

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana P. Kolaković

Genetičko-epidemiološka analiza i analiza
ekspresije gena renin-angiotenzin sistema
(RAS) u karotidnoj aterosklerozi kod
čoveka

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana P. Kolaković

Genetic-epidemiology and gene expression
analysis of the renin-angiotensin system
(RAS) in human carotid atherosclerosis

PhD Thesis

Belgrade, 2013

Mentori

Dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča”,
Univerziteta u Beogradu

Dr Goran Brajušković, vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

Dr Tamara Đurić Delić, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča”,
Univerziteta u Beogradu

Dr Goran Korićanac, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča”, Univerziteta
u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekata ev. Br. III 41028 i ev. Br. IO175085.

Glavnom mentoru dr Aleksandri Stanković se veoma zahvaljujem na rukovođenju doktorske teze, na svim projektnim zadacima koji su me usmeravali ka njenoj realizaciji. Takođe joj se zahvaljujem na pregledu i oceni rada, konstruktivnim diskusijama koje su doprinele kvalitetu konačne verzije ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Goranu Brajuškoviću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na stručnoj pomoći, korisnim savetima, podršci i razumevanju tokom izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Tamari Đurić, naučnom saradniku INN Vinča, rukovodiocu projektnog zadatka „Molekularna genetika remodelovanja srca i krvnih sudova« (projekat III41028) u okviru koga je rađena doktorska disertacija, na pregledu teze, oceni rada, stručnim i praktičnim savetima tokom izrade teze.

Dr Draganu Alavantiću i dr Maji Živković se zahvaljujem na rukovođenju delova projektnih zadataka u kojima sam bila angažovana u periodu tokom izrade teze.

Želim da se zahvalim svim kolegama iz naše Laboratorija, 080 ©: Ivanu Životiću, Ivanu Jovanoviću, Maji Bundalo, Jovani Kuveljić, Ani Đorđević, Ivani Kolić, Ljiljani Stojković, Nini Petrović, Vesni Mandušić, Rajku Davidoviću, Ani Božović, Mileni Krajnović, Snežani Jovanović-Ćupić, Koveljki Krtolici, Nasti Tanić, Tanji Dramićanin, Lidiji Todorović, Sanji Soskić, Emimi Sudar, a posebno Branislavi Dobutović na prijateljskoj atmosferi i svakodnevnoj podršci.

Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije, Institutu za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“ i Vojnomedicinskoj Akademiji u Beogradu zahvaljujem se na saradnji, prikupljanju i kliničkoj karakterizaciji uzaraka tkiva plakova koji su obrađivani u jednom od eksperimentalnih delova izrade ove disertacije.

Poštovanim kolegama iz laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu, Dr Goranu Korićancu, Snežani Tepavčević, Tijani Čulafić, Snježani Romić se najtoplije zahvaljujem na stručnoj pomoći, predusretljivosti u realizaciji jednog dela doktorske disertacije vezanih za ekspresiju proteina.

Genetičko-epidemiološka analiza i analiza ekspresije gena renin-angiotenzin sistema (RAS) u karotidnoj aterosklerozi kod čoveka

Rezime :

Karotidna ateroskleroza (KA) je hronična bolest koja započinje aktivacijom i nakupljanjem inflamatornih ćelija koje se pune lipidima u zidu arterijskog krvnog suda. Aterosklerotski plak sadrži lipidno jezgro, fibroznu kapu, akumulira glatke mišićne ćelije (GMĆ) i proteine ekstraćelijskog matriksa (EĆM).

Renin-angiotenzin sistem (RAS) ima ključnu ulogu u aktivaciji inflamacije u zidu krvnog suda. Glavni molekuli RAS su: angiotenzin-konvertujući enzim (ACE), angiotenzin-konvertujući enzim-homolog (ACE2), angiotenzin II receptori tipa 1 (ATR1) i tipa 2 (ATR2), ACE2 homolog (TMEM 27) i regulatorna RNK (miR-155). Angiotenzin II (Ang II) je glavni efektorni molekul RAS koji se sintetiše aktivnošću ACE, a razgrađuje aktivnošću ACE2. Ang II ostvaruje svoje efekte vezujući se za ATR1 i ATR2. Efekti Ang II imaju važnu ulogu u regulaciji vaskularne homeostaze i to su: vazokonstrikcija, migracija, proliferacija i hipertrofija GMĆ, povećana sinteza EĆM i povećana produkcija metaloproteinaza matriksa (MMPs). Ekspresija ATR1 regulisana je sa miR-155. Balans između aktivacije i represije RAS može biti odlučujući u patološkom remodelovanju zida krvnog suda i patogenezi KA. Zato je važno ispitati funkcionalnu aktivaciju RAS sistema na lokalnom (tkivnom) nivou u karotidama i to na nivou ekspresije gena koji kodiraju za komponente RAS, enzime i receptore. Ekspresija gena je regulisana preko prisustva/odsustva različitih alelnih varijanti funkcionalnih polimorfizama u genima za RAS.

