prikazane vrednosti citokina, citokinskih receptora i faktora rasta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 21. Vrednosti citokina, citokinskih receptora i faktora rasta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	0,79 $\pm$ 0,23
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	2,84 $\pm$ 2,73
IL-2 (pg/mL)	6,02 (5,52–7,25)
IL-3 (pg/mL)	8,15 (7,71–13,67)
IL-4 (pg/mL)	4,55 $\pm$ 0,73
IL-5 (pg/mL)	6,68 (3,17–23,97)
IL-6 (pg/mL)	6,01 (3,25–12,55)
IL-7 (pg/mL)	2,76 (1,57–6,30)
IL-8 (pg/mL)	6,18 (5,11–9,14)
IL-10 (pg/mL)	3,64 (1,36–7,75)
IL-12 p70 (pg/mL)	10,95 $\pm$ 11,52
IL-13 (pg/mL)	9,52 $\pm$ 14,14
IL-15 (pg/mL)	0,77 (0,56–1,05)
IL-23 (pg/mL)	0,00 (0,00–0,00)
sIL-2R $\alpha$ (ng/mL)	0,13 (0,10–0,17)
sIL-6R (ng/mL)	1,63 $\pm$ 0,83
sTNFR1 (ng/mL)	0,53 (0,35–0,73)
sTNFR2 (ng/mL)	0,67 $\pm$ 0,50
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	4,27 $\pm$ 2,66
TNF- $\beta$ (pg/mL)	3,39 $\pm$ 2,41
INF- $\gamma$ (pg/mL)	3,65 $\pm$ 1,20
MCP-1 (pg/mL)	215,18 (153,60–307,95)
MIP-1 $\alpha$ (pg/mL)	8,08 (5,57–12,49)
GM-CSF (pg/mL)	2,66 $\pm$ 1,24

EGF (pg/mL)	6,00 ± 4,49
VEGF (pg/mL)	56,72 ± 41,45

IL-interleukin, s-solubilni (rastvorljivi), R-receptor, TNF-faktor nekroze tumora, INF-interferon, MCP-protein-1 koji privlači monocite, MIP-makrofagni inflamatorni protein-1 $\alpha$ , GM-CSF- faktor stimulacije kolonija makrofaga, EGF-epidermalni faktor rasta, VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

U tabeli 22 su prikazane vrednosti solubilnih adhezionih molekula kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u bolnicu.

Tabela 22. Vrednosti solubilnih adhezionih molekula kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

sP-selektin (ng/mL)	164,32 (127,13–216,59)
sE-selektin (ng/mL)	29,54 ± 14,02
sL-selektin (ng/mL)	2649,07 ± 890,47
sVCAM-1 (ng/mL)	1290,70 ± 457,28
sICAM-1(ng/mL)	438,43 ± 165,30

s-solubilni (rastvorljivi), VCAM-vaskularne ćelijske adhezione molekule, ICAM-intercelularne adhezione molekule.

U tabeli 23 su prikazane ehokardiografske karakterisitike ispitivane grupe bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Tabela 23. Ehokardiografske karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI

LP (mm)	3,65 ± 0,51
LK EDD (mm)	5,24 ± 0,57
LK ESD (mm)	3,80 ± 0,64
LKEF (%)	46,65 ± 12,11

LP-leva pretkomora, LK EDD-dijastolna dimenzija leve komore, LK ESD-sistolna dimenzija leve komore, EF-ejekciona frakcija leve komore.

U tabeli 24 su prikazane angiografske karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Tabela 24. Angiografske karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Infarktna arterija (%)	
LAD (%)	100,0
Jednosudovna koronarna bolest (%)	44,9
Dvosudovna koronarna bolest (%)	30,8
Trosudovna koronarna bolest (%)	24,4

LAD-leva prednja silazna koronarna arterija

U tabeli 25 su prikazane proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Tabela 25. Proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Broj implantiranih stentova	1 (1–2)
Metalni stent (%)	95
Stent sa oslobađanjem leka (%)	5
Maksimalna širina stenta (mm)	3 (3–3,5)
Maksimalna dužina stenta (mm)	23 (18–38)
Disekcija koronarke (%)	4,3
Finalni protok TIMI 3 (%)	100

TIMI- trombolize u infarktu miokarda

U tabeli 26 je prikazana terapija koju su bolesnici sa prvim prednjim STEMI dobijali tokom hospitalizacije

Tabela 26. Primenjena terapija kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u toku hospitalizacije

NFH/NMH (%)	98,7
ACE inhibitori/ARB (%)	85,9
Diuretici (%)	29,5
Statini (%)	96,2
$\beta$ -blokatori (%)	89,7
GpIIb/IIIa antagonisti	32,1

NFH-nefrakcionisani heparin, NMH-niskomolekularni heparin, ACE-angiotenzin konvertujući enzim, ARB- antagonisti AT-II receptora, Gp-glikoprotein

U tabeli 27 prikazane su intrahospitalne komplikacije kod bolesnika sa prvom prednjim STEMI.

Tabela 27. Intrahospitalne komplikacije kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Aritmije	
VT/VF (%)	1,3
Atrijalna fibrilacija (%)	11,5
Srčana insuficijencija	
Kilip klasa>1	27,3
Smrtni ishod (%)	6,0

VT-komorska tahikardija, VF-komorska fibrilacija

U tabeli 28 prikazani su neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u prvih 30 dana nakon infarkta.

Tabela 28. Neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u prvih 30 dana nakon infarkta

Smrti ishod (%)	6,0
Reinfarkt (%)	3,0
Moždani udar (%)	0,0
Revaskularizacija ciljne lezije (%)	6,0
NKVD (%)	10,0

NKVD-neželjeni kardiovaskularni događaji

U tabeli 29 prikazani su neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u toku jednogodišnjeg praćenja.

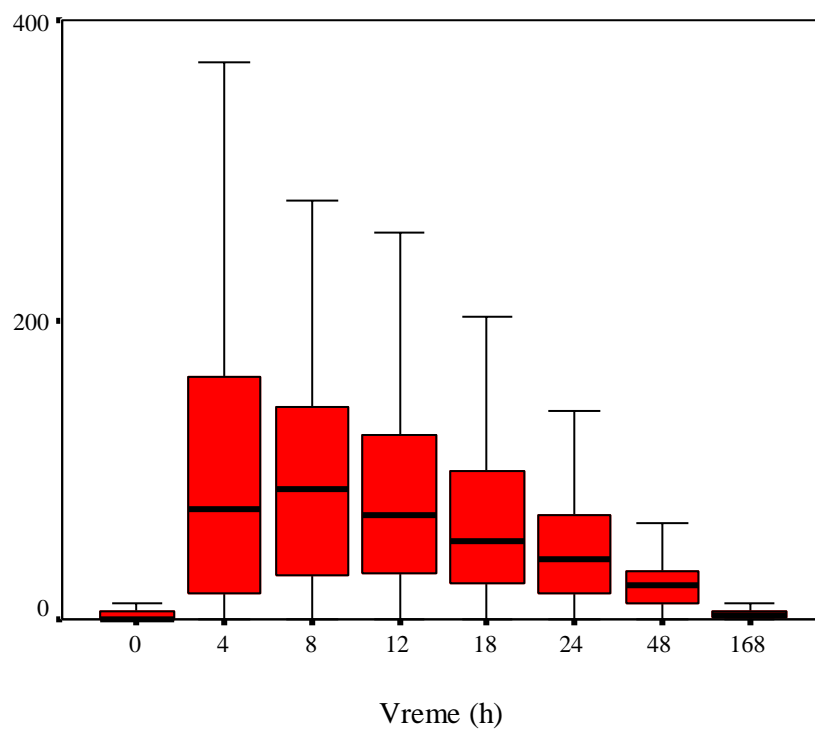
Tabela 29. Neželjeni kardiovaskularni i drugi neželjeni događaji kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u toku jednogodišnjeg praćenja

Smrti ishod (%)	5,0
Reinfarkt (%)	5,0
Moždani udar (%)	0,0
Revaskularizacija ciljne lezije (%)	5,0
NKVD (%)	10,0

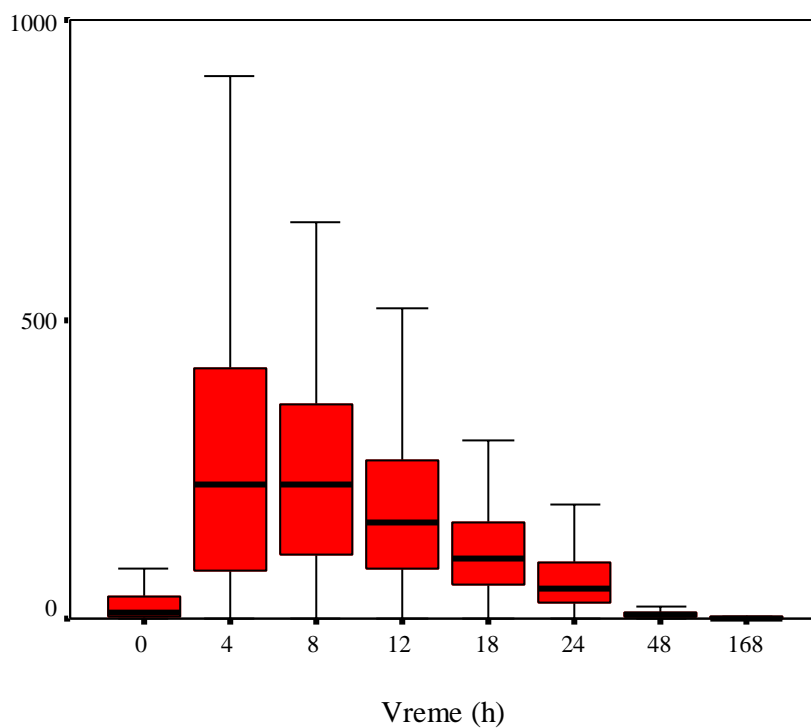
NKVD-neželjeni kardiovaskularni događaji

#### **4.3. Vremenski profili biomarkera kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI**

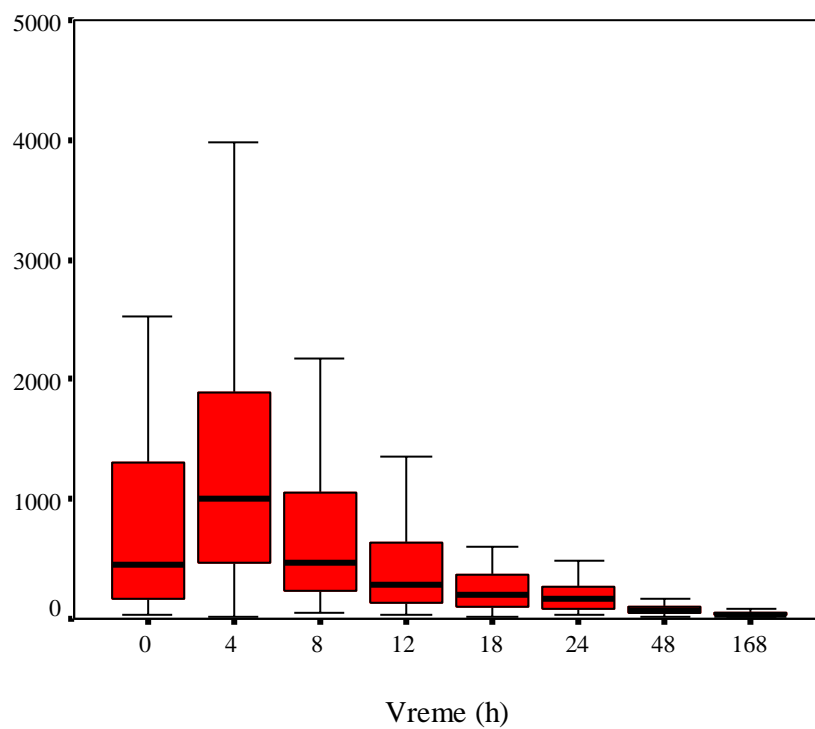
Prednost u analizi vremenskih profila biomarkera u ovoj studiji data je grupi bolesnika sa prvim prednjim STEMI jer su oni imali kraći vremenski period od početka infarktne bola do pPKI, prethodno nisu imali infarkt miokarda, imali su samo prednji STEMI, svi su imali kompletnu reperfuziju infarktne arterije (TIMI 3), a uzorkovanje biološkog materijala je bilo češće, tj. u kraćim vremenskim intervalima. Na slikama 3–13 prikazani su vremenski profili biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI.



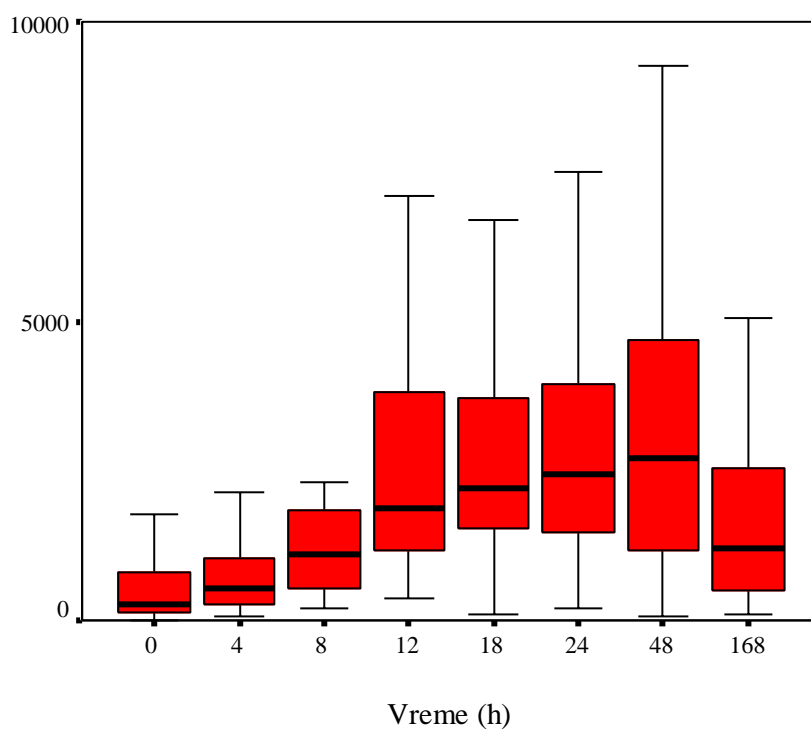
Slika 3. Vremenski profil TnI kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



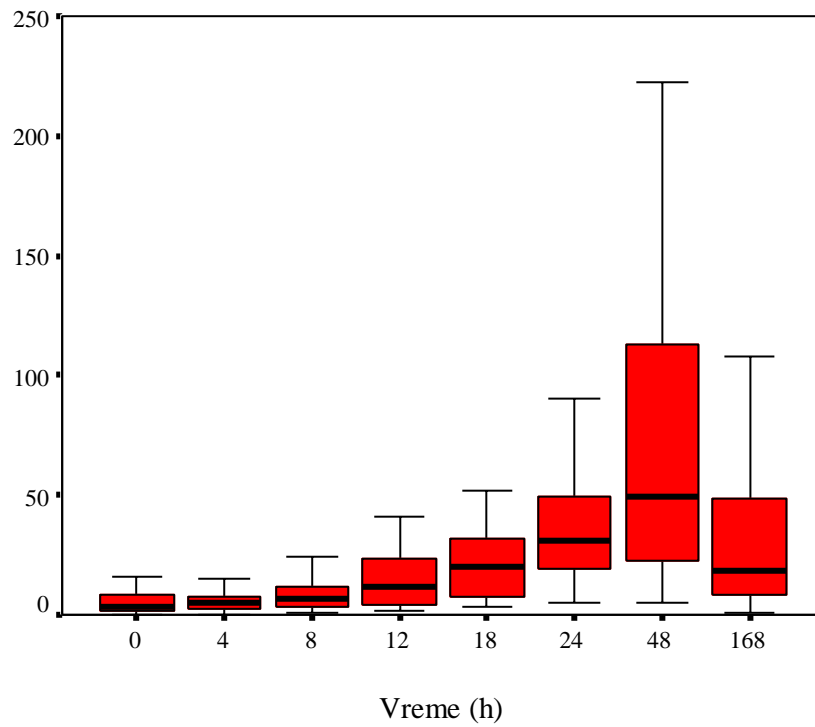
Slika 4. Vremenski profil mase CK-MB kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



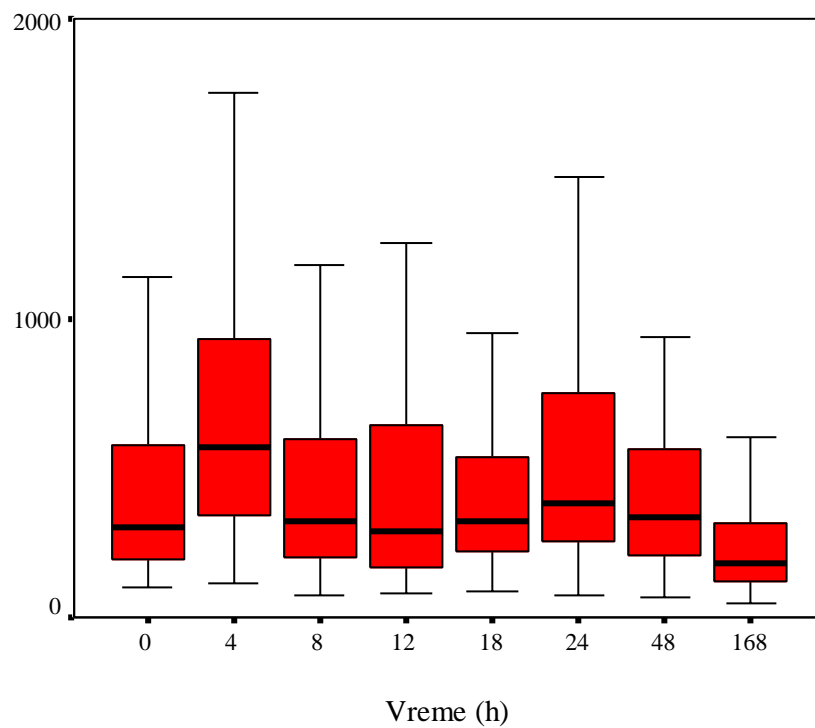
Slika 5. Vremenski profil mioglobina kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



Slika 6. Vremenski profil NT-proBNP kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

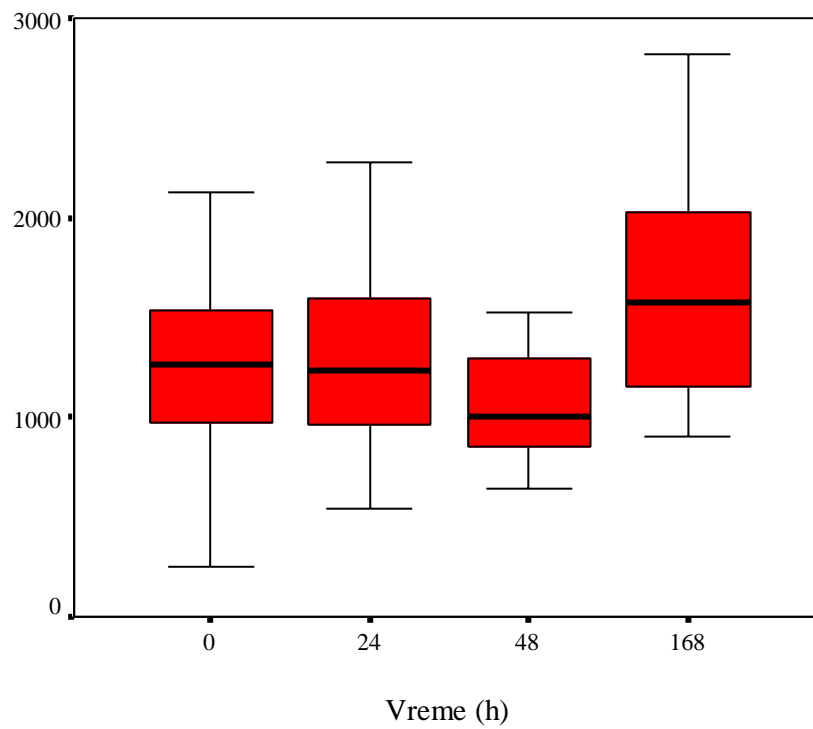


Slika 7. Vremenski profil CRP kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

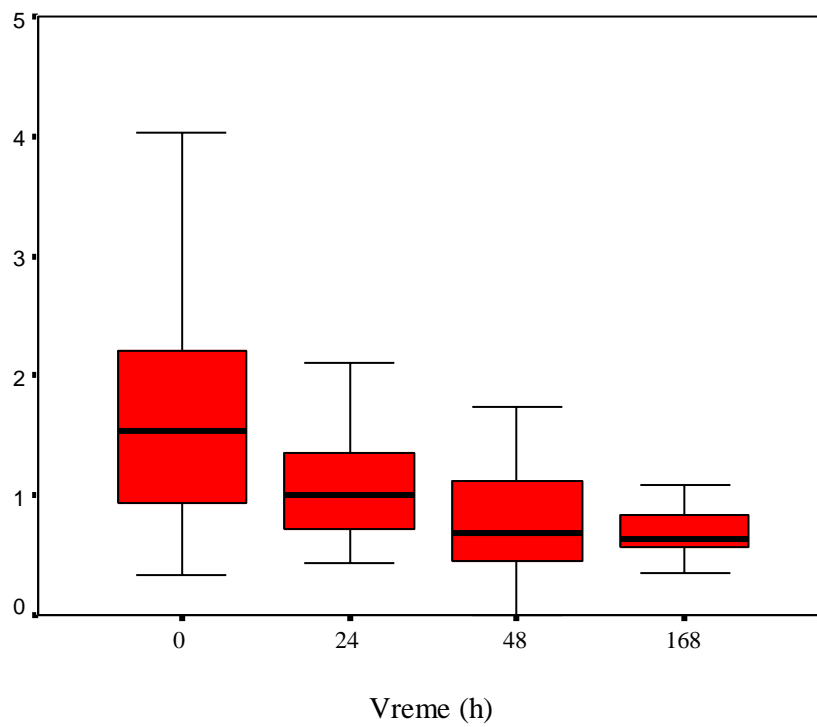


Slika 8. Vremenski profil MPO kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

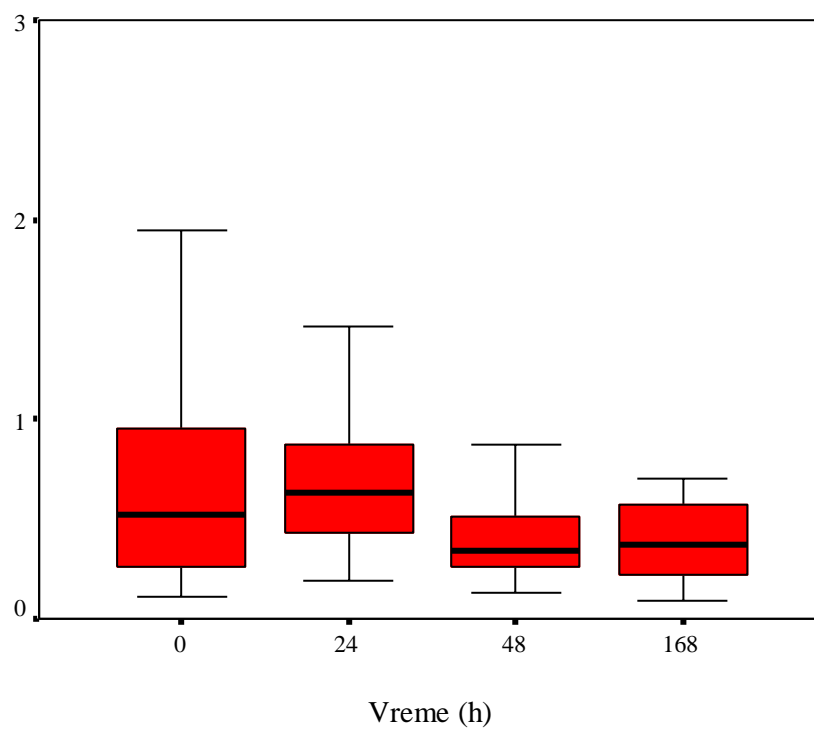




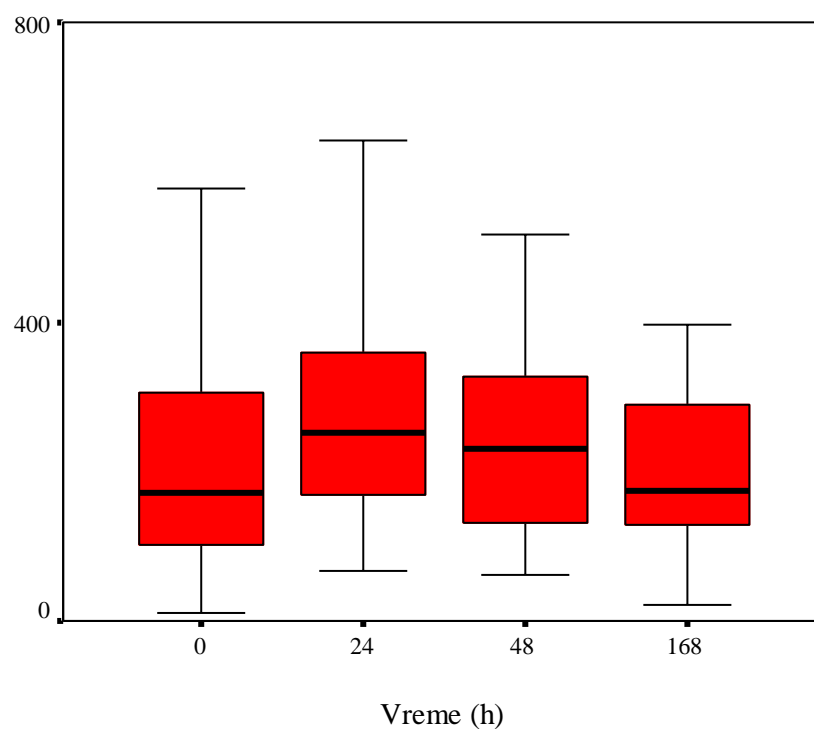
Slika 9. Vremenski profil sVCAM-1 kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



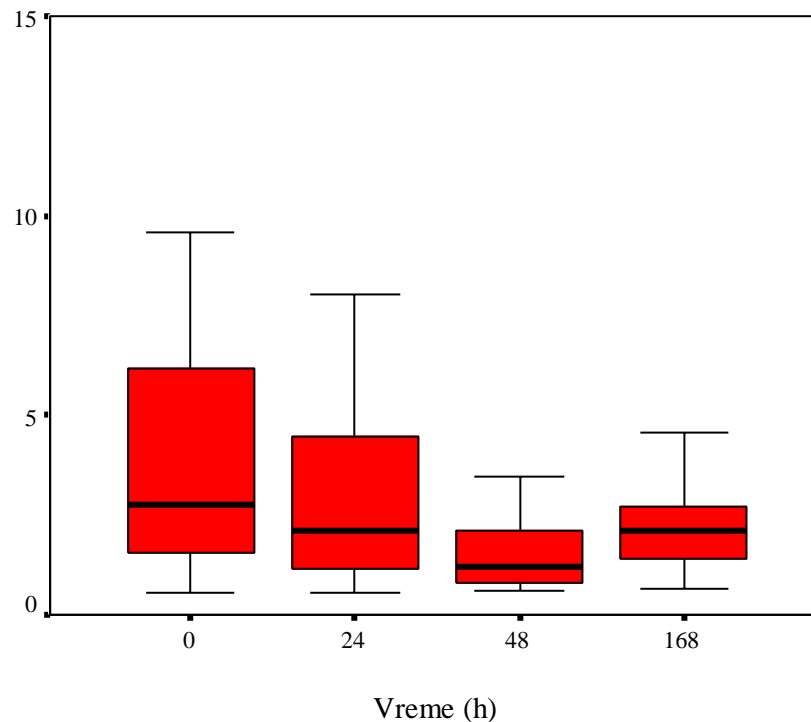
Slika 10. Vremenski profil sIL-6R kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



Slika 11. Vremenski profil sTNFR2 kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



Slika 12. Vremenski profil MMP-9 kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI



Slika 13. Vremenski profil IL-7 kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

#### **4.4. Korelacija biomarkera nekroze, inflamacije, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida sa demografskim karakteristikama, faktorima rizika i karakteristikama postinfarktnog toka kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI**

U tabeli 30 su prikazane statistički značajne korelacije pikova (maksimalnih vrednosti) ispitivanih biomarkera nekroze, hemodinamskog stresa, dislipidemije i modifikacije lipida sa demografskim karakteristikama, faktorima rizika i karakteristikama postinfarktnog toka kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI. Pikovi ispitivanih markera utvrđeni su na osnovu prethodno određenih profila ispitivanih biomarkera.

Tabela 30. Korelacija biomarkera kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

	eGFR	TnI	CK-MB	CRP	MPO
Starost	-0,309**				0,222*
Pol	0,230*				-0,258**
BMI	-0,293*				
Dijabetes melitus			-0,268*		
Pušenje					
Hipertenzija					
Hiperholesterolemija				0,309**	
Vreme od početka bola					
Kilip klasa na prijemu>1					0,242*
KSI tokom hospitalizacije				0,290*	0,295**
AF					
LKEF		-0,376**	-0,473**	-0,332**	
Višesudovna KB		0,285*	0,345**	0,450**	
eGFR	1				-0,286**
Pik TnI		1	0,774**	0,346**	
Pik CK-MB			1	0,342**	
Pik CRP				1	0,218*
Pik MPO					1
Pik PAPP-A					
Pik sCD40L					
Pik BNP					
Pik NT-proBNP					
Pik Lp-PLA <sub>2</sub>					
Pik oksLDL					

p<0,05, \*\*p<0,01.

Vrednosti su prikazane kao Spearman–ovi koeficijenti korelacije.

BMI-indeks telesne mase, AF-atrijalna fibrilacija, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-izoenzim kreatin kinaze, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, PAPP-A- protein udružen sa trudnoćom, s-solubilni, L-ligand, BNP-B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, oks-oksidovani.

Tabela 30. Korelacija biomarkera kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI (nastavak)

	PAPPA	sCD40L	BNP	NTproBNP	LpPLA <sub>2</sub>	oksLDL
Starost				0,343**		
Pol				-0,319**		
BMI	-0,294*					
Dijabetes melitus						
Pušenje		0,444**		-0,123	0,386**	0,331*
Hipertenzija				0,399**		
Hiperholesterolemija						
Vreme od početka bola						0,261*
Kilip klasa na prijemu >1	-0,224*	0,275*	0,666**			
KSI tokom hospitalizacije			0,669**			0,305*
AF						
LKEF			-0,36**	-0,397**		
Višesudovna KB		0,242*	0,440**	0,303*		
eGFR				-0,274*		
Pik TnI						
Pik CK-MB				0,271*		
Pik CRP				0,525**		
Pik MPO		0,238*				0,287*
Pik PAPP-A	1		-0,228*			
Pik sCD40L		1	0,231*		0,251*	
Pik BNP			1	0,249*	0,215*	0,273*
Pik NT-proBNP				1		
Pik Lp-PLA <sub>2</sub>					1	
Pik oksLDL						1

p<0,05, \*\*p<0,01.

Vrednosti su prikazane kao Spearman–ovi koeficijenti korelacije.

BMI-indeks telesne mase, AF-atrijalna fibrilacija, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, KB-koronarna bolest, eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-izoenzim kreatin kinase, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, PAPP-A- protein udružen sa trudnoćom, s-solubilni, L-ligand, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, oks-oksidovani.

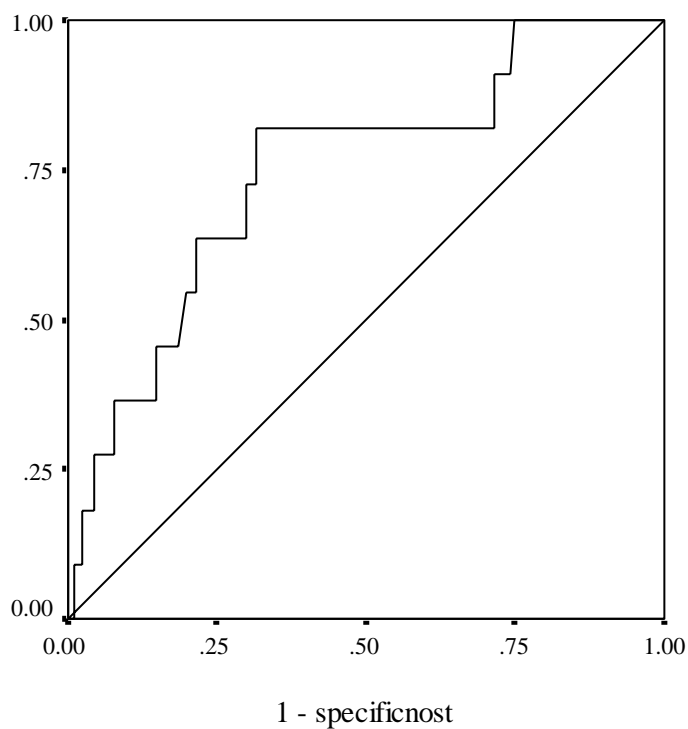
#### **4.5. Povezanost biomarkera sa kratkoročnom prognozom u bolesnika sa STEMI, odnosno bolesnika sa prvim prednjim STEMI**

*Prognostički značaj mijeloperoksidaze u predikciji mortaliteta u toku boravka u bolnici kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI*

Analizom ROC krive (slika 14) utvrđeno je da je MPO  $\geq 840$  pmol/L prediktor smrtnog ishoda u bolnici sa osetljivošću od 81,8% i specifičnošću 68,5%. Površina ispod ROC krive je bila 0,747 ( $p=0,006$ ).

Bolesnici su podeljeni u dve grupe prema izračunatoj cut-off vrednosti MPO: grupa sa vrednostima MPO  $\geq 840$  pmol/L označena je kao grupa sa visokim MPO, a grupa sa MPO  $< 840$  pmol/L kao grupa sa niskim MPO. Dve grupe su bile slične starosne dobi, pola, imale su slične kardiovaskularne faktore rizika, slično vreme od početka bola do prijema u bolnicu, kao i incidence prethodnog AIM ili moždanog udara. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracija TnI, hs-CRP i eGFR između grupa. Međutim incidenca prednjeg AIM i Kilip klase  $>1$  na prijemu bila je statistički značajno viša u grupi sa visokim MPO u odnosu na grupu sa niskim MPO. Takođe bolesnici u grupi sa visokim MPO imali su statistički značajno veći broj leukocita i više koncentracije MPO i BNP u odnosu na drugu grupu.

U tabeli 31 prikazane su osnovne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO  $< 840$  pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO  $\geq 840$  pmol/L).



Slika 14. ROC kriva za procenu sposobnosti MPO za predikciju smrtnog ishoda u bolnici

Tabela 31. Demografske karakteristike i faktori rizika bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥ 840 pmol/L (n=65)	P
Starost (godine)	57,94 ± 9,70	59,03 ± 10,75	0,489
Muški pol (%)	67,7	72,3	0,518
Hipertenzija (%)	63,7	67,7	0,587
Diabetes mellitus (%)	12,9	22,6	0,091
Hiperholesterolemija (%)	41,4	43,1	0,828
Pušenje (%)	70,9	60,7	0,179

U tabeli 32 su prikazane prethodne ispitivanih bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L).

Tabela 32. Prethodne bolesti ispitivane grupe bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Prethodni AIM (%)	7,3	8,1	0,844
Prethodni moždani udar (%)	4,8	6,5	0,646

AIM-akutni infarkt miokarda

U tabeli 33 su prikazane kliničke karakteristike bolesnika sa STEMI pri prijemu u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L).

Tabela 33. Kliničke karakterisitike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Vreme od početka bola (min)	150 (96–270)	180 (115–270)	0,530
Prednji AIM (%)	25,0	54,7	<0,001
Killip klasa>1 na prijemu (%)	4,8	15,4	0,013
Reinfarkt (%)	0,9	1,7	0,620
Smrtni ishod u bolnici (%)	1,6	13,8	0,001

AIM-akutni infarkt miokarda



U tabeli 34 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L).

Tabela 34. Vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	10,81 ± 2,48	12,14 ± 3,02	0,011
eGFR (mL/min)	68,47 ± 14,39	72,39±15,52	0,101
TnI (μg/L)	44,00 (20,92–76,05)	45,61 (21,15–82,02)	0,686
hs-CRP (mg/L)	14,65 (8,42–23,65)	18,20 (8,55–38,70)	0,178
MPO (pmol/L)	399,75 (202,5–560,92)	1564 (1024,11–2028,75)	<0,001
BNP (pg/mL)	286,08 (158,86–506,85)	347,02 (216,77–809,95)	0,029

eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, BNP-B-tip natriuretičkog peptida

Spearman–ova korelacija je pokazala statistički značajnu korelaciju između nivoa MPO u plazmi i broja leukocita ( $\rho=0,159$ ;  $p=0,036$ ). Nije utvrđena statistički značajna korelacija između nivoa MPO u plazmi i TnI ( $\rho=0,060$ ;  $p=0,427$ ), kao i MPO i hs-CRP ( $\rho= 0,081$ ;  $p=0,296$ ).

U tabeli 35 su prikazane ehokardiografske karakterisitike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L).

Tabela 35. Ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥ 840 pmol/L (n=65)	P
LP (mm)	37,70 ± 6,97	37,45 ± 7,89	0,826
LK EDD (mm)	53,44 ± 7,05	53,47 ± 5,90	0,979
LK ESD (mm)	38,18 ± 6,42	38,78 ± 6,69	0,573
LKEF (%)	48,60 ± 8,84	44,78 ± 11,21	0,011

LP-leva pretkomora, LK EDD-dijastolna dimenzija leve komore, LK ESD-sistolna dimenzija leve komore, EF-ejekciona frakcija leve komore

U tabeli 36 su prikazane angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L).

Tabela 36. Angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Višesudovna koronarna bolest (%)	59,1	55,6	0,679
Infarktina arterija (%)			0,000
LAD (%)	24,1	62,5	
LCX (%)	25,3	10,7	
RCA (%)	49,4	26,8	
LM (%)	1,1	0,0	

LAD-leva prednja silazna koronarna arterija, RCA-desna koronarna arterija, Cx-leva cirkufleksna koronarna arterija, LM-glavno stablo leve koronarne arterije

U tabelama 37 i 38 su prikazane proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L).

Tabela 37. Proceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Broj implantiranih stentova	1 (1, 2)	1(1, 2)	0,491
Metalni stent (%)	95,3	92,6	0,505
Stent sa oslobađanjem leka (%)	2,4	5,6	0,323
Maksimalna širina stenta (mm)	3 (3,3,5)	3 (3,3,5)	0,174
Maksimalna dužina stenta (mm)	20 (18–24)	20 (18,75–23)	0,994

Tabela 38. Postproceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
Finalni protok TIMI 3 (%)			0,368
TIMI protok 0	1,6	0	
TIMI protok 1	0	2,9	
TIMI protok 2	6,6	11,8	
TIMI protok 3	91,8	85,3	
Akutna okluzija stenta (%)	2,3	3,3	0,696

TIMI- trombolize u infarktu miokarda

Angiografski nalazi su pokazali da se finalni TIMI protok, zastupljenost višesudovne koronarne bolesti i broj implantiranih stentova nisu razlikovali između grupe sa niskim i visokim MPO. Ehokardiografski, LKEF bila je značajno niža u grupi sa visokim MPO u odnosu na grupu sa niskim MPO. Utvrđena je ukupna incidenca bolničkog mortaliteta od 5,8% i bila je značajno veća u grupi sa visokim MPO u odnosu na grupu sa niskim MPO.

U tabeli 39 prikazana je primenjena terapija kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u toku hospitalizacije u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥840 pmol/L).

Tabela 39. Primenjena terapija kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u toku hospitalizacije u niskoj (MPO <840 pmol/L) i visokoj MPO grupi (MPO ≥ 840 pmol/L)

	Grupa sa MPO <840 pmol/L (n=124)	Grupa sa MPO ≥840 pmol/L (n=65)	P
NFH/NMH (%)	95,2	90,8	0,240
ACE inhibitori/ARB (%)	76,2	76,2	0,995
Diuretici (%)	21,0	34,1	0,090
Statini (%)	91,4	93,2	0,720

NFH-nefrakcionisani heparin, NMH-niskomolekularni heparin, ACE inhibitori, ARB-antagonisti angiotenzinskih receptora

Koristeći binarnu logističku regresionu analizu, u univarijantnoj analizi je dobijen OR 3,07 (95% CI 1,37–6,86; P=0,006). U multivarijantnoj analizi sa poznatim prediktorima, MPO je ostao prediktor za smrtni ishod u bolnici sa OR 3,88 (95% CI 1,13–13,34; P=0,031) (Tabela 40).

Tabela 40. Univarijantna i multivarijantna binarna logistička regresiona analiza za predikciju smrtnog ishoda u bolnici

Varijabla	OR (95% CI)	P
“Unadjusted” model		
lnMPO	3,07 (1,37–6,86)	0,006
“Multivarijantni” model		
LnMPO	3,88 (1,13–13,34)	0,031
LnTnI	2,64 (0,94–7,45)	0,065
Lnhs-CRP	0,55 (0,26–1,16)	0,120
LnBNP	4,40 (1,11–17,37)	0,034
Leukociti	1,19 (0,97–1,47)	0,083
Starost	1,03 (0,96–1,10)	0,363
Pol	1,39 (0,31–6,12)	0,659
Hipertenzija	1,71 (0,32–9,15)	0,526
Dijabetes melitus	1,72 (0,35–8,49)	0,501
Prethodni MI	4,85 (0,73–32,11)	0,101
Prednji AMI	1,65 (0,40–6,83)	0,488
Kilip klasa >1	10,76 (1,23–94,01)	0,032
Pušenje	1,12 (0,23–5,32)	0,880
Ln vreme od početka simptoma	1,43 (0,50–4,03)	0,498
LKEF (%)	0,88 (0,80–0,97)	0,009
eGFR	0,93 (0,88–0,99)	0,035

OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, MPO-mijeloperoksidaza, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, BNP-B-tip natriuretičkog peptida, MI-infarkt miokarda, AIM-akutni infarkt miokarda, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije

*Prognostički značaj mijeloperoksidaze u predikciji mortaliteta u toku boravka u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI*

Analizom vrednosti laboratorijskih biomarkera u ovom radu, posebno u grupi sa prvim prednjim STEMI gde je uzorkovanje biološkog materijala vršeno u 8 vremenskih tačaka, utvrđeni su vremenski profili laboratorijskih biomarkera. Na slici prikazane su promene vrednosti MPO od trenutka prijema do 7. dana kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečeni pPKI. Utvrđen je bifazni ritam oslobađanja MPO kod ovih bolesnika. Najvišu vrednost MPO je dostizala 4h nakon pPKI. Značajno smanjenje u odnosu na ovu vrednost utvrđeno je 8h i 12h nakon završene intervencije. Zatim sledi blagi skok vrednosti MPO 24h po završenoj pPKI koji je dalje praćen postepenim sniženjem vrednosti MPO i zatim MPO dostiže najniže koncentracije 7 dana. Nije utvrđena statistički značajna razlika u MPO tokom vremena ( $\chi^2=125,52$ ;  $P<0,001$ ).

Tabela 41. Korelacije koncentracija MPO 4h i MPO 24h sa biohemijskim i kliničkim parametrima

	MPO 4h	MPO 24h
Smrtni ishod u bolnici	0,265**	0,290**
Kilip klasa>1 na prijemu	0,174	0,242*
Leukociti	0,220*	0,343**
Neutrofili	0,287**	0,382**
oksLDL	0,298*	0,287*
TnI 4h	0,110	0,083
TnI 24h	0,230*	0,223*
hsCRP	0,047	0,153
eGFR	-0,185	-0,286**

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ . Vrednosti su prikazane kao Spearmanovi koeficijenti korelacije. oks-oksidovali, TnI-troponin I, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, eGFR-jačina glomerularne filtracije

Korelacije između MPO 4 h i MPO 24 h sa biohemijskim i kliničkim parametrima prikazane su u tabeli 41. Koncentracije mokraćne kiseline uzete pre izvođenja pPKI značajno su korelirale sa muškim polom ( $r=0,240$ ;  $P=0,017$ ), BMI ( $r=0,268$ ;  $P=0,019$ ), hsCRP ( $r=0,339$ ;  $P=0,028$ ) i eGFR ( $r= -0,430$ ;  $P<0,001$ ).

Analizom ROC kriva utvrđene vremenski zavisne promene u dijagnostičkoj osetljivosti i specifičnosti MPO za smrtni ishod u bolnici i odgovarajuće površine ispod krivih, kao i cut-off vrednosti prikazane su u tabeli 42. Tabela 42. Vremenski zavisne promene u dijagnostičkoj osetljivosti i specifičnosti MPO za smrtni ishod u bolnici i odgovarajuće cut-off vrednosti.

Vreme (h)	AUC	95 % CI	P	Cut-off (pmol/L)	Osetljivost (%)	Specifičnost (%)
0	0,491		0,942			
4	0,823	0,631–1,015	0,008	1065	83,3	86,2
8	0,793	0,628–0,958	0,017	693	66,7	83,0
12	0,755	0,601–0,909	0,037	567	66,7	72,3
18	0,725	0,539–0,911	0,065	349	66,7	57,4
24	0,853	0,690–1,016	0,004	916	83,3	86,2
48	0,793	0,607–0,978	0,017	621	83,3	80,9
168	0,812	0,525–1,029	0,011	452	83,3	86,2

OR-odnos šansi, 95 % CI- 95 % interval pouzdanosti

Univarijantnom logističkom regresijom utvrđeno je da su statistički značajni prediktori smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI MPO 4 h, MPO 24 h, mokraćna kiselina, Kilip klasa >1 i LKEF (Tabela 43).

Tabela 43. Univarijantna analiza prediktora smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Varijabla	OR	95 % CI	P
“Unadjusted” model			
MPO 4h	2,201	1,19–4,04	0,011
MPO 24h	3,475	1,57–7,69	0,002
TnI	1,564	0,97–2,53	0,068
hs-CRP	1,678	0,74–3,82	0,218
NT-proBNP	1,948	0,95–4,01	0,070
oksLDL	3,879	0,97–15,4	0,055
Mokraćna kiselina	2,438	1,09–5,42	0,029
Glukoza	1,293	0,69–2,43	0,424
Leukociti	1,597	0,82–3,12	0,170
Neutrofili	1,875	0,95–3,69	0,069
Starosna dob	1,316	0,56–3,11	0,532
Pol	0,483	0,21–1,10	0,083
Hipertenzija	0,689	0,31–1,52	0,356
Dijabetes melitus	0,898	0,34–2,37	0,827
Killip klasa >1	2,279	1,03–5,04	0,042
Pušenje	1,064	0,43–2,62	0,893
Vreme od početka bola	1,546	0,72–3,32	0,264
LKEF %	0,257	0,09–0,73	0,010
eGFR	0,428	0,16–1,13	0,087

OR-odnos šansi za promenu 1SD (standardna devijacija), 95% CI-95% interval pouzdanosti za promenu 1SD; MPO-mijeloperoksidaza, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, NT-proBNP- N-terminalni proB-tip natriuretičkog peptida, oks-oksidovani, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije



Multivarijantnom logističkom regresijom utvrđeni su prediktori smrtnog ishoda u bolnici. MPO na 4 h i MPO na 24 h su testirane u dva modela A i B. U modelu B, MPO na 24 h je ostala nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici sa OR 3,34 (95% CI 1,13–9,86; P=0,029), dok je u modelu A samo koncentracija mokraćne kiseline na prijemu bila nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici (Tabela 44).

Tabela 44. Multivarijantna analiza prediktora smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

	OR	95 % CI	P
<i>Model A</i>			
MPO 4h	1,984	0,982–4,269	0,080
Mokraćna kiselina	3,514	1,047–11,79	0,042
Kilip klasa >1	2,187	0,713–6,712	0,171
LKEF %	0,424	0,140–1,283	0,129
<i>Model B</i>			
MPO 24h	3,345	1,135–9,860	0,029
Mokraćna kiselina	4,072	0,932–17,79	0,062
Kilip klasa >1	1,771	0,516–6,082	0,364
LKEF %	0,445	0,165–1,199	0,109

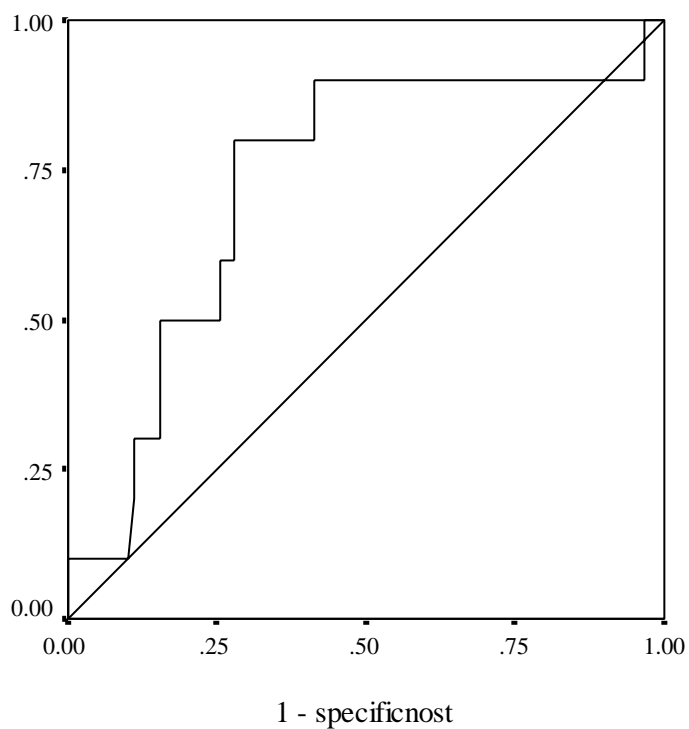
OR-odnos šansi za promenu 1SD (standardna devijacija), 95% CI-95% interval pouzdanosti za promenu 1SD, MPO-mijeloperoksidaza, LKEF-ejekciona frakcija leve komore

Utvrđena je snaga od 46,6%, 83,0%, 89,0%, 49,9% i 89,7% na nivou od 5% da detektuje razliku u jednoj standardnoj devijaciji za varijable MPO 4h, MPO 24 h, mokraćna kiselina, Kilip klasa i LKEF% sa incidencom događaja 0,06.

*Prognostički značaj lipoproteinske fosfolipaze A<sub>2</sub> u predikciji pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI*

Na slici 15 je prikazana ROC kriva Lp-PLA<sub>2</sub> za predikciju NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI. Koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi  $\geq 463$  ng/mL određene pri prijemu bolesnika imale su osetljivost 80,0 % i specifičnost 72,2 % za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana. Površina ispod ROC krive je bila 0,728 (p=0,018).

Bolesnici su podeljeni u dve grupe prema određenoj cut-off vrednosti: grupa sa vrednostima Lp-PLA<sub>2</sub>  $\geq 463$  ng/mL označena je kao grupa sa visokim Lp-PLA<sub>2</sub>, a grupa sa Lp-PLA<sub>2</sub>  $< 463$  ng/mL kao grupa sa niskim Lp-PLA<sub>2</sub>. Između grupa nije utvrđena statistički značajna razlika u demografskim karakteristikama, kardiovaskularnim faktorima rizika (dijabetes, hiperholesterolemija, hipertenzija) i vremenu od pojave bola u grudima do prijema u bolnicu. Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika između ove dve grupe u angiografskim karakteristikama i podacima koji se odnose na pPKI. Incidenca smrtnog ishoda u prvih 30 dana nakon infarkta bila je 18,2 % (6/33) u visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi, dok u niskoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi nije zabeležen smrtni ishod (p<0,001). Uzrok smrti bilo je kardiovaskularno oboljenje. Trend prema većoj učestalosti pojave reinfarkta utvrđen je kod bolesnika u visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi. Deset bolesnika je imalo NKVD (10 % od ukupnog broja) tokom 30-dnevnog praćenja; NKVD se javio kod 3 % bolesnika u niskoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi i 24,2 % bolesnika u visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (p=0,001).



Slika 15. ROC kriva Lp-PLA<sub>2</sub> za predikciju NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta

U tabeli 45 prikazane su osnovne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> < 463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

U tabeli 46 su prikazane kliničke karakterisitike bolesnika sa prvim prednjim STEMI pri prijemu u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL).

Tabela 45. Demografske karakteristike i faktori rizika bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
Starost (godine)	60,26 ± 12,51	60,58 ± 11,06	0,902
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,84 ± 3,41	26,39 ± 3,16	0,566
Muški pol (%)	64,2	75,8	0,243
Hipertenzija (%)	73,1	84,8	0,191
Diabetes mellitus (%)	23,5	25,0	0,968
Hiperholesterolemija (%)	55,2	54,5	0,937
Pušenje (%)	37,3	37,0	0,926

BMI-indeks telesne mase

Tabela 46. Kliničke karakterisitike bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
Vreme od početka bola (min)	2 (2–3)	3,5 (1,3 – 4,3)	0,724
Killip klasa >1 na prijemu (%)	25,3	30,3	0,602
Reinfarkt (%)	0,0	8,3	0,052
Smrtni ishod u prvih 30 dana nakon infarkta (%)	0,0	18,2	<0,001
Revaskularizacija ciljne lezije (%)	4,5	8,0	0,555

U tabeli 47 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL). Koncentracije LDL-holesterola, apoB i Lp-PLA<sub>2</sub> bile su značajno

vise, a eGFR značajno niže u grupi sa visokom u poređenju sa grupom sa niskom koncentracijom Lp-PLA<sub>2</sub> (Tabela 49).

Tabela 47. Vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	12,16 ± 3,54	12,92 ± 3,93	0,359
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	9,66 ± 3,30	10,05 ± 3,37	0,600
Fibrinogen (g/L)	3,70 (3,15–5,10)	3,90 (3,30–4,60)	0,664
Ukupan holesterol (mmol/L)	5,97 ± 1,18	6,49 ± 1,12	0,042
HDL-holesterol (mmol/L)	1,22 ± 0,41	1,11 ± 0,33	0,190
LDL-holesterol (mmol/L)	3,91 ± 0,98	4,39 ± 1,11	0,033
Glukoza (mmol/L)	8,74 ± 3,32	9,24 ± 2,86	0,460
Trigliceridi (mmol/L)	1,47 (1,02–1,95)	1,75 (1,19–2,54)	0,102
Apo AI (g/L)	1,46 ± 0,27	1,39 ± 0,20	0,204
Apo B (g/L)	1,08 ± 0,27	1,21 ± 0,26	0,032
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	93,52 ± 28,49	79,15 ± 24,47	0,018
TnI (μg/L)	0,87 (0,18–5,48)	0,53 (0,03–2,59)	0,360
CK-MB (μg/L)	10,45 (4,62–41,97)	6,90 (1,90–31,50)	0,169
hs-CRP (mg/L)	3,25 (1,37–8,30)	3,90 (1,99–11,50)	0,410
NT-proBNP (pg/mL)	257,9 (94,8–782,1)	300,7 (152,7–1062,0)	0,305
Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/mL)	353,48 ± 77,37	536,69 ± 60,77	0,000

HDL-lipoproteini velike gustine, LDL-lipoproteini male gustine, apo-apolipoprotein, eGFR-jačina glomerularne filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-izoenzim kreatin kinaze, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, NT-proBNP- N-terminalni proB-tip natriuretičkog peptida, Lp PLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>

U tabeli 48 su prikazane ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL).

Tabela 48. Ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
LP (mm)	36,6 ± 5,5	23,4 ± 2,80	0,959
LK EDD (mm)	51,8 ± 6,2	53,5 ± 4,7	0,432
LK ESD (mm)	37,8 ± 6,5	38,5 ± 6,4	0,773
LKEF (%)	47,58 ± 11,39	44,86 ± 13,42	0,328

LP-leva pretkomora, LK EDD-dijastolna dimenzija leve komore, LK ESD-sistolna dimenzija leve komore, EF-ejekciona frakcija leve komore

U tabeli 49 su prikazane angiografske, proceduralne (tokom pPKI) i postproceduralne (nakon pPKI) karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL).

U tabeli 50 prikazan je primenjena terapija bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL).

Tabela 49. Angiografske, proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
Višesudovna koronarna bolest (%)	55,0	54,0	0,836
Infarktna arterija (%)			
LAD (%)	100,0	100,0	
Broj implantiranih stentova	1 (1–2)	2 (1–2)	0,489
Maksimalna širina stenta (mm)	3,5 (3,0 – 3,5)	3,5 (3,1 – 3,5)	0,745
Maksimalna dužina stenta (mm)	23 (18 – 33)	30 (24–44)	0,120
Finalni protok TIMI 3 (%)	100,0	100,0	

LAD- leva prednja silazna koronarna arterija, TIMI- trombolize u infarktu miokarda

Tabela 50. Primenjena terapija bolesnika sa prvim prednjim STEMI u niskoj (Lp-PLA<sub>2</sub> <463 ng/mL) i visokoj Lp-PLA<sub>2</sub> grupi (Lp-PLA<sub>2</sub> ≥463 ng/mL)

	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> <463 ng/mL (n=67)	Grupa sa Lp-PLA <sub>2</sub> ≥463 ng/mL (n=33)	P
NFH/NMH (%)	98,5	100,0	0,481
ACE inhibitori/ARB (%)	83,6	90,9	0,321
Diuretici (%)	28,3	33,3	0,610
Statini (%)	98,5	93,9	0,208

NFH-nefrakcionisani heparin, NMH-niskomolekularni heparin, ACE inhibitori, ARB-antagonisti angiotenzinskih receptora

Poređenjem koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi kod bolesnika sa i bez prisutnih faktora rizika, utvrđene su statistički značajno više vrednosti Lp-PLA<sub>2</sub> kod muškaraca u odnosu na žene i značajno više vrednosti Lp-PLA<sub>2</sub> kod pušaša u odnosu na nepušače (Tabela 51).

Tabela 51. Poređenje koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi kod bolesnika sa i bez prisutnih faktora rizika

	Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/mL)	P
Muškarci	380,59 ± 110,83	0,042
Žene	429,63 ± 110,78	
Starost <65 godina	412,93 ± 111,30	0,820
Starost ≥65 godina	418,30 ± 116,56	
Dijabetes melitus (+)	422,36 ± 99,56	0,809
Dijabetes melitus (-)	415,82 ± 111,44	
Hipertenzija (+)	418,36 ± 63,12	0,909
Hipertenzija (-)	421,50 ± 111,14	
Hiperholesterolemija (+)	410,92 ± 108,29	0,863
Hiperholesterolemija (-)	414,92 ± 118,75	
Pušenje (+)	467,08 ± 116,37	0,000
Pušenje (-)	379,89 ± 99,94	
eGFR < 60 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	421,22 ± 72,91	0,896
eGFR > 60 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	416,94 ± 117,52	

eGFR-jačina glomerularne filtracije, Lp PLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>

Utvrđena je statistički značajna korelacija između koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> i koncentracije ukupnog holesterola ( $r=0,232$ ;  $p=0,022$ ), LDL-holesterola ( $r=0,266$ ;  $p=0,009$ ), apoB ( $r=0,276$ ;  $p=0,005$ ), i eGFR ( $r= -0,211$ ;  $p=0,043$ ) (Tabela 52).

Univarijantnom logističkom regresijom utvrđeno je da je Lp-PLA<sub>2</sub> značajan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta (OR 1,007 (95 % CI 1,001–1,013;  $P=0,034$ )). U multivarijantnoj logističkoj regresiji, Lp-PLA<sub>2</sub> je bio nezavisan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta (OR 1,011 (95% CI 1,001–1,021;  $P=0,037$ )) (Tabela 53).



Tabela 52. Korelacije koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> i biohemijskih i kliničkih parametara

	Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/mL)
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	0,065
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	0,033
Fibrinogen (g/L)	-0,066
Ukupan holesterol (mmol/L)	0,232*
HDL-holesterol (mmol/L)	-0,122
LDL-holesterol (mmol/L)	0,266**
Glukoza (mmol/L)	0,089
Trigliceridi (mmol/L)	0,072
Apo AI (g/L)	-0,119
Apo B (g/L)	0,276**
TnI (μg/L)	-0,045
CK-MB (μg/L)	0,022
hs-CRP (mg/L)	0,077
NT-proBNP (pg/mL)	0,128
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	-0,211*
Vreme od početka bola (min)	0,180
Kilip klasa >1 na prijemu (%)	0,020
LKEF (%)	-0,099
Višesudovna koronarna bolest (%)	-0,013

\*p<0,05, \*\*p<0,01.

Vrednosti su prikazane kao Pearsonovi koeficijenti korelacije.

Lp PLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, HDL-lipoproteini velike gustine, LDL-lipoproteini male gustine, Apo-apolipoprotein, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti; NT-proBNP-N-terminalni proB-tip natriuretičkog peptida, oks-oksidovani, eGFR-jačina glomerulske filtracije, LKEF-ejekciona frakcija leve komore

Tabela 53. Univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta

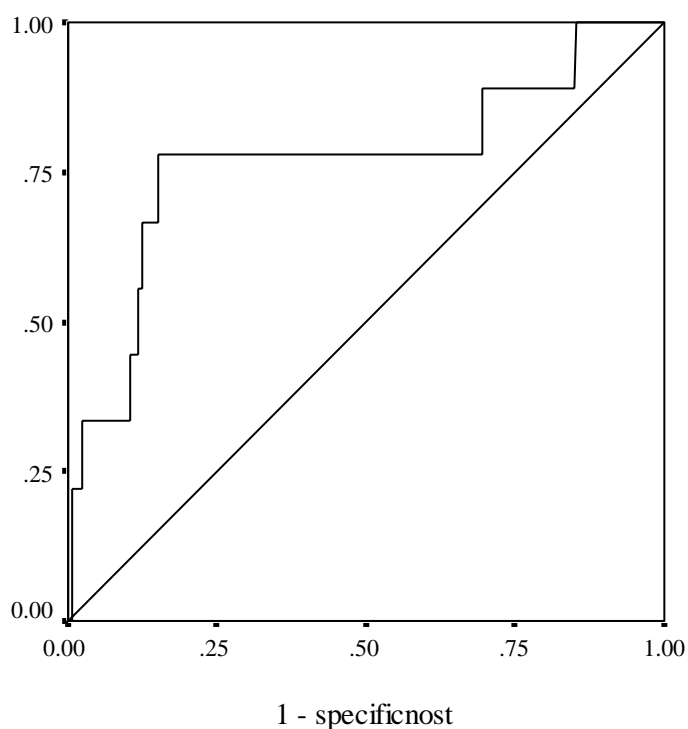
Varijable	OR (95 % CI)	P
<i>"Unadjusted" model</i>		
Lp-PLA <sub>2</sub>	1,007 (1,001–1,013)	0,034
<i>"Multivarijantni" model</i>		
Lp-PLA <sub>2</sub>	1,011 (1,001–1,021)	0,037
Glukoza	1,331 (1,042–1,700)	0,022
Mokraćna kiselina	1,008 (0,997–1,020)	0,158
ln Fibrinogen	0,622 (0,041–9,463)	0,733
Ukupan holesterol	0,536 (0,210–1,371)	0,193
LDL-holesterol	0,481 (0,194–1,196)	0,116
ln Trigliceridi	1,143 (0,304–4,297)	0,843
ln TnI	1,114 (0,800–1,553)	0,522
ln CK-MB	1,322 (0,807–2,164)	0,267
ln hs-CRP	0,937 (0,536–1,639)	0,819
ln NT-proBNP	1,130 (0,670–1,905)	0,648
BMI	1,264 (0,937–1,706)	0,125
Leukociti	1,113 (0,905–1,370)	0,310
Starost	0,978 (0,916–1,046)	0,520
Pol	4,552 (0,705–29,402)	0,111
Hipertenzija	2,227 (0,289–17,134)	0,442
Dijabetes melitus	1,164 (0,192–7,041)	0,869
Hiperholesterolemija	3,394 (0,664–17,354)	0,142
Pušenje	2,581 (0,505–13,188)	0,255
ln vreme od početka simptoma	1,805 (0,018–179,531)	0,801
Kilip klasa >1	1,756 (0,343–8,991)	0,499
LKEF (%)	0,920 (0,856–0,990)	0,025

eGFR	0,992 (0,959–1,026)	0,639
------	---------------------	-------

OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, Lp PLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, LDL-lipoproteini male gustine, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, NT-proBNP-N-terminalni proB-tip natriuretičkog peptida, BMI-indeks telesne mase, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije

*Prognostički značaj BNP u odnosu na pojavu novonastale atrijalne fibrilacije kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI*

Analizom ROC krive (slika 16) utvrđeno je da je BNP  $\geq 720$  pg/mL prediktor pojave atrijalne fibrilacije (AF) sa osetljivošću od 77,8% i specifičnošću 84,8%. Površina ispod ROC krive je bila 0,769 (p=0,007).



Slika 16. ROC kriva BNP za predikciju pojave AF

Bolesnici su podeljeni u dve grupe prema izračunatoj cut-off vrednosti BNP: grupa sa vrednostima BNP  $\geq 720$  pg/mL označena je kao grupa sa visokim BNP, a grupa

sa BNP <720 pg/mL kao grupa sa niskim BNP. Bolesnici sa visokim BNP su bili stariji, imali su češće prednji infarkt, višu Kilip klasu pri prijemu, veći pik troponina i izraženiju sistolnu disfunkciju u odnosu na bolesnike u grupi sa niskim BNP. Utvrđena je statistički značajno niža vrednost eGFR u grupi sa visokim BNP u poređenju sa drugom grupom. Ukupna incidence AF je bila 5,0%, i statistički značajno viša u grupi bolesnika sa visokim BNP (7/33, 21,2%) u poređenju sa niskom BNP grupom (2/147, 1,4%). Analizom vremena pojave novonastale AF tokom hospitalizacije pokazano je da se novonastala AF zabeležena  $44,11 \pm 13,84$  h od početka bola u grudima i  $20,11 \pm 13,83$  h nakon uzimanja BNP. Prosečno trajanje epizoda AF bilo je  $22,44 \pm 14,72$  h. Nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa u stepenu finalnog TIMI protoka, ušestalosti višesudovne koronarne bolesti, broju i vrsti implantiranih stentova. Ukupna incidenca smrtnog ishoda u bolnici bila je 6,1%.

U tabeli 54 prikazane demografske karakteristike i faktori rizika bolesnika sa STEMI u niskoj BNP grupi (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP  $\geq$ 720 pg/mL).

Tabela 54. Demografske karakteristike, faktori rizika i prethodne bolesti bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP  $\geq$ 720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP $\geq$ 720 pg/mL (n=65)	P
Starost (godine)	$57,51 \pm 10,38$	$62,25 \pm 8,41$	0,017
Muški pol (%)	68,7	63,6	0,573
Hipertenzija (%)	66,4	64,5	0,837
Diabetes mellitus (%)	12,3	29,0	0,019
Pušenje (%)	69,3	55,2	0,141
Prethodni MI (%)	6,8	9,7	0,584

MI-infarkt miokarda

U tabeli 55 su prikazane kliničke karakterisitike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

Tabela 55. Kliničke karakterisitike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
Vreme od početka bola (min)	160 (95-270)	165 (105-270)	0,649
Prednji AIM (%)	30,6	53,1	0,015
Killip klasa>1 na prijemu (%)	6,8	18,2	0,038
Reinfarkt (%)	1,4	3,0	0,502
AF (%)	1,4	21,2	<0,001
Smrtni ishod u bolnici (%)	2,7	21,2	<0,001

AIM-akutni infarkt miokarda, AF-atrijalna fibrilacija

U tabeli 56 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL).

Tabela 56. Vrednosti biohemijskih parametara kod bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	10,03 ± 2,57	11,25 ± 3,13	0,033
eGFR (mL/min)	70,99 ± 14,63	63,71 ± 15,04	0,013
TnI (μg/L)	38,61 (19,00–70,34)	70,00 (37,49–88,28)	0,002
hs-CRP (mg/L)	14,50 (8,30–23,70)	22,90 (14,70–48,80)	0,005
BNP (pg/mL)	249,64 (114,51–325,56)	987,67 (829,46–1256,53)	<0,001

eGFR-jačina glomerularne filtracije, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom visoke osetljivosti, BNP-B-tip natriuretičkog peptida

U tabeli 57 su prikazane ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL).

Tabela 57. Ehokardiografske karakteristike ispitivane grupe bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
LVEDD (mm)	53,02 ± 6,88	55,43 ± 5,81	0,078
LVEDD (mm)	37,70 ± 6,52	40,92 ± 6,03	0,019
LA (mm)	37,16 ± 7,29	39,06 ± 7,89	0,205
LKEF (%)	48,69 ± 9,42	44,60 ± 10,44	0,029

LP-leva pretkomora, LK EDD-dijastolna dimenzija leve komore, LK ESD-sistolna dimenzija leve komore, EF-ejekciona frakcija leve komore

U tabeli 58 su prikazane angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL).

Tabela 58. Angiografske karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
Višesudovna koronarna bolest (%)	59,5	59,1	0,974
Infarktina arterija (%)			0,125
LAD (%)	34,5	61,9	
LCX (%)	20,4	14,3	
RCA (%)	44,2	23,8	
LM (%)	0,9	0,0	

LAD-leva prednja silazna koronarna arterija, RCA-desna koronarna arterija, Cx-leva cirkuleksna koronarna arterija, LM-glavno stablo leve koronarne arterije

U tabelama 59 i 60 su prikazane proceduralne i postproceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL).

Tabela 59. Proceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP<720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
Broj implantiranih stentova	1(1,2)	1(1,1)	0,281
Metalni stent (%)	94,6	89,5	0,384
Stent sa oslobađanjem leka (%)	2,7	10,5	0,099
Maksimalna širina stenta (mm)	3,25 (3–3,5)	3,5 (2,8–3,5)	0,742
Maksimalna dužina stenta (mm)	20 (18–23)	20 (15,5–27,5)	0,902

Tabela 60. Postproceduralne karakteristike bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
Finalni protok TIMI 3 (%)			0,938
TIMI protok 0	1,3	0,0	
TIMI protok 1	1,3	0,0	
TIMI protok 2	6,6	10,0	
TIMI protok 3	90,8	90,0	
Akutna okluzija stenta (%)	3,5	0,0	0,354

TIMI- trombolize u infarktu miokarda

U tabeli 61 prikazan je primenjena terapija kod bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL).

Tabela 61. Primenjena terapija kod bolesnika sa STEMI u niskoj (BNP <720 pg/mL) i visokoj BNP grupi (BNP ≥720 pg/mL)

	Grupa sa BNP <720 pg/mL (n=124)	Grupa sa BNP ≥720 pg/mL (n=65)	P
NFH/NMH (%)	95,2	93,9	0,757
ACE inhibitori/ARB (%)	72,7	84,0	0,241
Diuretici (%)	21,7	42,3	0,030
Statini (%)	91,3	92,3	0,868

NFH-nefrakcionisani heparin, NMH-niskomolekularni heparin, ACE inhibitori, ARB-antagonisti angiotenzinskih receptora

Utvrđena je statistički značajna korelacija između koncentracije BNP u plazmi i starosne dobi bolesnika ( $\rho=0,182$ ,  $p=0,016$ ), TnI ( $\rho=0,233$ ,  $p=0,002$ ), hs-CRP ( $\rho=0,223$ ,  $p=0,004$ ), prednjeg infarkta ( $\rho=0,181$ ,  $p=0,015$ ) i Kilip klase na prijemu ( $\rho=0,155$ ,  $p=0,038$ ), kao i dijametra leve pretkomore ( $\rho=0,160$ ,  $p=0,041$ ), LKESD ( $\rho=0,195$ ,  $p=0,015$ ), i LKEF ( $\rho= -0,162$ ,  $p=0,030$ ).

Univarijantnom logističkom regresijom utvrđeno je da je BNP značajan prediktor AF (OR 3,80 (95 % CI 1,46–9,85, P=0,006)). U multivarijantnoj logističkoj regresionoj analizi, BNP je bio nezavisan prediktor AF sa OR 3,70 (95 % CI 1,40–9,77; P=0,008) (Tabela 62).



Tabela 62. Univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza za predikciju AF

Varijable	OR (95 % CI)	P
“Unadjusted” model		
lnBNP	3,80 (1,46–9,85)	0,006
“Multivarijantni” model		
lnBNP	3,70 (1,40–9,77)	0,008
lnTnI	1,42 (0,48–4,19)	0,520
lnhs-CRP	1,58 (0,63–3,97)	0,329
Leukociti	0,98 (0,73–1,31)	0,893
Starost	1,00 (0,93–1,08)	0,853
Pol	1,74 (0,42–7,13)	0,439
Hipertenzija	1,79 (0,34–9,32)	0,485
Dijabetes melitus	2,10 (0,24–18,41)	0,502
Prednji AIM	6,48 (0,75–55,36)	0,088
Kilip klasa >1 na prijemu	1,98 (0,35–11,08)	0,434
LKEF (%)	1,03 (0,95–1,12)	0,364
eGFR	0,96 (0,92–1,00)	0,103

95% CI-95% interval pouzdanosti, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, TnI-troponin I, hs-CRP-C-reaktivni protein određen testom velike osjetljivosti, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije

#### 4.6. Povezanost biomarkera sa udaljenom prognozom u bolesnika sa STEMI, odnosno bolesnika sa prvim prednjim STEMI

S obzirom da je u grupi sa STEMI u toku jednogodišnjeg praćenja umrlo samo dva bolesnika, nije analizirana povezanost biomarkera sa jednogodišnjim mortalitetom.

U tabeli 63 prikazani su rezultati univarijantne i multivarijantne analize za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Nezavisni prediktori pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod ovih bolesnika bila je višesudovna koronarna bolest.

Tabela 63. Cox-ova regresiona analiza za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod bolesnika sa STEMI

Varijable	OR (95 % CI)	P
<i>Univarijantna analiza</i>		
Starost	0,997 (0,953–1,042)	0,877
Pol	1,034 (0,393–2,720)	0,947
BMI	1,000 (0,994–1,005)	0,924
Hipertenzija	1,086 (0,407–2,893)	0,869
Dijabetes melitus	2,945 (0,392–22,129)	0,294
Hiperholesterolemija	1,468 (0,551–3,911)	0,443
Pušenje	1,764 (0,581–5,359)	0,317
Višesudovna koronarna bolest	2,764 (1,051–7,274)	0,039
Vreme od početka simptoma	0,908 (0,720–1,147)	0,419
Anteriorni AIM	4,204 (0,967–18,286)	0,056
AF	1,451 (0,194–10,868)	0,717
VF/VT	1,445 (0,412–5,071)	0,566
Kilip klasa tokom hospitalizacije >2	1,906 (0,440–8,250)	0,388
LKEF (%)	1,032 (0,982–1,086)	0,215
eGFR <60 mL/min	1,594 (0,562–4,525)	0,381
Pik TnI	1,002 (0,990–1,014)	0,750

Pik mase CK-MB	1,002 (0,998–1,005)	0,406
Pik NT-proBNP	1,000 (0,999–1,001)	0,704
Pik BNP	1,000 (0,999–1,001)	0,431
Pik CRP	1,004 (0,988–1,020)	0,644
Pik MPO	1,000 (1,000–1,000)	0,759
Pik PAPP-A	1,037 (1,001–1,074)	0,043
Pik sCD40L	1,034 (0,720–1,484)	0,857
Pik oksLDL	1,000 (0,982–1,018)	0,987
Pik leukociti	1,063 (0,912–1,240)	0,436
Pik glukoze	1,006 (0,908–1,114)	0,916
Pik mokraćne kiseline	1,003 (0,997–1,009)	0,312
<i>Multivarijantna analiza</i>		
Višesudovna koronarna bolest	3,229 (1,151–9,059)	0,026

BMI-indeks telesne mase, AIM-akutni infarkt miokarda, AF-atrijalna fibrilacija, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-MB izoenzim kreatin kinaze, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, PAPP-A- protein udružen sa trudnoćom, L-ligand, oks-oksidovani.

U tabeli 64 prikazani su rezultati univarijantne i multivarijantne analize za predikciju jednogodišnjeg mortaliteta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI. Nezavisni prediktori jednogodišnjeg mortaliteta kod ove grupe bolesnika bili su pik vrednosti mase CK-MB, Kilip klasa tokom hospitalizacije>2, eGFR<60mL/min.

Tabela 64. Cox–ova regresiona analiza za predikciju jednogodišnjeg mortaliteta kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Varijable	OR (95 % CI)	P
<i>Univarijantna analiza</i>		
Starost	1,075 (0,972–1,189)	0,157
Pol	7,481 (0,778–71,952)	0,081
BMI	1,071 (0,826–1,389)	0,605
Hipertenzija	0,925 (0,096–8,896)	0,946
Dijabetes melitus		0,504
Hiperholesterolemija	0,832 (0,117–5,910)	0,854
Pušenje	1,860 (0,262–13,204)	0,535
Višesudovna koronarna bolest	2,904 (0,302–27,916)	0,356
Vreme od početka simptoma	0,996 (0,536–1,850)	0,990
AF	5,047 (0,524–48,599)	0,161
Kilip klasa tokom hospitalizacije >2	12,748 (1,326–122,558)	0,028
LKEF (%)	0,939 (0,846–1,043)	0,238
eGFR < 60mL/min	10,267 (1,443–73,052)	0,020
Pik TnI	1,009 (1,002–1,015)	0,015
Pik mase CK-MB	1,003 (1,001–1,006)	0,007
Pik NT-proBNP	1,000 (1,000–1,000)	0,167
Pik BNP	1,003 (0,999–1,006)	0,152
Pik CRP	1,011 (1,002–1,020)	0,022
Pik MPO	1,002 (1,000–1,004)	0,068
Pik PAPP-A	1,010 (0,984–1,037)	0,450
Pik LpPLA <sub>2</sub>	1,002 (0,993–1,011)	0,641
Pik sCD40L	2,639 (1,009–6,900)	0,048
Pik oksLDL	0,987 (0,930–1,047)	0,657
Pik leukociti	1,117 (0,982–1,272)	0,093
Pik glukoze	1,053 (0,815–1,360)	0,692
Pik mokraćne kiseline	1,000 (0,987–1,014)	0,964

<i>Multivarijantna analiza</i>		
Kilip klasa tokom hospitalizacije >2	19,031 (1,190–304,315)	0,037
eGFR < 60mL/min	22,635 (1,645–311,509)	0,020
Pik mase CK-MB	1,004 (1,000–1,007)	0,038

BMI-indeks telesne mase, AF-atrijalna fibrilacija, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-MB izoenzim kreatin kinaze, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, PAPP-A-protein udružen sa trudnoćom, L-ligand, oks-oksidovani.

U tabeli 65 prikazani su rezultati univarijantne i multivarijantne analize za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI. Nezavisni prediktori pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod ovih bolesnika bili su pojava AF i pik vrednosti mase CK-MB.

Tabela 65. Cox-ova regresiona analiza za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Varijable	OR (95 % CI)	P
<i>Univarijantna analiza</i>		
Starost	0,992 (0,941–1,046)	0,772
Pol	1,913 (0,540–6,782)	0,315
BMI	0,971 (0,793–1,190)	0,779
Hipertenzija	1,041 (0,216–5,010)	0,960
Dijabetes melitus	2,384 (0,298–19,063)	0,413
Hiperholesterolemija	1,835 (0,518–6,5059)	0,347
Pušenje	2,722 (0,768–9,651)	0,121
Višesudovna koronarna bolest	1,167 (0,313–4,345)	0,818
Vreme od početka simptoma	1,102 (0,764–1,590)	0,603
AF	5,920 (1,520–23,058)	0,010
Kilip klasa tokom hospitalizacije >2	4,502 (0,570–35,535)	0,154

LKEF (%)	0,983 (0,923–1,046)	0,587
eGFR <60 ml/min	2,453 (0,521–11,557)	0,257
Pik TnI	1,005 (1,000–1,010)	0,047
Pik mase CK-MB	1,002 (1,000–1,004)	0,039
Pik NT-proBNP	1,000 (1,000–1,000)	0,791
Pik BNP	1,000 (0,999–1,003)	0,941
Pik CRP	1,007 (1,000–1,014)	0,052
Pik MPO	1,001 (1,000–1,003)	0,164
Pik PAPP-A	1,007 (0,987–1,027)	0,511
Pik LpPLA <sub>2</sub>	1,003 (0,998–1,009)	0,262
Pik sCD40L	1,402 (0,727–2,705)	0,314
Pik oksLDL	0,995 (0,959–1,032)	0,777
Pik leukociti	1,025 (0,904–1,163)	0,700
Pik glukoze	0,947 (0,756–1,185)	0,632
Pik mokraćne kiseline	1,005 (0,996–1,014)	0,271
<i>Multivarijantna analiza</i>		
AF	8,402 (1,905–37,061)	0,005
Pik mase CK-MB	1,003 (1,001–1,005)	0,005

BMI-indeks telesne mase, AF-atrijalna fibrilacija, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije, TnI-troponin I, CK-MB-izoenzim kreatin kinaze, BNP- B-tip natriuretičkog peptida, NT-proBNP-N-terminalni pro B-tip natriuretičkog peptida, hsCRP-C-reaktivni protein određen testom velike osetljivosti, MPO-mijeloperoksidaza, LpPLA<sub>2</sub>-lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub>, PAPP-A-protein udružen sa trudnoćom, L-ligand, oks-oksidovani.

#### 4.7. Grupisanje citokina, solubilnih citokinskih receptora, solubilnih adhezionih molekula i molekula funkcionalno povezanih sa citokinima eksploratornom faktorskom analizom kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI

Pre faktorske analize potrebno je proveriti podobnost korelacione matrice za faktorizaciju. Determinanta je iznosila 0,007. Primenom Bartletovog testa sferičnosti koji testira nultu hipotezu da je matrica interkorelacija varijabli uključenih u proceduru matrica identiteta dobijen je  $\chi^2=135,72$ ,  $P=0,000$ . Određena je anti-image korelaciona matrica i svaka varijabla je testirana merenjem adekvatnosti uzorka (MSA). Vrednost Kaiser-Meyer-Olkin mere adekvatnosti uzorkovanja (MSA) bila je 0,548. Varijable sa MSA vrednošću  $<0,5$  nisu uključene u dalju analizu. U faktorsku analizu je uključeno 12 manifestnih varijabli.

U tabeli 66 je prikazana matrica komunaliteta koja sadrži podatke o inicijalnom komunalitetu (deo varijanse varijable koji ona deli sa ostalim varijablama), kao i komunalitet nakon ekstrakcije faktora (deo varijanse svake varijable koji je objašnjen ekstrahovanim faktorima).

Tabela 66. Matrica komunaliteta

	Svojstvena vrednost	Ekstrakcija
sICAM-1	1,000	0,826
sE-sel	1,000	0,817
SL-sel	1,000	0,699
logIL6	1,000	0,681
logIL7	1,000	0,465
logIL8	1,000	0,728
logIL15	1,000	0,544
logMCP1	1,000	0,747
logMIP-a	1,000	0,478
logsTNFR1	1,000	0,796
sTNFR2	1,000	0,805
MMP-9	1,000	0,524

### Faktorska analiza

Analiza glavnih komponenti korišćena je kao metoda faktorske analize. Kod izbora broja faktora korišćen je Kaiserov kriterijum-kriterijum svojstvene vrednosti (latentnog korena) prema kome količina varijabiliteta objašnjenog svakim faktorom mora biti veća od 1, kriterijum procenta varijanse i kriterijum skri testa.

Rezultati dobijeni analizom glavnih komponenti sa 12 varijabli prikazane su u tabeli 63. U prvoj koloni je prikazan latentni koren koji predstavlja varijansu objašnjenu glavnom komponentom, iskazanu u terminima manifestnih varijabli. U sledećoj koloni prikazan je procenat varijanse koju objašnjava glavna komponenta, a u trećoj koloni kumulativni procenat varijanse objašnjene glavnim komponentama.

Prema rezultatima iz tabele 67 uočljivo je da prema Kaiserovom kriterijumu može ekstrahovati četiri faktora kod kojih je svojstvena vrednost veća od jedan. Prema udelu objašnjene ukupne varijanse model sa četiri faktora objašnjava 67,6% varijabilnosti, te su ti modeli prihvatljivi u daljoj analizi. U ovom rešenju prvi faktor objašnjava 27,9% ukupne varijanse, drugi faktor objašnjava 18,9%, treći faktor 10,8%, a četvrti faktor 10,23%.

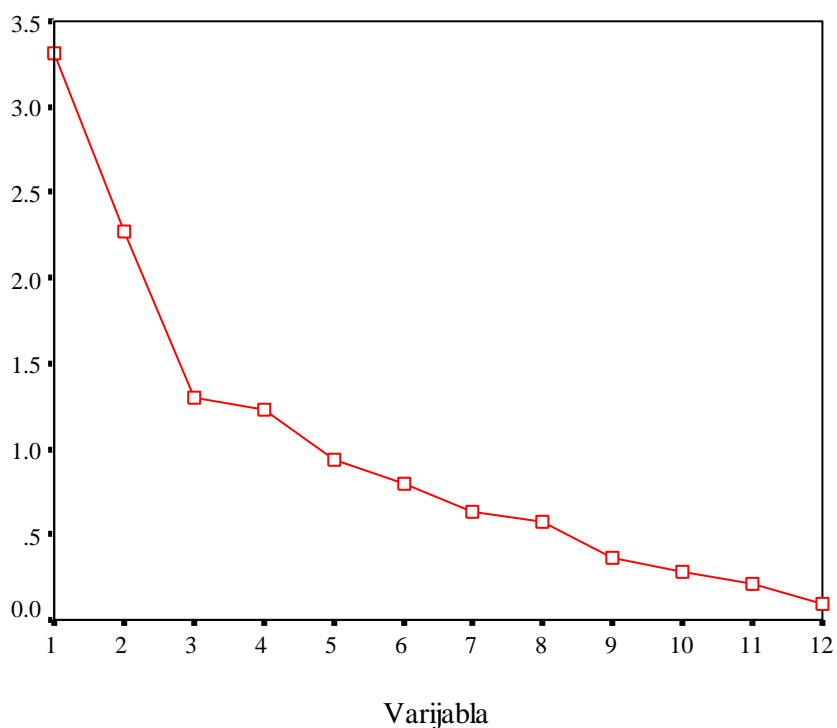
Tabela 67. Ukupna objašnjena varijansa sa uključenih 12 manifestnih varijabli u polaznom modelu i modelu sa ekstrahovanim faktorima-nerotirana faktorska rešenja

Polazne manifestne varijable	Polazni model			Model sa ekstrahovanim faktorima-bez rotacije		
	Svojstvena vrednost	% od ukupne varijanse	Kumulativni % od ukupne varijanse	Svojstvena vrednost	% od ukupne varijanse	Kumulativni % od ukupne varijanse
1	30,310	27,582	27,582	30,310	27,582	27,582
2	20,275	18,958	46,540	20,275	18,958	46,540
3	10,297	10,810	57,350	10,297	10,810	57,350
4	10,228	10,236	67,586	10,228	10,236	67,586
5	0,940	7,830	75,416			



6	0,800	6,669	82,085			
7	0,628	5,236	87,321			
8	0,569	4,739	92,060			
9	0,361	3,012	95,072			
10	0,283	2,360	97,432			
11	0,211	1,758	99,190			
12	0,097	0,810	100,000			

Na slici 17 prikazan je Cattelijev dijagram (scree plot) za 12 varijabli koji se takođe primenjuje za određivanje broja značajnih faktora. On predstavlja grafički prikaz svojstvenih vrednosti (latentnih korenova) po faktorima. Vizuelno, prema dijagramu se takođe izdvajaju četiri faktora.



Slika 17. Cattelijev dijagram

Nakon ekstrahovanja faktora dobija se matrica komponenti bez rotacije prikazana u tabeli 68.