Genetičko-epidemiološka studija gena RAS je urađena po pacijenti - kontrole dizajnu, na tri gena i tri polimorfizma. Ova studija obuhvatila je 750 ispitanika oba pola iz populacije Srbije, 505 pacijenata i 246 kontrola iste etničke pripadnosti. Urađena je asocijaciona studija polimorfizma I/D u genu za ACE, polimorfizma A1166C u genu za ATR1 i polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 sa nastankom KA, kliničkim parametrima KA, fenotipom plaka (stabilni (SAP) i nestabilni (NAP)), kliničkim događajima (prolazni ishemijski događaj (TIA) i cerebrovaskularni insult (CVI)) u Srbiji. Isti polimorfizmi su asocirani i sa ekspresijom gena u tkivu plaka. Analiza

ekspresije gena RAS na nivou iRNK je urađena po istom dizajnu, na šest gena. To su ACE, ACE2, TMEM27, ATR1, ATR2 i miR-155. Ova studija obuhvatila je tkivo plaka od 61 pacijenta po tipu SAP (45) i po tipu NAP (16). Studija ekspresije gena na nivou proteina obuhvatila je 8 pacijenata, po tipu SAP (3) i po tipu NAP (5) za ATR1, ATR2 i ACE2. U genotipizaciji ispitivanih polimorfizama korišćena je reakcija amplifikacije DNK *in vitro* (PCR) i restrikciona analiza sintetisanih fragmenata (RFLP). Relativna kvantifikacija iRNK za ACE, ACE2, ATR1, ATR2, kolektrin (TMEM27) i miR-155 urađena je *Real-time PCR* metodom. Analiza ekspresije gena RAS i miR-155 urađena je u programu REST (*REST Software, QIAGEN*), kao i metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i $2^{-\Delta Ct}$. Relativna kvantifikacija proteina urađena je Western blot metodom i denzitometrijom. Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem programskog paketa STATISTICA 8.0.

Ispitani polimorfizmi: I/D u genu za ACE, A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2 nisu bili nezavisni faktori rizika za nastanak KA u ispitanom uzorku u populaciji Srbije. Polimorfizam I/D u genu za ACE bio je nezavistan faktor rizika za formiranje NAP u grupi pacijenata muškog pola. Nosioци genotipa II imali su 2.52 puta veći korigovani rizik za formiranje NAP od nosilaca genotipova koji sadrže alel D. Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1 između pacijenata sa SAP i NAP. Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 je nezavistan faktor rizika za formiranje NAP. Nosioци alela C, po dominantnom modelu nasleđivanja, imaju 1.94 puta veći korigovani rizik za formiranje NAP od nosilaca genotipa AA. Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 nije asociran sa rizikom za formiranje NAP. Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 je značajan nezavistan faktor rizika za nastanak CVI u grupi pacijenata muškog pola. Hemizigot G/- je asociran sa 2.67 većim korigovanim rizikom za nastanak CVI u odnosu na hemizigot A/-. Polimorfizam I/D u genu za ACE je asociran sa nastankom TIA u grupi pacijenata muškog pola. Genotip DD, po recesivnom modelu nasleđivanja asociran je sa 2.2 puta većim korigovanim rizikom za nastanak TIA nego genotipovi koji sadrže alel I. U tkivu plaka iRNK za ACE, ACE2, TMEM 27, ATR1 i miR-155 se ekspimiraju, a iRNK za ATR2 se ne ekspimiraju. U ovoj studiji relativni odnos ekspresije gena za ACE/ACE2 u plaku čoveka je bio statistički značajno smanjen u poređenju sa kontrolnim arterijom u muškom (3.4 puta) i u ženskom (2.7 puta) polu. Relativni nivo ekspresije iRNK za ACE u poređenju sa nivoom iRNK za ACE2 bio je

statistički značajno niži. Nivo ekspresije iRNK za ACE i ATR1 se nisu statistički značajno razlikovale po genotipovima polimorfizama I/D i A1166C. Nivo ekspresije miR-155 se statistički značajno razlikovao u odnosu na genotipove polimorfizma 1166 A/C u genu za ATR1 u grupi pacijenata ženskog pola. Genotip CC je po recesivnom modelu nasleđivanja statistički značajno asociran sa višim nivoom ekspresije miR-155. Nivo ekspresije iRNK za ACE, ACE2, ATR1 i TMEM27 se nije statistički značajno razlikovao između SAP i NAP. Nivo ekspresije proteina ATR1 bio je statistički značajno viši u NAP u odnosu na SAP, dok se nivoi proteina ACE2 i ATR2 nisu statistički značajno razlikovali između SAP i NAP. Nivoi ekspresije proteina ATR1 i ATR2 nisu se statistički značajno razlikovali po genotipovima ispitivanih polimorfizama A1166C i A/G -1332.

Ispitani genetički markeri RAS u KA bi mogli biti od kliničkog značaja kao faktori modulacije nastanka i toka bolesti, za koje se do sada nije znalo. U različitim podgrupama pacijenata sa KA asocijacija genetičkih faktora sa kliničkim parametrima može imati potencijalnu primenu u prevenciji i terapiji KA u bliskoj budućnosti.