Tabela 68. Matrica komponenti-nerotirana faktorska rešenja

Varijable	Faktori			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
logMCP1	0,804			
logsTNFR1	0,712			
logIL8	0,609			
logIL15	0,601			
sE-selektin	0,593			
logIL6	0,567		-0,520	
sICAM-1		-0,742		
sE-selektin		-0,637		
sTNFR2	0,534	0,614		
MMP-9		0,508		
logMIP-1 $\alpha$				0,510
logIL7				

Ortogonalnom rotiracijom faktora „varimax“ metodom, varijansa se raspodeljuje sa faktora koji je prvi po redu na naredne faktore. Na taj način se dolazi do jednostavnije strukture u kontekstu tumačenja, bez promene ukupne varijanse. Rezultati dobijeni analizom glavnih komponenata sa rotacijom faktora sa 12 varijabli prikazani su u tabeli 69.

Tabela 69. Ukupna objašnjena varijansa sa uključenih 12 varijabli-rotirana faktorska rešenja

Polazne manifestne varijable	Model sa ekstrahovanim faktorima-sa rotacijom		
	Svojstvena vrednost	% od ukupne varijanse	Kumulativni % od ukupne varijanse
Faktor 1	2,278	18,982	18,982
Faktor 2	2,258	18,815	37,796
Faktor 3	2,129	17,741	55,537
Faktor 4	1,446	12,049	67,586

Četiri faktora objašnjava 67,6% varijanse što se može smatrati zadovoljavajućim u modelu sa 12 varijabli.

U tabeli 70 prikazana je matrica komponenti sa rotacijom. Ona u stvari pokazuje faktorska opterećenja, odnosno koeficijente korelacije originalnih varijabli sa dobijenim faktorima.

I u rotiranom rešenju četiri faktora zadovoljavaju kriterijum svojstvene vrednosti i kriterijum procenta ukupne varijanse. Varijable sa faktorskim opterećenjem nakon rotacije većim od 0,5 (objašnjavaju 25% varijanse) značajno doprinose faktoru. Varijable sa faktorskim opterećenjem nakon rotacije od 0,4–0,5 (objašnjavaju 16–25% varijanse) potencijalno mogu doprinosti specifičnom faktoru. Primarni značaj za interpretaciju imaju one manifestne varijable koje su u najvećoj korelaciji s datim faktorom, a u zanemarljivoj (ili nisu u korelaciji) sa ostalim faktorima.

Tabela 70. Matrica komponenti-rotirana faktorska rešenja

Varijable	Faktori			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
sTNFR2	0,876	-0,030	0,164	-0,104
logsTNFR1	0,809	0,186	0,322	-0,059
MMP-9	0,661	-0,171	-0,164	0,174
sICAM-1	-0,115	0,900	0,054	0,021
sE-selektin	0,068	0,819	-0,160	0,341
sL-selektin	0,023	0,723	0,414	-0,064
logIL8	-0,050	0,279	0,803	-0,044
logIL6	0,140	-0,149	0,773	0,203
logMCP1	0,468	0,092	0,656	0,298
logMIP-1 $\alpha$	0,105	-0,012	0,118	0,673
logIL7	0,308	-0,068	0,046	-0,603
logIL15	0,231	0,280	0,285	0,576

U tabeli 71 je prikazana matrica komponenti sa rotacijom koja je uključivala samo varijable sa faktorskim opterećenjama većim od 0,5.

Tabela 71. Matrica komponenti-rotirana faktorska rešenja

Varijable	Faktori			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
sTNFR2	0,876			
logsTNFR1	0,809			
MMP-9	0,661			
sICAM-1		0,900		
sE-selektin		0,819		
sL-selektin		0,723		
logIL8			0,803	
logIL6			0,773	
logMCP1			0,656	
logMIP-1 $\alpha$				0,673
logIL7				-0,603
logIL15				0,576

Interpretacija faktora polazi od matrice faktorske strukture nakon rotacije faktora i identifikacije varijabli koje imaju visoka apsolutna opterećenja na isti faktor. Prvi faktor obuhvata sledeće varijable logsTNFR1, sTNFR2, MMP-9. Drugi faktor obuhvata sledeće varijable: sICAM-1, sE-selektin i L-selektin. Treći faktor obuhvata sledeće varijable log IL-6, log IL-8 i log MCP-1. Četvrti faktor obuhvata log MIP-1 $\alpha$ , log IL7 i log IL15.

Zatim izračunavamo faktorske skorove za naš uzorak linearnim kombinovanjem varijabli. Tabela 72 prikazuje matricu koeficijenata koja je korišćena za dobijanje faktorskih skorova.

Tabela 72. Faktorski skorovi za svaku varijablu pojedinačno

Varijable	Faktori			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
sICAM-1	-0,030	0,427	-0,058	-0,082
sE-selektin	0,089	0,387	-0,239	0,184
sL-selektin	-0,033	0,312	0,157	-0,167
logIL6	-0,083	-0,182	0,423	0,087
logIL7	0,159	0,038	0,039	-0,458
logIL8	-0,160	0,042	0,449	-0,143
logIL15	0,060	0,051	0,032	0,368
logMCP-1	0,110	-0,046	0,256	0,136
logMIP-1 $\alpha$	0,013	-0,087	-0,017	0,492
logsTNFR1	0,356	0,093	0,022	-0,117
sTNFR2	0,410	0,013	-0,051	-0,114
MMP-9	0,350	-0,055	-0,214	0,149

U tabeli 73 prikazani su rezultati Kolmogorov-Smirnov testa koji pokazuju da su skorovi faktora normalno distribuirani, te na pouzdan način grupišu varijable u faktorima.

Tabela 73. Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa

	Skor faktora 1	Skor faktora 2	Skor faktora 3	Skor faktora 4
Kolmogorov-Smirnov Z	0,598	10,053	10,091	0,843
P (dvostrani test)	0,867	0,217	0,185	0,476

#### **4.8. Univarijantna, multivarijantna i ROC analiza povezanosti citokina, citokinskih receptora i adhezivnih molekula sa kratkoročnom i jednogodišnjom prognozom kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI**

Za nekoliko biomarkera koji pripadaju različitim faktorima (reprezentativno), urađena je univarijantna/multivarijantna logistička regresiona analiza, odnosno Cox-ova univarijantna/multivarijantna logistička regresija i analiza ROC krive za predikciju pojave smrtnog ishoda u bolnici i pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta, kao i predikciju smrtnog ishoda i pojave NKVD u toku 1-godišnjeg praćenja. Analizirana je i površina ispod ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih prediktora (starost, pol, BMI, hipertenzija, pušenje, hiperholesterolemija, porodična istorija, srčana insuficijencija pri prijemu, višesudovna koronarna bolest) za predikciju smrtnog ishoda u bolnici i 1-godišnjem praćenju i predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta i u 1-godišnjem praćenju. Da bi uporedili sposobnost različitih logističkih modela da diskriminišu bolesnike sa i bez određenog ishoda, izračunata je c-statistika koja je analogna površini ispod ROC krive.

U tabeli 74 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za E-selektin i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti E-selektina za predikciju smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju E-selektina i uobičajenih prediktora za smrtni ishod u bolnici nakon infarkta miokarda.

Tabela 74. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za E-selektin i uobičajene prediktore smrtnog ishoda u bolnici

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,044	0,985–1,106	0,152	0,704	0,174	0,395–1,000
UP				0,964	0,001	0,914–1,000
E-selektin + UP	1,114	0,924–1,344	0,259	0,965	0,002	0,898–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 75 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta za E-selektin i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti E-selektina za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta za kombinaciju E-selektina i uobičajenih prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Tabela 75. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za E-selektin i uobičajene prediktore pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,040	0,991–1,091	0,114	0,609	0,349	0,326–0,892
UP				0,904	0,000	0,825–0,982
E-selektin + UP	1,031	0,968–1,097	0,341	0,884	0,001	0,766–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 76 su prikazani:

- a) rezultati Cox–ove univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja za E-selektin i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti E-selektina za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju E-selektina i uobičajenih prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Tabela 76. Cox–ova univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za E-selektin i uobičajene prediktore pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,011	0,948–1,077	0,743	0,533	0,830	0,240–0,825
UP				0,934	0,004	0,871–0,998
E-selektin + UP	1,168	0,940–1,452	0,161	0,933	0,005	0,855–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 77 prikazana su:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za E-selektin i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti E-selektina za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;



- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobicajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju E-selektina i uobicajenih prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja.

Tabela 77. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za E-selektin i uobicajene prediktore pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	0,993	0,942–1,048	0,806	0,537	0,740	0,320–0,754
UP				0,797	0,004	0,626–0,968
E-selektin + UP	0,997	0,941–1,056	0,914	0,808	0,006	0,642–0,974

UP-uobicajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 78 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za MCP-1 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti MCP-1a za predikciju smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobicajenih (iz literature poznatih) prediktora smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju MCP-1 i uobicajenih prediktora za smrtni ishod u bolnici nakon infarkta miokarda.

Tabela 78. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za MCP-1 i uobičajene prediktore smrtnog ishoda u bolnici

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,008	1,003–1,012	0,001	0,812	0,012	0,573–1,000
UP				0,964	0,001	0,914–1,000
E-selektin + UP	1,020	0,992–1,049	0,165	0,841	0,006	0,593–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 79 su prikazani:

- rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za MCP-1 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti MCP-1a za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju MCP-1 i uobičajenih prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Tabela 79. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za MCP-1 i uobičajene prediktore pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,007	1,003–1,010	0,001	0,803	0,003	0,631–0,975
UP				0,904	0,000	0,825–0,982
E-selektin + UP	1,013	1,001–1,025	0,038	0,972	0,000	0,931–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 80 prikazana su:

- a) rezultati Cox-ove univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja za MCP-1 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti MCP-1a za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju MCP-1 i uobičajenih prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Tabela 80. Cox-ova univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za MCP-1 i uobičajene prediktore pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,004	0,998–1,010	0,239	0,675	0,244	0,413–0,937
UP				0,934	0,004	0,871–0,998
E-selektin + UP	1,020	0,992–1,049	0,165	0,948	0,003	0,874–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 81 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za MCP-1 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti MCP-1a za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;

- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobicajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju MCP-1 i uobicajenih prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja.

Tabela 81. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za MCP-1 i uobicajene prediktore pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,001	0,996–1,007	0,633	0,574	0,500	0,403–0,745
UP				0,797	0,004	0,626–0,968
E-selektin + UP	1,003	0,996–1,009	0,464	0,810	0,005	0,625–0,995

UP-uobicajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 82 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za IL-15 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti IL-15 za predikciju smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobicajenih (iz literature poznatih) prediktora smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju IL-15 i uobicajenih prediktora za smrtni ishod u bolnici nakon infarkta miokarda.

Tabela 82. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za IL-15 i uobičajene prediktore smrtnog ishoda u bolnici

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,855	0,776–4,435	0,165	0,764	0,032	0,578–0,950
UP				0,964	0,001	0,914–1,000
E-selektin + UP	4,796	0,945–24,336	0,059	0,977	0,000	0,935–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ).

U tabeli 83 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za IL-15 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti IL-15 za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju IL-15 i uobičajenih prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Tabela 83. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za IL-15 i uobičajene prediktore pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	1,660	0,741–3,717	0,218	0,716	0,027	0,564–0,869
UP				0,904	0,000	0,825–0,982
E-selektin + UP	2,949	0,784–11,098	0,110	0,909	0,000	0,830–0,987

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 84 su prikazani:

- a) rezultati Cox-ove univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja za IL-15 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti IL-15 za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju IL-15 i uobičajenih prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Tabela 84. Cox-ova univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za IL-15 i uobičajene prediktore pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	0,515	0,032–8,182	0,638	0,647	0,328	0,282–1,000
UP				0,934	0,004	0,871–0,998
E-selektin + UP	0,134	0,001–20,540	0,434	0,951	0,003	0,891–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 85 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za IL-15 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti IL-15 za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;

- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju IL-15 i uobičajenih prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja.

Tabela 85. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za IL-15 i uobičajene prediktore pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	0,279	0,029–2,637	0,265	0,634	0,174	0,439–0,829
UP				0,797	0,004	0,626–0,968
E-selektin + UP	0,226	0,011–4,794	0,340	0,846	0,001	0,725–0,968

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 86 su prikazani:

- rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za sTNFR2 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti sTNFR2 za predikciju smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora smrtnog ishoda u bolnici nakon infarkta miokarda;
- rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju sTNFR2 i uobičajenih prediktora za smrtni ishod u bolnici nakon infarkta miokarda.

Tabela 86. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za sTNFR2 i uobičajene prediktore smrtnog ishoda u bolnici

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	2,803	0,599–13,109	0,190	0,602	0,444	0,254–0,951
UP				0,964	0,001	0,914–1,000
E-selektin + UP	0,469	0,017–12,890	0,654	0,959	0,001	0,901–1,000

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

U tabeli 87 su prikazani:

- rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za sTNFR2 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti sTNFR2 za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta;
- rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju sTNFR2 i uobičajenih prediktora pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Tabela 87. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za sTNFR2 i uobičajene prediktore pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	5,043	1,440–17,664	0,011	0,716	0,035	0,495–0,936
UP				0,904	0,000	0,825–0,982
E-selektin + UP	4,063	0,468–35,255	0,204	0,915	0,000	0,847–0,983

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive



Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 88 su prikazani:

- a) rezultati Cox-ove univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja za sTNFR2 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti sTNFR2 za predikciju smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju sTNFR2 i uobičajenih prediktora pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Tabela 88. Cox-ova univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za sTNFR2 i uobičajene prediktore pojave smrtnog ishoda u toku 1-godišnjeg praćenja.

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	2,400	0,416–13,861	0,328	0,678	0,236	0,418–0,938
UP				0,934	0,004	0,871–0,998
E-selektin + UP	1,284	0,016–104,827	0,911	0,951	0,000	0,906–0,997

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P>0,05$ ).

U tabeli 89 su prikazani:

- a) rezultati univarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za sTNFR2 i rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti sTNFR2 za predikciju pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;

- b) rezultati analize ROC krive za procenu sposobnosti uobičajenih (iz literature poznatih) prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja;
- c) rezultati multivarijantne logističke regresione analize za predikciju smrtnog ishoda u bolnici za kombinaciju sTNFR2 i uobičajenih prediktora pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja.

Tabela 89. Univarijantna, multivarijantna logistička regresiona analiza i analiza ROC krive za sTNFR2 i uobičajene prediktore pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja

Model	OR	95% CI	P	AUC	P	95% CI
E-selektin	0,663	0,147–2,990	0,593	0,548	0,629	0,362–0,734
UP				0,797	0,004	0,626–0,968
E-selektin + UP	0,569	0,076–4,265	0,583	0,818	0,003	0,656–0,980

UP-uobičajeni prediktori, OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, AUC-površina ispod ROC krive

Poređenjem površina ispod ROC krivih nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ).

#### **4.9. Povezanost faktora dobijenih eksploratornom faktorskom analizom i kratkoročne prognoze kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI**

##### *Univarijantna analiza*

Univarijantna logistička regresiona analiza za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta urađena je za sva četiri faktora i za sve bazalne karakteristike. Rezultati su prikazani u tabeli 90. Najjači prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta bili su atrijalna fibrilacija, LKEF i faktor 3. Univarijantna logistička regresija pokazala je da su i faktor 2 i pušenje takođe statistički značajni prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Tabela 90. Univarijantna analiza

Varijabla	OR	95% CI	P
Faktor 1	1,922	0,797–4,635	0,146
Faktor 2	2,818	1,086–7,309	0,033
Faktor 3	4,332	1,142–16,432	0,031
Faktor 4	1,059	0,459–2,440	0,894
Starost	1,010	0,955–1,067	0,730
Muški pol	3,692	0,962–14,168	0,057
BMI	1,192	0,980–1,450	0,079
Hipertenzija	0,964	0,182–5,110	0,966
Dijabetes melitus	1,687	0,379–7,517	0,492
Hiperholesterolemija	3,216	0,780–13,268	0,106
Pušenje	4,667	1,123–19,385	0,034
Nasleđe	1,143	0,261–5,009	0,859
Atrijalna fibrilacija	5,786	1,184–28,272	0,030
Sistolni arterijski pritisak	0,971	0,941–1,001	0,058
Dijastolni arterijski pritisak	0,967	0,929–1,006	0,097
Srčana frekvencija	1,000	0,958–1,044	0,990
Kilip na prijemu >1	3,167	0,822–12,192	0,094
LKEF	0,930	0,874–0,990	0,023
Višesudovna koronarna bolest	1,730	0,400–7,481	0,463
eGFR <60 mL/min	1,458	0,276–7,717	0,657

OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti, BMI-indeks telesne mase, LKEF-ejekciona frakcija leve komore, eGFR-jačina glomerulske filtracije

### Multivarijantna analiza

U tabeli 91 su prikazani različiti multivarijantni logistički regresioni modeli.

U prvom modelu su kao kovarijate korišćeni dobijeni faktori, njih četiri. Za predikciju pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta, faktor 2 i faktor 3 su bili statistički značajni. U drugom modelu su uz faktore kao kovarijate dodati i svi značajni prediktori ishoda iz univarijantne analize. Značajni nezavisni prediktori za pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta su bili faktor 3 i faktor 2.

Tabela 91. Multivarijantana analiza

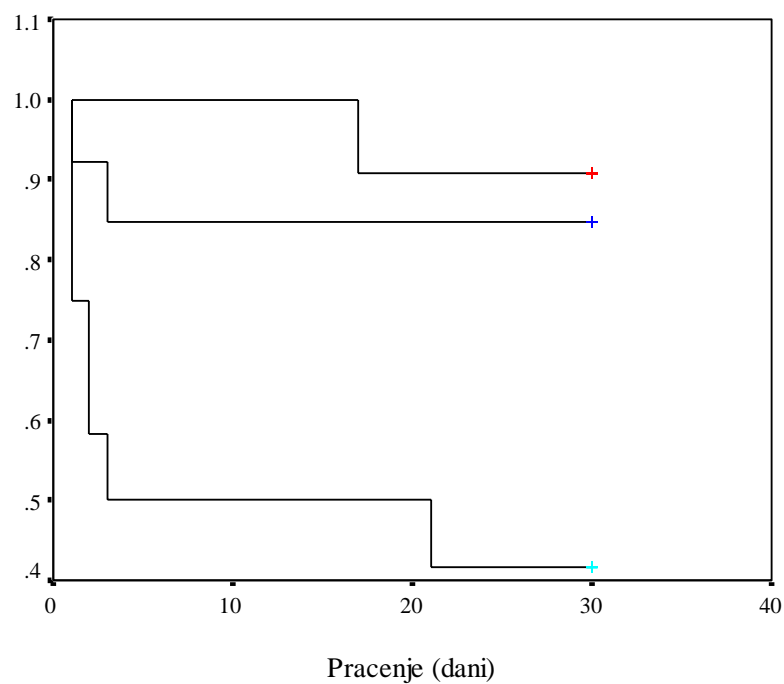
Varijabla	OR	95% CI	P
Model 1			
Faktor 2	3,686	1,157–11,740	0,027
Faktor 3	4,189	1,212–14,473	0,024
Model 2			
Faktor 2	3,503	1,093–11,232	0,035
Faktor 3	4,046	1,183-13,831	0,026

OR-odnos šansi, 95% CI-95% interval pouzdanosti

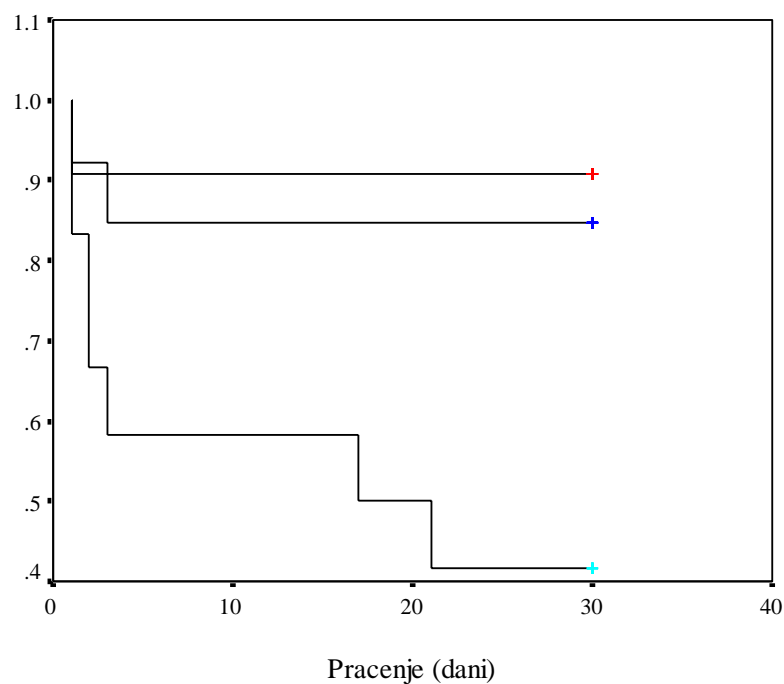
### Kaplan-Mayerova kriva preživljavanja

Slika 18 ilustruje distribuciju događaja kod bolesnika grupisanih prema tercilima individualnih skorova na faktoru 2. Bolesnici sa faktor 2 skorom u najvišem tercilu imali su češće NKVD u prvih 30 dana u poređenju sa ostalim tercilima.

Slika 19 ilustruje distribuciju događaja kod bolesnika grupisanih prema tercilima individualnih skorova na faktoru 3. Bolesnici sa faktor 3 skorom u najvišem tercilu imali su češće NKVD u prvih 30 dana u poređenju sa ostalim tercilima.



Slika 18. Distribucija događaja kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI grupisanih prema tercilima individualnih skorova na faktoru 2 ( $\chi^2=9,44$  Log Rank:P<0,01)



Slika 19. Distribuciju događaja kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI grupisanih prema tercilima individualnih skorova na faktoru 3 ( $\chi^2=8,37$  Log Rank:P=0,01)

## 5. DISKUSIJA

U Srbiji kao i u svetu evidentan je trend porasta broja obolelih od ishemijske bolesti srca. U Srbiji je ishemijska bolest srca veliki zdravstveni i socioekonomski problem. Čak 54,7% svih smrtnih ishoda je posledica kardiovaskularnih oboljenja. U Srbiji je tokom 2010. godine (prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović-Batut“) od infarkta sa elevacijom ST segmenta obolelo 7887 osoba, a smrtni ishod je zabeležen kod 9,2% (5). Ovoj alarmantnoj slici treba dodati i visoku stopu prevalencije tradicionalnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja (pušenje, hipertenzija, gojaznost, hiperlipidemija, dijabetes melitus). Uvođenje pPKI kao rutinskog metoda izbora u lečenju bolesnika sa STEMI od novembra 2005. godine je važna prekretnica u strategiji lečenja ovih bolesnika u Srbiji.

Nakon više od pet decenija istraživanja i velikog kliničkog iskustva, kardiolozi su jedinstveni u stavu da je pojedinačno najefikasnija terapija bolesnika sa STEMI brza i kompletna indukcija reperfuzije miokarda implementacijom revaskularizacije kulprit koronarne arterije. S druge strane, paradoksalno, literatura je prepuna radova o reperfuzionoj povredi koja može da se javi u toku izvođenja PKI i koja može da umani korisnost reperfuzije. Ova reperfuziona povreda je posledica reperfuzije, ali ona ne uključuje i dodatno oštećenje kardiomiocita.

Brojni dokazi ukazuju da reperfuzija ishemičnog miokarda može rezultirati ireverzibilnim oštećenjem tkiva. Vaskularni endotel strateški lociran između cirkulišuće krvi i sloja vaskularnih glatkih mišićnih ćelija igra značajnu ulogu u kontroli vazomotornog tonusa, lokalnoj homeostazi i adheziji leukocita. Postishemijska aktivacija endotelnih ćelija indukuje sekvencijalnu interakciju eksprimiranih adhezionih molekula i njihovih liganada na leukocitima i trombocitima, kao i sekreciju proinflamatornih molekula. Ovo vodi adheriranju, migraciji, akumulaciji leukocita unutar aterosklerotične lezije, kao i seriji događaja koji su blisko povezani sa inflamacijom. Nakon reperfuzije, inflamatorni odgovor udružen sa smanjenjem

mikrovaskularne perfuzije tkiva utiče na autokrino/parakrino oslobađanje različitih supstanci iz endotela i miokarda.

Nekoliko fenomena može da doprinese posledicama reperfuzije uključujući kiseonični i kalcijumski paradoks, kao i otvaranje mitohondrijalnih neselektivnih kanala unutrašnje membrane mitohondrija koje se javlja unutar prvih minuta od početka reperfuzije. Sledi influks kalcijuma u mitohondrije i iznenadna značajna promena ultrastrukture miokarda. Povećanje koncentracije kalcijuma aktivira kalcijum zavisne ATP-aze, što rezultira smanjenjem prisutnog ATP neophodnog za brojne procese. Iznenadna reoksigenacija ishemijom zahvaćenog miokarda indukuje oksidativni stres koji je deo kiseoničnog paradoksa u kome reoksigenacija ishemičnog miokarda generiše stepen oštećenja miokarda koji nekad umnogome prevazilazi povredu indukovanu samom ishemijom. Stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala sa daljom peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani koja može da poveća kalcijumski paradoks jedan je od predloženih mehanizama. Oksidativni stres tokom reperfuzije miokarda takođe redukuje biorasploživost intraćelijskih signalnih molekula, npr. NO koji ima kardioprotektivne efekte (inhibicija akumulacije neutrofila, inaktivacija superoksidnih radikala i poboljšanje koronarnog protoka) (750).

Reperfuzija može indukovati defekt u kontraktilnosti miokarda što negativno utiče na hemodinamski status bolesnika. Ovo može usloviti mikrovaskularne povrede koje leže u osnovi „no reflow“ fenomena. Takođe, može da doprinese produženju AIM sa hemoragijom i verovatno kasnijem remodelovanju leve komore i promenama performansi leve komore, kao i fibroze u regionima koji sadrže još uvek vijabilne kardiomiocyte i posledično dovede do srčane insuficijencije.

Sa biohemijske tačke gledišta, iako je poslednjih decenija PKI postala standard u lečenju STEMI, iako je poznato da otvaranje akutno okludirane arterije uzrokuje reperfuzionu povredu okarakterisanu akutnim inflamatornim odgovorom i oštećenjem miokarda, ne postoji dobar laboratorijski biomarker koji bi pomogao da se utvrdi reperfuzijom indukovano oštećenje miokarda i njegov doprinos finalnoj veličini

infarkta. Ovakvi markeri morali bi da imaju dobru osetljivost i dinamički opseg, ali osim toga od izuzetne važnosti bi bilo i da koreliraju sa odgovorom na terapiju.

Treba imati u vidu da dodatna posledica reperfuzije uključuje biohemijske manifestacije kao što je ubrzani „washout“ makromolekula, što rezultira pojavom (dodatnog) pika koncentracije biomarkera u krvi. Pojava tog pika koncentracije biomarkera može biti pogrešno interpretirana kao dokaz dodatne nekroze kardiomiocita, odnosno može da dovede do pogrešnog zaključka u odnosu na kvantitativnu povezanost veličine infarkta i koncentracije biomarkera u plazmi u određenim vremenskim intervalima. Iz navedenih razloga neophodno je poznavati vremenski profil biomarkera, tj. određivati biomarker u kratkim vremenskim razmacima kako bi se utvrdila njegova kinetika i vreme kada treba uzorkovati biološki materijal za određivanje ispitivanog biomarkera u prognostičke svrhe.

Poznato je da je uvođenje PKI smanjilo morbiditet i mortalitet bolesnika sa STEMI. Međutim, imajući u vidu sve napred navedeno, reperfuziona povreda bi mogla značajno da utiče na ranu i udaljenu prognozu bolesnika sa STEMI lečenih PKI. Višestruke analize varijabli iz velikih kliničkih istraživanja, kao skorova rizika, nisu rezultirale zadovoljavajućim modelom za rutinsku kliničku praksu koji bi optimalno razlikovao bolesnike s visokim od onih s niskim rizikom i jednako tako mogao optimalno procijeniti rizik neželjenog ishoda. Razlog verovatno leži u činjenici da bolesnici iz kliničkih istraživanja nemaju isti stepen rizika kao svakodnevni bolesnici iz kliničke prakse. Iako nekoliko skorova, a među njima najviše TIMI ili GRACE skor, pružaju prognostičke informacije i koriste se za identifikaciju visokorizičnih bolesnika, svako izračunavanje skorova predstavlja za lekare dodatno opterećenje. S toga bi bilo idealno odrediti laboratorijski biomarker ili kombinaciju biomarkera koji bi mogli da posluže u svrhu predikcije mortaliteta ili pojave NKVD u praćenju kod bolesnika sa STEMI.

U ovom istraživanju kao ciljna grupa izabrani su bolesnici sa STEMI lečeni pPKI. Ispitivane su dve grupe bolesnika sa STEMI. Prva grupa bolesnika obuhvatala je



200 bolesnika koji su konsekutivno primljeni u Urgentni centar sa bolom u grudima (kraćim od 12h od početka bola) i kod kojih je potvrđena dijagnoza STEMI. Na osnovu ostalih kriterijuma za uključivanje bolesnika u studiju može da se zaključi da je formirani uzorak reprezentativan, odnosno da odlikava realnu populaciju bolesnika koji su lečeni pPKI. Konsekutivnim uključivanjem bolesnika izbegnuta je pristrasnost izbora. Ovo istraživanje je unicentrično, tj. uključuje bolesnike samo iz jedne zdravstvene ustanove. Međutim, treba naglasiti da se u ovoj ustanovi, Kliničkom centru Srbije, u salama za kateterizaciju koje su otvorene 24h dnevno uradi oko 1000 pPKI godišnje, što i po broju i po rezultatima koji se ostvaruju svrstava Klinički centar Srbije u red iskusnijih evropskih i svetskih centara. Stručnost i iskustvo specijalno edukovanih interventnih kardiologa koji obavljaju PKI, kao i neinvazivnih kardiologa koji su odgovorni za preproceduralnu pripremu i postproceduralno lečenje obezbeđuje dodatni kvalitet ovom istraživanju.

Prva ispitivana grupa bolesnika sa STEMI nije bila homogena u odnosu na lokalizaciju infarkta i infarktne arterije već je odražavala „realni scenario“. Smatrali smo da bi istraživanje trebalo sprovesti i na homogenijoj grupi jer bi to bilo od velikog značaja za ispitivanje kinetike biomarkera nakon urađene pPKI, čime bi se obezbedila uniformnost oslobađanja biomarkera. S toga smo u dalje istraživanje uključili 100 konsekutivnih bolesnika sa prvim STEMI prednje lokalizacije uspešno lečenih primarnom PKI prednje descedentne grane leve koronarne arterije (rezidualna stenoza manja od 20% i TIMI protok 3) u Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije. Dodatni kriterijum homogenizacije grupe bilo je vreme od početka bola u grudima do prijema bolesnika u Urgentni centar kraće od 6 h. Učestalost uzorkovanja biološkog materijala za analiziranje biomarkera u osam vremenskih tačaka (pri prijemu bolesnika, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h, 48h, 168h po završenoj pPKI) daje dodatni kvalitet ovom istraživanju. Stratifikacija rizika u ovoj homogenoj grupi (koja se obično smatra niskorizičnom) je od velikog značaja u cilju selekcije visokorizičnih bolesnika koji će imati koristi od striktnog kliničkog praćenja. Zapravo, pouzdana stratifikacija rizika ima značajnu ulogu u lečenju bolesnika sa AKS, posebno onih sa STEMI. S obzirom da je istraživanje koje nije sastavni deo ove doktorske disertacije, uključivalo i ispitivanje

funkcije koronarne mikrocirkulacije merenjem rezerve koronarnog protoka kao fiziološkog načina procene i težine stenozе epikardne koronarne arterije i mikrovaskularne funkcije i vijabilnosti miokarda infarktne zone, globalne sistolne i dijastolne funkcije leve komore u ranoj fazi nakon AIM to je bio dodatni razlog da se grupa bolesnika homogenizuje.

Bolesnici sa prvim prednjim STEMI razlikovali su se u odnosu na bolesnike sa STEMI u dužini infarktne zone, prethodnom infarktu miokarda, lokalizaciji STEMI, uspešnosti primenjene reperfuzije i ušestalosti uzorkovanja biološkog materijala za analizu biomarkera. Prednost u analizi vremenskih profila biomarkera data je grupi bolesnika sa prvim prednjim STEMI jer su oni imali kraći vremenski period od početka infarktne zone do pPKI, prethodno nisu imali infarkt miokarda, imali su samo prednji STEMI, svi su imali kompletnu reperfuziju infarktne arterije (TIMI 3), a uzorkovanje biološkog materijala je bilo češće (u kraćim vremenskim intervalima). Dobijeni rezultati vremenskih profila tradicionalnih biomarkera nekroze (cTnI, masa CK-MB, mioglobin), inflamacije (CRP), hemodinamskog stresa (BNP, NT-proBNP) u ovoj studiji su u saglasnosti sa poznatim krivama promene koncentracija biomarkera u AIM. Dobijeni rezultati korelacije potvrđuju poznatu povezanost biomarkera nekroze (cTnI, mase CK-MB), markera inflamacije (CRP) i hemodinamskog stresa (NT-proBNP) sa LKEF.

Procenat NKVD i pojedinačnih neželjenih događaja u kratkoročnom i udaljenom praćenju ispitivane grupe bolesnika su u skladu sa podacima iz literature (17, 18, 26, 751–755). S obzirom da NKVD predstavlja kompozitni neželjeni događaj, vrlo je teško definisati nezavisne prediktore za sve pojedinačne događaje koji su uključeni u kompozitni događaj. U toku jednogodišnjeg praćenja utvrđeno je da se najveći broj smrtnih ishoda i NKVD desio u prvih 30 dana po infarktu miokarda. Ovo se može objasniti time da je rizik za trombozu metalnih stentova najveći u prvih 30 dana. Prema literaturnim podacima rizik za pojavu NKVD je najveći u prvim danima nakon infarkta miokarda (756). Uzrok mortaliteta kod naših bolesnika kako u kratkoročnom, tako i u udaljenom praćenju bio je kardiovaskularni. Bolesnici koji su razvili kardiogeni šok u toku hospitalizacije nisu bili uključeni u dalju analizu.

U ovom istraživanju kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI najznačajniji prediktori za pojavu smrtnog ishoda u bolnici od od kliničkih parametara bio je Kilip klasa na prijemu i LKEF, a od faktora rizika pušenje. Najznačajniji prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta bili su LKEF i pojava atrijske fibrilacije, a od faktora rizika takođe pušenje. Kao najbolji prediktor udaljenog mortaliteta pokazala se pojava atrijske fibrilacije kod bolesnika.

Kod bolesnika sa STEMI najznačajniji prediktor smrtnog ishoda u bolnici bila je Kilip klasa na prijemu i LKEF, najznačajniji prediktor za pojavu NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta Kilip na prijemu, LKEF, atrijska fibrilacija, a najbolji prediktori udaljenog mortaliteta infarkt prednjeg zida i višesudovna koronarna bolest.

Evidentno je da je procena rizika nakon AIM i dalje ima veliki značaj čak i u eri PKI, jer pomaže u selekciji bolesnika sa visokim rizikom od NKVD (757–759). S toga je sledeći korak bio da se utvrdi koji bi pojedinačni marker bio nezavisan prediktor ispitivanih ishoda (smrtnog ishoda u bolnici, smrtnog ishoda ili kompozitnog događaja (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, moždani udar, hitna revaskularizacija miokarda zbog ishemije) u praćenju). Iako je u ovom istraživanju utvrđeno više biomarkera koji su bili nezavisni prediktori ispitivanih ishoda, prikazani su rezultati koji se odnose na mijeloperoksidazu i lipoproteinsku fosfolipazu A<sub>2</sub>. Do skoro su ovi markeri određivani različitim principima i testovima različitih proizvođača. Najčešće, u objavljenim radovima je korišćena ELISA tehnika koja je prilično zametna za rad i dugo traje. Uvođenjem automatizovanih određivanja aplikovanih na velike biohemijske analizatore učinjen je značajan korak u približavanju ovih markera rutinskom određivanju. Ovo je u mnogome skratilo vreme određivanja i testove učinilo dostupnijim kliničarima, a da pri tom određivanje nije izgubilo na kvalitetu.

Poznato je da je MPO kao enzim leukocita, posebno polimorfonuklearnih neutrofila uključen u sve stadijume ateroskleroze (760). MPO katalizuje oksidativnu modifikaciju lipoproteina (761), redukuje biorasploživost endotelnog NO (762, 763), aktivira matriks metaloproteinaze i doprinosi rupturi aterosklerotičnog plaka (138, 764).

Poznato je da inflamacija predstavlja ključni mehanizam u AKS i da je povećan broj neutrofila i monocita prisutan u nestabilnom plaku ili nakon ruptуре plaka (765, 766). Zbog toga se pretpostavilo da MPO može da odslikava inflamaciju i destabilizaciju plaka (767, 768). U skladu s tim MPO je ispitivan kod zdravih osoba (142), bolesnika sa bolom u grudima (769), kao i bolesnika sa AKS (770–772). Nivoi MPO mogu da budu korisni za procenu rizika kod bolesnika sa AIM (773, 774). Nekoliko studija je ispitivalo povezanost između nivoa MPO i kratkoročne prognoze bolesnika sa STEMI koji su lečeni pPKI (775, 776). Međutim, evolucija povišenih nivoa MPO nakon pPKI kod bolesnika sa STEMI nije objašnjena. Step en oslobođanja MPO zavisi od brojnih faktora kao što su nekroza miocita i reperfuzija (777–779), od vremena uzimanja uzorka za određivanje MPO merenog od početka bola u grudima (780).

Jedan od ciljeva postavljenih u ovom istraživanju bio je da se ispita prediktivna vrednost nivoa MPO u plazmi u odnosu na smrtni ishod u bolnici kod bolesnika sa STEMI koji su lečeni pPKI. Nalazi koji su dobijeni u ovoj studiji doprinose rasvetljavanju potencijalne uloge MPO u proceni rizika kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. U literaturi je malo podataka o prognostičkoj vrednosti MPO kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI u predikciji kratkoročnog smrtnog ishoda u bolnici i pojave NKVD (775, 776). U ispitivanoj grupi bolesnika sa STEMI, MPO je identifikovan kao prediktor smrtnog ishoda u bolnici nezavisno od drugih klinički relevantnih kovarijata. Važno je naglasiti da MPO nije korelirao sa TnI. Ovaj nalaz je u skladu sa gledištem da MPO nije marker nekroze miokarda (769, 774). Poznato je da leukociti sekretuju MPO i da su odgovorni za oko 95% ukupnog MPO u cirkulaciji (781). Pozitivna korelacija između MPO i broja leukocita ukazuje na povećanu aktivaciju leukocita u stanju AIM (766, 769, 771, 782). Drugi značajan nalaz u ovom istraživanju je da se nivoi hsCRP nisu statistički značajno razlikovali između bolesnika u grupi sa nižim i grupi sa višim MPO. Ovo može da ukaže na to da aktivacija leukocita i oslobođanje MPO predstavlja patofiziološki mehanizam inflamacije u AIM koji se razlikuje od delovanja sistemskih medijatora kao što je npr. CRP. Ovo istraživanje takođe ukazuje da su viša Kilip klasa i smanjena LKEF klinički značajni za identifikaciju bolesnika sa većim rizikom od smrtnog ishoda (775, 783-786).

Prognostičke informacije koje nosi koncentracija MPO bile su nezavisne od BNP i jačine glomerularne filtracije, markera za koje je dobro poznato da reflektuju promene koje su rezultat smanjene funkcije leve komore, kao i opterećenja leve komore i bubrežne insuficijencije (787–789). Međutim, treba naglasiti da je cilj ovog istraživanja bio da ispita prediktivnu sposobnost MPO, ali ne i moguću ulogu MPO kao medijatora progresije bolesti.

Mada je pokazano da je MPO nezavisan prediktor povećanog smrtnog ishoda u bolnici, ostaje nejasno da li MPO na neki način može da doprinese komplikovanijem toku bolesti. MPO modulira proteazne kaskade i generiše nastanak citotoksičnih vrsta koje su povezane sa remodelovanjem leve komore nakon AIM (782, 790). Pokazano je da MPO povećava katabolizam NO tokom ishemije miokarda (763) i može negativno da utiče na mikrocirkulaciju nakon reperfuzije (779, 791), doprinoseći na taj način pogoršanju funkcije leve komore. Povezanost MPO sa najznačajnijim prediktorima može da ukaže na to da je MPO pre prediktor smrtnog ishoda nego uzročni faktor. Uzimajući u obzir da su leukociti glavni izvor MPO, dobijeni rezultati ukazuju da aktivacija leukocita uz povećano oslobađanje MPO može da se smatra značajnom karakteristikom AIM. Dalje studije su međutim neophodne da bi se ispitali patofiziološki mehanizmi aktivacije leukocita u AIM, kao i to da li lečenje može da se planira na osnovu određenih koncentracija MPO.

Iz svega navedenog može se zaključiti da su koncentracije MPO u plazmi nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.

Određivanje pojedinačnih vrednosti MPO pre pPKI (775, 776) povećava mogućnost da MPO ne reflektuje nekoliko aspekata postproceduralnog stanja bolesnika (779, 792–794). Zbog toga smo mi ispitivali optimalan vremenski period za uzimanje MPO da bi procenili rizik bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Osnovni cilj nam je bio da analiziramo kinetiku MPO i prognostičku vrednost MPO u odnosu na pojavu smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI koji su lečeni pPKI.

Ovo istraživanje koje je uključivalo samo bolesnike sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI dovelo je do nekoliko osnovnih zaključaka. Prvo, MPO u ispitivanoj grupi bolesnika pokazala je bifaznu krivu oslobađanja, pri čemu je prvi pik odgovarao MPO uzetom 4h nakon pPKI, a drugi pik MPO uzetom 24h nakon pPKI. Utvrđena je statistički značajna korelacija između drugog pika vrednosti MPO i vrednosti TnI, kao i srčane insuficijencije. Ovo istraživanje je prvo istraživanje koje je rađeno na jednoj homogenoj grupi: to su bili bolesnici sa prvim, prednjim STEMI koji su podvrgnuti pPKI u toku prvih 6h od početka bola u grudima i koje je prospektivno procenjivalo prognozu u odnosu na vremenski profil MPO. Koncentracija MPO 24h nakon intervencije bila je nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici.

Prethodno objavljena studija (795) analizirala je koncentracije MPO uzete tokom prvih 48 h (pri prijemu bolesnika, 12 h, 24 h i 48 h nakon intervencije) kod 58 bolesnika sa STEMI i pPKI. Autori su utvrdili bifazni odgovor MPO tokom vremena i identifikovali najviše koncentracije MPO pri prijemu bolesnika, značajno sniženje na 12h i blago povišenje na 24h. U poređenju sa prethodnom studijom, može se pretpostaviti da ovi autori nisu mogli da identifikuju pik na 4h, jer su analizirali MPO samo u uzorku pri prijemu bolesnika i 12h nakon završene pPKI. Ova hipoteza se dalje može potvrditi kratkim poluvremenom eliminacije MPO u plazmi koje iznosi oko 6h (796, 797).

Prethodne studije su određivale koncentracije MPO nakon koronarne angioplastike i pokazale da postproceduralno povećanje MPO može biti povezano sa oštećenjem plaka (792–794, 798). Ovo povišenje koncentracija MPO bilo je statistički značajno više u prisustvu kompleksnih lezija u poređenju sa jednostavnim lezijama (798). Brugger-Andersen i sar. (172) su ispitivali neposredne efekte koronarne reperfuzije na nivo MPO i utvrdili trend skoro dvostrukog povećanja koncentracija MPO nakon pPKI u vezi sa primenjenom tenekteplazom. U našoj studiji, MPO na 4h nije korelirao sa TnI na 4h. Ovi nalazi ukazuju da rane i prolazne promene koncentracije MPO u plazmi nakon pPKI mogu biti delimično povezane is a samom intervencijom.

Literaturni podaci ukazuju da je koncentracija MPO povezana i sa veličinom infarkta miokrada (799), kao i sa daljim remodelovanjem leve komore (782). Feld i sar. (800) su koristeći model ocnjaka sa AIM utvrdili trend povišenja aktivnosti MPO u infarktnoj regiji u poređenju sa neinfarktним ishemičkim regijama nakon reperfuzije. Karadag i sar. (778) su pokazali da su koncentracije MPO jak prediktor odgovora na trombolitičku terapiju kod bolesnika sa STEMI. Oni su utvrdili da su nivoi MPO kod bolesnika sa uspešnom reperfuzijom bili značajno niži u odnosu na bolesnike kod kojih reperfuzija nije bila uspešna. U našem istraživanju, MPO na 24h je pozitivno korelirao sa TnI na 24 h kao tradicionalnim biomarkerom nekroze miokarda.

Nekoliko studija je pokazalo da su koncentracije MPO ushodno regulisane u srčanoj insuficijenciji (801–803). Literaturni podaci ukazuju da su koncentracije MPO povišene kod bolesnika sa hroničnom sistolnom srčanom insuficijencijom i da više koncentracije MPO ukazuju na klinički teži oblik srčane insuficijencije (803, 804). Utvrđeno je da je inflamacija nakon AIM prediktor veličine leve komore (474) i na kraju razvoja srčane insuficijencije (805). U našoj studiji utvrđeno je da je MPO na 24h povezan sa srčanom insuficijencijom. Potencijalni mehanizam je da TnI reflektuje veličinu infarkta (806) koja može biti povezana sa srčanom insuficijencijom i aktivacijom neutrofila. Takođe, koncentracije MPO koreliraju sa inflamatornim biomarkerima kao što su broj leukocita i neutrofila, ali ne i sa koncentracijom CRP. Ovo podržava hipotezu da su neutrofilni primarni izvor oslobađanja MPO.

U literaturi je dostupno nekoliko podataka o prognostičkoj ulozi mokraćne kiseline kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Nedavno je objavljena studija u kojoj je pokazana povezanost između hiperurikemije i komplikovanog kliničkog toka kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI (807). U skladu sa prethodnom studijom (808), rezultati našeg istraživanja pokazuju da je koncentracija mokraćne kiseline određena neposredno pre PKI nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici. Koncentracije mokraćne kiseline povezane sa postojećim faktorima rizika (muški pol, BMI), inflamacijom (hs-CRP) i bubrežnom funkcijom. Nije u potpunosti jasno da li je

hiperurikemija jednostavno marker rizika zbog njegove asocijacije sa faktorima rizika ili je nezavisan faktor rizika za pojavu smrtnog ishoda u bolnici.

Iako postoje dokazi da je MPO dobar prognostički marker nakon STEMI kod bolesnika lečenih pPKI (775, 776), optimalna vremenska strategija uzorkovanja biološkog materijala da sada nije bila definisana. Mada su maksimalne vrednosti MPO zabeležene 4h nakon pPKI, one nisu identifikovane kao nezavisni prediktor smrtnog ishoda u bolnici. Sa ove tačke gledišta, ostaje nejasno da li angioplastika može da ima negativan uticaj na prognostičku sposobnost biomarkera. Osim toga, koncentracija MPO izmerena 24 h po završenoj pPKI mogla bi da bude najbolji prediktor smrtnog ishoda u bolnici kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI. Treba naglasiti da iz ove studije ne možemo da zaključimo da je MPO uključen u proces oštećenja miokarda tokom ishemije-reperfuzije. Ispitivanja na ovu temu zahtevaju dalja istraživanja.

U doktorskoj disertaciji su prikazana i ispitivanja vezana za Lp-PLA<sub>2</sub> kao nezavisni prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana od infarkta.

Poznato je da lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) pripada superfamiliji fosfolipaza A<sub>2</sub>. Sintetiše se u monocitima, makrofagama, T-limfocitima, mast ćelijama i ćelijama jetre koje su uključene u aterogenezu i progresiju ateroskleroze (715, 716, 737, 809). Lp-PLA<sub>2</sub> je važan inflamatorni marker sa velikom vaskularnom specifičnošću i malom biovarijabilnošću, koji reflektuje prisustvo plaka sklonog rupturi. Lp-PLA<sub>2</sub> u cirkulaciji je dominantno vezana za LDL, nešto manje za HDL, lipoprotein (a), lipoproteinske ostatke i mikročestice trombocita (719, 722, 738, 810). Lp-PLA<sub>2</sub> deluje na oksidovane fosfolipide LDL uslovljavajući stvaranje proinflamatornih medijatora-lizofosfatidilholina i oksidovanih masnih kiselina, koji su uključeni u destabilizaciju plaka (738). Lp-PLA<sub>2</sub> se takođe sintetiše de novo u ateromu i slobodni Lp-PLA<sub>2</sub> se ponovo vraća u cirkulaciju (721).

Rezultati brojnih epidemioloških i kliničkih studija su pokazali asocijaciju povišenih nivoa (mase ili aktivnosti) Lp-PLA<sub>2</sub> i povišenog kardiovaskularnog rizika kod



zdravih osoba (746, 811, 812), bolesnika sa stabilnom koronarnom bolešću (813, 814), AKS (815, 816), AIM (816, 817), moždanim udarom (818) i srčanom insuficijencijom (819). U literaturi nema podataka da li je koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi nezavisan prediktor pojave NKVD u toku 30 dana nakon STEMI kod bolesnika lečenih pPKI.

Ovo istraživanje je prvo objavljeno istraživanje koje je pokazalo da je koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi pre intervencije (pPKI) nezavisan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana nakon STEMI kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI. Ovaj deo istraživanja predstavlja pokušaj da se napravi rana procena rizika kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.

Osnovu za ovo istraživanje predstavljala je činjenica da je Lp-PLA<sub>2</sub> povezana sa brojnim proaterogenim biološkim procesima. Činjenica je da Lp-PLA<sub>2</sub> hidrolizuje oksidovane fosfolipide na modifikovanim LDL česticama u intimi arterije i da na taj način doprinosi inicijaciji i progresiji ateroma. Lp-PLA<sub>2</sub> se sintetiše u makrofagama i penastim ćelijama u aterosklerotičnom plaku. Njena ekspresija je uglavnom ograničena na oblasti plaka sa masivnom akumulacijom lipida i infiltracijom leukocita, nekrozom ćelija i kalcifikacijom ukazujući da je Lp-PLA<sub>2</sub> marker nestabilnosti plaka, tj. plaka koji je sklon rupturi (820). Količina Lp-PLA<sub>2</sub>, kao i lizofosfatidilholina u cirkulaciji je proporcionalna veličini ateroma i indirektno utiče na lokalnu funkciju endotela (743). Ovi nalazi ukazuju na to da vakularna sinteza i aktivnost Lp-PLA<sub>2</sub> mogu biti značajni u prognostičke svrhe.

Potencijal LpPLA<sub>2</sub> kao prognostičkog markera razmatran je u koronarnoj arterijskoj bolesti. Li i sar. (821) su utvrdili prognostičku vrednost bazalnog određivanja Lp-PLA<sub>2</sub> za pojavu NKVD koji su obuhvatali kardiovaskularnu smrt, infarkt miokarda bez letalnog ishoda i revaskularizaciju ciljne lezije kod bolesnika sa AKS tokom 6-mesečnog praćenja. Mockel i sar. (822) su pokazali da su nivoi Lp-PLA<sub>2</sub> u prvih 7h nakon pojave simptoma nezavisni prediktor NKVD u prvih 42 dana nakon infarkta kod bolesnika sa AKS. U PROVEIT-TIMI 22 studiji (815) je pokazano da je Lp-PLA<sub>2</sub> kod bolesnika randomizovanih za atorvastatin ili pravastatin izmerena 30 dana nakon AKS

udružena sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih događaja (smrt, infarkt miokarda, nestabilna angina, revaskularizacija, moždani udar) tokom dvogodišnjeg praćenja. Gerber i sar. (816) su utvrdili da je nivo Lp-PLA<sub>2</sub> izmeren rano nakon infarkta miokarda jak i nezavisan prediktor 1-godišnjeg mortaliteta. U ovoj studiji, po prvi put je prikazano da Lp-PLA<sub>2</sub> može biti prediktor kratkoročne prognoze kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih PKI.

Dobro je poznato da je Lp-PLA<sub>2</sub> enzim kome se komercijalnim testovima mogu određivati i masa i aktivnost. U toku 2010. godine objavljena su dva rada koja su dala sveobuhvatan prikaz studija koje su razmatrale asocijaciju Lp-PLA<sub>2</sub> i rizika od kardiovaskularnih događaja. Madjid i sar. (823) su pronašli 16 studija koje su određivale masu, 11 studija koje su određivale aktivnost i 6 studija koje su određivale i masu i aktivnost. Studija Mallat i sar. (824) predstavlja pregled 14 studija koje su merile masu, 4 aktivnost i 7 i masu i aktivnost Lp-PLA<sub>2</sub>. Pregledom ovih studija koje su procenjivale korisnost Lp-PLA<sub>2</sub> kao biomarkera kardiovaskularnog rizika, utvrđena je izrazita disocijacija između mase i aktivnosti ovog enzima u odnosu na predikciju rizika. Različite studije došle su do različitih zaključaka.

Nedavno publikovana meta-analiza koja je obuhvatila 32 prospektivne studije bolesnika sa stabilnim vaskularnim oboljenjem ili nedavnom akutnom ishemijom utvrdila je umerenu korelaciju mase i aktivnosti Lp-PLA<sub>2</sub> (825). Studija PROVEIT-TIMI 22 (815) je takođe utvrdila umerenu korelaciju između aktivnosti i mase Lp-PLA<sub>2</sub> izmerene pri prijemu i 30 dana nakon AKS. Još uvek postoji puno kontroverznih razmišljanja vezanih za metod određivanja Lp-PLA<sub>2</sub>. Dok su Koenig i sar. (826) utvrdili da je masa Lp-PLA<sub>2</sub> bolji prediktor budućih kardiovaskularnih događaja nego aktivnost, Persson i sar. (827) su došli do suprotnog zaključka. Jenny i sar. (828) nisu utvrdili statistički značajnu razliku u aktivnosti i masi Lp-PLA<sub>2</sub> u odnosu na predikciju rizika. Preporuke konsenzus panela za inkorporiranje određivanja Lp-PLA<sub>2</sub> za procenu rizika od kardiovaskularnih oboljenja uvrstile su test za određivanje mase Lp-PLA<sub>2</sub> kao test za procenu rizika (829). Nedavno je FDA odobrio test za merenje mase Lp-PLA<sub>2</sub> u cilju skrininga bolesnika koji imaju veliki rizik od kardiovaskularnih oboljenja. U tom

kontekstu mi smo se odlučili da u ovom istraživanju određujemo masu Lp-PLA<sub>2</sub>, ali ne i njenu aktivnost.

U ovoj studiji, analizirana je koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi kod bolesnika sa i bez prisutnih faktora rizika. Utvrđena je statistički značajna razlika u Lp-PLA<sub>2</sub> između polova; muškarci su imali značajno više vrednosti od žena. Takođe, utvrđena je značajna asocijacija Lp-PLA<sub>2</sub> i pušačkog statusa. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim studijama (814, 830). Niži nivoi Lp-PLA<sub>2</sub> kod žena mogu se objasniti estrogenom posredovanom nishodnom regulacijom nivoa Lp-PLA<sub>2</sub>, zbog nižih koncentracija LDL holesterola kod žena ili sa estrogenom povezanim smanjenjem aktivnosti PAF (831). Pušenje može da poveća nosač (LDL) i supstrat (oksidovani LDL) za Lp-PLA<sub>2</sub> (832).

Ova studija je pokazala pozitivnu korelaciju između Lp-PLA<sub>2</sub> i ukupnog holesterola, LDL holesterola i apoB. Poznato je da više od 70% Lp-PLA<sub>2</sub> cirkuliše nekovalentno vezan za aterogene elektronegativne LDL čestice male gustine. Ova fizička asocijacija je od izuzetnog značaja jer je enzim prisutan da bi oslobodio aterogene produkte kada se LDL transformiše u oksidativnom miljeu zida arterije. Osobe sa povišenim koncentracijama LDL u plazmi takođe imaju i povišene aktivnosti Lp-PLA<sub>2</sub> u plazmi (810). U epidemiološkim studijama, aktivnost i masa Lp-PLA<sub>2</sub> reflektuju dominantno kompleks LDL-Lp-PLA<sub>2</sub> (730). Nedavno objavljena meta-analiza genomskih studija udruženosti (833) sastavljena od pet populacionih studija i ukupno 13 664 osoba utvrdila je da genetski regioni koji utiču na nivo lipoproteina takođe utiču i na nivo Lp-PLA<sub>2</sub>. Moguće je da geni koji utiču na metabolizam lipoproteina mogu da menjaju vezivanje Lp-PLA<sub>2</sub> za različite klase lipoproteina.

Korelaciona analiza u našoj studiji nije pokazala statistički značajnu korelaciju Lp-PLA<sub>2</sub> i CRP što je u skladu sa više prethodno objavljenih studija (746, 811, 817, 828, 834, 835). Poznato je da je CRP reaktant akutne faze i da je njegovo povećanje uslovljeno sistemskom inflamacijom. CRP pokazuje intraindividualnu varijabilnost od oko 40%. Nasuprot njemu Lp-PLA<sub>2</sub> je specifičan marker vaskularne inflamacije i

pokazuje malu biološku varijabilnost u poređenju sa CRP, kao i veću stabilnost u stanju ishemije miokarda (816).

Lp-PLA<sub>2</sub> bi mogao biti marker za predikciju rizika koji mnogo više obećava u budućnosti u poređenju sa CRP (836). Winkler i sar. (837) su utvrdili da povišene koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> kod bolesnika sa umerenim rizikom i hs-CRP <3 mg/L udvostručavaju rizik od srčane smrti. Studija WOSCOPS (746) je utvrdila da je Lp-PLA<sub>2</sub> bila značajno povezana sa kardiovaskularnim rizikom u poređenju sa hs-CRP. Naši rezultati pokazuju da je Lp-PLA<sub>2</sub> bila bolji prediktor rizika u poređenju sa CRP.

Povišenje koncentracija glukoze tokom prvih sati nakon AIM zapaženo je kod bolesnika sa i bez prisutnog dijabetes melitusa (838). Nedavno objavljene studije potvrdile su korisnost određivanja koncentracije glukoze pri prijemu u cilju predikcije rizika kod bolesnika sa STEMI koji su lečeni pPKI (839–841). Naše istraživanje je pokazalo da je koncentracija glukoze udružena sa pojavom NKVD u prvih 30 dana nakon pPKI kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI. Tačni mehanizmi koji povezuju hiperglikemiju i pojavu NKVD nisu objašnjeni. Ovaj mehanizam može biti povezan sa deficijencijom insulina ili može biti posledica odgovora na stres udružen sa kateholaminima i glukokortikoidima koji povećavaju glikolizu i lipolizu i smanjuju insulinsku senzitivnost (842). Hiperglikemija takođe vodi povećanju endotelne disfunkcije, hiperkoagulabilnosti i poremećaju fibrinolize, kao i povećanju oksidativnog stresa (843–846). Ona takođe aktivira proinflamatorne citokine, što vodi daljem oštećenju kardiomiocita, i kao posledicu ima povećanje srčanih markera nekroze i smanjenje LKEF (847).

U ovoj studiji nije utvrđena statistički značajna korelaciju između nivoa Lp-PLA<sub>2</sub> i Kilip klase na prijemu ( $r=0,020$ ,  $p=0,854$ ), ni značajna korelacija između Lp-PLA<sub>2</sub> i LKEF ( $r=-0,099$ ,  $p=0,369$ ). S obzirom na napred navedeno ne može da se tvrdi da Lp-PLA<sub>2</sub> više korelira sa srčanom insuficijencijom nego sa nekrozom miokarda. Prethodno objavljene studije su ispitivale i utvrdile asocijaciju Lp-PLA<sub>2</sub> i incidence srčane insuficijencije u populaciji zdravih osoba i osoba starijih od 65 godina (848).

Gerber i sar. (849) su ispitivali povezanost Lp-PLA<sub>2</sub> i mortaliteta kod osoba sa dijagnostikovanom srčanom insuficijencijom. Lp-PLA<sub>2</sub> je bila nezavisan prediktor mortaliteta u bolesnika mlađih od 80 godina. Nažalost nema podataka u literaturi o asocijaciji Lp-PLA<sub>2</sub> i srčane insuficijencije na prijemu kod bolesnika sa AIM. Mi možemo da pretpostavimo da bolesnici sa prvim prednjim STEMI koji su imali više nivoa Lp-PLA<sub>2</sub> imaju lošiju prognozu, ali ne i veću verovatnoću od razvoja srčane insuficijencije.

U ovom istraživanju je pokazano da je Lp-PLA<sub>2</sub> značajan nezavisan prediktor za pojavu NKVD. Dobijeni rezultati potvrđuju da je smanjena LKEF glavni prediktor za pojavu NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta (783). U skladu sa prethodnom studijom (816), mi nismo utvrdili značajne korelacije između nivoa Lp-PLA<sub>2</sub> i troponina I, Kilip klase i LKEF. Vrednosti Lp-PLA<sub>2</sub> korelirale su sa faktorima rizika kao što su muški pol, pušenje, koncentracija ukupnog holesterola, LDL holesterola, apoB, bubrežnom insuficijencijom. Korelacija Lp-PLA<sub>2</sub> sa drugim faktorima treba da se uzme u razmatranje u cilju određivanja uloge povišene koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub> u pojavi NKVD. Podaci velikih randomiziranih kliničkih studija koji procenjuju efekte inhibicije Lp-PLA<sub>2</sub> na kardiovaskularni end-point (STABILITY i SOLID-TIMI 52) (850, 851) mogu da pomognu u dobijanju definitivnog odgovora.

Iz svega navedenog možemo zaključiti da su nivoi Lp-PLA<sub>2</sub> bili nezavisan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta miokarda kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI. Takođe, Lp-PLA<sub>2</sub> ima veću prediktivnu vrednost u odnosu na tradicionalne faktore rizika, te se s toga može koristiti za ranu procenu rizika kod bolesnika sa AIM.

Deo istraživanja odnosio se na utvrđivanje povezanosti biomarkera sa komplikacijama AIM. Jedna od najozbiljnijih komplikacija AIM je svakako atrijalna fibrilacija.

Atrijalna fibrilacija je pretkomorski poremećaj srčanog ritma. Odlikuje je odsustvom sinhrona depolarizacije pretkomora određenim redosledom, sa posledničnim gubitkom mehaničke funkcije pretkomora. AF je česta komplikacija AIM, sa incidencom od 2,3 do 21% (852, 853). Uz oštećenje miokarda uzrokovano AIM, pojava atrijalne fibrilacije može dodatno kompromitovati srčanu funkciju. Ovo je posledica gubitka pretkomorske kontrakcije, iregularnog i često ubrzanog srčanog rada, što dovodi do nedovoljnog dijastolnog punjenja komora. Ova redukcija u srčanoj funkciji uzrokovana postojanjem AF može da poveća rizik za nastanak komplikacija kao što su srčana insuficijencija, kardiogeni šok, komorske aritmije ili ozbiljne tromboembolijske komplikacije. Bolesnici sa AF imaju češće višesudovnu koronarnu bolest i lošiju reperfuziju za infarkt odgovorne arterije. AF često odražava lošiji klinički status uopšte i hemodinamsku nestabilnost i zato ima nepovoljne prognostičke implikacije (45,46,53). Patofiziologija AF koja se javlja u toku AIM je multifaktorska. Najčešći uzroci AF u AIM su ishemija i infarkt pretkomora, disfunkcija leve komore sa hemodinamskom dekompenzacijom, infarkt desne komore (41). Povišen end-dijastolni pritisak u izmenjenoj komori povećava pritisak u pretkomori i tenziju zida što je predispozicija za AF. Podaci o povezanosti biomarkera i pojave novonastale AF u AIM su ograničeni (854).

Poznato je da se BNP se oslobađa iz komora kao odgovor na povećanje pritiska punjenja i volumena leve komore (855). S toga, BNP može da označi i razvoj AF kod bolesnika sa AIM.

Markeri neurohumoralne aktivacije, u koje se ubrajaju natriuretički peptidi, pružaju značajne dijagnostičke i prognostičke informacije u AKS i kongestivnoj srčanoj insuficijenciji. S obzirom na njihove karakteristike i mogućnost automatizovanog laboratorijskog određivanja, natriuretički peptidi bi mogli u budućnosti mogli predstavljati nezaobilaznu kariku u evaluaciji mnogih hemodinamskih poremećaja. BNP je marker koji je 2008. i zvanično našao svoje mesto u Preporukama Evropskog kardiološkog društva za postavljanje dijagnoze i lečenje akutne i hronične srčane insuficijencije (856). Određivanje BNP uvedeno je kao sredstvo za postavljanje

dijagnoze i lečenje srčane insuficijencije, za procenu prognoze prilikom otpusta iz bolnice, kao i za praćenje efikasnosti terapije za lečenje srčane insuficijencije (857–860).

U ovoj studiji procenjivano je da li BNP može biti prediktor novonastale AF u bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Ovaj deo istraživanja sproveden je na 180 bolesnika sa STEMI. Dijagnoza AF je bila postavljena ehokardiografski prema sledećim kriterijumima: odsustvo P talasa, prisustvo talasa fibrilacije i potpuno nepravilni RR intervali. Termin novonastala AF bio je korišćen za novo dijagnostikovanu AF koja se javila tokom AIM. Uključeni su svi bolesnici sa AF nezavisno od dužine trajanja. Utvrđeno je da je koncentracija BNP nezavisan prediktor razvoja AF u bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.

Iz literature je poznato da je pojava AF u AIM uglavnom povezana sa disfunkcijom leve komore (45, 57, 861–863). Mehanizam koji je dominantan u razvoju AF u AIM uključuje povećan end-dijastolni volume i pritisak u oslabljenoj komori indirektno povećava pritisak u pretkomori i tenziju zida što doprinosi AF (864). Osim toga upotreba ACE ili AT II-inhibitora kod bolesnika sa AIM povezana je sa smanjenjem incidence AF (865, 866). Ovo bi se moglo objasniti time da ACE inhibitori smanjuju opterećenje, koje će smanjiti end-dijastolni volumen komore i pritisak. Smanjenje opterećenja indirektno smanjuje pritisak na zid pretkomore. Može se pretpostaviti da BNP koji se sekretuje primarno iz leve komore kao odgovor na povećanje volume i pritiska može biti rani marker AF.

Nakon infarkta miokarda utvrđeno je značajno povećanje koncentracija BNP (867, 868). Većina bolesnika ima visoke koncentracije BNP u prvih 24h nakon AIM (868). Podaci iz TRIUMPH registra (publikovani u vidu apstrakta) pokazali su da povišeni nivoi BNP mogu biti prediktori AF kod bolesnika sa AIM (869). Naše istraživanje je po prvi put pokazalo da BNP može biti uključen u predikciju AF kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Pokazano je da pruža bolje prognostičke informacije u odnosu na pojavu AF nego konvencionalni prognostički markeri. BNP korelira sa

kliničkim faktorima koji su povezani sa oštećenjem miokarda i disfunkcijom leve komore, što ide u prilog činjenici da je povišenje BNP marker smanjenja srčane funkcije. Ovo ukazuje na to da je sposobnost BNP da predvidi razvoj AF primarno povezana sa hemodinamskim poremećajima. Kako dimenzije pretkomore utiču na ritam, pozitivna korelacija između BNP i veličine leve pretkomore, podržava koncept da rastezanje pretkomore indukovano povećanjem pritiska u pretkomori može da uslovi AF kroz efekat refraktornosti pretkomore (870, 871).

Postoji interesovanje i za CRP kao marker koji bi pomogao u identifikaciji bolesnika sa AIM koji bi mogli da dobiju AF (854). CRP je reaktant akutne faze i sintetise se kao odgovor na akutno oštećenje. Međutim u ispitivanoj grupi, CRP kao prediktor AF nije dostigao statističku značajnost u multivarijantnoj analizi. Nedavno publikovani rezultati analize bolesnika sa AIM koji su učestvovali u TRIUMPH registru podržavaju naš negativni nalaz (869).

U bolesnika sa AIM, razvoj AF može da uzrokuje dalje slabljenje srčane funkcije i pojavu srčane insuficijencije. AIM komplikovan pojavom AF povećava rizik od nastanka moždanog udara (45, 865). AF utiče ne samo na povećanje morbiditeta, već utiče i na povećanje pojave smrtnog ishoda u bolnici (45, 50, 863, 865, 866). Zbog toga je rana identifikacija bolesnika sa AIM koji imaju povećan rizik od nastanka AF od izuzetnog značaja. Iz ovoga se može zaključiti da je BNP veoma značajan marker za procenu pojave AF kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Ovakav pristup mogao bi da bude veoma koristan u identifikaciji bolesnika koji bi imali koristi od primene adjuvantne terapije nakon pPKI. Postoje razlozi koji nas navode na to da možemo da očekujemo da se pojava AF može izbeći preciznim praćenjem hemodinamike. Nema potvrde za primenu profilaktičke terapije, mada bi uspostavljanje hemodinamike lečenjem srčane insuficijencije mogla da bude potencijalna strategija za lečenje aritmija.

Medicina zasnovana na dokazima i Preporuke su se proteklih nekoliko godina konačno nametnuli kao vodeći koncept u dijagnostici, kliničkom radu, svakodnevnoj praksi, pa i u edukaciji. Ova doktorska disertacija je jasno izdvojila nekoliko biomarkera (mijeloperoksidaza, lipoproteinska fosfolipaza A<sub>2</sub> i B-tip natriuretičkog peptide) koji imaju potencijal kao prediktori smrtnog ishoda u bolnici, prediktori pojave neželjenih



kardiovaskularnih događaja u prvih 30 dana po infarktu miokarda, kao i prediktori jedne od najozbiljnijih komplikacija AIM-atrijalne fibrilacije. Prema rezultatima naše i drugih studija oni imaju veliki potencijal da se u godinama koje dolaze nađu u preporukama kao prognostički markeri.

Poseban kvalitet ovom istraživanju daje i uvođenje multipleks testova u rutinsku laboratorijsku primenu. Uvođenje tehnologije biočipova za istovremeno kvantitativno određivanje više analita iz jednog uzorka bolesnika sa AIM značajan je pomak u laboratorijskoj dijagnostici u ustanovi tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite. Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje je u našoj zemlji i regionu urađeno uz korišćenje pomenute tehnologije.

Istovremena evaluacija više biomarkera, kojima se procenjuje stepen ishemije, nekroze miokarda, inflamacije, vaskularnog oštećenja, hemodinamskog stresa trebalo bi da okarakteriše različit doprinos svakog patološkog procesa nastanku AKS na individualnom nivou. Zahvaljujući ovim kliničkim očekivanjima, uvode se nove strategije za procenu i merenje biomarkera sa ciljem ispitivanja multimarkerskih profila (872–877). Uvođenjem sistema koji su razvijeni po ugledu na standardnu metodologiju ELISA (878) i kojima se za relativno kratko vreme istovremeno može analizirati veliki broj biomarkera u jednom uzorku je od velikog značaja. Testiranje ovakvih multimarkerskih panela može biti veoma važno za praćenje same intervencije, kao i za predviđanje rizika kod bolesnika sa AIM.

Osnovno pitanje koje se često u literaturi nameće je da li smo spremni za kliničku aplikaciju multipleks testova? Uprkos potencijalnim prednostima koja se očekuje od tih visoko-propusnih testova, multipleks testova, mali broj kliničkih studija razmatrao je ove metode i nema dostupnih jasnih podataka o njihovoj pouzdanosti u odnosu na standardni ELISA test (879–888). Neke kritike o upotrebi multipleks ELISA platformi su objavljene u literaturi, što ograničava primenu ovih tehnika (887, 888). Dokazi o poređenju nivoa markera u plazmi/serumu multipleks testovima i ELISA testovima, generalno su pokazali slabu korelaciju (889–893). Ovo je delimično

povezano sa razlikama u korišćenim antitelima i efektom matriksa (889–893). Antitela koja su korišćena u multipleks testovima su odabrana u cilju obezbeđivanja istovremenog i teorijski ultrasetljivog merenja proteina u širokom dinamičkom opsegu koncentracija. Dakle, glavna mana multipleks testova zasnovanih na sendvič tehnici u stvari leži u različitim ukrštenim reakcijama koje se javljaju između niza antitela i: a) reagensa ostalih analita koji se detektuju u istoj ploči, b) proteina matriksa uzorka (889–893). Iz tih razloga, uprkos velikog broja komercijalno dostupnih ELISA, samo nekoliko antitela je pogodno da bude uključeno u multipleks testove (890, 891). Utvrđene su brojne interferencije koje potiču od solubilnih receptora, heterofilnih antitela, serumskih vezujućih proteina, hemoglobina i lipida (889–893).

U populaciji bolesnika sa AIM, ovaj efekat je pojačan iz različitih razloga, kao što su komorbiditeti, karakteristike bolesnika ili antikoagulantna terapija koji mogu biti odgovorni za zamućenost uzorka, hemolizu, lipemiju ili pojavu fibrina. Svi ovi faktori mogu da interferiraju sa detekcijom. Zbog toga, su izbor vrste biološkog materijala i antitela od izuzetnog značaja jer utiču na tačnost merenja i dinamički opseg koncentracija proteina u multipleks testovima (889–893). Iako su ova „tehnička“ pitanja u domenu laboratorijske nadležnosti, lekari treba da ih budu svesni kada koriste ove metode.

Međutim iz dana u dan kvalitet ovih testova se sve više poboljšava, posebno za određivanje koncentracije različitih citokina. Multipleks testovi za određivanje citokina mogu dati više ili niže vrednosti u zavisnosti od biomarkera u odnosu na ELISA-u. Iako aktuelne vrednosti citokina možda ne mogu direktno da se porede, treba imati u vidu da su trendovi u ekspresiji citokina vrlo slični kada se porede različiti tipovi testova.

Tehnološki napredak u formatu ovih testova sigurno ima veliku budućnost, posebno u laboratorijskoj dijagnostici urgentnih stanja. S pravom se može reći da budućnost multipleks testova leži zapravo u formiranju individualnog profila biomarkera.

Lekare i istraživače još uvek privlači proteomika koju nude ovi multipleks testovi u cilju istraživanja kompleksnih mreža inflamatornih i angiogenih faktora u akutnom događaju, merenjem širokog spektra proteina (877, 882). Multipleks testovi danas pružaju mogućnost određivanja od 9 do 50 analita.

U međuvremenu, literatura o ovim testovima ukazuje na ograničenu reproduktivnost merenja ovim testovima (879–886, 889–893). Zapravo, u studijama u kojima su korišćeni multipleks testovi dobijeni su kontradiktorni podaci (879–886). Ovo se može prevazići standardizacijom mikročipova, kojima bi se određivao manji broj analita, čime bi se smanjila ukrštena reaktivnost antitela (889–893). Pokazano je da ukrštena reaktivnost raste sa povećanjem broja markera u istoj platformi (889–893). Dakle, poboljšanje multimarkerske strategije u AKS može se postići sub-microarrays, tj. merenje nekoliko analita na istoj platformi, izabranih na osnovu: a) njihove biološki uloge u pojavi i evoluciji bolesti; b) smanjenja ukrštene reaktivnosti antitela; c) sličnog ospega koncentracija analita. Činjenica je da u AKS, multimarkerski pristup može da poboljša stratifikaciju rizika, rasvetljavajući povezanost različitih bioloških puteva u akutnom događaju.

Ipak se napredak u AKS očekuje sa poboljšanjem karakteristika određivanja, povećanjem osetljivosti i pouzdanosti merenja kako za dobro poznate tako i za nove biomarkere (894–896). Dalja evolucija multimarkerskog pristupa, proizvodnjom sub-microarray platformi, može da doprinese bazičnim promenama u konceptu dijagnostike, lečenja i prognoze AIM. Inicijalni multimarker pristup je otkrio kompleksnost interakcije događaja iza kliničkih dokaza kulprit lezije. Međutim, početak AKS utiče čak i na druge sisteme osim kardiovaskularnog, izazivajući povećanje različitih sistemskih biohemijskih markera kao što su kateholamini i neurohormoni, hormon rasta, glukagon, kortizol, renin angiotenzin aldosteron sistem (RAAS) markeri, lipidi i peptidi koje sintetiše jetra (897–901).

Objedinjeni rezultati određivanja biohemijskih markera koji se oslobađaju iz različitih sistema osim kardiovaskularnog mogu promeniti klasifikaciju AKS od organ

specifične do sistemske bolesti. Ovo je u skladu sa idejom da su i preventivne i terapijske strategije predstavljene farmakološkom modulacijom metaboličkih puteva jetre (kao suplementacija statinima) ili inhibicija drugih organa povezanih sa kardiovaskularnim sistemom, kao npr. RAAS (901). Dakle, pored inflamatorinih imunomodulatora nekoliko sistemskih markera može imati potencijalnu vrednost u lečenju bolesnika sa AKS.

U 21. veku može s pravom da se kaže da multimarkerski pristup AIM prati i razvoj multipleks testova. Multimarkerski pristup u AKS potpomognut multipleks testovima, treba da dostigne značajnu ulogu u prognozi, ali ne i u postavljanju dijagnoze AMI, jer istovremeno merenje više markera nekroze, u ranoj dijagnostici, trenutno može da zameni cTnI koji se određuje visoko osetljivim testovima (902). Razvoj multimarkerskog pristupa može biti ekonomski isplativ pošto bi mogao da omogućiti jeftinije određivanje markera u odnosu na pojedinačne testove (903). Prvi korak ka evoluciji multimarkerskog pristupa je standardizacija submikročipova, merenjem seta biomarkera, sa nižim troškovima u odnosu na pojedinačne rutinske ELISA testove. Uvođenje multimarkerskog pristupa koji bi obuhvatao samo četiri biomarkera u odnosu na pojedinačno određivanje ELISA tehnikom značajno bi smanjilo utrošeno vreme rada laboratorijskih tehničara, upotrebljenu količinu uzorka biološkog materijala, kao i cenu reagensa. Biostatistički prilaz u razvoju testova i validaciji ima ključnu ulogu u ukupnom procesu. Standardizacija zahteva evaluaciju kalibracije i performansi testa kao što su reproducibilnost, poređenje sa pojedinačnim standardizovanim ELISA metodama, kao i uspostavljanje kontrole kvaliteta za proveru validnosti rezultata. Ova nova multimarkerska strategija trenutno izgleda ubedljivo, ali su potrebne ozbiljnije statističke analize za procenu iste. Neophodne su populacione studije kojima bi se uradila klinička validacija i inkorporacija multimarkerskog profila i dobila pouzdanija procena rizika. Ovo istraživanje svakako predstavlja doprinos ovoj ideji.

Razumevanje značaja biomarkera u identifikaciji i lečenju bolesnika sa AIM je od izuzetne važnosti. Povećava se broj studija koje ispituju biomarkere nekroze i disfunkcije miokarda i diferenciraju patofiziologiju inflamacije, vulnerabilnosti plaka i

ishemije miokarda. Mada koncentracije pojedinačnih markera mogu u proseku da pokažu značajan porast kod bolesnika sa kardiovaskularnim oboljenjima, varijacije biomarkera su još uvek veoma velike, te tako i neke obolele osobe mogu da imaju jasno niže koncentracije biomarkera od očekivanih. Iako se poslednjih godina kontinuirano traga za novim, moćnijim biomarkerima koji bi imali mogućnost da predvide pojavu budućih NKVD, jasno je da se danas nijedan pojedinačni biohemijski marker ne može smatrati „zlatnim standardom“ za njihovu predikciju. Zbog toga postoji sumnja da je verovatnoća da će biti otkriven samo jedan biomarker za predviđanje neželjenih kardiovaskularnih događaja mala. Opšte mišljenje se pomera ka multimarkerskom pristupu. Smatra se da bi istovremeno određivanje više patobiološki udaljenih biomarkera moglo da pruži komplementarne informacije za ranu procenu rizika bolesnika sa AIM. Nekoliko studija je međutim pružilo eksperimentalne dokaze o ulozi novih biomarkera zajedno sa već dobro poznatim i potvrđenim biomarkerima, povezujući spektar patofiziologije koronarnih događaja od inflamacije, destabilizacije plaka, ruptur plaka, preko nekroze ćelija miokarda i njegove disfunkcije. Međutim, još uvek nije jasno definisano koji bi to biomarkeri mogli biti uključeni u panele za procenu rizika bolesnika sa AIM, kao i koje metode bi se mogle koristiti da se izaberu i kombinuju markeri u praktičnoj multimarkerskoj strategiji. Sugerisu se metode kao što su sumiranje broja pozitivnih markera, razvijanje skorova rizika i/ili kompleksne tehnologije kao što su neuronske mreže i CART („classification and regression trees“) analiza.

Ideja o razvoju panela specifičnih biomarkera za AIM, slično otisku prsta svakog pojedinca, rezultirala je manjim brojem pokušaja da se ispita korisnost različitih panela biomarkera kod bolesnika sa AIM kako u cilju postavljanja dijagnoze, tako i u prognostičke svrhe.

Jednostavan multimarkerski prilaz AIM obuhvatao je kombinovanje markera nekroze u cilju postavljanja dijagnoze, zatim dvojnju strategiju kombinovanjem različitih markera sa troponinom (CRP, BNP/NT-proBNP). Usledio je multimarkerski pristup koji je obuhvatao tri markera (najčešće CRP, BNP i troponin) za procenu rizika u bolesnika sa AKS. Čini se da su biomarkeri inflamacije i hemodinamskog stresa

robustni, nezavisni prediktori ishoda u bolesnika sa hroničnom i akutnom aterotrombozom. Specifično, određivanje hsCRP je pogodno za detekciju niskih nivoa sistemske inflamacije koja je faktor rizika za razvoj aterotrombotične vaskularne bolesti (767), kao i loše kratkoročne i udaljene prognoze u bolesnika nakon AKS (904, 905). Dodatno, CRP se pripisuje i uloga medijatora aterotromboze (906). Slično, natriuretički peptidi su vrlo značajni za procenu ishoda i komplikacija kod bolesnika sa ishemijskom bolešću srca.

Koncentracije BNP i NT-proBNP koreliraju sa dilatacijom leve komore, remodelovanjem i disfunkcijom, kao i kongestivnom srčanom insuficijencijom i smrtnim ishodom u bolesnika sa AIM (907, 908). Štaviše, veliki broj studija je pokazao asocijaciju BNP ili NT-proBNP i kratkoročnog ili udaljenog mortaliteta kod bolesnika sa AKS (909–913), uključujući one bez nekroze miokarda ili kliničkih znakova srčane insuficijencije (912). Osim toga, CRP i BNP/NT-proBNP, kao i drugi novi markeri inflamacije i tromboze kao što su sCD40L i MPO udruženi su sa ishodom nezavisno od vrednosti troponina, te tako mogu biti deo multimarkerske strategije.

Moguće je da bi neki od biomarkera kao što su sCD40L, MMP, MPO itd., mogli da budu pridodati ili čak da zamene neki od tri biomarkera (troponin, BNP, CRP) koji su najbolje proučeni do danas. Oni biomarkeri koji mogu da pruže dodatne informacije ili reflektuju neke druge procese osim nekroze i hemodinamskog stresa mogli bi biti korisniji; naročito oni kandidati koji su specifičniji za vaskularnu inflamaciju i imaju malu biološku varijabilnost kao što je npr. Lp PLA<sub>2</sub>. Solubilni CD40L reflektuje inflamatorni proces u osnovi ruptуре plaka i aktivaciju trombocita, dva ključna procesa u aterotrombozi. Primenjen zajedno sa CRP ili srčanim troponinom, sCD40L pruža dodatne informacije u odnosu na smrtni ishod ili rekurentne ishemijske događaje u bolesnika sa AKS (914). MPO kao enzim koji se oslobađa tokom degranulacije leukocita takođe doprinosi aterotrombozi aktivacijom MMP i potrošnjom endogenog vazodilatatora NO. Koncentracije MPO se povećavaju kod nekih bolesnika sa nestabilnom anginom i mogu da doprinesu prognostičkim informacijama kod bolesnika sa AKS, zajedno sa troponinom i sCD40L, kao i da smanje prediktivnu vrednost CRP kada se razmatraju zajedno (771).

Veći broj studija ispitivao je različite kombinacije biomarkera kod bolesnika sa CAD, posebno AKS ili STEMI sa ciljem da utvrdi njihov doprinos bržoj i preciznijoj proceni ishoda bolesti. Shlipack i sar. (915) su na učesnicima Hear and Soul studije ispitivali kombinaciju 6 biomarkera (NT-proBNP, IL-6, CRP, fibrinogen, cistatin C, albuminurija) u cilju poboljšanja predikcije kardiovaskularnih događaja (moždani udar, AIM, smrtni ishod) kod osoba sa dokazanom koronarnom arterijskom bolešću tokom 3,5 godišnjeg praćenja. Kada su svi biomarkeri uključeni u multivarijantnu analizu, samo NT-proBNP, CRP i albuminurija su ostali značajni prediktori događaja. Površina ispod ROC krive za kliničke prediktore je bila 0,73 (95% CI, 0,68–0,78); a dodatkom tri biomarkera se značajno povećala na 0,77 (95% CI, 0,73–0,82,  $P < 0,005$ ). NT-proBNP, cTnT, CRP i klirens kreatinina su analizirani u velikoj GUSTO-IV studiji bolesnika sa AKS. U ovoj studiji utvrđeno je da je najveći 1-godišnji mortalitet utvrđen u grupi bolesnika sa nivoima NT-proBNP u najvišem kvartilu i klirensom kreatinina u najnižem kvartilu. Sličan visok mortalitet nađen je kod bolesnika sa NT-proBNP u kombinaciji sa cTnT, CRP ili srčanom frekvencijom u najvišem kvartilu (913).

Apple i sar. (916) su pratili spektar biomarkera kod bolesnika sa sumnjom na AKS pri prijemu. Autori su uzeli uzorke pri prijemu i koristili cutoff vrednost za cTnI 0,1 µg/L. Mortalitet je bio veći kod bolesnika sa povećanim cTnI, NT-proBNP, hsCRP, placentalnim faktorom rasta (PIGF) i smanjenom jačinom glomerularne filtracije (eGFR) (izračunatom MDRD formulom). Autori nisu utvrdili značajnu razliku u mortalitetu između grupa sa povišenim i normalnim koncentracijama MPO, CD40L ili MMP-9. Međutim, samo povišene koncentracije NT-proBNP i cTnI su bile nezavisni prediktori kardiovaskularnih događaja. Najbolji prediktori rizika za NKVD (AIM, PKI, CABG, smrtni ishod) bile su kombinacija cTnI sa NT-proBNP, kao i cTnI sa MPO.

U grupi bolesnika sa NSTEMI ispitivana je korisnost kombinovanog merenja cTnI, mioglobina, hsCRP, fibrinogena i homocisteina u predikciji glavnih NKVD (smrtni ishod ili nefatalni infarkt miokarda) nakon 30 dana u 1 godine praćenja. U multivarijantnom modelu koji je uključivao bazalne karakteristike, elektrokardiografske karakteristike i biohemijske markere varijable koje su bile udružene sa glavnim neželjenim koronarnim događajima bile su godine starosti, insulin-zavisni dijabetes, ST

depresija, mioglobin >70 ng/mL, CRP>11 mg/L. U drugom modelu koji je uključivao ukupan broj pozitivnih markera (0-5), kao i u trećem modelu koji je uključivao samo mioglobin i CRP kao nezavisne prediktore), broj povišenih markera bio je nezavisan prediktor glavnih neželjenih koronarnih događaja (917). Manenti i sar. (918) su ispitivali u kohorti od 172 bolesnika sa NSTEMI-AKS, da li dodavanje biohemijskih markera TIMI skor rizika može da poboljša predikciju glavnih neželjenih događaja (smrtni ishod i hospitalizacija zbog kardiovaskularnih razloga) nakon 30 dana i 6 meseci. Kombinacija NT-proBNP i kreatinina sa TIMI skorom rizika bila je značajno bolji prediktor neželjenih događaja kako na 30 dana, tako i na 6 meseci u odnosu na TIMI skor rizika.

Roubille i sar. (919) su kod 138 ispitanika sa STEMI uspešno lečenih pPKI, određivali kreatinin, BNP, hsCRP, cTnI na prijemu utvrdili da multimarkerski pristup pruža dodatne prognostičke informacije koje pomažu u identifikuju bolesnike sa visokim rizikom od klinički nepovoljnih događaja (smrtnog ishoda, nove hospitalizacije zbog kardiovaskularnih razloga, AKS), ali nije utvrdio prednost multimarkerskog pristupa nad pojedinačnim određivanjem BNP ili cTnI prvog dana ili CRP trećeg dana.

Sabatine i sar. (920) su publikovali jednu od prvih multimarkerskih studija u bolesnika sa AKS. Bazalna merenja cTnI, CRP i BNP su bila nezavisni prediktori kompozitnog događaja (smrtni ishod, AIM, kongestivna srčana insuficijencija) tokom 30 dana i 10 meseci u kohorti 450 bolesnika sa NSTEMI-AKS u OPUS-TIMI 16 studiji, kao i tokom 30 dana i 6 meseci u kohorti od 1635 bolesnika u TACTICS-TIMI studiji. Kada su bolesnici u studiji OPUS-TIMI 16 kategorizovani na osnovu broja povišenih markera na prijemu, utvrđeno je dupliranje rizika od smrtnog ishoda sa svakim dodatnim povišenim biomarkerom. U studiji TACTICS-TIMI ukupan broj povišenih biomarkera CRP, BNP i cTn ostaje značajna prediktor ishoda nakon uklanjanja uticaja poznatih kliničkih prediktora; bolesnici sa povišenim jednim, dva ili tri biomarkera imaju 2,1-, 3,1-, i 3,7-puta veći rizik od kompozitnog neželjenog događaja tokom 6 meseci.



Mockel i sar. (822) su proširili istraživanje Sabatine i sar. (920). Određivali su Lp-PLA<sub>2</sub> u kombinaciji sa cTnI, NT-proBNP, hsCRP i D-dimerom kod bolesnika suspektnih na AKS i utvrdili da kombinacija biomarkera (NT-proBNP, cTn i Lp-PLA<sub>2</sub>) povećava identifikaciju rizika od smrtnog ishoda, ponovne hospitalizacije zbog AKS ili srčane insuficijencije, akutnog neplaniranog PKI i CABG. Isti autori su proširili paletu biomarkera na cTnI, NT-Pro-BNP, CRP, holin u plazmi i punoj krvi, LpPLA<sub>2</sub>, PIGF i D-dimer u multimarkerskom pristupu i identifikovali kombinaciju biomarkera NT-proBNP, holin u punoj krvi i LpPLA<sub>2</sub> koji uzeti pri prijemu predstavljaju najbolji prediktor NKVD (smrtni ishod, nefatalni AIM, nestabilna angina, kongestivna srčana insuficijencija, PKI i CABG) (921).

Morrow i sar. (922) su određivali vrednosti biomarkera cTn, BNP, MPO i CD40L i utvrdili da određivanje kombinacije biomarkera cTn, BNP, MPO povećava više od tri puta rizik od nefatalnih rekurentnih ishemijskih događaja kod bolesnika sa NSTEMI-AKS u TACTICS-TIMI 18 studiji.

Samo dve studije (923, 924) ispitivale su multimarkerski pristup u predikciji smrtnog ishoda kod bolesnika sa AIM, sa kontradiktornim rezultatima. Brügger-Andersen i sar. (923) su kod 298 bolesnika sa AIM lečenih PKI ili trombolizom, utvrdili da multimarkerski pristup koji je obuhvatao NT-proBNP, hsCRP, MMP-9, PAPP-A, MPO, sCD40L i fibrin monomer ne pruža dodatne prognostičke informacije za reinfarkt ili smrtni ishod nakon AIM u odnosu na konvencionalne faktore rizika. Studija Damman i sar. (924) ispitivala je mulimarkerski pristup u predikciji bazalnog rizika za udaljeni smrtni ishod kod bolesnika sa STEMI lečenih pPKI. Oni su ispitivali da li kombinacija NT-proBNP, glukoze, troponina T i eGFR poboljšava predikciju mortaliteta. Skor rizika su činili najznačajniji prediktori-biomarkeri u multivarijantnoj Cox regresiji. Dobijeni markeri su analizirani zajedno sa već poznatim faktorima rizika (godine, telesna masa, dijabetes, hipertenzija, sistolni krvni pritisak, srčana frekvencija, prednji infarkt i vreme do početka lečenja) u multivarijantnoj Cox regresiji. Dobijeni su najznačajniji prediktori mortaliteta tokom praćenja (medijana 901 dan) i to su glukoza,

eGFR, NT-proBNP. Dodatak ova 3 biomarkera standardnim prognostičkim faktorima značajno povećava predikciju za mortaliteta u bolesnika sa STEMI lečenih pPKI.

Pretraživanjem literature, može se utvrditi da je javnosti dostupan mali broj studija čiji je cilj bio da utvrdi korisnost multimarkerskog pristupa u proceni rizika od smrtnog ishoda u bolnici ili pojave neželjenih efekata kod bolesnika sa STEMI lečenih primarnom PKI. Gde treba tražiti uzrok? Dugo je u fokusu kad su STEMI pacijenti u pitanju bilo samo skraćenje vremena od početka simptoma do primene terapije, sa relativno malim interesom za procenu rizika kod ovih bolesnika, uključujući i analiziranje biomarkera. Postavljanje dijagnoze STEMI smatralo se jednostavnijim i osnovni cilj je bio brzo sprovođenje reperfuzione terapije zasnovano samo na elevaciji ST segmenta i simptomima. Uprkos smanjenju stope smrtnosti bolesnika sa STEMI nakon uvođenja primarne PKI, evidentan je veliki broj neželjenih događaja koji se javljaju nakon AKS, uključujući i STEMI što bez sumnje idu u prilog većem interesovanju za određivanje biomarkera u ovih bolesnika. S toga bi u narednom periodu trebalo očekivati veći broj studija na ovu temu. Osim toga, iako multimarkerska strategija naizgled ima potencijala za kliničku primenu neophodna je klinička evaluacija ovih markera u dodatnim studijama, kao i precizno definisanje analitičkih faktora (vrsta biološkog materijala, karakteristike analitičkog metoda određivanja, optimalni cut-off, biološke varijacije, itd.).

Gde vidimo ograničenja multimarkerskog pristupa u sveobuhvatnoj proceni rizika? Nesigurnost vrednosti dodatnih biomarkera se zasniva na ograničenoj dostupnosti statističkih alata koji bi pokazali vrednost svakog dodatnog biomarkera globalnom bodovanju rizika. Većina studija pokazuje da, kada postoji jedan jak prediktor rizika u modelu, veoma je teško da se pokaže odgovarajući doprinos dodatnog biomarkera u prediktivnom modelu. Dobijen je različit relativan rizik pojedinih specifičnih biomarkera i ishoda/prognoze bolesti. Tako će se optimalna težina svakog markera za procenu rizika od mortaliteta razlikovati od rizika za rekurentni AKS. Posebno, nedostatak jedinstvenih odnosa između svakog biomarkera i rizika od

specifičnih kliničkih manifestacija onemogućava jasno definisanje uloge biomarkera u proceni rizika kao i u terapijskom odgovoru.

Napredak na polju proteomike i genomike u AIM, trebalo bi da omogući strategiju za otkriće novih biomarkera i tako dodatno proširi listu biomarkera kandidata za multimarkersku strategiju primenljivu u kliničkoj praksi.

Osnovni izazovi u razvoju multimarkerske strategije obuhvataju sledeće:

- Adekvatnu kliničku i analitičku validaciju individualnog biomarkera, uključujući odgovarajuće rukovanje uzorcima biološkog materijala, analitičke performanse metode određivanja, biološku varijabilnost i nivoe kliničke odluke;
- Povezanost između biomarkera i rizika od specifičnih kliničkih događaja mogu se razlikovati (nisu svi biomarkeri povezani sa istim kliničkim događajem istom jačinom);
- Dihotomizacija rezultata biomarkera može da bude suviše jednostavna, pa čak i obmanjujuća u odnosu na veličinu rizika;
- Kompleksno modelovanje će verovatno ometati kliničku primenu, dok preterano pojednostavljena formulacija može da ograniči validnost i diskriminatorni kapacitet strategije;
- Dokaz o implikaciji za terapiju je od ključnog značaja za kliničku primenu.

Koristeći profil biomarkera koji pokrivaju različite aspekte kompleksne patofiziologije AKS može se povećati racionalna osnova za procenu kardiovaskularnog rizika. Sa pojavom novih markera inflamacije, nekroze, vaskularnog oštećenja i hemodinamskog stresa, moguće je okarakterisati različite doprinose svakog od ovih glavnih mehanizama kratkoročnoj i udaljenoj prognozi nakon AKS. Moguće je da bolesnici mogu imati koristi od različitih terapijskih strategija u zavisnosti od profila biomarkera.

U literaturi postoje brojni dokazi da su inflamatorni medijatori uključeni u proces razvoja aterogeneze, ali i da inflamacija ima fundamentalnu ulogu u patogenezi ruptуре plaka. Ranije studije su pokazale da lokalna inflamacija rezultira rupturom pojedinačnog vulnerabilnog plaka. Nedavni dokazi podržavaju koncept vulnerabilnog bolesnika. Tako su se i istraživači i kliničari okrenuli ka traženju biomarkera inflamacije kao potencijalnih neinvazivnih indikatora rizika od pojave rekurentnih kardiovaskularnih događaja nakon AIM i kao prediktora uspešno primenjene terapije. Jedan od najčešće proučavanih markera kardiovaskularnog rizika je CRP koji je jedini inflamatorni marker preporučen za kliničku aplikaciju. Iako je CRP vrlo pouzdan marker inflamacije, nekoliko drugih inflamatornih medijatora je značajno u patogenezi AIM i oni mogu da posluže kao novi biomarkeri, obezbeđujući dodatne dijagnostičke i prognostičke informacije. Njih u ovom trenutku treba doživljavati kao prozor kroz koji bi mogli da vidimo osnovne patofiziološke mehanizme koronarne aterotrombotične bolesti, kao i da individualizujemo primenu terapije.

U ovom istraživanju je na jednoj veoma homogenoj grupi bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenih pPKI u više vremenskih intervala određena koncentracija citokina, citokinskih receptora i faktora rasta, kao i molekula funkcionalno povezanih sa citokinima. Razmatrana je povezanost bazalnih vrednosti i pojave ciljevima rada definisanih ishoda. Određivano je 27 citokina, citokinskih receptora ili faktora rasta, 5 adhezionih molekula i MMP-9. Za neke biomarkere (npr. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-12p70, IL-13, IL-23) kod određenog broja bolesnika (u proseku 20–25%) koncentracije navedenih citokina bile su ispod donje granice detekcije testa. Iako u literaturi istraživači uvršćuju i ove vrednosti u statistiku tako što od najniže vrednosti standarda korišćenog za izradu standardne krive oduzmu 1 i tu vrednost dodele bolesniku, mi smo odlučili da ove citokine ne uzimamo u razmatranje.

Pretraživanjem literature utvrđeno je da je istraživanje inflamatornih markera u AIM vrlo aktuelan problem. Ispitivano je puno potencijalnih prognostičkih biomarkera kao nezavisnih prediktora rizika. Međutim, saznanja o povezanosti između ovih

biomarkera su ograničena. Metod koji omogućava grupisanje markera u biološki smislene klustere može da pomogne u razjašnjavanju mehanizama kolinearnosti. Ovaj prilaz može takođe da pomogne u identifikaciji superfamilija biomarkera, predstavljajući novi pristup u proceni rizika bolesnika sa AIM. Hipoteza da multimarkerski pristup, merenjem koncentracije biomarkera može da otkrije nešto nalik „fingerprint“-u AIM i može da posluži za procenu rizika od budućih NKVD, pobudila je veliku pažnju.

Jasno je da bi bilo neralno očekivati da jedan marker sam po sebi može da odražava odgovore na sve patološke procese koji su uključeni u kompleksna oboljenja kao što je AIM. Iako kombinacija biomarkera može da poboljša identifikaciju bolesnika sa povećanim rizikom od NKVD, multikolinearnost predstavlja poznati problem u multivarijantnim modelima. Veliki broj biomarkera na relativno maloj ispitivanoj populaciji može da predstavlja zamku. Eksploratorna faktorska analiza omogućila je da se informacije u setu podataka sačuvaju kao i da se eliminiše problem kolinearnosti, čak i na relativno malom uzorku kao što je naš.

S obzirom da su u literaturi citokini, kao i solubilne adhezione molekule vrlo retko deo multimarkerskih panela u studijama na bolesnicima sa AIM (osim sporadično IL-6 ili TNF- $\alpha$ ), jedan od ciljeva ove studije bio je da se ispita kompleksna interakcija između cirkulišućih citokina i solubilnih adhezionih molekula kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI uspešno lečenim pPKI, kao i da se definiše njihova povezanost sa ishodom. Korišćenjem eksploratorne faktorske analize 12 biomarkera je grupisano u četiri faktora. Prvi faktor obuhvatio je sledeće varijable: log<sub>s</sub>TNFR1, sTNFR2, MMP-9. Drugi faktor obuhvatio je sledeće varijable: sICAM-1, sE-selektin i sL-selektin. Treći faktor obuhvata sledeće varijable: log IL-6, log IL-8 i log MCP-1. Četvrti faktor obuhvatio je sledeće varijable: log MIP-1 $\alpha$ , log IL7 i log IL15. Na ovaj način smo utvrdili faktore koji leže u osnovi međusobne povezanosti manifestnih varijabli, tj. redukovali dimenzionalnost originalnog prostora postupkom faktorizacije, utvrdili povezanost pojedinih manifestnih varijabli s tim faktorima (rotacijom faktora postigli interpretabilnija rešenja). Dobijeni faktori su korišćeni u multivarijantnoj logističkoj ili

Cox-ovoj regresionoj analizi za predikciju NKVD. Utvrđeno je da su faktori 2 i 3 (posebno 3) bili nezavisni prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana nakon infarkta. Treći faktor mogao bi se nazvati proinflamatornim faktorom, dok bi drugi mogli nazvati faktorom adhezionih molekula.

Rezultati faktorske analize iako možda delimično neočekivani, bili su biološki prihvatljivi. Za nekoliko biomarkera koji pripadaju trećem faktoru je prethodno objavljeno da njihovo određivanje ima prognostički značaj u AIM.

Dva od tri markera koja je obuhvatio 3. faktor pripadaju hemokinima. Hemokini pripadaju velikoj grupi strukturno povezanih hemotaktičkih, inflamatornih citokina koji se mogu podeliti u četiri familije CC, CXC, CX3C, XC u zavisnosti od pozicije prva dva cisteinska ostatka. Oni se nalaze u endotelnim i inflamatornim ćelijama. Hemokini se mogu detektovati i u aterosklerotičnoj leziji, gde usmeravaju leukocite do mesta inflamacije ali takođe kontrolišu homeostazu i druge aktivnosti leukocita koji podležu dijapedezi kroz zid krvnih sudova. Vezivanjem za hemokinske receptore kuplovane sa G-proteinom, hemokini ostvaruju niz efekata, aktivaciju ćelija i transmigraciju leukocita, kao i nehematopoetskih ćelija. Nekoliko studija je utvrdilo povećanu ekspresiju IL-8 i MCP-1 hemokina u humanoj aterosklerotičnoj leziji, kao i da su hemokini kolokalizovani sa povećanom ekspresijom njihovih receptora. Uloga hemokina u aterosklerozi je poduprta i rezultatima nekoliko studija koje su pokazale da su modifikovane LDL čestice potentni induktori hemokina u različitim ćelijama kao što su makrofage i glatke mišićne ćelije, ukazujući da bi hemokini mogli biti spona između lipida i inflamacije u aterogenezi. Poznato je da infiltracija i aktivacija leukocita u aterosklerotičnom plaku ima značajnu ulogu u pokretanju AKS sa hemokinima kao vrlo značajnim faktorima. Nakon stimulacije hemokinima *in vitro*, utvrđeno je da hemokini utiču na proliferaciju leukocita/makrofaga, sekreciju enzima, indukciju kiseoničnih reaktivnih vrsta i ubrzavaju formiranje penastih ćelija.

MCP-1 je najbolje okarakterisan CC hemokin, hemoatraktant koji privlači monocite, T-limfocite i NK ćelije, ali ne i neutrofile. MCP-1 je značajno indukovano u

ranog aterosklerotičnoj leziji i imobilizovan na luminalnoj površini endotela vezivanjem za proteoglikane. Interakcija između MCP-1 i njegovog receptora CCR2, eksprimiranog na monocitima, posreduje privlačenje monocita u subendotelni prostor. Monociti diferenciraju u makrofage, koje se obogaćene lipidima transformišu u penaste ćelije. Povećana ekspresija MCP-1 u zidu krvnog suda doprinosi progresiji ateroskleroze aktivacijom penastih ćelija i indukuje neovaskularizaciju plaka. MCP-1 može takođe da indukuje sintezu MMP, ubrza degradaciju matriksa i rupturu plaka. On takođe indukuje ekspresiju tkivnog faktora, ostvarujući tako prokogulantne efekte. MCP-1 je uključen i u „zaceľjivanje“ miokarda i modeliranje srca. Tokom proinflatorne faze zaceľjivanja, MCP-1 je ushodno regulisan u miokardu i posreduje u privlačenju monocita. Tokom zaceľjivanja miokarda, sinteza MCP-1 se suprimira. Produženo povišene vrednosti MCP-1 u plazmi nakon AKS mogu da identifikuju bolesnike sa povećanim inflamatornim odgovorom u „zaceľjujućem“ miokardu. Smanjenje sinteze MCP-1 je od klucijalnog značaja za optimalno zaceľjivanje miokarda, jer je u protivnom moguća ekstenzivna degradacija matriksa i remodelovanje infarktne zahvaćene komore (447, 449, 925–927) .

Četiri studije podržavaju prognostičku vrednost MCP-1 u AKS. U podstudiji studije Oral Glycoprotein IIb/IIIa Inhibition with Orbofiban in Patients with Unstable Coronary Syndromes (OPUS-TIMI) 16 (928), pokazano je da je kod 2 270 bolesnika sa AKS, koncentracija MCP-1 iznad 75-tog percentila udružena sa skoro dva puta većim rizikom od smrtnog ishoda ili AIM u 10-mesečnom praćenju, nakon „adjustmenta“ na standardne faktore rizika, uključujući i CRP. Slično tome, Kervinen i sar. (461) su utvrdili povišene koncentracije MCP-1, kao i solubilnih IL-2 receptora u predikciji rekurentnog koronarnog događaja tokom 13-mesečnog praćenja, nezavisno od drugih inflamatornih medijatora (CRP i IL-6). Međutim, ova druga studija je uključivala mali broj bolesnika sa velikim procentom neželjenih kardiovaskularnih događaja (ponovljeni MI, revaskularizacija ili smrtni ishod).

Serijsko merenje koncentracije MCP-1 u plazmi može da pruži dodatne prognostičke informacije kod bolesnika sa AKS. Mala studija je pokazala povećanje

MCP-1 kod bolesnika sa komplikovanim AIM. Tokom prve nedelje u bolnici, pik MCP-1 je bio viši kod bolesnika sa AIM komplikovanim srčanom insuficijencijom u odnosu na bolesnike bez ove komplikacije (929). Nakon mesec dana, bolesnici sa LKEF <35% imali su značajno više koncentracije MCP-1 u plazmi u odnosu na bolesnike sa očuvanom funkcijom leve komore (LKEF >35%).

Prospektivna studija koja je bila dao studije A do Z, u velikoj populaciji AKS bolesnika (460) određivala je koncentraciju MCP-1 sa ciljem da ispita prognostički značaj serijskog određivanja MCP-1 pri prijemu u Z fazu (medijana 3,5 dana nakon početka simptoma) i nakon 4 i 12 meseci. Primarni ispitivani ishod bio je mortalitet, a sekundarni smrt ili AIM, smrt ili srčana insuficijencija, kardiovaskularna smrt, AIM, prijem zbog AKS ili moždanog udara. Utvrđeno je da je MCP-1 dobar biomarker za stratifikaciju rizika kako u inicijalnoj, tako i u hroničnoj fazi nakon AKS. Nasuprot CRP, MCP-1 je više marker za procenu rizika u udaljenom praćenju nego marker akutne prognoze.

Nedavno objavljena studija Korybalska i sar. (930) procenjivala je kliničku korisnost koncentracija MCP-1 kod bolesnika sa STEMI pri prijemu, nakon 24h i nakon 6 meseci. Medijana koncentracija MCP-1 nije se razlikovala pri prijemu i nakon 6 meseci, ali je utvrđena razlika u promenama koncentracija MCP-1 tokom vremena. Kod bolesnika kod kojih su na prijemu koncentracije MCP-1 bile niže, koncentracije su se povećavale i obrnuto. Primećeno je značajno smanjenje koncentracije MCP-1 nakon PKI. Neočekivano, bolesnici koji su imali restenozu imali su značajno nižu koncentraciju MCP-1 nakon 24h u odnosu na one koji to nisu.

Koji bi bili mehanizmi odgovorni za lošu prognozu bolesnika sa AKS i povišenim koncentracijama MCP-1? Smatra se da povećan rizik kod AKS bolesnika sa povišenim MCP-1 nije uzrokovan povredom, jer bazalni nivoi MCP-1 nakon AKS ne reflektuju stepen nekroze miokarda. Ali za klinički lošiji ishod mogu da budu odgovorni sledeći mehanizmi: bazalno povišenje MCP-1 može da reflektuje povećanu ekspresiju hemokina u ateomatoznoj leziji, povećana sistemska aktivacija MCP-1 uslovljava protrombotičke efekte koji rezultiraju rekurentnim koronarnim događajem, povećana



koncentracija MCP-1 koja duže traje može da identifikuje bolesnike sa jačom inflamatornom reakcijom nakon koronarnog događaja ili defekt u suzbijanju postinfarktne inflamatornog odgovora.

Pokazano je da genetske varijacije imaju značajnu ulogu u varijabilnosti nivoa MCP-1 u plazmi. Utvrđeno je da osobe nosioci MCP-1-2578G alela imaju veće koncentracije MCP-1 i imaju veliki rizik od AIM (931). Da li je MCP-1 polimorfizam udružen sa povišenim koncentracijama MCP-1 i lošijom prognozom nakon AKS još uvek nije u potpunosti istražena.

Interleukin-8 pripada hemokinima i svoje delovanje ostvaruje preko dve klase receptora CXCR-1 i CXCR-2 (specifičan za IL-8). IL-8 je povezan sa brojnim funkcijama u inflamaciji i promociji rasta vaskularnih ćelija kao i sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja kao što su nestabilna angina i AIM. U prospektivnoj EPIC-Norfolk populacionoj studiji, koncentracije IL-8 kod zdravih osoba koje su u toku 6-godišnjeg praćenja razvile koronarnu arterijsku bolest sa fatalnih ishodom ili bez njega bile su statistički značajno više nego kod zdravih osoba. IL-8 haplotipovi i/ili SNP-ovi nisu bili povezani sa rizikom od nastanka AIM ili ishemijskog moždanog udara (932, 933).

Interleukin-8 je klasičan hemokin što znači da je odgovoran za indukciju hemotakse odnosno usmerene migracije ćelija (naročito neutrofila) na mesto inflamacije, dakle deluje proinflamatorno. IL-8 je jedinstven po tome što se može sintetisati rano u toku inflamatornog odgovora, ali će perzistirati u dužem periodu, čak danima i nedeljama. Po tome, ovaj citokin je potpuno različit od većine drugih inflamatornih medijatora, čija se sinteza i klirens *in vivo* odvija u toku nekoliko sati. Otporan je na temperaturu, proteolizu i kiselu sredinu. To su idealne biohemijske karakteristike za molekul koji treba da opstane na mestu akutne inflamacije. Povećana koncentracija IL-8 u plazmi može ispoljiti anti-inflamatorno dejstvo pošto smanjuje nakupljanje neutrofila. IL-8 je ekstremno osetljiv na oksidanse koji čak učestvuju u regulaciji genske ekspresije za ovaj citokin. Ovo je važno zbog toga što ishemijsko-

reperfuziono oštećenje indukuje stvaranje reaktivnih kiseoničkih intermedijera koji su snažni oksidansi.

U studiji, Funayama i sar. (934) utvrđene su povišene koncentracije IL-8 unutar 24 h od početka infarkta kod 50 bolesnika sa STEMI. Takođe, utvrđene su značajno više koncentracije IL-8 u arteriji povezanoj sa infarktom nego u perifernim krvnim sudovima. Vaskularni endotel može biti izvor IL-8 (935). Kako endotelne ćelije u kulturi oslobađaju IL-8 u uslovima hipoksije (936), ishemija miokarda može sama po sebi biti stimulus za oslobađanje IL-8. Osim toga, IL-8 je potentni stimulus za oslobađanje enzima i markera oksidativnog stresa u neutrofilima (937, 938). U studiji Berns i sar. (939) kod 150 bolesnika sa STEMI lečenih PKI koncentracija IL-8 izmerena 10. dana nakon PKI bila je prediktor rizika od nastanka NKVD u jednogodišnjem praćenju.

Interleukin 6 je plejotropni citokin uključen u različite, često kontradiktorne procese. On je jedan od najznačajnijih elemenata inflamatorne reakcije (940), ali on istovremeno može imati i antiinflamatorne efekte ograničavajući ekspresiju TNF- $\alpha$  i povećavajući sekreciju IL-10 (940, 941). Povišene koncentracije IL-6 povezane su sa lošijom prognozom bolesnika sa AIM ili srčanom insuficijencijom (942). S druge strane on je od vitalnog značaja za efekte ishemijskog prekondicioniranja (943) i ograničava aterosklerozu u eksperimentalnim modelima (941). Ovi dvosmisleni nalazi mogu se objasniti vezivanjem IL-6 za dva receptora (IL-6R ili gp80 i gp130). I gp80 i gp130 mogu da se eksprimiraju na ćelijskoj membrani ili u funkcionalnoj solubilnoj formi. Nivoi IL-6 mogu takođe da reflektuju i stepen poremećaja hemodinamike (944). IL-6 može da smanji kontraktilnost miokarda (945), ili može biti samo indikator težine ishemije (946). Povećano vezivanje za sIL-6R i povećana IL-6 signalizacija u miokardu mogu biti veza sa kardiovaskularnim komplikacijama AIM. Ovo inicijalno vezivanje i IL-6 trans-signalizacija u miokardu mogu biti stimulus za dalju sekreciju IL-6 (947). Pošto je srčani mišić relativno siromašan u IL-6R (948), obilje sIL-6R može regulisati ekspresiju IL-6 (949). Dodatnu povezanost povišenih koncentracija IL-6 sa komplikacijama nakon AIM, treba tražiti i u činjenici da je IL-6 jedan od najpotentnijih

aktivatora lokalne inflamacije (940, 950) koja može biti povezana sa pojavom atrijalne fibrilacije i ventrikularnih aritmija (951).

Studije na bolesnicima sa AKS su utvrdile da su povišene koncentracije IL-6 prediktor budućeg AKS (952, 953). Jednogodišnje praćenje bolesnika sa AKS pokazalo je da su nivoi IL-6 tokom prvih 48 h od AKS prediktor NKVD u prvih 30 dana, kao i u toku jednogodišnjeg praćenja (954). U studiji Tang i sar. (955) utvrđeno je da IL-6 nezavisan prediktor kardiovaskularnog mortaliteta tokom trogodišnjeg praćenja kod bolesnika sa STEMI.

Interleukin-6 je moćan induktor akutno-faznog odgovora jetre. Povišene koncentracije reaktanata akutne faze, npr. CRP korelira sa IL-6, i IL-6 može da obezbedi dodatne informacije u odnosu na CRP u proceni rizika od budućih kardiovaskularnih događaja. Reakcija akutne faze je povezana sa povišenjem koncentracije fibrinogena poznatim faktorom rizika za koronarnu bolest, sa autokrinom i parakrinom aktivacijom monocita pomoću IL-6 u zidu krvnog suda doprinoseći taloženju fibrinogena. Reakcija akutne faze je povezana sa povećanim viskozitetom krvi, brojem trombocita i aktivnošću. Interleukin-6 smanjuje aktivnost lipoproteinske lipaze i nivoje monomerne lipoproteinske lipaze u plazmi što povećava preuzimanje lipida od strane makrofaga. Cirkulišući IL-6 takođe stimuliše osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, čija aktivacija je povezana sa centralnom gojaznošću, hipertenzijom i insulinskom rezistencijom (955).

Ohtsuka i sar. (956) su utvrdili da koncentracije IL-6 koreliraju sa geometrijskim promenama leve komore tokom procesa remodelovanja u bolesnika sa AIM. Koncentracija IL-6 u uzročnoj koronarnoj arteriji nakon PKI je povezana sa restenozom revaskularizovane koronarne arterije u AIM (934). IL-6 nije samo nezavisan marker povećanog mortaliteta u nestabilnoj koronarnoj arterijskoj bolesti, već i omogućava identifikaciju bolesnika koji bi imali koristi od ranog invazivnog lečenja (957).

Drugi faktor je obuhvatio sICAM-1, E- i L-selektin. Iako nešto manje značajno u odnosu na treći faktor, ovaj faktor je bio dobar prediktor pojave NKVD kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI.

Promene u funkciji trombocita i endotelnih ćelija su očigledni u aterosklerozi. Povrede endotela i/ili aktivacija, bilo kog uzroka, vode sintezi određenih faktora i promenama membrane endotela, čija je posledica direktan kontakt sa trombocitima i leukocitima (958). Ovaj koncept je doveo do velikog interesovanja za mehanizam interakcija leukocita i trombocita, a zatim i do otkrića više adhezionih molekula kao što su ICAM-1, VCAM-1 i familija selektina (P-selektin, E-selektin L-selektin) koji zajedno imaju značajnu ulogu u inicijaciji migracije leukocita u zid krvnog suda (959). U plazmi se takođe mogu detektovati adhezivne molekule (solubilne adhezivne molekule), koje se sekretuju, izlivaju ili cepaju od ćelijske membrane kao deo prisutneog procesa, tj. oboljenja.

Brojni dokazi danas ukazuju da bolesnici sa AIM lečeni PKI mogu da imaju i disfunkciju endotela i koronarne mikrocirkulacije (960). Tako PKI sama po sebi može biti odgovorna za lokalno i sistemsko oštećenje direktno delujući na endotel. ICAM-1 se smatra markerom endotelne disfunkcije i povišene koncentracije njegove solubilne forme u plazmi povezane su sa incidencom hronične ishemijske bolesti srca (961–963). Nekoliko studija je ispitivalo povezanost solubilnih adhezionih molekula i rizika od NKVD kod bolesnika sa AKS. Rezultati su bili vrlo kontradiktorni. Povišene koncentracije ICAM-1, VCAM-1 kao i selektina P i E, utvrđene su kod bolesnika sa AKS (964–966). O'Malley i sar. (967) su utvrdili povišene nivoe ICAM-1 kod većine bolesnika u prvim satima nakon početka bola u grudima. Međutim, podaci o korisnosti solubilnih adhezionih molekula u predikciji ishoda kod bolesnika sa STEMI su vrlo ograničeni.

Postadzhiyan i sar. (968) su pokazali da su povišeni nivoi sICAM-1 identifikovali bolesnike sa AKS koji su imali najviši rizik od dobijanja ishemijskih događaja. Nasuprot njima, u prospektivnoj opservacionoj studiji povišene koncentracije samo sVCAM-1, ali ne i sICAM-1, E-selektina, ili P-selektina su bile prediktori

povećanog rizika od pojave NKVD tokom 6-mesečnog praćenja kod bolesnika sa AKS (nestabilna angina i non-Q AIM) (969). U studiji Fan i sar. (970) nije utvrđena povezanost koncentracije koncentracija sICAM-1, sVCAM-1, sP-selektina u ranoj fazi akutnog STEMI sa lošim kliničkim ishodom.

Prvi faktor dobijen u faktorskoj analizi je obuhvatao sTNFR1, sTNFR2 i MMP-9. Iako on nije bio značajno povezan sa pojavom NKVD u prvih 30 dana njegova struktura je vrlo logična.

Tokom ishemije miokarda, TNF- $\alpha$  se oslobađa unutar nekoliko minuta iz mast ćelija i makrofaga. Tokom perzistentne ishemije TNF- $\alpha$  potiče iz kardiomiocita. Pokazano je kod pacova da se nakon AIM, gustina TNFR1 povećava tokom 10 dana, dok gustina TNFR2 ostaje nepromenjena (520, 521, 971). Nasuprot tome, u ishemičnom miokardu, primećena je nishodna regulacija ovih receptora, praćena povećanjem solubilnih formi sTNFR1 i sTNFR2. Solubilni receptori imaju duži poluživot od TNF- $\alpha$  i njihove koncentracije mogu da posluže kao surogat marker za aktivnost TNF- $\alpha$  (972).

Kardiotoksičnost TNF- $\alpha$  ogleda se u suprimiranju kontraktilnosti srčanog mišića, indukciji hipertrofije srca i apoptoze u miocitima srca. Takođe ima direktne efekte na ekstracelularni matriks i kolagen i doprinosi remodelovanju srca. Poslednjih godina u takozvanim anti-citokinskim kliničkim studijama korišćena su u terapijske svrhe ili anti-TNF antitela (ATTACH) ili solubilni TNF receptori (RENEWAL) (973, 974).

Međutim negativni rezultati ovih studija naveli su na ponovno razmatranje uloge TNF- $\alpha$  u kardiovaskularnim oboljenjima, navodeći na zaključak da TNF- $\alpha$  osim toksičnog efekta može i imati i protektivnu ulogu u AIM. Rezltati studije Monden i sar. (975) su pokazali da sTNFR1 povećava rupturu komore nakon AIM bez uticaja na vrednost arterijskog pritiska ili srčanu frekvenciju, ali da značajno redukuje sadržaj kolagena u miokardu nakon infarkta sa daljom aktivacijom MMP-9. Dalja aktivacija MMP-9 se može pripisati povećanju broja makrofaga. Povećanje broja makrofaga može biti rezultat anti-apoptotičkih efekata sTNFR1. Ovo ukazuje da je TNF- $\alpha$  neophodan za odgovarajuću koordinaciju procesa reparacije nakon AIM. Nekoliko studija je pokazalo

da su MMP, posebno MMP-9 i MMP-2 uključeni ne samo u proces rupture miokarda, već i u remodelovanje leve komore i pojavu srčane insuficijencije. Poznato je da TNF- $\alpha$  doprinosi remodelovanju leve komore lokalnom indukcijom specifičnih MMP, na životinjskom modelu srčane insuficijencije. Studija Ueland i sar. (976) je pokazala da koncentracija sTNFR1 pruža značajne prognostičke informacije tokom dvogodišnjeg praćenja kod bolesnika koji su razvili srčanu insuficijenciju tokom akutne faze AIM. Utvrđeno je da visoki nivoi solubilnih TNFR mogu blokirati i citotoksični TNFR1, ali i protektivni TNFR2.

Osim najava da bi sTNFR tokom hospitalizacije mogao biti koristan prediktor za identifikaciju visokorizičnih bolesnika nakon komplikovanih AIM, dalje kliničke studije su neophodne da bi se detaljno ispitala povezanost sTNFR, MMP-9 i pojave NKVD. Možda baš ova sprega u budućnosti otvori put za novi terapijski pristup u cilju smanjenja pojave NKVD nakon infarkta.

Četvrti faktor obuhvatao je interleukine 7 i 15 i MIP-1 $\alpha$ . Za razliku od drugog i trećeg faktora koji su obuhvatali biomarkere koji su prethodno pojedinačno ispitivani kod bolesnika sa AKS, AIM ili ređe u STEMI, u literaturi nema podataka o prognostičkom značaju IL-7, IL-15 i MIP-1 $\alpha$  za pojavu smrtnog ishoda/pojavu NKVD kod bolesnika sa STEMI.

Interleukin-7 je esencijalni citokin za razvoj T-ćelija i regulaciju homeostaze istih (977). Inflamacija indukovana IL-7 može da doprinese aterosklerozi. On stimuliše aktivaciju monocita i NK ćelija, što uslovljava povećanu sintezu inflamatornih citokina (978–980). Interleukin-7 deluje na endotelne ćelije preko receptora (981).

Dugo nije bilo studije koja bi razjasnila da li IL-7 ima ulogu u aterosklerozi, povezanu sa posredovanim u disfunkciji endotelne ćelije. Nedavno objavljena studija utvrdila je da se IL-7 povećava koncentraciju ćelijskih adhezivnih molekula i MCP-1 u endotelne ćelije i ubrzava adheziju monocita na endotelne ćelije. Ova regulacija je posredovana PI3K/AKT-zavisnom ili nezavisnom aktivacijom NF- $\kappa$ B. Povišenje IL-7 u plazmi indukuje privlačenje monocita/makrofaga na endotel bez uticaja na koncentraciju holesterola u plazmi. Nedostatak IL-7 u ćelijama koštane srži

redukuje migraciju monocita/makrofaga u aterosklerotičnu leziju. Iz ovoga se može zaključiti da IL-7 ima aktivnu ulogu u aterogenezi. Povišene koncentracije IL-7 u serumu utvrđene su kod bolesnika sa nestabilnom anginom (980) ili koronarnom bolešću (982).

Delovanjem IL-7, hemokini IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  i IP-10 se povećano ekspimiraju pogotovo u uznapredovalom aterosklerotičnom plaku. Ovo delovanje sigurno svrstava IL-7 u red „novih“ medijatora inflamacije kod ovih bolesnika. Kod bolesnika sa nestabilnom anginom utvrđeno je da trombociti daju značajan doprinos povišenju koncentracije IL-7. Smatra se da nakon aktivacije trombociti iz  $\alpha$ -granula oslobađaju veliku količinu IL-7. Nije slučajno što se u četvrtom faktoru sa IL-7 našao i MIP-1 $\alpha$ . IL-7 indukuje sintezu MIP-1 $\alpha$  u monocitima. Ovaj hemokin stimuliše oslobađanje IL-7 iz trombocita jer trombociti ekspimiraju receptor za MIP-1 $\alpha$  (CCR1).

IL-7 potencira nestabilnost plaka koja vodi AIM. Iako se može pretpostaviti da je povećanje IL-7 nakon PKI više posledica bolesti, nego uzrok bolesti, studije opisuju AKS kao kontinuirani proces koji uključuje rupturu više plakova a ne samo uzročne lezije (983). Iako nije specifična za aterosklerozu i ako nije incijalni događaj, IL-7 indukovana inflamacija može da doprinese progresiji nestabilnosti plaka, predstavljajući amplifikujući faktor u ovom procesu.

Interleukin-15 ima esencijalnu ulogu u razvoju NK ćelija. Aktivira proliferaciju, citotoksičnost i i sintezu citokina i reguliše interakciju NK ćelija i makrofaga. Studije su pokazale da IL-15 može da ima značajnu ulogu u imunom odgovoru i održavanju neutrofilima-posredovanih inflamatornih procesa. On je potentan faktor rasta za aktivirane T-ćelije indukujući njihovu pokretljivost i usmeravajući njihovu migraciju. IL-15 je citokin sa brojnim dejstvima koji igra važnu ulogu u razvoju i homeostazi ćelija kako urođenog, tako i adaptivnog imunog sistema (984, 985), te se zbog toga smatra vrlo važnim faktorom u aterosklerozi (412, 416, 417, 986). IL-15 se sintetiše i sekretuje kao heterodimer sa IL-15R $\alpha$  (987). Međutim, njegova uloga kao prognostičkog markera AIM nije ispitivana.

Samo jedna objavljena studija na malom broju bolesnika, ispitivala je i utvrdila prognostički značaj MIP-1 $\alpha$  (CCL-3) kod bolesnika sa AIM (881). Povišene koncentracije CCL3 tokom AIM i zatim njihov nagli pad ilustruju iz temelja promenjenu homeostazu hemokina u AKS. Ranije je potvrđena ushodna regulacija CCL3 iRNK u ishemičnom miokardu (988). Dve studije su takođe potvrdile da se CCL3 prolazno sekretuje tokom ishemije miokarda, gde potencijalno deluje u mehanizmu ishemija/reparacija privlačenjem CCR5+ T ćelija.

Koji bi bili neki budući pravci istraživanja na ovu temu?

Poznato je da se da se genetskim faktorima može objasniti oko 40% rizika za nastanak ateroskleroze i posledičnih oboljenja. Istraživanja u 2011. god. na polju genetike atroskleroze i koronarne arterijske bolesti, korišćenjem genomske studije udruženosti, rezultirala su udvostručavanjem identifikovanog broja lokusa sa značajnom asocijacijom. Tačkasti polimorfizam rs1859023 na hromozomu 7q21 blizu PFTK1 gena koji kodira serin/treonin protein kinazu, ciklin-zavisnu kinazu koja reguliše progresiju ćelijskog ciklusa i proliferaciju. Polimorfizam rs6903956 na hromozomu 6p24.1 takođe je udružen sa koronarnom bolešću. Utiče na ekspresiju C6orf105 iRNA, koja kodira protein koji utiče na biologiju endotelnih ćelija. Nedavno objavljena meta-analiza identifikovala je uz postojeće još i pet novih polimorfizama povezanih sa koronarnom bolešću, kao npr. LIPA na 10q23, PDGFD na 11q22, ADAMTS7-MORF4L1 na15q25, genskilokus 7q22, KIAA1462 na 10Q11v (989). Lokus odgovoran ua inflamaciju i reparaciju arterije je 10q11.21 sa varijantom rs1746048 u blizini gena koji koodira hemokin CXCL12 (990, 991). Literaturni podaci ukazuju da hromozomi 1, 6, 9, 10 i 17 imaju mnogo više CHD lokusa nego drugi hromozomi (990, 992). Mnogi od novootkrivenih gena udruženih sa aterosklerozom koristeći genomske studije udruženosti nisu povezani sa biologijom lipoproteina (> 80%) ili sa bilo kojim poznatim faktorom rizika za CHD (> 50%). Oni pripadaju opštoj biologiji ćelije i identifikovani su kao tumor supresori za različite vrste kancera, kao regulatori inflamacije, stem ćelija, endotelnih ćelija, ekstracelualrnog matriksa, ćelijske signalizacije, pokretljivosti i rasta, i kao deo kanoničnih biohemijskih puteva koji posreduju u ćelijskom metabolizmu na različite načine. Ovo navodi na zaključak da mnogi od njih doprinose arterijskoj



inflamaciji i procesu obnavljanja arterije (993). Ove studije su rasvetlile gene relevantne za mehanizam inflamacije i biologiju stem ćelije. Ovi nalazi ne osporavaju činjenicu da se ateroskleroza pokreće i pogoršava povišenim lipidima; aterosklerotski "novi geni" sugerišu da je mehanizam odgovoran za razvoj arterijske lezije mnogo složeniji od jednostavnog odgovora na povredu, gde je povreda potrebna, ali možda ne i dovoljna za napredovanje bolesti.

Genetika i epigenetika će nastaviti da doprinese boljem razumevanju suspektosti za aterosklerozu, i mehanizma ateroskleroze i njene distribucije. Tradicionalni koncept oštećenja arterijskog zida indukovanog lipidima, praćen stvaranjem masne pruge, ateroma, lipidnog jezgra, rupturom plaka i tromboembolijskim komplikacijama, više nije dovoljno objašnjenje za novija otkrića. Mnogo relevantniji je novi model ravnoteže između arterijske inflamacije i reparacije, između genetske suspektosti i rezistencije na povredom izazvanu arterijsku inflamaciju. Godinama je fokus bio na smanjenju arterijske povrede sa modifikacijama životnih navika (izbegavanje pušenja, lečenje depresije, ishrana i fizička aktivnosti), lečenju dislipidemije (ishrana i statini), kontroli krvnog pritiska (ishrana, vežbanje, lekovi), i sprečavanju i ograničavanju tromboze (acetilsalicilna kiselina, antagonisti purinskih receptora). Činjenica da je na životinjskim modelima pokazano da se ateroskleroza može značajno sprečiti bez modifikacije uzročne povrede (visok holesterol), očuvanjem kapaciteta reparacije arterije davanjem injekcije kondicioniranih progenitornih ćelija, sugeriše da će budućnost doneti novu paletu terapijskih mogućnosti. Takođe, genetska revolucija na polju ateroskleroza će povećati mogućnost korišćenja personalizovanog pristupa, posebno pri primeni mera prevencije i lečenja AIM (994).

Danas, u eri translacione medicine, ulažu se veliki naponi kako bi se premostio jaz između eksperimentalnih istraživanja i kliničke prakse, kao i da bi se razradili i objavili novi podaci koji bi mogli da pomognu u prevenciji, dijagnostici i lečenju AIM (994–997). Modeli za predviđanje rizika su često kompleksni, a verovatno možemo očekivati da će vremenom postati još kompleksniji. Njihova uspešna translacija u praksu zahteva ne samo bolje razumevanje u smislu procene njihove uspešnosti, već i

jedno “široko” znanje o tome kako dobijene rezultate koristiti u praksi. Razvoj translacione medicine trebalo bi da omogući da se stvarno vidi neka korist od multimarkerskog pristupa AIM i da se izbegne upadanje u zamku identifikovanja visokorizičnih bolesnika, ali bez naznaka daljeg tretmana bolesnika sa AIM. Ovo će zahtevati dodatno obrazovanje kako lekara-kliničara, tako i kreatora zdravstvene politike i javnosti.

Zahvaljujući završetku projekta humanog genoma (engl. *Human Genome Project*, HGP) (1998) kao i projekta koji je zatim usledio International HapMap Project (1999), i uz izvanredna tehnološka dostignuća, genetsko testiranje je danas široko rasprostranjeno u kliničkim laboratorijama, uz pomoć relativno jeftinih, brzih i pouzdanih visoko propulzivnih tehnika. Nažalost, povezanost genotipa, fenotipa i kliničkih podataka nije uvek očigledna. S toga je veliki izazov istraživanje povezanosti između gena i okoline, kao i njihov uticaj na lečenje bolesnika. Nema nikakve sumnje da će saznanja koja se stiču u disciplinama sa zajedničkim nastavkom -omika (genomika, proteomika, lipidomika, metabolomika, citomika) pokrenuti i podstaći širok spektar istraživanja, što će omogućiti da se rasvetli nekoliko faza na genetskom-ćelijskom-molekularnom-biohemijskom nivou. Tada će biti moguće prevladati tradicionalni mehanistički pristup bolesti i razviti personalizovani okvir za klasifikovanje bolesnika u različite (čak pojedinačne) podgrupe (1995–2000). S izumom epigenetske tehnologije velikog kapaciteta zasnovane na čipovima (npr. ChIP-on-chip i ChIP-seq), genetsko testiranje će se proširiti dalje od genske ekspresije i istraživati aktivnost genske regulacije, čime će se prevladati nedostaci svojstveni tradicionalnom genetskom testiranju i omogućiti istovremeno merenje relativnih nivoa ekspresije hiljada pojedinih gena.

Dok sve ove strategije ne postanu naša svakodnevnica u rutinskoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi, ova studija bi mogla da bude osnova za dalja istraživanja sa ciljem da se dizajnira kliničko praćenje koje će se razlikovati za visokorizične i niskorizične bolesnike sa STEMI lečene pPKI koje bi predložilo veoma striktno, detaljno kliničko praćenje visokorizičnih bolesnika svakog meseca u narednih 6 meseci do godinu dana

uz modifikaciju životnih navika (pušenje, način ishrane,...). Takođe, bolesnici sa visokim rizikom mogli bi da imaju koristi od dodatne mehaničke ili farmakološke terapije tokom ili nakon pPKI.

U ovom trenutku veza između genetskog testiranja i kliničkih podataka kod bolesnika sa AIM nije u potpunosti uspostavljena, tako da bi procena rizika mogla bolesnika da navede na neispravan zaključak. Nova strategija, teragnostika, koja objedinjuje bioinformatiku, genomiku, proteomiku i funkcionalnu genomiku kao molekularno-biološke alate za razvoj savremene medicine, posebno molekularne dijagnostike i terapije bi mogla da nam pomogne u boljem razumevanju stvarne korisnosti genetskih analiza, a samim tim i farmakogenetike. Do tada fenotipsko testiranje ostaje temeljno uporište kliničko-biohemijske prakse u godinama koje dolaze.

## ZAKLJUČCI

Na osnovu istraživanja izloženih u ovoj doktorskoj disertaciji može se zaključiti:

1. Vremenski profili tradicionalnih biomarkera nekroze (cTnI, masa CK-MB, mioglobin), inflamacije (CRP), hemodinamskog stresa (BNP, NT-proBNP) u ovoj studiji se podudaraju sa poznatim krivama promene koncentracija biomarkera u akutnom infarktu miokarda.
2. Rezultati korelacione analize u ovoj studiji potvrđuju poznatu povezanost biomarkera nekroze (cTnI, mase CK-MB), markera inflamacije (CRP) i hemodinamskog stresa (NT-proBNP) sa oslabljenom srčanom funkcijom.
3. Rezultati ove studije pokazuju da je oslobađanje MPO u toku prvog prednjeg STEMI u vidu bifazne krive sa dva pika na 4h i 24h posle pPKI. MPO na 24h značajno korelira sa markerom nekroze TnI, kao i pojavom srčane insuficijencije.
4. Vrednosti Lp-PLA<sub>2</sub> pri prijemu koreliraju sa faktorima rizika kao što su muški pol, pušenje, ukupan holesterol, LDL-holesterol, apoB i smanjenom bubrežnom funkcijom kod bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI.
5. Incidenca smrtnog ishoda u bolnici u bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI je bila 6%. MPO na 24h od pPKI je bio nezavisan prediktor smrtnog ishoda u bolnici. Koncentracije MPO  $\geq 916$  pmol/L imale su prediktivnu vrednost za smrtni ishod u bolnici sa osetljivošću 83,3% i specifičnošću 86,2%.
6. Incidenca pojave NKVD (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, revaskularizacija ciljne lezije, moždani udar) u prvih 30 dana nakon prvog prednjeg STEMI lečenog pPKI je bila 10,6%. Koncentracija Lp-PLA<sub>2</sub> određena pri prijemu bolesnika je bila nezavisan prediktor pojave NKVD u prvih 30 dana. Koncentracije Lp-PLA<sub>2</sub>  $\geq 463$  ng/mL imale su

prediktivnu vrednost za pojavu NKVD u prvih 30 dana sa osetljivošću 80,0 % i specifičnošću 72,2 %.

7. Incidenca novonastale atrijalne fibrilacije u bolesnika sa STEMI lečenih pPKI je bila 5,0%. BNP uzet 24h nakon pPKI je bio nezavisan prediktor pojave novonastale atrijalne fibrilacije. Koncentracije BNP  $\geq 720$  pg/mL imale su prediktivnu vrednost za pojavu novonastale atrijalne fibrilacije sa osetljivošću 77,8% i specifičnošću 84,8%.

8. Incidenca smrtnog ishoda u toku jednogodišnjeg praćenja u bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI je bila 5%. Nezavisni prediktori jednogodišnjeg mortaliteta bili su koncentracija mase CK-MB, srčana insuficijencija u toku hospitalizacije i smanjena bubrežna funkcija.

9. Incidenca pojave NKVD (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, revaskularizacija ciljne lezije, moždani udar) u toku jednogodišnjeg praćenja u bolesnika sa prvim prednjim STEMI lečenih pPKI je bila 10%. Nezavisni prediktori pojave NKVD u toku jednogodišnjeg praćenja bili su koncentracija mase CK-MB i pojava novonastale atrijalne fibrilacije.

10. Grupisanje više biomarkera eksploratornom faktorskom analizom može da bude korisno u istraživanju biološke interakcije između različitih biomarkera u STEMI. Dobijeni faktor koga su sačinjavale adhezione molecule (sICAM-1, sE-selektin i sL-selektin), kao i faktor koji je obuhvatao citokine (IL-6, IL-8 i MCP-1) bili su nezavisni prediktori pojave NKVD u prvih 30 dana nakon prvog prednjeg STEMI lečenog pPKI.

## LITERATURA

1. Vasiljević Z. Akutni koronarni sindrom: patofiziološki mehanizam, klasifikacija i klinički oblici: *Acta Clinica* 2006;6(1):29–36.
2. Grech ED, Ramsdale DR. Acute coronary syndrome: unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. *BMJ* 2003;326:1259–1261.
3. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W; Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2002;23(23):1809–1840.
4. Hasdai D, Behar S, Wallentin L, Danchin N, Gitt AK, Boersma E, Fioretti PM, Simoons ML, Battler A. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin; the Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes (Euro Heart Survey ACS). *Eur Heart J* 2002;23(15):1190–1201.
5. <http://www.batut.org.rs/>
6. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
7. Gelfand EV, Cannon CP. Pathophysiology of acute coronary syndromes. In: *Management of acute coronary syndromes*. John Wiley & Sons, Ltd; 2009:1–12.
8. Burt BA. Definitions of risk. *J Dent Educ* 2001;65(10):1007–1008.
9. Kraemer HC, Stice E, Kazdin A, Offord D, Kupfer D. How do risk factors work together? Mediators, moderators, and independent, overlapping, and proxy risk factors. *Am J Psychiatry* 2001;158(6):848–856.
10. Rodríguez-Artalejo F, Banegas Banegas JR. Cardiovascular epidemiology and prevention. *J Epidemiol Community Health* 2004;58(2):116–119.
11. Ostojić M, Terzić B, Jančev M, Rajković T, Ničić B, Nedeljković I. Protokol za

- prehospitalnu dijagnostiku i terapiju akutnog koronarnog sindroma. Beograd 2012.
12. ECC Committee, Subcommittees and Task Forces of the American Heart Association. 2005 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2005;112(24 Suppl):IV1–203.
  13. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):959–969.
  14. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56(5):786–794.
  15. Hasche ET, Fernandes C, Freedman SB, Jeremy RW. Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation* 1995;92(4):710–719.
  16. DeWood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang HT. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980;303(16):897–902.
  17. A clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO IIb) Angioplasty Substudy Investigators. *N Engl J Med* 1997;336(23):1621–1628.
  18. Aversano T, Aversano LT, Passamani E, Knatterud GL, Terrin ML, Williams DO, Forman SA; Atlantic Cardiovascular Patient Outcomes Research Team (C-PORT). Thrombolytic therapy vs primary percutaneous coronary intervention for myocardial infarction in patients presenting to hospitals without on-site cardiac surgery: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;287(15):1943–1951.
  19. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P,

- Abildgaard U, Pedersen F, Madsen JK, Grande P, Villadsen AB, Krusell LR, Haghfelt T, Lomholt P, Husted SE, Vigholt E, Kjaergard HK, Mortensen LS; DANAMI-2 Investigators. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349(8):733–742.
20. Taher T, Fu Y, Wagner GS, Goodman SG, Fresco C, Granger CB, Wallentin L, van de Werf F, Verheugt F, Armstrong PW. Aborted myocardial infarction in patients with ST-segment elevation: insights from the Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Regimen-3 Trial Electrocardiographic Substudy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(1):38–43.
  21. Lamfers EJ, Hooghoudt TE, Uppelschoten A, Stolwijk PW, Verheugt FW. Effect of prehospital thrombolysis on aborting acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;84(8):928–930, A6–7.
  22. Lamfers EJ, Hooghoudt TE, Hertzberger DP, Schut A, Stolwijk PW, Verheugt FW. Abortion of acute ST segment elevation myocardial infarction after reperfusion: incidence, patients' characteristics, and prognosis. *Heart* 2003;89(5):496–501.
  23. Ostojić M. Perkutane koronarne intervencije u akutnom infarktu miokarda sa ST elevacijom. *Acta Clinica* 2006;6(1):93–113.
  24. Zijlstra F, de Boer MJ, Hoorntje JC, Reiffers S, Reiber JH, Suryapranata H. A comparison of immediate coronary angioplasty with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;328(10):680–684.
  25. Vermeer F, Oude Ophuis AJ, vd Berg EJ, Brunninkhuis LG, Werter CJ, Boehmer AG, Lousberg AH, Dassen WR, Bär FW. Prospective randomised comparison between thrombolysis, rescue PTCA, and primary PTCA in patients with extensive myocardial infarction admitted to a hospital without PTCA facilities: a safety and feasibility study. *Heart* 1999;82(4):426–431.
  26. Widimský P, Groch L, Zelízko M, Aschermann M, Bednár F, Suryapranata H. Multicentre randomized trial comparing transport to primary angioplasty vs immediate thrombolysis vs combined strategy for patients with acute



- myocardial infarction presenting to a community hospital without a catheterization laboratory. The PRAGUE study. *Eur Heart J* 2000;21(10):823–831.
27. Widimský P, Budesínský T, Vorác D, Groch L, Zelízko M, Aschermann M, Branny M, St'ásek J, Formánek P; 'PRAGUE' Study Group Investigators. Long distance transport for primary angioplasty vs immediate thrombolysis in acute myocardial infarction. Final results of the randomized national multicentre trial-PRAGUE-2. *Eur Heart J* 2003;24(1):94–104.
  28. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003; 361 (9351): 13–20.
  29. Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M, Knot J, Aaberge L, Andrikopoulos G, Baz JA, Betriu A, Claeys M, Danchin N, Djambazov S, Erne P, Hartikainen J, Huber K, Kala P, Klineva M, Kristensen SD, Ludman P, Ferre JM, Merkely B, Milicic D, Morais J, Noc M, Opolski G, Ostojic M, Radovanovic D, De Servi S, Stenestrand U, Studencan M, Tubaro M, Vasiljevic Z, Weidinger F, Witkowski A, Zeymer U; European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010;31(8):943–957.
  30. Cristal N, Szwarcberg J, Gueron M. Supraventricular arrhythmias in acute myocardial infarction. Prognostic importance of clinical setting; mechanism of production. *Ann Intern Med* 1975;82(1):35–39.
  31. Hunt D, Sloman G, Penington C. Effects of atrial fibrillation on prognosis of acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1978;40(3):303–307.
  32. Bosch X, Théroux P, Waters DD, Pelletier GB, Roy D. Early postinfarction ischemia: clinical, angiographic, and prognostic significance. *Circulation* 1987;75(5):988–995.
  33. Benhorin J, Andrews ML, Carleen ED, Moss AJ. Occurrence, characteristics and prognostic significance of early postacute myocardial infarction angina

- pectoris. *Am J Cardiol* 1988;62(1):679–685.
34. Fluck DC, Olsen E, Pentecost BL, Thomas M, Fillmore SJ, Shillingford JP, Mounsey JP. Natural history and clinical significance of arrhythmias after acute cardiac infarction. *Br Heart J* 1967;29(2):170–189.
  35. Jewitt DE, Balcon R, Raftery EB, Oram S. Incidence and management of supraventricular arrhythmias after acute myocardial infarction. *Lancet* 1967;2(7519):734–738.
  36. Luria MH, Knoke JD, Wachs JS, Luria MA. Survival after recovery from acute myocardial infarction. Two and five year prognostic indices. *Am J Med* 1979;67(1):7–14.
  37. Kitchin AH, Pocock SJ. Prognosis of patients with acute myocardial infarction admitted to a coronary care unit. II. Survival after hospital discharge. *Br Heart J*;39(11):1167–1171.
  38. Peterson ED, Shaw LJ, Califf RM. Risk stratification after myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1997;126(7):561–582
  39. Braunwald E, Zipes DF, Libby P. *Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2001.
  40. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, Julian D, Lengyel M, Neumann FJ, Ruzyllo W, Thygesen C, Underwood SR, Vahanian A, Verheugt FW, Wijns W; Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2003;24(1):28–66.
  41. Sugiura T, Iwasaka T, Takahashi N, Yuasa F, Takeuchi M, Hasegawa T, Matsutani M, Inada M. Factors associated with atrial fibrillation in Q wave anterior myocardial infarction. *Am Heart J* 1991;121(5):1409–1412.
  42. Rechavia E, Strasberg B, Mager A, Zafirir N, Kusniec J, Sagie A, Sclarovsky S. The incidence of atrial arrhythmias during inferior wall myocardial infarction with and without right ventricular involvement. *Am Heart J*

- 1992;124(2):387–391.
43. DeSanctis RW, Block P, Hutter AM Jr. Tachyarrhythmias in myocardial infarction. *Circulation* 1972;45(3):681–702.
  44. Goldberg RJ, Seeley D, Becker RC, Brady P, Chen ZY, Osganian V, Gore JM, Alpert JS, Dalen JE. Impact of atrial fibrillation on the in-hospital and long-term survival of patients with acute myocardial infarction: a community-wide perspective. *Am Heart J* 1990;119(5):996–1001.
  45. Crenshaw BS, Ward SR, Granger CB, Stebbins AL, Topol EJ, Califf RM. Atrial fibrillation in the setting of acute myocardial infarction: the GUSTO-I experience. *Global Utilization of Streptokinase and TPA for Occluded Coronary Arteries. J Am Coll Cardiol* 1997;30(2):406–413.
  46. Eldar M, Canetti M, Rotstein Z, Boyko V, Gottlieb S, Kaplinsky E, Behar S. Significance of paroxysmal atrial fibrillation complicating acute myocardial infarction in the thrombolytic era. *SPRINT and Thrombolytic Survey Groups. Circulation* 1998;97(10):965–70.
  47. Helmers C, Lundman T, Mogensen L, Orinius E, Sjögren A, Wester PO. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Acta Med Scand* 1973;193(1-2):39–44.
  48. Cristal N, Peterburg I, Szwarcberg J. Atrial fibrillation developing in the acute phase of myocardial infarction. Prognostic implications. *Chest* 1976;70(1):8–11.
  49. Behar S, Zahavi Z, Goldbourt U, Reicher-Reiss H. Long-term prognosis of patients with paroxysmal atrial fibrillation complicating acute myocardial infarction. *SPRINT Study Group. Eur Heart J* 1992;13(1):45–50.
  50. Wong CK, White HD, Wilcox RG, Criger DA, Califf RM, Topol EJ, Ohman EM. New atrial fibrillation after acute myocardial infarction independently predicts death: the GUSTO-III experience. *Am Heart J* 2000;140(6):878–885.
  51. Sugiura T, Iwasaka T, Ogawa A, Shiroyama Y, Tsuji H, Onoyama H, Inada M. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1985;56(1):27–29.
  52. Zoni Berisso M, Carratino L, Ferroni A, Mela GS, Mazzotta G, Vecchio C.

- Frequency, characteristics and significance of supraventricular tachyarrhythmias detected by 24-hour electrocardiographic recording in the late hospital phase of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;65(16):1064–1070.
53. Serrano CV Jr, Ramires JA, Mansur AP, Pileggi F. Importance of the time of onset of supraventricular tachyarrhythmias on prognosis of patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 1995;18(2):84–90.
  54. Madias JE, Patel DC, Singh D. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction: a prospective study based on data from a consecutive series of patients admitted to the coronary care unit. *Clin Cardiol* 1996;19(3):180–186.
  55. Pedersen OD, Bagger H, Køber L, Torp-Pedersen C. The occurrence and prognostic significance of atrial fibrillation/flutter following acute myocardial infarction. TRACE Study group. TRAndolapril Cardiac Evaluation. *Eur Heart J* 1999;20(10):748–754.
  56. Pizzetti F, Turazza FM, Franzosi MG, Barlera S, Ledda A, Maggioni AP, Santoro L, Tognoni G; GISSI-3 Investigators. Incidence and prognostic significance of atrial fibrillation in acute myocardial infarction: the GISSI-3 data. *Heart* 2001;86(5):527–532.
  57. Asanin M, Perunicic J, Mrdovic I, Matic M, Vujisic-Tesic B, Arandjelovic A, Vasiljevic Z, Ostojic M. Prognostic significance of new atrial fibrillation and its relation to heart failure following acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2005;7(4):671–676.
  58. Verdouw PD, Hagemeyer F, Dorp WG, Vrom AV, Hugenholtz PG. Short-term survival after acute myocardial infarction predicted by hemodynamic parameters. *Circulation* 1975;52:413–419.
  59. Killip T, Kimball J. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit: a two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol* 1967;20:457–465.
  60. Madias JE. Killip and Forrester classifications: should they be abandoned, kept, reevaluated, or modified? *Chest* 2000;117:1223–1226.
  61. Siniorakis E, Arvanitakis S, Voyatzopoulos G, Hatziandreu P, Plataris G, Alexandris A, Bonoris P. Hemodynamic classification in acute myocardial

- infarction. *Chest* 2000;117(5):1286–1290.
62. Rudiger A, Harjola VP, Müller A, Mattila E, Säila P, Nieminen M, Follath F. Acute heart failure: clinical presentation, one-year mortality and prognostic factors. *Eur J Heart Fail* 2005;7(4):662–670.
  63. Yan AT, Jong P, Yan RT, Tan M, Fitchett D, Chow CM, Roe MT, Pieper KS, Langer A, Goodman SG; Canadian Acute Coronary Syndromes registry investigators. Clinical trial--derived risk model may not generalize to real-world patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2004;148(6):1020–1027.
  64. Steg PG, López-Sendón J, Lopez de Sa E, Goodman SG, Gore JM, Anderson FA Jr, Himbert D, Allegro J, Van de Werf F; GRACE Investigators. External validity of clinical trials in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2007;167(1):68–73.
  65. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69: 89–95.
  66. Majkić-Singh N. What is a biomarker? From its discovery to clinical application. *J Med Biochem* 2011;30(3):186–192.
  67. King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Morrison DA, Williams DO, Feldman TE, Kern MJ, O'Neill WW, Schaff HV, Whitlow PL; ACC/AHA/SCAI, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. 2007 focused update of the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(2):172–209.
  68. Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS); European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI), Wijns W, Kolh P, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T, Garg

- S, Huber K, James S, Knuuti J, Lopez-Sendon J, Marco J, Menicanti L, Ostojic M, Piepoli MF, Pirlet C, Pomar JL, Reifart N, Ribichini FL, Schalić MJ, Sergeant P, Serruys PW, Silber S, Sousa Uva M, Taggart D. Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2010;31(20):2501–2555.
69. Majkić-Singh N. Izbor biohemijskih pokazatelja za dijagnostikovanje akutnog koronarnog sindroma. *J Med Biochem* 2005; 24(1):1–13.
  70. Panteghini M. Cardiac: is this biomarker ready for the prime time? *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2010;70(Suppl242):66–72.
  71. Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravkilde J, Wu AH; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50(2):327–332.
  72. Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndrome. *Clin Chem* 1998;44:1855–1864.
  73. Balk EM, Ioannidis JP, Salem D, Chew PW, Lau J. Accuracy of biomarkers to diagnose acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann Emerg Med* 2001;37:478–494.
  74. Christenson RH, Cervelli DR, Bauer RS, Gordon M, Stratus CS. Cardiac troponin I method: performance characteristics including imprecision at low concentrations. *Clin Biochem* 2004;37:679–683.
  75. Apple FS, Wu AH, Jaffe AS. European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: how to use existing assays clinically and for clinical trials. *Am Heart J* 2002;144:981–986.
  76. Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, Lorell BH, Shemin R, Grossman W, Allen PD. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N Engl J Med* 1985;313(17):1050–1054.
  77. Tsung SH. Creatine kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery. *Clin Chem* 1976;22:173–175.
  78. Wevers RA, Delsing M, Klein Gebbink JA, Soons JB. Post-synthetic changes in

- creatine kinase isozymes. *Clin Chim Acta* 1978;86:323–327.
79. Ishikawa Y, Saffitz JE, Mealman RL, Grace AM, Roberts R. Reversible myocardial ischemic injury is not associated with increased creatine kinase activity in plasma. *Clin Chem* 1997;43:467–475.
  80. Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, Brand DA, Cook EF, Acampora D, Goldman L. Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing myocardial infarction within 24 hours of hospitalization. *Ann Intern Med* 1987;106(2):181–186.
  81. Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28(20):2525–2538.
  82. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AHB, Christenson RH, the NACB committee members, Apple FS, Christenson RH, Jaffe AS, Mair J, Ordonez-Llanos J, Pagani F, Panteghini M, Tate J, Wu AHB, the IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage (C-SMCD). National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:547–551.
  83. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH, Apple FS, Francis G, Tang W. National Academy of Clinical Biochemistry practice guidelines: clinical characteristics and utilization of biomarkers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:552–574.
  84. Parmacek MS, Solaro RJ. Biology of troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis* 2004;47:159–176.
  85. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, Remppis A, Scheffold T, Borgya A, Essig U, Geuss U. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992;38(3):386–393.
  86. Ricchiuti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin Chem* 1999;45(12):2129–2135.

87. Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PA, Apple FS. Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem* 1998;44(9):1919–1924.
88. Remppis A, Scheffold T, Greten J, Haass M, Greten T, Kübler W, Katus HA. Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(2):793–803.
89. Peronnet E, Becquart L, Poirier F, Cubizolles M, Choquet-Kastylevsky G, Jolivet-Reynaud C. SELDI-TOF MS analysis of the cardiac troponin I forms present in plasma from patients with myocardial infarction. *Proteomics* 2006;6:6288–6299.
90. Labugger R, Organ L, Collier C, Atar D, Van Eyk JE. Extensive troponin I and T modifications detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2000;102:1221–1226.
91. Michielsen ECHJ, Diris JHC, Kleijnen VWVC, Wodzig WKWH, Van Dieijen-Visser MP. Interpretation of cardiac troponin T behaviour in size-exclusion chromatography. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1422–1427.
92. Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lovgren T, Severina ME, Pulkki K, Vuopio-Pulkki LM, Gusev NB. Troponin I is released in blood stream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin Chem* 1997;43:1379–1385.
93. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44:1198–1208.
94. Hessel MHM, Michielsen ECHJ, Atsma DE, Schalijs MJ, van der Valk EJM, Bax WH, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP, van der Laarse A. Release kinetics of intact and degraded troponin I and T after irreversible cell damage. *Exp Mol Pathol* 2008;85:90–95.
95. Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes



- and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 1998;10(5):525–531.
96. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(5):1931–1936.
  97. Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 1992;149(3):775–782.
  98. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1995;182(1):33–40.
  99. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180(4):1263–1272.
  100. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(10):4342–4346.
  101. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 1993;178(2):669–674.
  102. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391(6667):591–594.
  103. Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol* 2004;43(12):2326–2328.
  104. Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliani S, Mantuano E. Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked

- hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(6):2110–2114.
105. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 1996;61:1–77.
  106. Santilli F, Basili S, Ferroni P, Davì G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med* 2007;2(4):256–268.
  107. Clark LB, Foy TM, Noelle RJ. CD40 and its ligand. *Adv Immunol* 1996;63:43–78.
  108. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106(8):896–899.
  109. André P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 2002;8(3):247–252.
  110. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12367–12371.
  111. Léveillé C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, Reyes-Moreno C, Lapointe R, Merhi Y, Wilkins JA, Mourad W. CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem*;282(8):5143–5151.
  112. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, Ley K, Sarembock IJ. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol* 2008;172(4):1141–1152.
  113. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L, Boon L, Flavell RA, Noelle RJ, Gerdes N, Biessen EA, Daemen MJ, Heemskerk JW, Weber C, Lutgens E. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in

- atherosclerosis. *Blood* 2010;116(20):4317–4327.
114. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17(4):118–123.
  115. Omari KM, Chui R, Dorovini-Zis K. Induction of beta-chemokine secretion by human brain microvessel endothelial cells via CD40/CD40L interactions. *J Neuroimmunol* 2004;146(1-2):203–208.
  116. Pluvinet R, Olivar R, Krupinski J, Herrero-Fresneda I, Luque A, Torras J, Cruzado JM, Grinyó JM, Sumoy L, Aran JM. CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling. *Blood* 2008;112(9):3624–3637.
  117. Phipps RP. CD40: Lord of the endothelial cell. *Blood* 2008;112(9):3531–3532.
  118. Sakurai K, Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, Sasaki N, Takuwa Y, Masaki T, Sawamura T. Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44 (Suppl 1):S173–180.
  119. Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, Zhang Y, Wang H, Bharadwaj U, Zhang S, Li M, Lin P, Yao Q. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 2008;112(8):3205–3216.
  120. Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callar RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100(4):441–448.
  121. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000;156(1):7–14.
  122. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med* 2008;14(12):530–538.

123. Antoniadou C, Van-Assche T, Shirodaria C, Diesch J, Antonopoulos AS, Lee J, Cunningham C, Tousoulis D, Stefanadis C, Casadei B, Taggart D, Channon KM, Leeson P. Preoperative sCD40L levels predict risk of atrial fibrillation after off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 2009;120(Suppl. 11):S170–176.
124. Vishnevetsky D, Kiyani VA, Gandhi PJ. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother* 2004;38(9):1500–1508.
125. Bos A, Wever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1978;525:37–44.
126. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994;94:437–444.
127. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006;445:214–224.
128. Chevrier I, Tregouet DA, Massonnet-Castel S, Beaune P, Lloriot MA. Myeloperoxidase genetic polymorphisms modulate human neutrophil enzyme activity: genetic determinants for atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2006;188:150–154.
129. Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem* 1995;270:16542–16548.
130. Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM, Crowley JR, Heinecke JW. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest* 1996;98:1283–1289.
131. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;391:393–397.
132. Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 2002;109:1311–1319.
133. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of

- myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997;99:2075–2081.
134. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 1997;272:3520–3526.
  135. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000;105:1095–1108.
  136. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* 2010;23:447–454.
  137. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002;296:2391–2394.
  138. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001;276:41279–41287.
  139. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001;158:879–891.
  140. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lusis AJ, Moore KP, Freeman BA. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 2001; 108:1759–1770.
  141. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P.

- Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1309–1314.
142. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:159–165.
  143. Wong ND, Gransar H, Narula J, Shaw L, Moon JH, Miranda-Peats R, Rozanski A, Hayes SW, Thomson LE, Friedman JD, Berman DS. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2:1093–1099.
  144. Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Kristensen L, Sottrup-Jensen L. Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochim Biophys Acta* 1994;1201(3):415–423.
  145. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR 3rd, Conover CA. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):3149–3153.
  146. Silahatoglu AN, Tümer Z, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, Tommerup N. Assignment of the human gene for pregnancy-associated plasma protein A (PAPPA) to 9q33.1 by fluorescence in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1993;62(4):214–216
  147. Kristensen T, Oxvig C, Sand O, Møller NP, Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry* 1994;33(6):1592–1598.
  148. Haaning J, Oxvig C, Overgaard MT, Ebbesen P, Kristensen T, Sottrup-Jensen L. Complete cDNA sequence of the preproform of human pregnancy-associated

- plasma protein-A. Evidence for expression in the brain and induction by cAMP. *Eur J Biochem* 1996;237(1):159–163.
149. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res* 2007;17(1):10–8.
  150. Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover CA, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Haaning J. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999;61(4):1083–1089.
  151. Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA, Overgaard MT, Christiansen M, Oxvig C, Ashai K, Holmes DR Jr, Conover CA. Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(3):335–341.
  152. Resch ZT, Chen BK, Bale LK, Oxvig C, Overgaard MT, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein a gene expression as a target of inflammatory cytokines. *Endocrinology* 2004;145(3):1124–1129.
  153. Ortiz CO, Chen BK, Bale LK, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Transforming growth factor-beta regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003;18(6):1066–1072.
  154. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, Virmani R, Oxvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345(14):1022–1029.
  155. Lund J, Qin QP, Ilva T, Pettersson K, Voipio-Pulkki LM, Porela P, Pulkki K. Circulating pregnancy-associated plasma protein a predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. *Circulation* 2003;108(16):1924–1926.

156. Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, Cole D, Holt DW, Kaski JC. Pregnancy-associated plasma protein A and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004;109(14):1724–1728.
157. Consuegra-Sanchez L, Fredericks S, Kaski JC. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2009;203(2):346–352
158. Conti E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, Andreotti F. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 2004;110(15):2260–2265.
159. Harrington SC, Simari RD, Conover CA. Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet. *Circ Res* 2007;100(12):1696–1702.
160. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16(2):143–163.
161. Renier G, Clément I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Endocrinology* 1996;137(11):4611–4618.
162. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 2000;86(2):125–130.
163. Conti E, Volpe M, Carrozza C, Marzo F, Zuppi C, Crea F, Andreotti F. Pregnancy-associated plasma protein-A and acute coronary syndromes: cause or consequence? *J Am Coll Cardiol* 2005;46(8):1583-4.
164. Nikkari ST, Höyhty M, Isola J, Nikkari T. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol* 1996;149(5):1427–1433.
165. Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR. Ligand occupancy of the



- alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(6):2482–2487.
166. Du J, Delafontaine P. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth through antisense transcription of a rat insulin-like growth factor I receptor cDNA. *Circ Res* 1995;76(6):963–972.
  167. Nichols TC, du Laney T, Zheng B, Bellinger DA, Nickols GA, Engleman W, Clemmons DR. Reduction in atherosclerotic lesion size in pigs by alphaVbeta3 inhibitors is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I-mediated signaling. *Circ Res* 1999;85(11):1040–1045.
  168. Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Vaughn C, Mohler J, Li Y, Song YH, Titterington J, Delafontaine P. IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(12):2684–2690.
  169. Sangiorgi G, Mauriello A, Bonanno E, Oxvig C, Conover CA, Christiansen M, Trimarchi S, Rampoldi V, Holmes DR Jr, Schwartz RS, Spagnoli LG. Pregnancy-associated plasma protein-a is markedly expressed by monocyte-macrophage cells in vulnerable and ruptured carotid atherosclerotic plaques: a link between inflammation and cerebrovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(11):2201–2211.
  170. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM; CAPTURE Study Investigators. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(2):229–237.
  171. Iversen KK, Teisner AS, Teisner B, Kliem A, Thanning P, Grande P, Clemmensen P. Pregnancy associated plasma protein A, a novel, quick, and sensitive marker in ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2008;101(10):1389–1394.
  172. Brügger-Andersen T, Hetland Ø, Pönitz V, Grundt H, Nilsen DW. The effect of

- primary percutaneous coronary intervention as compared to tenecteplase on myeloperoxidase, pregnancy-associated plasma protein A, soluble fibrin and D-dimer in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2007;119(4):415–421.
173. Setacci C, de Donato G, Chisci E, Setacci F, Stella A, Faggioli G, Reimers B, Cernetti C, Lopera Quijada MJ, Cappi B, Sangiorgi G; Submarine Registry Group. Deferred urgency carotid artery stenting in symptomatic patients: clinical lessons and biomarker patterns from a prospective registry. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35(6):644–651.
  174. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85(1):1–31.
  175. Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 1999;41:376–384.
  176. Tayebjee MH, Lip GYH, Macfadyen RJ. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease: clinical and therapeutic implications and pathological significance. *Curr Med Chem* 2005;12:917–925.
  177. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463–516.
  178. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562–573.
  179. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–262.
  180. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94(6):2493–2503.
  181. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(9):1117–1126.
  182. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse

- brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(43):15575–15580.
183. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 2002;91(9):852–859.
184. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000;102(23):2861–2866.
185. Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kawarabayashi T, Iida H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2006;97(2):175–180.
186. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2001;141(2):211–217.
187. Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005;96(3):339–345.
188. Tayebjee MH, Tan KT, MacFadyen RJ, Lip GY. Abnormal circulating levels of metalloprotease 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity. *J Intern Med* 2005;257(1):110–116.
189. Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21(11):861–867.
190. Taurino M, Raffa S, Mastroddi M, Visco V, Rizzo L, Torrisi MR, Faraglia V. Metalloproteinase expression in carotid plaque and its correlation with plasma

- levels before and after carotid endarterectomy. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41(6):516–521.
191. Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2001;18(10):777–780.
  192. Jones GT, Kay IP, Chu JW, Wilkins GT, Phillips LV, McCormick M, van Rij AM, Williams MJ. Elevated plasma active matrix metalloproteinase-9 level is associated with coronary artery in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(7):e121–e125.
  193. Renko J, Kalela A, Jaakkola O, Laine S, Höyhty M, Alho H, Nikkari ST. Serum matrix metalloproteinase-9 is elevated in men with a history of myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64(3):255–261.
  194. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001;38:189–197.
  195. Kinoshita CM, Ying SC, Hugli TE, Siegel JN, Potempa LA, Jiang H, Houghten RA, Gewurz H. Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein. *Biochemistry* 1989;28(25):9840–9848.
  196. Li SP, Goldman ND. Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. *Biochemistry* 1996;35(28):9060–9068.
  197. Vilahur G, Hernández-Vera R, Molins B, Casaní L, Duran X, Padró T, Badimon L. Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (cyclo-oxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1, and tissue factor) upregulation in peripheral blood mononuclear cells. *J Thromb Haemost* 2009;7(3):485–493.
  198. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001;158(3):1039–1051.
  199. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N,

- Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003;107(5):671–674.
200. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(9):1386–1392.
201. Hutchinson WL, Noble GE, Hawkins PN, Pepys MB. The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994;94(4):1390–1396.
202. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993;91(4):1351–1357.
203. Bhakdi S, Torzewski M, Paprotka K, Schmitt S, Barsoom H, Suriyaphol P, Han SR, Lackner KJ, Husmann M. Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* 2004;109(15):1870–1876.
204. Rowe IF, Soutar AK, Trayner IM, Thompson GR, Pepys MB. Circulating human C-reactive protein binds very low density lipoproteins. *Clin Exp Immunol* 1984;58(1):237–244.
205. Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(1):61–66.
206. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, Díez J, Libby P, Páramo JA. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(7):1369–1378.

207. Bello G, Cailotto F, Hanriot D, Kolopp-Sarda MN, Latger-Cannard V, Hess K, Zannad F, Longrois D, Ropars A. C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells via a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway. *Atherosclerosis* 2008;200(2):286–293.
208. Wang Q, Zhu X, Xu Q, Ding X, Chen YE, Song Q. Effect of C-reactive protein on gene expression in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(4):H1539–1545.
209. Cirillo P, Golino P, Calabrò P, Cali G, Ragni M, De Rosa S, Cimmino G, Pacileo M, De Palma R, Forte L, Gargiulo A, Corigliano FG, Angri V, Spagnuolo R, Nitsch L, Chiariello M. C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2005;68(1):47–55.
210. Wu J, Stevenson MJ, Brown JM, Grunz EA, Strawn TL, Fay WP. C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(4):698–704.
211. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999;68:459–486.
212. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83(4):1325–1358.
213. Liuzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, Brugaletta S, Pinnelli M, Rizzello V, Maseri A, Crea F. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(2):185–194.
214. Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK,

- Mickle DA. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(6):1886–1891.
215. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG, Cushman M, Cornell ES, Kuller LH. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(10):2167–2176.
216. Greenfield JR, Samaras K, Jenkins AB, Kelly PJ, Spector TD, Gallimore JR, Pepys MB, Campbell LV. Obesity is an important determinant of baseline serum C-reactive protein concentration in monozygotic twins, independent of genetic influences. *Circulation* 2004;109(24):3022–3028.
217. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999;282(22):2131–2135.
218. LaMonte MJ, Durstine JL, Yanowitz FG, Lim T, DuBose KD, Davis P, Ainsworth BE. Cardiorespiratory fitness and C-reactive protein among a tri-ethnic sample of women. *Circulation* 2002;106(4):403–406.
219. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001;154(3):681–689.
220. Calabrò P, Golia E, Yeh ET. CRP and the risk of atherosclerotic events. *Semin Immunopathol* 2009; 31:79–94.
221. Hirano T. Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260(2):303–308.
222. Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 2002;277(33):29355–29358.
223. Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436–445.

224. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):23–35.
225. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86(2):515–581.
226. McNicol A, Israels SJ. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008;8(2):99–117.
227. Grötzinger J. Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592(3):215–223.
228. Uzé G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:71–95.
229. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214(2):149–160.
230. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(11):1950–1959
231. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994;300(Pt 2):281–290.
232. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998;76(4):300–317.
233. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 1995;268(5208):251–255.
234. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(4):253–265.
235. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23(5):479–490.
236. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87(6):2095–2147.
237. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*



- 1993;328(2):106–13.
238. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992;356(6372):768–774.
239. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 1999;10(5):1463–1475.
240. Bonetti A, Marchini M, Ortolani F. Immunolocalization of interleukin-1 receptor antagonist in healthy and infarcted myocardium. *Histol Histopathol* 2008;23(9):1093–1102.
241. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007;74(2):184–195.
242. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang XF, Frangogiannis NG. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* 2007;116(19):2127–2138.
243. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* 2008;173(1):57–67.
244. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993;261(5120):472–475.
245. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994;15(12):562–566.
246. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270(23):13757–13765.
247. Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L. NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic

- endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol* 2000;67(4):577–584.
248. Stanford SJ, Pepper JR, Mitchell JA. Cyclooxygenase-2 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin-8, production by human vascular cells: role of cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(3):677–682.
249. Braun M, Pietsch P, Felix SB, Baumann G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(12):2571–2579.
250. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(8):1000–1006.
251. Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995;115(1):89–98.
252. Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest* 1989;83(2):444–455.
253. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25(Suppl 2):S9–12.
254. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart* 1996;76(1):24–28.
255. Oyama J, Shimokawa H, Morita S, Yasui H, Takeshita A. Elevated interleukin-1beta in pericardial fluid of patients with ischemic heart disease. *Coron Artery Dis* 2001;12(7):567–571.
256. Momiyama Y, Hirano R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Effects of interleukin-1 gene polymorphisms on the development of coronary artery

- disease associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(3):712–717.
257. Guillén I, Blanes M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol* 1995;269(2 Pt 2):R229–235.
258. Munkvad S, Gram J, Jespersen J. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha in plasma of patients with acute ischemic heart disease who undergo thrombolytic therapy: a randomized, placebo-controlled study. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10(4):325–327.
259. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57(3):165–176.
260. Waldman TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006;6(8):595–601.
261. Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 2008;28(6):635–639.
262. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996;14:179–205.
263. Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001;14(2):105–110.
264. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010;33(2):153–165.
265. Hémar A, Subtil A, Lieb M, Morelon E, Hellio R, Dautry-Varsat A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  chains. *J Cell Biol* 1995;129:55–64.
266. Yu A, Malek TR. The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of

- interleukin-2. *J Biol Chem* 2001;276:381–385.
267. Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, Leary AC, Kriz R, Donahue RE, Wong GG. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* 1986;47(1):3–10.
268. Mangi MH, Newland AC Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines, cellular & molecular therapy* 1999;5(2):87–95.
269. Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, Ramshaw HS, Stomski F, Perugini M, D'Andrea R, Grimbaldston M, Parker MW. Molecular basis of cytokine receptor activation. *UBMB Life* 2010;62(7):509–518.
270. Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9655–9659.
271. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 1991;66(6):1165–1174.
272. Dentelli P, Del Sorbo L, Rosso A, Molinar A, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *J Immunol* 1999;163(4):2151–2159.
273. Brizzi MF, Formato L, Dentelli P, Rosso A, Pavan M, Garbarino G, Pegoraro M, Camussi G, Pegoraro L. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation* 2001;103(4):549–554.
274. Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS, Newlands S, Korpelainen EI, Noack LM, Berndt MC, Lopez AF, Gamble JR, Vadas MA. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood* 1996;87(4):1432–1438.

275. Brizzi MF, Garbarino G, Rossi PR, Pagliardi GL, Arduino C, Avanzi GC, Pegoraro L. Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;91(6):2887–2892.
276. Rudolph T, Schaps KP, Steven D, Koester R, Rudolph V, Berger J, Terres W, Meinertz T, Kaehler J. Interleukin-3 is elevated in patients with coronary artery disease and predicts restenosis after percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol* 2009;132(3):392–397.
277. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859–1870.
278. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O<sub>2</sub> - and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001;89:408–411.
279. Rocken M, Racke M, Shevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigenspecific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* 1996;17:225–31.
280. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635–673.
281. Lamkhioued B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, Capron M. Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann N Y Acad Sci* 1996;796:203–208.
282. Galéa P, Thibault G, Lacord M, Bardos P, Lebranchu Y. IL-4, but not tumor necrosis factor-alpha, increases endothelial cell adhesiveness for lymphocytes by activating a cAMP-dependent pathway. *J Immunol* 1993;151:588–596.
283. Hong HY, Lee HY, Kwak W, Yoo J, Na MH, So IS, Kwon TH, Park HS, Huh S, Oh GT, Kwon IC, Kim IS, Lee BH. Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques: IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2008;12(5B):2003–2014.
284. Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie JP. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase

- mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1147–1154.
285. Lee YW, Eum SY, Chen KC, Hennig B, Toborek M. Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells. *Mol Med* 2004;10:19–27.
286. Lee YW, Hennig B, Toborek M. Redox-regulated mechanisms of interleukin-4-induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H185–192.
287. Lee YW, Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis. *Arch Pharm Res* 2006;29:1–15.
288. Lee YW, Kühn H, Hennig B, Neish AS, Toborek M. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:83–94.
289. Lee YW, Kühn H, Kaiser S, Hennig B, Daughterty A, Toborek M. Interleukin 4 induces transcription of the 15-lipoxygenase I gene in human endothelial cells. *J Lipid Res* 2001;42:783–791.
290. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:1315–1319.
291. Walch L, Massade L, Dufilho M, Brunet A, Rendu F. Pro-atherogenic effect of interleukin-4 in endothelial cells: modulation of oxidative stress, nitric oxide and monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Atherosclerosis* 2006;187:285–291.
292. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999;17:701–738.
293. Miloux B, Laurent P, Bonnin O, Lupker J, Caput D, Vita N, Ferrara P. Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett* 1997;401(2-3):163–166.
294. Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda RL, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG. The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of

- mouse chromosome 7. *Genomics* 1991;10(3):801–806.
295. Szkodzinski J, Hudzik B, Osuch M, Romanowski W, Szygula-Jurkiewicz B, Polonski L, Zubelewicz-Szkodzinska B. Serum concentrations of interleukin-4 and interferon-gamma in relation to severe left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels* 2011;26(4):399–407.
  296. van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC, Young IG. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* 1989;73(5):1142–1148.
  297. Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* 2009;101:191–236.
  298. Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol* 1994;57:145–190.
  299. Moon BG, Yoshida T, Shiiba M, Nakao K, Katsuki M, Takaki S, Takatsu K. Functional dissection of the cytoplasmic subregions of the interleukin-5 receptor alpha chain in growth and immunoglobulin G1 switch recombination of B cells. *Immunology* 2001;102:289–300.
  300. Moon BY, Miyake K, Takaki S, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol* 2004;172:6020–6029.
  301. Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH, Lanier LL. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* 1995;154:5144–5152.
  302. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol* 2007;179:3452–3462.
  303. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest*

- 2004;114(3):427–437.
304. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J* 2004;45:183–193.
  305. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: Clinical implications. *J Intern Med* 2003;253:120–127.
  306. Wollert KC, Drexler H. The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 2001;6:95–103.
  307. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: From basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S233–242.
  308. Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: The agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:251–263.
  309. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: Mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 2001;15:43–58.
  310. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(5):241–253.
  311. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996;87:847–857.
  312. Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, Simpson RJ. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 1994;269(37):23286–23289.
  313. Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B. Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. *FEBS Lett* 2003;546:1–5.
  314. Teague TK, Murrack P, Kappler JW, Vella AT. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol* 1997;158(12):5791–5796.
  315. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling



- suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6(5):583–588.
316. Yoshida H, Hashizume M, Suzuki M, Mihara M. Anti-IL-6 receptor antibody suppressed T cell activation by inhibiting IL-2 production and inducing regulatory T cells. *Eur J Pharmacol* 2010;634(1–3):178–183.
  317. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997;185(3):461–469.
  318. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40(7):1830–1835.
  319. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441(7090):235–238.
  320. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441(7090):231–234.
  321. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24(2):179–89.
  322. Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. *Int Immunopharmacol* 2011;11(3):319–322.
  323. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198(12):1875–1886.
  324. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through

- Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004;172(9):5149–5153.
325. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, Serada S, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, Naka T. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2011;186(1):32-40.
326. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, Monteleone G, Rose-John S, Neurath MF, Becker C. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* 2007;179(4):2041–5.
327. Jones GW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, Malhotra R, Scheller J, Williams AS, Rose-John S, Topley N, Jones SA. Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J Immunol* 2010;184(4):2130–2139.
328. Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig GH, Seegert D, Williams AS, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood* 2008;111(3):1021–1028.
329. McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(27):9589–9594.
330. Sutherland GR, Baker E, Fernandez KE, Callen DF, Goodwin RG, Lupton S, Namen AE, Shannon MF, Vadas MA. The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12-13. *Hum Genet* 1989;82(4):371–372.
331. Lupton SD, Gimpel S, Jerzy R, Brunton LL, Hjerrild KA, Cosman D, Goodwin RG. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol* 1990;144(9):3592–3601.
332. Wiles MV, Ruiz P, Imhof BA. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol*. 1992;22:1037-1042.

333. Sakata T, Iwagami S, Tsuruta Y, Teraoka H, Tatsumi Y, Kita Y, Nishikawa S, Takai Y, Fujiwara H. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* 1990;48(3):205–212.
334. Oosterwegel MA, Haks MC, Jeffry U, Murray R, Kruisbeek AM. Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity* 1997;6:351–360.
335. Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty DG, Kelleher D, O'Donoghue DP, Feighery C, O'Farrelly C. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol* 1997;58(2):83–90.
336. Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, Namen AE, Schuler G. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* 1993;178(3):1109–1114.
337. Gutierrez-Ramos JC, Olsson C, Palacios R. Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokinemediated positive and negative regulation. *Exp Hematol* 1992;20:986–990.
338. Golden-Mason L, Kelly AM, Traynor O, McEntee G, Kelly J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine* 2001;14(3):143–151.
339. Sorg RV, McLellan AD, Hock BD, Fearnley DB, Hart DN. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* 1998;198:514–526.
340. Kroncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin- 7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 1996;26:2541–2544.
341. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002;99(11):3892–3904.

342. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(4-5):513–533.
343. Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 1987;139(3):788–793.
344. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(4):375–391.
345. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1278–1280.
346. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1280–1283.
347. Grob PM, David E, Warren TC, DeLeon RP, Farina PR, Homon CA. Characterization of a receptor for human monocyte- derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J Biol Chem* 1990;265:8311–8316.
348. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, Beckmann MP, Cerretti DP. Assignment of the genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics* 1992;14(3):685–691.
349. Knall C, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin 8- stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3052–3057.
350. Venkatakrisnan G, Salgia R, Groopman JE. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2000;275: 6868–6875.
351. Richardson RM, Ali H, Pridgeon BC, Haribabu B, Snyderman R. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation

- by phosphorylation. *J Biol Chem* 1998;273:10690–10695.
352. Feniger-Barish R, Yron I, Meshel T, Matityahu E, Ben-Baruch A. IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase. *Biochemistry* 2003;42:2874–2886.
  353. Cohen-Hillel E, Yron I, Meshel T, Soria G, Attal H, Ben-Baruch A. CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner. *Cytokine* 2006;33:1–16.
  354. Cohen-Hillel E, Yron I, Meshel T, Ben-Baruch A. Interleukin 8 and cell migration to inflammatory sites: the regulation of focal adhesion kinase under conditions of migratory desensitization. *Isr Med Assoc J* 2007;9:579–583.
  355. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081–2095.
  356. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992;148:3618–3623.
  357. Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:115–124.
  358. Volk H, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grutz G. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol* 2001;22:414–417.
  359. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002;168:5397–5402.
  360. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;10(11):1178–1184.

361. Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schlüter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Müller W. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* 2004;200(10):1289–1297.
362. Seki S, Osada S, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nishikage T, Mochizuki H, Hiraide H. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun* 1998;66(11):5286–5294.
363. Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Muller W, Roers A. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* 2006;36:3248–3255.
364. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:41–52.
365. Chomarot P, Risoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993;177:523–527.
366. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;3:944–950.
367. Grant LR, Yao ZJ, Hedrich CM, Wang F, Moorthy A, Wilson K, Ranatunga D, Bream JH. Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells. *Genes Immun* 2008;9(4):316–327.
368. Mehrotra PT, Donnelly RP, Wong S, Kanegane H, Geremew A, Mostowski HS, Furuke K, Siegel JP, Bloom ET. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 1998;160(6):2637–2644.
369. Rhodes KA, Andrew EM, Newton DJ, Tramonti D, Carding SR. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur J Immunol* 2008;38:2274–2283.
370. Speiran K, Bailey DP, Fernando J, Macey M, Barnstein B, Kolawole M, Curley

- D, Watowich SS, Murray PJ, Oskeritzian C, Ryan JJ. Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *J Leukoc Biol* 2009;85(5):826–836.
371. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 2009;182:7459–7472.
372. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 2009;31:761–771.
373. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994;152:1821–1829.
374. Taniyama T, Takai S, Miyazaki E, Fukumura R, Sato J, Kobayashi Y, Hirakawa T, Moore KW, Yamada K. The human interleukin-10 receptor gene maps to chromosome 11q23.3. *Hum Genet* 1995;95(1):99–101.
375. Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 1997;16:5894–5903.
376. Reineke U, Schneider-Mergener J, Glaser RW, Stigler RD, Seifert M, Volk HD, Sabat R. Evidence for conformationally different states of interleukin-10: binding of a neutralizing antibody enhances accessibility of a hidden epitope. *J Mol Recognit* 1999;12(4):242–248.
377. Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, Asadullah K, Volk HD, Sabat R. Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? *Genes Immun* 2005;6(1):8–18.
378. Yoon SI, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 2006;281:35088–35096.
379. Logsdon NJ, Jones BC, Josephson K, Cook J, Walter MR. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J Interferon*

- Cytokine Res 2002;22:1099–1112.
380. Moore KW, deWaal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
  381. Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:187–197.
  382. Kruglov AA, Kuchmiy A, Grivennikov SI, Tumanov AV, Kuprash DV, Nedospasov SA. Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:231–244.
  383. Schmid JA, Birbach A. IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKKBK) - a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:157–65.
  384. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(5):315–324.
  385. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170(3):827–845.
  386. Merberg DM, Wolf SF, Clark SC. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol Today* 1992;13(2):77–78.
  387. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(10):4143–4147.
  388. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 1996;26(7):1647–1651.
  389. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB,



- Menon S, Kastelein R, Bazan F, O'Garra A. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997;7(4):571–581.
390. Lauwerys BR, Renauld JC, Houssiau FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin-12 and interleukin-18. *Cytokine* 1999;11(11):822–830.
391. Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(8):3948–3953.
392. Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC, Puccetti P. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 1998;9(3):315–323.
393. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol* 1994;153(1):128–136.
394. Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 1995;155(9):4286–4294.
395. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):14002–14007.
396. Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med* 1995;181(1):399–404.
397. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem* 1997;272(9):6073–6077.

398. Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293–322.
399. Bacon CM, Petricoin EF 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Lerner AC, Johnston JA, O'Shea JJ. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7307–7311.
400. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996;382(6587):171–174.
401. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;382(6587):174–177.
402. Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 2002;297(5589):2063–2066.
403. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994;15(1):19–26.
404. de Waal Malefyt R, Abrams JS, Zurawski SM, Lecron JC, Mohan-Peterson S, Sanjanwala B, Bennett B, Silver J, de Vries JE, Yssel H. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol* 1995;7(9):1405–1416.
405. Woerly G, Lacy P, Younes AB, Roger N, Loiseau S, Moqbel R, Capron M. Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J Leukoc Biol* 2002;72(4):769–779.
406. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway

- hyperreactivity. *Nat Med* 2003;9(5):582–588.
407. Izuhara K, Arima K, Yasunaga S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1(3):263–269.
  408. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4(2):123–131.
  409. Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(4):858–865.
  410. Krause H, Jandrig B, Wernicke C, Bulfone-Paus S, Pohl T, Diamantstein T. Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine* 1996;8:667–674.
  411. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:259–280.
  412. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001;97(1):14–32.
  413. Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 2009;27:29–60
  414. Carroll HP, Paunovic V, Gadina M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1269–1277.
  415. Stonier SW, Schluns KS. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 2010;127:85–92
  416. Houtkamp MA, van Der Wal AC, de Boer OJ, van Der Loos CM, de Boer PA, Moorman AF, et al. Interleukin-15 expression in atherosclerotic plaques: an alternative pathway for T-cell activation in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1208–1213.
  417. Wuttge DM, Eriksson P, Sirsjo A, Hansson GK, Stemme S. Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*

2001;159:417–423

418. van der Meer JJ, de Boer OJ, Teeling P, van der Loos CM, Dessing MC, van der Wal AC. Smooth muscle homeostasis in human atherosclerotic plaques through interleukin 15 signalling. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4(3):287–294.
419. van de Vosse E, Lichtenauer-Kaligis EG, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics* 2003;54(12):817–829.
420. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, deWaal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004;202:96–105.
421. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007;80:273–290
422. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp* 2006;54(1):15–24.
423. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006;27(1):17–23.
424. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:221–242.
425. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276(40):37692–37699.
426. Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol* 2003;73(1):49–56.
427. Ghiladri N, Klajavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23

- deficient mice. *J Immunol* 2004;172(5):2827–2833.
428. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18(6):670–675.
429. Tan ZY, Bealgey KW, Fang Y, Gong YM, Bao S. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(4):733–735.
430. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat Genet* 2001;27:218–221.
431. Windsor L, Morahan G, Huang D, McCann V, Jones T, James I, Christiansen FT, Price P. Alleles of the IL12B . 3'UTR. associate with late onset of type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2004;65:1432–1436.
432. van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, Bouma G, Killestein J, van Winsen L, Salvador Pena A, Polman CH, Uitdehaag BM. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:275.
433. Momiyama Y, Ohmori R, Nagano M, Kato R, Taniguchi H, Egashira T, Nakamura H, Ohsuzu F. Polymorphism of the 3' -untranslated region of interleukin-12 p40 gene is not associated with the presence or severity of coronary artery disease. *Circ J* 2005;69:793–797.
434. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–874.
435. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685–1695.
436. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281–291.
437. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999;145(1):33–43.
438. Laurat E, Poirier B, Tupin E, Caligiuri G, Hansson GK, Bariéty J, Nicoletti A. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces

- atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001;104(2):197–202.
439. Methe H, Brunner S, Wiegand D, Nabauer M, Koglin J, Edelman ER. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(12):1939–1945.
440. Cheng X, Liao YH, Ge H, Li B, Zhang J, Yuan J, Wang M, Liu Y, Guo Z, Chen J, Zhang J, Zhang L. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol* 2005;25(3):246–253.
441. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 2008;127(1):89–97.
442. Valente AJ, Graves DT, Vialle-Valentin CE, Delgado R, Schwartz CJ. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry* 1988;27(11):4162–4168.
443. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 1989;169(4):1449–1459.
444. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 1989;169(4):1485–1490.
445. Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Luscis AJ. Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2–q21.1. *Genomics* 1991;9(1):200–203.
446. Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl* 2005;6(2):21–29.
447. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004;95(9):858–866.
448. Hamakawa Y, Omori N, Ouchida M, Nagase M, Sato K, Nagano I, Shoji M,

- Fujita T, Abe K. Severity dependent up-regulations of LOX-1 and MCP-1 in early sclerotic changes of common carotid arteries in spontaneously hypertensive rats. *Neurol Res* 2004;26(7):767–773.
449. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(13):5134–5138.
450. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(12):5252–5256.
451. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998;187(4):601–608.
452. Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida KI, Takeshita A. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001;103(16):2096–2101.
453. Kowalski J, Okopien B, Madej A, Makowiecka K, Zielinski M, Kalina Z, Herman ZS. Levels of sICAM-1, sVCAM-1 and MCP-1 in patients with hyperlipoproteinemia IIa and -IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001;39(2):48–52.
454. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Matsushima K, Sasayama S. Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):419–423.
455. Nishiyama K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Misumi K, Takazoe K, Yoshimura M, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K. Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in

- acute coronary syndromes. *Jpn Circ J* 1998;62(9):710–712.
456. Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, Bossi I, Ottini E, Vezzoli M, Meloni F, Lotzinker M, Mariani G. Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. *Heart* 2001;85(5):571–575.
457. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, Miles JS, Rhodes CE, Sharrett AR, Ballantyne CM. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis* 2005;183(2):301–307.
458. von Haehling S. Statins for heart failure: still caught in no man's land? *Clin Sci (Lond)* 2009;116(1):37–39.
459. Stumpf C, Petzi S, Seybold K, Wasmeier G, Arnold M, Raaz D, Yilmaz A, Daniel WG, Garlich CD. Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2009;116(1):45–52.
460. de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, Jarolim P, Wiviott SD, Sabatine MS, Califf RM, Braunwald E. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(22):2117–2124.
461. Kervinen H, Mänttari M, Kaartinen M, Mäkynen H, Palosuo T, Pulkki K, Kovanen PT. Prognostic usefulness of plasma monocyte/macrophage and T-lymphocyte activation markers in patients with acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2004;94(8):993–996.
462. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(10):1882–1886.
463. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(6):455–481.
464. Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989;58:45–77.
465. Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol*



- 2003;112:653–665.
466. Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:39–48.
  467. Kovacic JC, Muller DW, Graham RM. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:19–33.
  468. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, Mantovani A. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991;87:986–995.
  469. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, Eaves C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9253–9257
  470. Soldi R, Primo L, Brizzi MF, Sanavio F, Aglietta M, Polentarutti N, Pegoraro L, Mantovani A, Bussolino F. Activation of JAK2 in human vascular endothelial cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1997;89:863–872
  471. Devereux S, Bull HA, Campos-Costa D, Saib R, Linch DC. Granulocyte macrophage colony stimulating factor induced changes in cellular adhesion molecule expression and adhesion to endothelium: in vitro and in vivo studies in man. *Br J Haematol* 1989;71:323–330
  472. Gamble JR, Elliott MJ, Jaipargas E, Lopez AF, Vadas MA. Regulation of human monocyte adherence by granulocyte- macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7169–7173
  473. Hockel M, Jung W, Vaupel P, Rabes H, Khaledpour C, Wissler JH. Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induces controlled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin. *J Clin Invest* 1988;82:1075–1090.
  474. Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Asakura Y, Takahashi T, Ishikawa S, Mitamura H, Ogawa S. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:241–246
  475. Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of

- monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol Cell Biochem* 1995;147:13–19.
476. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Karas SM, Kremastinos DT. Clinical and neurohormonal correlates of circulating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in severe heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000;86:707–710, A709–A710.
477. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004;22:225–231.
478. Biwa T, Hakamata H, Sakai M, Miyazaki A, Suzuki H, Kodama T, Shichiri M, Horiuchi S. Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1998;273:28305–28313.
479. Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, Yano M, Taguchi T, Matsuo T, Sonoda K, Kukidome D, Imoto K, Nishikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Araki E. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 2005;280:6627–6633.
480. Plenz G, Koenig C, Severs NJ, Robenek H. Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2489–2499.
481. Ujihara M, Nomura K, Yamada O, Shibata N, Kobayashi M, Takano K. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ensures macrophage survival and generation of the superoxide anion: a study using a monocytic-differentiated HL60 subline. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1396–1404.
482. Wang J, Wang S, Lu Y, Weng Y, Gown AM. GM-CSF and M-CSF expression is associated with macrophage proliferation in progressing and regressing rabbit atheromatous lesions. *Exp Mol Pathol* 1994;61:109–118.
483. Plenz G, Reichenberg S, Koenig C, Rauterberg J, Deng MC, Baba HA, Robenek H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the

- expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1658–1668.
484. Kohno Y, Tanimoto A, Cirathaworn C, Shimajiri S, Tawara A, Sasaguri Y. GM-CSF activates RhoA, integrin and MMP expression in human monocytic cells. *Pathol Int* 2004;54:693–702.
485. Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. *Atherosclerosis* 1992;96:203–214.
486. Takahashi M, Nikkuni K, Moriyama Y, Shibata A. GM-CSF-mediated impairment of liver to synthesize albumin, cholinesterase, and cholesterol. *Am J Hematol* 1991;36:213–214.
487. Ishibashi T, Yokoyama K, Shindo J, Hamazaki Y, Endo Y, Sato T, Takahashi S, Kawarabayasi Y, Shiomi M, Yamamoto T, et al. Potent cholesterol-lowering effect by human granulocyte-macrophage colonystimulating factor in rabbits. Possible implications of enhancement of macrophage functions and an increase in mRNA for VLDL receptor. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1534–1541.
488. van der Kooij MA, Morand OH, Kempen HJ, van Berkel TJ. Decrease in scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:106–114.
489. Janson RW, Hance KR, Arend WP. Production of IL-1 receptor antagonist by human in vitro-derived macrophages. Effects of lipopolysaccharide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1991;147:4218–4223.
490. Roux-Lombard P, Modoux C, Dayer JM. Production of interleukin-1 (IL-1) and a specific IL-1 inhibitor during human monocyte-macrophage differentiation: influence of GM-CSF. *Cytokine* 1989;1:45–51.
491. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999;400:378–

382.

492. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161–171.
493. Finbloom DS, Lerner AC, Nakagawa Y, Hoover DL. Culture of human monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor results in enhancement of IFN-gamma receptors but suppression of IFN-gamma-induced expression of the gene IP-10. *J Immunol* 1993;150:2383–2390.
494. Eubank TD, Roberts R, Galloway M, Wang Y, Cohn DE, Marsh CB. GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice. *Immunity* 2004;21:831–842.
495. Shindo J, Ishibashi T, Yokoyama K, Nakazato K, Ohwada T, Shiomi M, Maruyama Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis via changes in the cellular and extracellular composition of atherosclerotic lesions in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 1999;99:2150–2156.
496. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, doubleblind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001;104:2012–2017.
497. Knoop S, Groeneveld AB, Kamp O, Lagrand WK, Hoekman K. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) decreases left ventricular function. An echocardiographic study in cancer patients. *Cytokine* 2001;14:184–187.
498. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7:145–173.
499. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991;124:5–24.

500. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965;149:310–311.
501. Seder RA, Gazzinelli RT, Sher A, Paul WE. Interleukin-12 acts directly on CD4<sup>+</sup> T cells to enhance priming for interferon- $\gamma$  production and diminishes interleukin-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10188–10194.
502. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, Kurimoto M. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 1995;63:3966–3972.
503. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN  $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997;15:563–591.
504. Pfizenmaier K, Wiegmann K, Scheurich P, Krönke M, Merlin G, Aguet M, Knowles BB, Ucer U. High affinity human IFN- $\gamma$ -binding capacity is encoded by a single receptor gene located in proximity to c-ros on human chromosome region 6q16 to 6q22. *J Immunol* 1988;141(3):856–860.
505. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571–611.
506. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, Emanuel S, Schwartz B, Miki T, Pestka S. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon  $\gamma$  receptor. *Cell* 1994;76(5):793–802.
507. Cook JR, Emanuel SL, Donnelly RJ, Soh J, Mariano TM, Schwartz B, Rhee S, Pestka S. Sublocalization of the human interferon- $\gamma$  receptor accessory factor gene and characterization of accessory factor activity by yeast artificial chromosome fragmentation. *J Biol Chem* 1994;269:7013–7018.
508. Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Mariano T, Donnelly R, Muthukumar G, Cook J, Garotta G, Silvennoinen O, Ihle J, Pestka S. Interaction between the components of the interferon  $\gamma$  receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270:20915–20921.

509. Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264(5164):1415–1421.
510. Levy DE, Darnell Jr JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):651–662.
511. van Boxel-Dezaire AH, Stark GR. Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:119–154.
512. Muhl H, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol* 2003;3(9):1247–1255.
513. Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 2001;194(8):1123–1140.
514. McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(2):125–135.
515. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(9):3666–3670.
516. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385(6618):729–733.
517. Huang CH, Vallejo JG, Kollias G, Mann DL. Role of the innate immune system in acute viral myocarditis. *Basic Res Cardiol* 2009;104(3):228–237.
518. Lula JF, Rocha MO, Nunes Mdo C, Ribeiro AL, Teixeira MM, Bahia MT, Talvani A. Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and FasLigand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2009;11(9):825–831.

519. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA Jr, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol* 2009;104(3):238–246.
520. Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 2003;60(3):608–616.
521. Dörge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van de Sand A, Konietzka I, Frede S, Hartung T, Vinten-Johansen J, Youker KA, Entman ML, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(1):51–62.
522. Reil JC, Gilles S, Zahler S, Brandl A, Drexler H, Hültner L, Matrisian LM, Welsch U, Becker BF. Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNFalpha from isolated mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(1):133–141.
523. Skyschally A, Leineweber K, Gres P, Haude M, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization. *Basic Res Cardiol* 2006;101(5):373–382.
524. Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G. Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* 2007;100(1):140–146.
525. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288:2351–2354.
526. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114:181–190.
527. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid JA, Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 13):2757–2770.
528. Baxter GT, Kuo RC, Jupp OJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ. Tumor necrosis

- factor-alpha mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem* 1999;274(14):9539–9547.
529. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2004;15:353–366.
530. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010;49:1215–1228.
531. Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Feldman AM. Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest* 2000;106(4):589–597.
532. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83(5):793–802.
533. McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 2009;6(6):410–417.
534. Bergh N, Ulfhammer E, Glise K, Jern S, Karlsson L. Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385(3):314–318.
535. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;86(1):228–234.
536. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002;106(6):653–658.
537. Gebhard C, Stämpfli SF, Gebhard CE, Akhmedov A, Breitenstein A, Camici GG, Holy EW, Lüscher TF, Tanner FC. Guggulsterone, an anti-inflammatory



- phytosterol, inhibits tissue factor and arterial thrombosis. *Basic Res Cardiol* 2009;104(3):285–294.
538. Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 2003;60(1):26–39.
539. Goldblum SE, Sun WL. Tumor necrosis factor-alpha augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol* 1990;258(2 Pt 1):L57–L67.
540. Skoog T, Dichl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 2002;23(5):376–383.
541. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA, Serrano CV Jr. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1(3):245–250.
542. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 2008;14(33):3574–3589.
543. Wilson PW. Evidence of systemic inflammation and estimation of coronary artery disease risk: a population perspective. *Am J Med* 2008 Oct;121(10 Suppl 1):S15–S20.
544. Nakase T, Yamazaki T, Ogura N, Suzuki A, Nagata K. The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2008;271(1-2):104–109.
545. Naya M, Tsukamoto T, Morita K, Katoh C, Furumoto T, Fujii S, Tamaki N, Tsutsui H. Plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha can predict coronary endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Hypertens Res* 2007;30(6):541–548.
546. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007;48(4):751–762.

547. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985;13(17):6361–6373.
548. [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de)
549. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003;284:2–13.
550. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993;62:515–41.
551. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;186(1):38–53.
552. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979;48:193–216.
553. Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. The neurotrophic action and signaling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 1997;51:19–37.
554. Savage Jr CR, Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1972;247:7612–7621.
555. Savage Jr CR, Hash JH, Cohen S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J Biol Chem* 1973;248:7669–7672.
556. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 2004;164:769–779.
557. Wong RW, Chan SY. Semiquantitative immunoblots of membrane protein-epidermal growth factor. *Mol Biotechnol* 2000;15:65–67.
558. Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, Pearsall RS, Green PJ, Yee D, Lampland AL, Balasubramaniam S, Crossley TD, Magnuson TR, James CD, Maihle NJ. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 2001;71(1):1–20.
559. Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and

- function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989;243:1074–1076.
560. Mitsumata M, Gamou S, Shimizu N, Yoshida Y. Response of atherosclerotic intimal smooth muscle cells to epidermal growth factor in vitro. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1364–1671.
  561. Gui Y, Zheng XL. Epidermal growth factor induction of phenotypic cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells is through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278:53017–53025.
  562. Ullian ME, Raymond JR, Willingham MC, Paul RV. Regulation of vascular angiotensin II receptors by EGF. *Am J Physiol* 1997;273:C1241–1249.
  563. Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/betaurogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* 1983;72:249–259.
  564. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983–998.
  565. Li X, Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:421–426.
  566. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68:84–92.
  567. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9267–9271.
  568. Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D. Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics* 1996;32:168–169.
  569. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165:1198–1206

570. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669–676.
571. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851–858.
572. Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 1):20–24.
573. Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568–581.
574. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:201–207.
575. Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis. *Bioessays* 2002;24:1030–1040.
576. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196(11):1497–1506.
577. Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res* 2001;23:263–272.
578. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194–1201.
579. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:826–835.
580. Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor

- up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999;41:773–780.
581. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:902–906.
  582. Holm PW, Slart RH, Zeebregts CJ, Hillebrands JL, Tio RA. Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Ann Med* 2009;41(4):257–264.
  583. Gu JW, Adair TH. Hypoxia-induced expression of VEGF is reversible in myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;273:H628–H633.
  584. Salomonsson L, Pettersson S, Englund MC, Wiklund O, Ohlsson BG. Post-transcriptional regulation of VEGF expression by oxidised LDL in human macrophages. *Eur J Clin Invest* 2002;32:767–774
  585. Nakagawa K, Chen YX, Ishibashi H, Yonemitsu Y, Murata T, Hata Y, Nakashima Y, Sueishi K. Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:61–66.
  586. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002;14(2):73–81.
  587. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;304(5921):30–34.
  588. Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995;181(2):669–675.
  589. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 1993;74(3):541–554.
  590. Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and

- adhesion molecules. *J Clin Invest* 1997;100(1):158–168.
591. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* 1996;184(1):81–92.
  592. Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood* 2000;95(10):3146–3152.
  593. Pan J, McEver RP. Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem* 1995;270(39):23077–23083.
  594. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9238–9242.
  595. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 1986 Mar 1;136(5):1680–1687.
  596. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med* 2001;193:863–872.
  597. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, Ahern TJ, Buurman WA. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992;77(4):543–549.
  598. Woollard KJ, Kling D, Kulkarni S, Dart AM, Jackson S, Chin-Dusting J. Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion. *Circ Res* 2006;98(1):149–156.
  599. Woollard KJ. Soluble bio-markers in vascular disease: much more than gauges of disease? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32(4):233–240.

600. Hajilooi M, Sanati A, Ahmadiéh A, Ghofraniha A, Massoud A. Circulating ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and TNFalphaRII in patients with coronary artery disease. *Immunol Invest* 2003;32(4):245–257.
601. Hajilooi M, Sanati A, Ahmadiéh A, Ghofraniha A, Massoud A. Circulating ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and TNFRII in patients with coronary artery disease. *Immunol Invest* 2004;33(3):263–275.
602. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001;103(13):1813–1818.
603. Lip GY, Blann AD, Zarifis J, Beevers M, Lip PL, Beevers DG. Soluble adhesion molecule P-selectin and endothelial dysfunction in essential hypertension: implications for atherogenesis? A preliminary report. *J Hypertens* 1995;13(12 Pt 2):1674–1678.
604. Davì G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, Bucciarelli T, Alessandrini P, Cuccurullo F, Bittolo Bon G. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998;97(10):953–957.
605. Shimomura H, Ogawa H, Arai H, Moriyama Y, Takazoe K, Hirai N, Kaikita K, Hirashima O, Misumi K, Soejima H, Nishiyama K, Yasue H. Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998;81(4):397–400.
606. Mehta P, Patel KD, Laue TM, Erickson HP, McEver RP. Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes. *Blood* 1997;90(6):2381-2389.
607. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. Procoagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13835–13840.
608. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg*

- 2003;38(5):1075–1089.
609. Hrachovinová I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH Jr, Schaub RG, McEver RP, Wagner DD. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003;9(8):1020–1025.
  610. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103(4):491–495.
  611. Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Miller JP, McCollum CN. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia: relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events. *Thromb Haemost* 1998;79(6):1080–1085.
  612. Galkina E, Ley K. Double jeopardy: how soluble P-selectin activates leukocytes in peripheral arterial occlusive disease. *Circ Res* 2006;98(1):12–14.
  613. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V. Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* 1995;38(9):1122–1124.
  614. Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD. Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thromb Haemost* 1994;72(6):979–984.
  615. Elhadd TA, Kennedy G, Robb R, McLaren M, Jung RT, Belch JJ. Elevated soluble cell adhesion molecules E-selectin and intercellular cell adhesion molecule-1 in type-2 diabetic patients with and without asymptomatic peripheral arterial disease. *Int Angiol* 2004;23(2):128–133.
  616. del Pozo MA, Pulido R, Muñoz C, Alvarez V, Humbría A, Campanero MR, Sánchez-Madrid F. Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism. *Eur J Immunol* 1994;24(11):2586–2594.
  617. Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y. Proteolytic cleavage of



- ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* 1998;161:6398–6405.
618. Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2002;21:5213–5223.
619. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60(4):577–584.
620. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99(1):3–8.
621. Rohatgi A, Owens AW, Khera A, Ayers CR, Banks K, Das SR, Berry JD, McGuire DK, de Lemos JA. Differential associations between soluble cellular adhesion molecules and atherosclerosis in the Dallas Heart Study: a distinct role for soluble endothelial cell-selective adhesion molecule. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(10):1684–1690.
622. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991;147: 3788–3793.
623. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506–512.
624. Ley K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg* 1992;8:495–503.
625. Munagala VK, Burnett JC Jr, Redfield MM. The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Curr Probl Cardiol* 2004;29(12):707–769.
626. Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloschitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Processing of pro-Brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem* 2009;55:493–498.
627. Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Serebryanaya DV, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Katrukha AG. Processing of

- pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem* 2010;56:1166–1176.
628. Nishikimi T, Minamino N, Masashi I, Takeda Y, Tadokoro K, Shibasaki I, Fukuda H, Horiuchi Y, Oikawa S, Ieiri T, Matsubara M, Ishimitsu T. Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide in heart failure-different proBNP-108 to BNP-32 ratios in atrial and ventricular overload. *Heart* 2010;96:432–439.
629. Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, Mukoyama M, Nakao K, Fujiwara T, Imura H, Kawai C. Ventricular expression of atrial and brain natriuretic peptides in dilated cardiomyopathy. An immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens using specific monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1993;142(1):107–116.
630. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006;69:318–328.
631. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2357–2368.
632. Weber M, Hamm C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 2006;92:843–849.
633. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993;7(2):328–338.
634. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006 27(1):47–72.
635. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004;6(3):261–268.
636. Burger AJ. A review of the renal and neurohormonal effects of B-type natriuretic peptide. *Congest Heart Fail* 2005;11(1):30–38.
637. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 2000;97(8):4239–4244.
638. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 2004;94(4):453–461.
639. Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG. Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24:481–509.
640. Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001;51:429–441.
641. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992;10:1111–1114.
642. Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol* 2000;167:239–246.
643. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000;36:355–359.
644. Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Head-to-head comparison of the diagnostic utility of BNP and NT-proBNP in symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clin Chim Acta* 2004;341(1-2):41–48.
645. Holmbäck K, Danton MJ, Suh TT, Daugherty CC, Degen JL. Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J* 1996;15(21):5760–5771.
646. Farrell DH, Thiagarajan P. Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem* 1994;269(1):226–231.
647. Rooney MM, Parise LV, Lord ST. Dissecting clot retraction and platelet aggregation. Clot retraction does not require an intact fibrinogen gamma chain C terminus. *J Biol Chem* 1996;271(15):8553–8555.

648. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20(3):129–147.
649. Chooi CC, Gallus AS. Acute phase reaction, fibrinogen level and thrombus size. *Thromb Res* 1989;53(5):493–501.
650. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279(18):1477–1482.
651. Koenig W. Fibrinogen in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost* 2003;89(4):601–609.
652. Catto AJ, Grant PJ. Risk factors for cerebrovascular disease and the role of coagulation and fibrinolysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6(6):497–510.
653. van Oijen M, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Fibrinogen is associated with an increased risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Stroke* 2005;36(12):2637–2641.
654. Tang L, Ugarova TP, Plow EF, Eaton JW. Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *J Clin Invest* 1996;97(5):1329–1334.
655. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167(5):2887–2894.
656. Bach TL, Barsigian C, Yaen CH, Martinez J. Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin. *J Biol Chem* 1998;273(46):30719–30728.
657. Bach TL, Barsigian C, Chalupowicz DG, Busler D, Yaen CH, Grant DS, Martinez J. VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res* 1998;238(2):324–334.
658. Oki T, Kitaura J, Eto K, Lu Y, Maeda-Yamamoto M, Inagaki N, Nagai H, Yamanishi Y, Nakajima H, Kumagai H, Kitamura T. Integrin alphaIIb beta3 induces the adhesion and activation of mast cells through interaction with fibrinogen. *J Immunol* 2006;176(1):52–60.

659. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118(12):956–963.
660. Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis* 1990;10(2):263–275.
661. Stroncek DF, Shankar RA, Skubitz KM. The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils. *J Transl Med* 2005;3:36.
662. Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol* 1988;107(5):1893–1900.
663. Colman RW. Interactions between the contact system, neutrophils and fibrinogen. *Adv Exp Med Biol* 1990;281:105–120.
664. van de Stolpe A, Jacobs N, Hage WJ, Tertoolen L, van Kooyk Y, Nováková IR, de Witte T. Fibrinogen binding to ICAM-1 on EA.hy 926 endothelial cells is dependent on an intact cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1996;75(1):182–189.
665. Duperray A, Languino LR, Plescia J, McDowall A, Hogg N, Craig AG, Berendt AR, Altieri DC. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* 1997;272(1):435–441.
666. Harley SL, Sturge J, Powell JT. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(3):652–658.
667. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31(4):386–393.
668. Gardiner EE, D'Souza SE. A mitogenic action for fibrinogen mediated through intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1997;272(24):15474–15480.
669. Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP, Plow EF. Integrin alpha(M)beta(2)-mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *J Exp Med* 2001;193(10):1123–1133.

670. Rubel C, Fernández GC, Dran G, Bompadre MB, Isturiz MA, Palermo MS. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol* 2001;166(3):2002–2010.
671. Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:386–405.
672. Cheresh DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989;58(5):945–953.
673. Yokoyama K, Zhang XP, Medved L, Takada Y. Specific binding of integrin alpha v beta 3 to the fibrinogen gamma and alpha E chain C-terminal domains. *Biochemistry* 1999;38(18):5872–5877.
674. Smith RA, Rooney MM, Lord ST, Mosesson MW, Gartner TK. Evidence for new endothelial cell binding sites on fibrinogen. *Thromb Haemost* 2000;84(5):819–825.
675. Altieri DC, Duperray A, Plescia J, Thornton GB, Languino LR. Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem* 1995;270(2):696–699.
676. Walldius G, Jungner I. Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A-I-new risk factors and targets for therapy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17(8):565–571.
677. Podrez EA. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37(7):719–725.
678. Nofer JR, Walter M, Assmann G. Current understanding of the role of high-density lipoproteins in atherosclerosis and senescence. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005;3(6):1071–1086.
679. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(4):222–232.
680. Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. *An*

- interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *J Lipid Res* 2004;45:1583–1593.
681. Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *J Intern Med* 2006;259(5):493–519.
682. Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 2006;259(5):447–454.
683. Tsimikas S, Mooser V. Molecular biology of lipoproteins and dyslipidemias. In: Chien KR, editor. *Molecular Basis of Cardiovascular Disease. A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia, PA: WB Saunders Co., 2004:365–84.
684. Hsieh Wu J. Lipoprotein(a) in vascular disease, cancer and longevity. *Chang Gung Med J* 2011;34(6):555–564.
685. Utermann G. Genetic architecture and evolution of the lipoprotein(a) trait. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:133–141.
686. Hobbs HH, White AL. Lipoprotein(a): intrigues and insights. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:225–236.
687. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963–20966.
688. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915–924.
689. Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381–1478.
690. Jialal I. Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1998;44:1827–1832.
691. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:199–205.
692. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and

- macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344(6263):254–257.
693. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001;103:1930–1932.
694. Langlois MR, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Bekaert S, Blaton V, De Backer GG, Gillebert TC; Asklepios Investigators. Femoral plaques confound the association of circulating oxidized low-density lipoprotein with carotid atherosclerosis in a general population aged 35–55 years (Asklepios Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1563–1568.
695. Jessup W, Kritharides L, Stocker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc Trans* 2004;32:134–138.
696. Torzewski M, Shaw PX, Han KR, Shortal B, Lackner KJ, Witztum JL, Palinski W, Tsimikas S. Reduced in vivo aortic uptake of radiolabeled oxidation-specific antibodies reflects changes in plaque composition consistent with plaque stabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(12):2307–2312.
697. Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 2002;16(11):1348–1360.
698. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103(15):1955–1960.
699. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1649–1654.
700. Tsimikas S, Shortal BP, Witztum JL, Palinski W. In vivo uptake of radiolabeled MDA2, an oxidation-specific monoclonal antibody, provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive



- to their regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(3):689–697.
701. Tsimikas S, Palinski W, Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(1):95–100.
702. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, Schoen FJ, Witztum JL, Libby P. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;106(11):1390–1396.
703. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001;103(7):926–33.
704. Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, Sasiela WJ, Szarek M, Olsson AG, Schwartz GG; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation* 2004;110(11):1406–1412.
705. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, Witztum JL, Berger PB. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;353(1):46–57.
706. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 1996;37(1):45–53.
707. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, Goodpaster B, Harris TB. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;53(4):1068–1073.
708. Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB, Rubin SM,

- Simonsick EM, Colbert LH, Kritchevsky SB. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(8):1444–1448.
709. Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* 2002;252(5):440–447.
710. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(7):1162–1167.
711. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, Patel R, Pattison J, Miller E, Juliano J, Witztum JL. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(3):360–370.
712. Tsimikas S, Lau HK, Han KR, Shortal B, Miller ER, Segev A, Curtiss LK, Witztum JL, Strauss BH. Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a): short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 2004;109(25):3164–3170.
713. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761(11):1246–1259.
714. Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem* 2002;131(5):635–640.
715. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990;265(17):9682–9687.
716. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261(2):511–514.

717. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991;266(25):16667–16673.
718. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Gray PW. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995;374(6522):549–553.
719. Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* 1995;270(43):25481–25487.
720. Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, Moores K, Gloger IS, Macphee CH. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(4):591–599.
721. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(5):923–931.
722. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999;274(11):7018–7024.
723. Casas JP, Ninio E, Panayiotou A, Palmén J, Cooper JA, Ricketts SL, Sofat R, Nicolaides AN, Corsetti JP, Fowkes FG, Tzoulaki I, Kumari M, Brunner EJ, Kivimaki M, Marmot MG, Hoffmann MM, Winkler K, März W, Ye S, Stirnadel HA, Boekholdt SM, Khaw KT, Humphries SE, Sandhu MS, Hingorani AD, Talmud PJ. PLA2G7 genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European Ancestry. *Circulation* 2010;121(21):2284–2293.

724. Hoffmann MM, Winkler K, Renner W, Winkelmann BR, Seelhorst U, Wellnitz B, Boehm BO, März W. Genetic variants and haplotypes of lipoprotein associated phospholipase A2 and their influence on cardiovascular disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). *J Thromb Haemost* 2009;7(1):41–48.
725. Suchindran S, Rivedal D, Guyton JR, Milledge T, Gao X, Benjamin A, Rowell J, Ginsburg GS, McCarthy JJ. Genome-wide association study of Lp-PLA(2) activity and mass in the Framingham Heart Study. *PLoS Genet* 2010;6(4):e1000928.
726. Häkkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, Rice SQ, Tew DG, Karkola K, Ylä-Herttuala S. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):2909–2917.
727. Kolodgie F, Burke A, Taye A, Liu W, Sudhir K, Virmani R. Lipoprotein associated phospholipase A2 is highly expressed in macrophages of coronary lesions prone to rupture. *Circulation.* 2004;110(suppl III): III-246. Abstract.
728. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;262(9):4215–4222.
729. Mitsios JV, Vini MP, Stengel D, Ninio E, Tselepis AD. Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(8):1907–1913.
730. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(5):327–338.
731. Caslake MJ, Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(4):347–352.

732. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997;272(29):17895–17898.
733. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488(1-2):102–123.
734. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, Michiels C, Raes M, Bult H, Collen D, Van Veldhoven P, Ninio E, Holvoet P. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103(20):2495–2500.
735. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002;3(4):57–68.
736. Dada N, Kim NW, Wolfert RL. Lp-PLA2: an emerging biomarker of coronary heart disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2(1):17–22.
737. Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(2):121–125.
738. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;338(2):479–487.
739. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90(3):1138–1144.
740. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(8):2805–2809.

741. Safaya R, Chai H, Kougiyas P, Lin P, Lumsden A, Yao Q, Chen C. Effect of lysophosphatidylcholine on vasomotor functions of porcine coronary arteries. *J Surg Res* 2005;126(2):182–188.
742. Gonçalves I, Edsfeldt A, Ko NY, Grufman H, Berg K, Björkbacka H, Nitulescu M, Persson A, Nilsson M, Prehn C, Adamski J, Nilsson J. Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.249854.
743. Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, Prasad A, Mathew V, Lerman LO, Lerman A. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2007;115(21):2715–2721.
744. Shi Y, Zhang P, Zhang L, Osman H, Mohler ER 3rd, Macphee C, Zalewski A, Postle A, Wilensky RL. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis* 2007;191(1):54–62.
745. Blackie JA, Bloomer JC, Brown MJ, Cheng HY, Hammond B, Hickey DM, Ife RJ, Leach CA, Lewis VA, Macphee CH, Milliner KJ, Moores KE, Pinto IL, Smith SA, Stansfield IG, Stanway SJ, Taylor MA, Theobald CJ. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(6):1067–1070.
746. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, Lowe GD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000;343(16):1148–1155.
747. Blake GJ, Dada N, Fox JC, Manson JE, Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(5):1302–1306.

748. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499–502.
749. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2006;145:247–254.
750. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357(11):1121–1135.
751. Keeley EC, Hillis LD. Primary PCI for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2007;356(1):47–54.
752. Widimský P, Budesínský T, Vorác D, Groch L, Zelízko M, Aschermann M, Branny M, St'ásek J, Formánek P; 'PRAGUE' Study Group Investigators. Long distance transport for primary angioplasty vs immediate thrombolysis in acute myocardial infarction. Final results of the randomized national multicentre trial-PRAGUE-2. *Eur Heart J* 2003;24(1):94–104.
753. Andersen HR, Nielsen TT, Vesterlund T, Grande P, Abildgaard U, Thayssen P, Pedersen F, Mortensen LS; DANAMI–2 Investigators. Danish multicenter randomized study on fibrinolytic therapy versus acute coronary angioplasty in acute myocardial infarction: rationale and design of the DANish trial in Acute Myocardial Infarction–2 (DANAMI–2). *Am Heart J* 2003;146(2):234–241.
754. Stone GW. Angioplasty strategies in ST–segment–elevation myocardial infarction: part I: primary percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2008;118(5):538–551.
755. Valgimigli M, Campo G, Arcozzi C, Malagutti P, Carletti R, Ferrari F, Barbieri D, Parrinello G, Percoco G, Ferrari R. Two–year clinical follow-up after sirolimus-eluting versus bare-metal stent implantation assisted by systematic glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor Infusion in patients with myocardial infarction: results from the STRATEGY study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(2):138–145.
756. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V,

- Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29(23):2909–1945.
757. Mueller HS, Cohen LS, Braunwald E, Forman S, Feit F, Ross A, Schweiger M, Cabin H, Davison R, Miller D. Predictors of early morbidity and mortality after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. Analyses of patient subgroups in the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial, phase II. *Circulation* 1992;85:1254–1264.
758. Michaels AD, Goldschlager N. Risk stratification after acute myocardial infarction in the reperfusion era. *Prog Cardiovasc Dis* 2000;42:273–309.
759. Lee KL, Woodlief LH, Topol EJ, Weaver WD, Betriu A, Col J, Simoons M, Aylward P, Van de Werf F, Califf RM. Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators. *Circulation* 1995;91(6):1659–1668.
760. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(6):1102–1111.
761. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000;105(8):1095–1108.
762. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF Jr, Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2004;110(9):1134–1139.
763. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, Petri S, Goldmann B, Duchstein HJ, Berger J, Helmchen U, Freeman BA, Meinertz T,



- Münzel T. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004;37(6):902–911.
764. Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(7):1143–1146.
765. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984;310:1137–1140.
766. Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;106(23):2894–2900.
767. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–1143.
768. Roman RM, Camargo PV, Borges FK, Rossini AP, Polanczyk CA. Prognostic value of myeloperoxidase in coronary artery disease: comparison of unstable and stable angina patients. *Coron Artery Dis* 2010;21:129–136.
769. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003;349(17):1595–1604.
770. Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, Chopra V, Yanamadala S, Clark LT, Pinsky DJ, Marmur JD. Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007;99(10):1364–1368.
771. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108(12):1440–1445.
772. Esporcatte R, Rey HC, Rangel FO, Rocha RM, Mendonça Filho HT, Dohmann

- HF, Albanesi Filho FM. Predictive value of myeloperoxidase to identify high risk patients admitted to the hospital with acute chest pain. *Arq Bras Cardiol* 200;89(6):342–348.
773. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(20):1993–2000.
774. Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart* 2007;93:826–831.
775. Chang LT, Chua S, Sheu JJ, Wu CJ, Yeh KH, Yang CH, Yip HK. Level and prognostic value of serum myeloperoxidase in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Circ J* 2009;73(4):726–731.
776. Dominguez-Rodriguez A, Samimi-Fard S, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Kaski JC. Prognostic value of admission myeloperoxidase levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and cardiogenic shock. *Am J Cardiol* 2008;101:1537–1540.
777. Jaremo P, Hansson G, Nilsson O. Elevated inflammatory parameters are associated with lower platelet density in acute myocardial infarctions with ST-elevation. *Thromb Res* 2000;100:471–478.
778. Karadag B, Vatan B, Hacıoglu Y, Duman D, Baskurt M, Keles I, Ongen Z, Vural VA. Serum myeloperoxidase level predicts reperfusion in patients with myocardial infarction receiving thrombolytic therapy. *Heart Vessels* 2009;24(4):247–253.
779. Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, Shirai N, Nakagawa M, Sugioka K, Ikura Y, Kusano KF, Itoh A, Haze K, Yoshiyama M, Becker AE, Ueda M. Relation of elevated levels of plasma myeloperoxidase to impaired myocardial microcirculation after reperfusion in patients with acute myocardial infarction.

- Am J Cardiol 2010;105(7):922–929.
780. Marshall CJ, Nallaratnam M, Mocatta T, Smyth D, Richards M, Elliott JM, Blake J, Winterbourn CC, Kettle AJ, McClean DR. Factors influencing local and systemic levels of plasma myeloperoxidase in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2010;106(3):316–322.
781. Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001;286(17):2136–2142.
782. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med* 2003;197(5):615–624.
783. St John Sutton M, Pfeffer MA, Plappert T, Rouleau JL, Moyé LA, Dagenais GR, Lamas GA, Klein M, Sussex B, Goldman S. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation* 1994;89(1):68–75.
784. Yip HK, Chang LT, Sun CK, Chen MC, Yang CH, Hung WC, Hsieh YK, Fang CY, Hang CL, Wu CJ, Chang HW. Platelet activity is a biomarker of cardiac necrosis and predictive of untoward clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary stenting. *Circ J* 2006;70(1):31–36.
785. Wu CJ, Chang HW, Hung WC, Yang CH, Chen YH, Su CY, Yip HK. N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a biomarker of congestive heart failure and predictive of 30-day untoward clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Circ J* 2006;70(2):163–168.
786. DeGeare VS, Boura JA, Grines LL, O'Neill WW, Grines CL. Predictive Value of the Killip classification in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2001;87:1035–1038.
787. Grabowski M, Filipiak KJ, Malek LA, Karpinski G, Huczek Z, Stolarz P,

- Spiewak M, Kochman J, Rudowski R, Opolski G. Admission B-type natriuretic peptide assessment improves early risk stratification by Killip classes and TIMI risk score in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Int J Cardiol* 2007;115(3):386–390.
788. Grabowski M, Filipiak KJ, Karpinski G, Wretowski D, Rdzanek A, Huczek Z, Horszczaruk GJ, Kochman J, Rudowski R, Opolski G. Serum B-type natriuretic peptide levels on admission predict not only short-term death but also angiographic success of procedure in patients with acute ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Am Heart J* 2004;148(4):655–662.
789. Goldberg A, Hammerman H, Petcherski S, Zdorovyak A, Yalonetsky S, Kapeliovich M, Agmon Y, Markiewicz W, Aronson D. Inhospital and 1-year mortality of patients who develop worsening renal function following acute ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2005;150(2):330–337.
790. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, Spitz DR, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005;112(18):2812–2820.
791. Funayama H, Ishikawa SE, Sugawara Y, Kubo N, Momomura S, Kawakami M. Myeloperoxidase may contribute to the no-reflow phenomenon in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2010;139:187–192.
792. Gach O, Biémar C, Nys M, Deby-Dupont G, Chapelle JP, Deby C, Lamy M, Piérard LA, Legrand V. Early release of neutrophil markers of activation after direct stenting in patients with unstable angina. *Coron Artery Dis* 2005;16(1):59–65.
793. Gach O, Nys M, Deby-Dupont G, Chapelle JP, Lamy M, Piérard LA, Legrand V. Acute neutrophil activation in direct stenting: comparison of stable and unstable angina patients. *Int J Cardiol* 2006;112(1):59-65.
794. Rudolph V, Steven D, Gehling UM, Goldmann B, Rudolph TK, Friedrichs K, Meinertz T, Heitzer T, Baldus S. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med*

- 2007;42(4):460–465.
795. Nilsson L, Hallén J, Atar D, Jonasson L, Swahn E. Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Heart* 2012;98(1):31–36.
796. Srivastava CH, Rado TA, Bauerle D, Broxmeyer HE. Regulation of human bone marrow lactoferrin and myeloperoxidase gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1991;146(3):1014–1019.
797. Hu ZB, Ma W, Uphoff CC, Metge K, Gignac SM, Drexler HG. Myeloperoxidase: expression and modulation in a large panel of human leukemia-lymphoma cell lines. *Blood* 1993;82(5):1599–1607.
798. Aminian A, Boudjeltia KZ, Babar S, Van Antwerpen P, Lefebvre P, Crasset V, Leone A, Ducobu J, Friart A, Vanhaeverbeek M. Coronary stenting is associated with an acute increase in plasma myeloperoxidase in stable angina patients but not in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Intern Med* 2009;20(5):527–532.
799. Gonon AT, Gourine AV, Middelveld RJ, Alving K, Pernow J. Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2001;96(5):454–462.
800. Feld S, Li G, Wu A, Felli P, Amirian J, Vaughn WK, Gornet T, Swenson C, Smalling RW. Reduction of canine infarct size by bolus intravenous administration of liposomal prostaglandin E1: comparison with control, placebo liposomes, and continuous intravenous infusion of prostaglandin E1. *Am Heart J* 1996;132(4):747–757.
801. Sinning C, Schnabel R, Peacock WF, Blankenberg S. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? *Congest Heart Fail* 2008;14(4 Suppl 1):46–48.
802. Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, Haddad M, Knittel K, Wende S, Wenzel J, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Hübner C, Baldus S. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med* 2007;43(8):1189–

- 1196.
803. Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98(6):796–799.
804. Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, Jasper S, Hazen SL, Klein AL. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(24):2364–2370.
805. Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy. *Circulation* 2000;102(19):2329–2334.
806. Hallén J, Buser P, Schwitter J, Petzelbauer P, Geudelin B, Fagerland MW, Jaffe AS, Atar D. Relation of cardiac troponin I measurements at 24 and 48 hours to magnetic resonance-determined infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2009;104(11):1472–1477.
807. Lazzeri C, Valente S, Chiostrì M, Picariello C, Gensini GF. Uric acid in the early risk stratification of ST-elevation myocardial infarction. *Intern Emerg Med* 2012;7(1):33–39.
808. Lazzeri C, Valente S, Chiostrì M, Sori A, Bernardo P, Gensini GF. Uric acid in the acute phase of ST elevation myocardial infarction submitted to primary PCI: its prognostic role and relation with inflammatory markers: a single center experience. *Int J Cardiol* 2010;138(2):206–209.
809. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991;266(25):16667–16673.
810. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Miltiados G, Goudevenos JA, Cariolou MA, Chapman MJ, Tselepis AD, Elisaf M. Altered distribution of platelet-activating factor-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J Lipid Res*

- 2002;43(2):256–263.
811. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, Myerson M, Wu KK, Sharrett AR, Boerwinkle E. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med* 2005;165(21):2479–2484.
  812. 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(9):913–919.
  813. Robins SJ, Collins D, Nelson JJ, Bloomfield HE, Asztalos BF. Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(6):1172–1178.
  814. Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonksi KA, Rice MM, Solomon S, Rosenberg Y, Domanski MJ, Hsia J; PEACE Investigators. Prognostic utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2463–2469.
  815. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT–TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial. *Circulation* 2006;113(14):1745–1752.
  816. Gerber Y, McConnell JP, Jaffe AS, Weston SA, Killian JM, Roger VL. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and prognosis after myocardial infarction in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2517–2252.
  817. Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W, Sparks CE. High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in

- postinfarction patients. *Clin Chem* 2006;52:1331–1338.
818. Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med* 2006;166(19):2073–2080.
819. van Vark LC, Kardys I, Bleumink GS, Knetsch AM, Deckers JW, Hofman A, Stricker BH, Wittteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of heart failure: The Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006;27(19):2346–2352.
820. Bhatti S, Hakeem A, Cilingiroglu M. Lp-PLA(2) as a marker of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12(2):140–144.
821. Li N, Li S, Yu C, Gu S. Plasma Lp-PLA2 in acute coronary syndrome: association with major adverse cardiac events in a community-based cohort. *Postgrad Med* 2010;122(4):200–205.
822. Möckel M, Müller R, Vollert JO, Müller C, Danne O, Gareis R, Störk T, Dietz R, Koenig W. Lipoprotein-associated phospholipase A2 for early risk stratification in patients with suspected acute coronary syndrome: a multi-marker approach: the North Wuerttemberg and Berlin Infarction Study-II (NOBIS-II). *Clin Res Cardiol* 2007;96(9):604–612.
823. Madjid M, Ali M, Willerson JT. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature. *Tex Heart Inst J* 2010;37:25–39.
824. Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A<sub>2</sub> in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 2010;122(21):2183–2200.
825. The Lp-PLA2 Studies Collaboration. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010; 375:1536–1544.
826. Koenig W, Khuseyinova N, Lowel 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;110:1903–1908.
827. Persson M, Hedblad B, Nelson JJ, Berglund G. Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(6):1411–1416.
828. Jenny NS, Solomon C, Cushman M, Tracy RP, Nelson JJ, Psaty BM, Furberg CD. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA(2)) and risk of cardiovascular disease in older adults: results from the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 2010; 209(2):528–32.
829. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, Lerman A, McConnell JP, Weintraub HS. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol* 2008;101(12A):51F–57F
830. Hatoum IJ, Nelson JJ, Cook NR, Hu FB, Rimm EB. Dietary, lifestyle, and clinical predictors of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity in individuals without coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 2010;91(3):786–793.
831. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340:1801–1811.
832. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007;131:1557–1566.
833. Grallert H, Dupuis J, Bis JC, Dehghan A, Barbalic M, Baumert J, Lu C, Smith NL, Uitterlinden AG, Roberts R, Khuseyinova N, Schnabel RB, Rice KM, Rivadeneira F, Hoogeveen RC, Fontes JD, Meisinger C, Keaney JF Jr, Lemaitre R, Aulchenko YS, Vasani RS, Ellis S, Hazen SL, van Duijn CM, Nelson JJ, März W, Schunkert H, McPherson RM, Stirratt HA, Psaty BM, Gieger C, Siscovick D, Hofman A, Illig T, Cushman M, Yamamoto JF, Rotter JI, Larson MG, Stewart AF, Boerwinkle E, Witteman JC, Tracy RP, Koenig W,

- Benjamin EJ, Ballantyne CM. Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease: meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies. *Eur Heart J* 2012;33(2):238–251.
834. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2005;111(5):570–575.
835. Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, Elesber AA, Meyer JG, Berger PB. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J* 2005;26:137–144.
836. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol* 2008;101:23F–33F.
837. Winkler K, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Friedrich I, Schäfer G, Seelhorst U, Wellnitz B, Wieland H, Boehm BO, März W. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts 5-year cardiac mortality independently of established risk factors and adds prognostic information in patients with low and medium high-sensitivity C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *Clin Chem* 2007;53(8):1440–1447.
838. Oswald GA, Corcoran S, Yudkin JS. Prevalence and risks of hyperglycaemia and undiagnosed diabetes in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 1984;1(8389):1264–1267.
839. Yildiz A, Arat-Ozkan A, Kocas C, Abaci O, Coskun U, Bostan C, Olcay A, Akturk F, Okcun B, Ersanli M, Gurmen T. Admission hyperglycemia and TIMI frame count in primary percutaneous coronary intervention. *Angiology* 2011, doi: 10.1177/0003319711418957.
840. Pres D, Gasior M, Strojek K, Gierlotka M, Hawranek M, Lekston A, Wilczek K, Tajstra M, Gumprecht J, Poloński L. Blood glucose level on admission determines in-hospital and long-term mortality in patients with ST-segment

- elevation myocardial infarction complicated by cardiogenic shock treated with percutaneous coronary intervention. *Kardiol Pol* 2010;68(7):743–751.
841. Lazzeri C, Valente S, Chiostrì M, Attanà P, Picariello C, Gensini GF. The glucose dysmetabolism in the acute phase of non-diabetic ST-elevation myocardial infarction: from insulin resistance to hyperglycemia. *Acta Diabetol*. 2011, doi: 10.1007/s00592–011–0325–6.
842. Mizock BA. Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15(4):533–551.
843. Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, La Marca C, Giunta R, Lucarelli C, Paolisso G, Ceriello A, Giugliano D. Glutathione reverses systemic hemodynamic changes induced by acute hyperglycemia in healthy subjects. *Am J Physiol* 1995;268(6 Pt 1):E1167–E1173.
844. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001;103(12):1618–1623.
845. Ceriello A, Motz E, Giugliano D. Hypertension and ascorbic acid. *Lancet* 2000;355:1272–1273.
846. Aronson D, Rayfield EJ, Chesebro JH. Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 1997; 126: 296–306.
847. Kosuge M, Kimura K, Ishikawa T, Shimizu T, Hibi K, Toda N, Tahara Y, Kanna M, Tsukahara K, Okuda J, Nozawa N, Umemura S. Persistent hyperglycemia is associated with left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2005;69(1):23–28.
848. van Vark LC, Kardys I, Bleumink GS, Knetsch AM, Deckers JW, Hofman A, Stricker BH, Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of heart failure: The Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006;27(19):2346–2352.
849. Gerber Y, Dunlay SM, Jaffe AS, McConnell JP, Weston SA, Killian JM, Roger VL. Plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 levels in heart failure:

- association with mortality in the community. *Atherosclerosis* 2009;203(2):593–598.
850. The Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy Trial (STABILITY). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00799903>.
  851. The Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy Trial (STABILITY). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00799903>.
  852. Aronson D. Clinical significance of atrial fibrillation after myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;9:1111–1113.
  853. Schmitt J, Duray G, Gersh BJ, Hohnloser SH. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction: a systematic review of the incidence, clinical features and prognostic implications. *Eur Heart J* 2009;30:1038–1045.
  854. Aronson D, Boulos M, Suleiman A, Bidoosi S, Agmon Y, Kapeliovich M, Beyar R, Markiewicz W, Hammerman H, Suleiman M. Relation of C-reactive protein and new-onset atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007;100(5):753–757.
  855. Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, Noguchi T, Sase K, Kihara Y, Goto Y, Nonogi H. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(4):742–748.
  856. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008;29(19):2388–2442.
  857. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA. Rapid

- measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161–167.
858. Mueller C, Laule-Kilian K, Scholer A, Frana B, Rodriguez D, Schindler C, Marsch S, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide for the management of women with dyspnea. *Am J Cardiol* 2004;94:1510–1514.
859. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliere Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1733–1739.
860. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355:1126–1130.
861. Kinjo K, Sato H, Sato H, Ohnishi Y, Hishida E, Nakatani D, Mizuno H, Fukunami M, Koretsune Y, Takeda H, Hori M; Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group. Prognostic significance of atrial fibrillation/atrial flutter in patients with acute myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2003;92(10):1150–1154.
862. Køber L, Swedberg K, McMurray JJ, Pfeffer MA, Velazquez EJ, Diaz R, Maggioni AP, Mareev V, Opolski G, Van de Werf F, Zannad F, Ertl G, Solomon SD, Zelenkofske S, Rouleau JL, Leimberger JD, Califf RM. Previously known and newly diagnosed atrial fibrillation: a major risk indicator after a myocardial infarction complicated by heart failure or left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(6):591–598.
863. Rathore SS, Berger AK, Weinfurt KP, Schulman KA, Oetgen WJ, Gersh BJ, Solomon AJ. Acute myocardial infarction complicated by atrial fibrillation in the elderly: prevalence and outcomes. *Circulation* 2000;101(9):969–974.
864. Waldecker B. Atrial fibrillation in myocardial infarction complicated by heart failure: cause or consequence? *Eur Heart J* 1999;20:710–712.
865. Lehto M, Snapinn S, Dickstein K, Swedberg K, Nieminen MS. OPTIMAAL investigators. Prognostic risk of atrial fibrillation in acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction: the OPTIMAAL experience. *Eur*

- Heart J 2005;26:350–356.
866. Pedersen OD, Bagger H, Køber L, Torp-Pedersen C. The occurrence and prognostic significance of atrial fibrillation/flutter following acute myocardial infarction. TRACE Study group. TRAndolapril Cardiac Evalution. Eur Heart J 1999;20:748–754.
  867. Crilley JG, Farrer M. Left ventricular remodelling and brain natriuretic peptide after first myocardial infarction. Heart 2001;86:638–642.
  868. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, Mukoyama M, Nakao K. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. Circulation 1993;88(1):82–91.
  869. Parashar S, Langberg JJ, Vaccarino V, Reid KJ, Spertus J, Lloyd MS. Elevated BNP predicts new onset atrial fibrillation complicating acute myocardial infarction: analysis of the TRIUMPH registry. J Am Coll Cardiol 2010;55:A7.E61.
  870. Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. Circulation 1997;96:1686–1695.
  871. Solti F, Vecsey T, Kekesi V, Juhasz-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. Cardiovasc Res 1989;23:882–886.
  872. Kavsak PA, Ko DT, Newman AM, Palomaki GE, Lustig V, Macrae AR, Jaffe AS. "Upstream markers" provide for early identification of patients at high risk for myocardial necrosis and adverse outcomes. Clin Chim Acta 2008;387(1–2):133–138.
  873. Martins TB, Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Roberts WL, Carlquist JF. Risk factor analysis of plasma cytokines in patients with coronary artery disease by a multiplexed fluorescent immunoassay. Am J Clin Pathol 2006;125(6):906–913.
  874. Parikh SV, de Lemos JA. Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice. Am J Med Sci 2006;332:186–197.
  875. Frangiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in

- myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53:31–47.
876. Ferraro S, Lupi A, Marano G, Rossi L, Ciardi L, Vendramin C, Bellomo G, Boracchi P, Bongo AS, Biganzoli E. Different patterns of NT-proBNP secretion in acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2009;402(1–2):176–181.
877. Boyle MD, Hess JL, Nuara AA, Buller RM. Application of immunoproteomics to rapid cytokine detection. *Methods* 2006;38:342–350.
878. Nielsen UB, Geierstanger BH. Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J Immunol Methods* 2004 290:107–120.
879. Kraaijeveld AO, de Jager SC, van Berkel TJ, Biessen EA, Jukema JW. Chemokines and atherosclerotic plaque progression: Towards therapeutic targeting? *Curr Pharm Des.* 2007;13:1039–1052.
880. Kraaijeveld AO, de Jager SC, de Jager WJ, Prakken BJ, McColl SR, Haspels I, Putter H, van Berkel TJ, Nagelkerken L, Jukema JW, Biessen EA. CC chemokine ligand-5 (CCL5/RANTES) and CC chemokine ligand-18 (CCL18/PARC) are specific markers of refractory unstable angina pectoris and are transiently raised during severe ischemic symptoms. *Circulation* 2007;116(17):1931–1941.
881. de Jager SC, Kraaijeveld AO, Grauss RW, de Jager W, Liem SS, van der Hoeven BL, Prakken BJ, Putter H, van Berkel TJ, Atsma DE, Schaliij MJ, Jukema JW, Biessen EA. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(3):446–452
882. Martins TB, Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Roberts WL, Carlquist JF. Risk factor analysis of plasma cytokines in patients with coronary artery disease by a multiplexed fluorescent immunoassay. *Am J Clin Pathol* 2006;125(6):906–913.
883. Zineh I, Luo X, Welder GJ, Debella AE, Wessel TR, Arant CB, Schofield RS, Chegini N. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. *Pharmacotherapy* 2006r;26(3):333–340.
884. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K. Interleukin-8

- as an independent predictor of longterm clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2008;124:319–325.
885. Lee BC, Hsu HC, Tseng WY, Su MY, Chen SY, Wu YW, Chien KL, Chen MF. Effect of cardiac rehabilitation on angiogenic cytokines in postinfarction patients. *Heart* 2009;95(12):1012–1018.
886. Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 2009;95:191–197.
887. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;63:879–884.
888. Knight PR, Sreekumar A, Siddiqui J, Laxman B, Copeland S, Chinnaiyan A, Remick DG. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. *Shock* 2004;21:26–30.
889. Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry* 2001;45:27–36.
890. Liew M, Groll MC, Thompson JE, Call SL, Moser JE, Hoopes JD, Voelkerding K, Wittwer C, Spendlove RS. Validating a custom multiplex ELISA against individual commercial immunoassays using clinical samples. *Biotechniques* 2007;42(3):327–333.
891. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* 2006;38:317–323.
892. Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: Comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61:35–39.
893. Lash GE, Scaife PJ, Innes BA, Otun HA, Robson SC, Searle RF, Bulmer JN. Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLight and FAST Quant. *J Immunol Methods* 2006;309(1–2):205–208.



894. Ray KK, Cannon CP, Cairns R, Morrow DA, Rifai N, Kirtane AJ, McCabe CH, Skene AM, Gibson CM, Ridker PM, Braunwald E; PROVE IT-TIMI 22 Investigators. Relationship between uncontrolled risk factors and C-reactive protein levels in patients receiving standard or intensive statin therapy for acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(8):1417–1424.
895. Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjöld A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am Heart J* 2004;148:574–881
896. Casals G, Filella X, Augé JM, Bedini JL. Impact of ultrasensitive cardiac troponin I dynamic changes in the new universal definition of myocardial infarction. *Am J Clin Pathol* 2008;130:964–968.
897. Clerico A. Increasing impact of laboratory medicine in clinical cardiology. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:871–883.
898. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease. The present and the future. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1–11.
899. Rosalki SB, Roberts R, Katus HA, Giannitsis E, Ladenson JH, Apple FS. Cardiac biomarkers for detection of myocardial infarction: perspectives from past to present. *Clin Chem* 2004;50(11):2205–2213.
900. Vasan S. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical consideration. *Circulation* 2006; 113:2335–2362.
901. Estensen ME, Hognestad A, Syversen U, Squire I, Ng L, Kjekshus J, Dickstein K, Omland T. Prognostic value of plasma chromogranin A levels in patients with complicated myocardial infarction. *Am Heart J* 2006;152(5):927.e1–6.
902. de Lemos JA, Lloyd-Jones DM. Multiple biomarker panels for cardiovascular risk assessment. *N Engl J Med*. 2008; 358:2172–2174.
903. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003;290(7):898–904.
904. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP,

- Braunwald E. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1460–1465.
905. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. N Engl J Med* 2000;343:1139–1147.
906. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165–2168.
907. de Lemos JA, Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation* 2002;106:2868–2870.
908. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttmore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998;97(19):1921–1929.
909. de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, Hall C, Cannon CP, Braunwald E. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345(14):1014–1021.
910. Omland T, de Lemos JA, Morrow DA, Antman EM, Cannon CP, Hall C, Braunwald E. Prognostic value of N-terminal pro-atrial and pro-brain natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2002;89(4):463–465.
911. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:437–445.
912. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E. Evaluation

- of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: B-type natriuretic peptide and prognosis in TACTICS-TIMI 18. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(8):1264–1272.
913. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, Barnathan ES, Califf R, Topol EJ, Simoons ML, Wallentin L. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation*. 2003 ;108(3):275–281.
914. Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schönbeck U. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108(9):1049–1052.
915. Shlipak MG, Ix JH, Bibbins-Domingo K, Lin F, Whooley MA. Biomarkers to predict recurrent cardiovascular disease: the Heart and Soul Study. *Am J Med* 2008;121(1):50–57.
916. Apple FS, Pearce LA, Chung A, Ler R, Murakami MM. Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2007;53(5):874–881.
917. Bodí V, Sanchis J, Llàcer A, Fácila L, Núñez J, Pellicer M, Bertomeu V, Ruiz V, Chorro FJ. Multimarker risk strategy for predicting 1-month and 1-year major events in non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2005;149(2):268–274.
918. Manenti ER, Bodanese LC, Camey SA, Polanczyk CA. Prognostic value of serum biomarkers in association with TIMI risk score for acute coronary syndromes. *Clin Cardiol* 2006;29(9):405–410.
919. Roubille F, Samri A, Cornillet L, Sportouch-Dukhan C, Davy JM, Raczka F, Gervasoni R, Pasquie JL, Cung TT, Piot C, Macia JC, Cransac F, Leclercq F. Routinely-feasible multiple biomarkers score to predict prognosis after revascularized STEMI. *Eur J Intern Med* 2010;21(2):131–136.
920. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N,

- McCabe C, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation* 2002;105(15):1760–1763.
921. Möckel M, Danne O, Müller R, Vollert JO, Müller C, Lueders C, Störk T, Frei U, Koenig W, Dietz R, Jaffe AS. Development of an optimized multimarker strategy for early risk assessment of patients with acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2008;393(2):103–109.
922. Morrow DA, Sabatine MS, Brennan ML, de Lemos JA, Murphy SA, Ruff CT, Rifai N, Cannon CP, Hazen SL. Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J* 2008;29(9):1096–1102.
923. Brügger-Andersen T, Aarsetoy H, Grundt H, Staines H, Nilsen DW. The long-term prognostic value of multiple biomarkers following a myocardial infarction. *Thromb Res* 2008;123:60–66.
924. Damman P, Beijk MA, Kuijt WJ, Verouden NJ, van Geloven N, Henriques JP, Baan J, Vis MM, Meuwissen M, van Straalen JP, Fischer J, Koch KT, Piek JJ, Tijssen JG, de Winter RJ. Multiple biomarkers at admission significantly improve the prediction of mortality in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(1):29–36.
925. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol* 2002; 32:404–412.
926. Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo IF, Fallon JT, Rossikhina M, Giesen PL, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem* 1997;272(45):28568–28573.
927. Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A,

- Winkelmann K, Michael LH, Lawler J, Entman ML. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* 2005;111(22):2935–2942.
928. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:690–695.
929. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentziko DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C–C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(2):223–229.
930. Korybalska K, Pyda M, Grajek S, Lanocha M, Breborowicz A, Witowski J. Serum profiles of monocyte chemoattractant protein-1 as a biomarker for patients recovering from myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 2010;99(5):315–322.
931. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112(8):1113–1120.
932. Kanda T, Hirao Y, Oshima S, Yuasa K, Taniguchi K, Nagai R, Kobayashi I. Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;77:304–307.
933. Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Reitsma PH, Khaw KT. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1503–1508.
934. Funayama H, Ishikawa SE, Kubo N, Yasu T, Saito M, Kawakami M. Close association of regional interleukin-6 levels in the infarct-related culprit coronary artery with restenosis in acute myocardial infarction. *Circ J* 2006;70(4):426–

- 429.
935. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992;6:2591–2599.
936. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;93(4):1564–1570.
937. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokine-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97–179.
938. Schroder JM, Mrowietz U, Christophers E. Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil stimulating activity. *J Immunol* 1998;140:3534–3540.
939. Berns SA, Shmidt EA, Kiprina ES, Klimenkova AV, Barbarash OL, Sin'kov MV, Moiseenkov GV, Barbarash LS. Predictors of coronary adverse events in patients with acute coronary syndrome with ST segment elevation treated with percutaneous coronary interventions with stenting. *Kardiologia* 2010;50(7):15–20.
940. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368(6469):339–342.
941. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110(22):3493–3500.
942. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996;27(5):1201–1206.
943. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Hunt G, Wu WJ, Tan W, Bolli R. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res*

- 2004;64(1):61–71.
944. Imaizumi T, Nejima J, Kiuchi K, Takeda S, Seino Y, Tanaka K, Takano T. Dynamics and source of endothelin-1 and interleukin-6 following coronary reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *J Nihon Med Sch* 2007;74(2):131–147.
945. Yang S, Zheng R, Hu S, Ma Y, Choudhry MA, Messina JL, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(5):H2183–H2191.
946. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res* 2002;55:329–340.
947. Keller P, Keller C, Carey AL, Jauffred S, Fischer CP, Steensberg A, Pedersen BK. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(2):550–554.
948. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 1992;148:4066–4071.
949. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seeger D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:613–624.
950. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002;86:41–59.
951. Leftheriotis DI, Fountoulaki KT, Flevari PG, Parissis JT, Panou FK, Andreadou IT, Venetsanou KS, Iliodromitis EK, Kremastinos DT. The predictive value of inflammatory and oxidative markers following the successful cardioversion of persistent lone atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2009;135(3):361–369.
952. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*

- 2004;351(25):2599–2610.
953. Koukkunen H, Penttilä K, Kemppainen A, Halinen M, Penttilä I, Rantanen T, Pyörälä K. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med* 2001;33(1):37–47.
  954. Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 2005;105(2):526–532.
  955. Tan J, Hua Q, Li J, Fan Z. Prognostic value of interleukin-6 during a 3-year follow-up in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Heart Vessels* 2009;24(5):329–334
  956. Ohtsuka T, Hamada M, Inoue K, Ohshima K, Sujzuki J, Matsunaka T, Ogimoto A, Hara Y, Shigematsu Y, Higaki J. Relation of circulating interleukin-6 to left ventricular remodeling in patients with reperfused anterior myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2004;27(7):417–420.
  957. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA* 2001;286(17):2107–2113.
  958. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115–126.
  959. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259–3287.
  960. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005;100:179–190.
  961. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part II. Acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006;113(7):152–155.
  962. O'Malley T, Ludlam CA, Riemersma RA, Fox KA. Early increase in levels of soluble inter-cellular adhesion molecule-1 (sICAM-1); potential risk factor for



- the acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2001;22(14):1226–1234.
963. Kamijikkoku S, Murohara T, Tayama S, Matsuyama K, Honda T, Ando M, Hayasaki K. Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: a marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis? *Am Heart J* 1998;136(2):231–236.
964. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Pate G, Crean PA, Walsh M. Enhanced endothelial activation in diabetic patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Diabet Med* 2001;18(12):979–983.
965. Parker C 3rd, Vita JA, Freedman JE. Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001;156(2):417–424.
966. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M. Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(4):1210–1216.
967. O'Malley T, Ludlam CA, Riemermsa RA, Fox KA. Early increase in levels of soluble inter-cellular adhesion molecule-1 (sICAM-1); potential risk factor for the acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2001;22(14):1226–1234.
968. Postadzhiyan AS, Tzontcheva AV, Kehayov I, Finkov B. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem* 2008;41(3):126–133.
969. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart* 2001;85(6):623–627.
970. Fan ZX, Hua Q, Li YP, Liu RK, Yang Z. Interleukin-6, but not soluble adhesion molecules, predicts a subsequent mortality from cardiovascular disease in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Cell Biochem Biophys* 2011;61(2):443–448.
971. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999;99(11):1492–1498.

972. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996;93(4):704–711.
973. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenstrom A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 2004;109(13):1594–1602.
974. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003;107:3133–3140.
975. Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, Ide T, Egashira K, Tsutsui H, Sunagawa K. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007;73(4):794–805.
976. Ueland T, Kjekshus J, Frøland SS, Omland T, Squire IB, Gullestad L, Dickstein K, Aukrust P. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor type I during the acute phase following complicated myocardial infarction predicts survival in high-risk patients. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(11):2018–2021.
977. Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine* 2007;39:75–83.
978. Ziegler SF, Tough TW, Franklin TL, Armitage RJ, Alderson MR. Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7. *J Immunol* 1991;147:2234–2239.
979. Standiford TJ, Strieter RM, Allen RM, Burdick MD, Kunkel SL. IL-7 up-regulates the expression of IL-8 from resting and stimulated human blood monocytes. *J Immunol* 1992;149:2035–2039.
980. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, Gullestad L, Frøland SS, Aukrust P. Interleukin-7-mediated inflammation in

- unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation* 2003;107:2670–2676.
981. Al-Rawi MA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The effects of interleukin-7 on the lymphangiogenic properties of human endothelial cells. *Int J Oncol* 2005;27:721–730.
  982. Romano Carratelli C, Nuzzo I, Cozzolino D, Bentivoglio C, Paolillo R, Rizzo A. Relationship between *Chlamydia pneumoniae* infection, inflammatory markers, and coronary heart diseases. *Int Immunopharmacol* 2006;6:848–853.
  983. Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol* 1998;142:1279–1287.
  984. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191(5):771–780.
  985. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998;9(5):669–676.
  986. Stemme S. Plaque T-cell activity: not so specific? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1099–1101.
  987. Bergamaschi C, Bear J, Rosati M, Kelly Beach R, Alicea C, Sowder R, Chertova E, Rosenberg SA, Felber BK, Pavlakis GN. Circulating interleukin-15 (IL-15) exists as heterodimeric complex with soluble IL-15 receptor alpha (IL-15R $\alpha$ ) in human serum. *Blood* 2012; doi: 10.1182/blood-2011-10-384362.
  988. Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007;73(4):783–793.
  989. Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;43(4):339–344.
  990. Stylianou IM, Bauer RC, Reilly MP, Rader DJ. Genetic basis of atherosclerosis:

- insights from mice and humans. *Circ Res* 2012;110(2):337–355.
991. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H; WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *Engl J Med* 2007;357(5):443–453.
992. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AF, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardissino D, Ball SG, Balmforth AJ, Barnes TA, Becker DM, Becker LC, Berger K, Bis JC, Boekholdt SM, Boerwinkle E, Braund PS, Brown MJ, Burnett MS, Buyschaert I; Cardiogenics, Carlquist JF, Chen L, Cichon S, Codd V, Davies RW, Dedoussis G, Dehghan A, Demissie S, Devaney JM, Diemert P, Do R, Doering A, Eifert S, Mokhtari NE, Ellis SG, Elosua R, Engert JC, Epstein SE, de Faire U, Fischer M, Folsom AR, Freyer J, Gigante B, Girelli D, Gretarsdottir S, Gudnason V, Gulcher JR, Halperin E, Hammond N, Hazen SL, Hofman A, Horne BD, Illig T, Iribarren C, Jones GT, Jukema JW, Kaiser MA, Kaplan LM, Kastelein JJ, Khaw KT, Knowles JW, Kolovou G, Kong A, Laaksonen R, Lambrechts D, Leander K, Lettre G, Li M, Lieb W, Loley C, Lotery AJ, Mannucci PM, Maouche S, Martinelli N, McKeown PP, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Merlini PA, Mooser V, Morgan T, Mühleisen TW, Muhlestein JB, Münzel T, Musunuru K, Nahrstaedt J, Nelson CP, Nöthen MM, Olivieri O, Patel RS, Patterson CC, Peters A, Peyvandi F, Qu L, Quyyumi AA, Rader DJ, Rallidis LS, Rice C, Rosendaal FR, Rubin D, Salomaa V, Sampietro ML, Sandhu MS, Schadt E, Schäfer A, Schillert A, Schreiber S, Schrezenmeir J, Schwartz SM, Siscovick DS, Sivananthan M, Sivapalaratnam S, Smith A, Smith TB, Snoep JD, Soranzo N, Spertus JA, Stark K, Stirrups K, Stoll M, Tang WH, Tennstedt S, Thorgeirsson G, Thorleifsson G, Tomaszewski M, Uitterlinden

- AG, van Rij AM, Voight BF, Wareham NJ, Wells GA, Wichmann HE, Wild PS, Willenborg C, Wittteman JC, Wright BJ, Ye S, Zeller T, Ziegler A, Cambien F, Goodall AH, Cupples LA, Quertermous T, März W, Hengstenberg C, Blankenberg S, Ouwehand WH, Hall AS, Deloukas P, Thompson JR, Stefansson K, Roberts R, Thorsteinsdottir U, O'Donnell CJ, McPherson R, Erdmann J; CARDIoGRAM Consortium, Samani NJ. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011;43(4):333–338.
993. Goldschmidt-Clermont PJ, Seo DM, Wang L, Beecham GW, Liu ZJ, Vazquez-Padron RI, Dong C, Hare JM, Kapiloff MS, Bishopric NH, Pericak-Vance M, Vance JM, Velazquez OC. Inflammation, stem cells and atherosclerosis genetics. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12(6):712–723.
994. Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Seo DM, Velazquez OC. Atherosclerosis, inflammation, genetics, and stem cells: 2012 update. *Curr Atheroscler Rep* 2012; doi 10.1007/s11883-012-0244-1.
995. Lippi G, Plebani M, Guidi GC. The paradox in translational medicine. *Clin Chem* 2007;53:1553.
996. Plebani M. The changing scenario in laboratory medicine and the role of laboratory professionals in translational medicine. *Clin Chim Acta* 2008;393:23–26.
997. Plebani M, Marincola FM. Research translation: a new frontier for clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1303–1312.
998. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860–921.
999. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299–1320.
1000. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Genomics and proteomics in venous thromboembolism: building a bridge toward a rational personalized medicine framework. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:759–770.

## BIOGRAFIJA

Sanja Stanković je rođena 27.12.1969. god. u Beogradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Vranju kao učenik generacije i nosilac mnogobrojnih diploma. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu (FF) u Beogradu 1993. god. sa prosečnom ocenom 9,47. Nakon obavljenog jednogodišnjeg staža u Kliničkom centru Srbije (KCS) položila je državni ispit. Na FF u Beogradu 1999.god. odbranila je magistarsku tezu, 2000. god. završila specijalizaciju iz medicinske biohemije, a 2009. i subspecijalizaciju iz kliničke enzimizacije. U periodu 1994-2011 bila je zaposlena na FF kao asistent na predmetima: statistika u farmaciji, medicinska biohemija, klinička hemija, klinička enzimizacija, uvod u studije medicinske biohemije i laboratorijski menadžment i osiguranje kvaliteta. Od 2000. god. zaposlena je u Centru za medicinsku biohemiju KCS gde obavlja poslove načelnika Službe za urgentnu laboratorijsku dijagnostiku. Bila je uključena kao saradnik na 5 projekata Republičkog ministarstva za nauku. Dobitnik je dve nagrade za poster na svetskom kongresu i Balkanske nagrade za kliničko-laboratorijsko istraživanje 2009. i 2010. god. Aktivno učestvuje kao predavač na seminarima kontinuirane edukacije i međunarodnim kongresima. Autor je i koautor 260 radova, od čega 14 u časopisima indeksiranim u CC/SCI. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije. U periodu 2006-2008 bila je sekretar „Balkan Clinical Laboratory Federation“. Od 2006-2011. bila je član Komisije za praćenje i unapređenje kvaliteta nastave na FF i član Komisije za odbranu više od 200 diplomskih radova. Član je Skupštine i predsednik ogranka Beograd u Komori biohemičara Srbije, sekretar Republičke stručne komisije za medicinsku i kliničku biohemiju, član Komisije za procenu zdravstvenih tehnologija, stručni nadzornik u Ministarstvu zdravlja za spoljašnju proveru kvaliteta stručnog rada, tehnički ekspert i spoljašnji ocenjivač Akreditacionog tela Srbije, spoljašnji ocenjivač Agencije za akreditaciju zdravstvenih ustanova. Govori engleski i služi se nemačkim jezikom.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Сања Станковић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Прогностички значај биохемијских показатеља код пацијената са инфарктом миокарда са СТ елевацијом лечених примарном перкутаном коронарном интервенцијом

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.5.2012. год.

Sanja Stančonić

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Станковић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Прогностички значај биохемијских показатеља код пацијената са инфарктом миокарда са СТ елевацијом лечених примарном перкутаном коронарном интервенцијом

Ментор Проф. Др Нада Мајкић-Сингх

Потписани Сања Станковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 11.5.2012. год.

Сања Станковић



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Прогностички значај биохемијских показатеља код пацијената са инфарктом миокарда са СТ елевацијом лечених примарном перкутаном коронарном интервенцијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.5.2012. год.

Sanja Stanovcic