Ključne reči :

RAS, ACE, ACE2, ATR1, ATR2, TMEM27, miR-155, A1166C, I/D, A/G -1332, polimorfizam gena, ekspresija gena, ekspresija proteina, karotidna ateroskleroza, SAP, NAP, TIA, CVI

Naučna oblast: Molekularna biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika ateroskleroze

UDK broj: 577.21: [616-004.6 : 611.13] (043.3)

Genetic-epidemiology and gene expression analysis of the renin-angiotensin system (RAS) in human carotid atherosclerosis

Abstract:

The carotid atherosclerosis (CA) is chronic disease, begins with activation of inflammatory cells and lipid accumulation in these cells within blood vessel wall. Atherosclerotic plaque contains a lipid core, fibrous cap, accumulates smooth muscle cells (GMC) and extracellular matrix proteins (ECM).

The renin-angiotensin system (RAS) has a key role in activation of inflammation within blood vessel wall. The main components of the system are: angiotensin I-converting enzyme (ACE), angiotensin converting enzyme homolog (ACE2), angiotensin II receptor type 1 (ATR1), angiotensin II receptor type 2 (ATR2), ACE2 homolog (TMEM27) and regulatory RNA (miR-155). Angiotensin II (Ang II) is the main effector molecule of the RAS, which is synthesized by the activity of ACE and is cleaved by ACE2. Ang II achieves its effects by binding to ATR1 and ATR2. These effects has an important role in the regulation of vascular homeostasis and include the following: vasoconstriction, vascular smooth muscle cells (SMC) migration, proliferation and hypertrophy, increased synthesis of extracellular matrix (ECM) and enhanced production of matrix metalloproteinases (MMPs). The ATR1 expression is regulated by the miR-155. The balance between activation and repression of RAS can be decisive in pathological remodeling of the vessel wall and in the pathogenesis of CA. It is therefore important to examine the functional activation of RAS at the local (tissue) level in carotid vessel wall at level of expression genes encoding for components of the RAS, enzymes and receptors. The gene expression of components of RAS is regulated through the presence/absence of different allelic variants of functional polymorphisms in these genes.

The association of the RAS genes was performed by case-control design and considered three gene polymorphisms. The study included 750 subjects (males/females) from the Serbian population, 505 patients and 246 controls of the same ethnic background. The ACE I/D, ATR1 A1166C and ATR2 A/G -1332 gene polymorphisms were investigated in association with CA onset, clinical parameters of CA; in two plaque

phenotypes: stable (SP) and unstable (USP)), clinical events of disease (transient ischemic attack (TIA) and cerebrovascular insult (CVI)) in Serbia. The same polymorphisms are associated with the expression of the genes in the carotid atherosclerotic plaques tissue. The mRNA RAS gene expression analysis was performed according to the same design, for the six genes: ACE, ACE2, TMEM27, ATR1, ATR2 and miR-155. This study involved plaque tissue of 61 patients; SP (45) and USP (16). The proteins expression analysis in plaque tissue included 8 patients, SP (3) and USP (5) for ATR1, ATR2 and ACE2. Genotyping was done by PCR and RFLP. Relative quantification of mRNA for ACE, ACE2, ATR1, ATR2, collectrin (TMEM27) and miR-155 was performed by real-time PCR. Analysis of the gene expression of RAS and miR-155 was performed by REST software (REST Software, QIAGEN) and by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and $2^{-\Delta Ct}$ method. Relative quantification of protein was done by Western blot and densitometry. The statistical analysis was performed using the software package STATISTICA 8.0.

The ACE I/D polymorphism, the ATR1 A1166C and ATR2 A/G -1332 were not independent risk factors for CA occurrence in examined sample from Serbian population. The ACE I/D gene polymorphism was an independent risk factor for the formation of USP plaques in group of male patients. The II genotype had 2.52 fold higher adjusted OR for formation of USP plaques compared to those carriers containing allele D. There was a significant statistical difference in the genotypes and alleles distribution of the ATR1 A1166C gene polymorphism between patients with SP and USP carotid plaques. The ATR1 A1166C gene polymorphism was an independent risk factor for the formation of USP plaques. The C allele carriers according to the dominant model of inheritance had a 1.94 fold higher adjusted OR for the formation of USP plaques compared to AA genotype carriers. The ATR2 A/G -1332 gene polymorphism is not associated with the risk USP plaques formation. The ATR2 A/G -1332 gene polymorphism was a significant independent risk factor for CVI in the group of male patients. The hemizygote G/- was associated with a 2.67 fold increase adjusted OR for CVI compared to hemizygote A/- carriers. The ACE I/D polymorphism was associated with an increased risk for the occurrence of TIA in male group of patients. The genotype DD, according to the recessive model of inheritance is associated with 2.2

higher fold adjusted OR for the occurrence of TIA compared to those genotypes which contain I allele.

The mRNA expression of ACE, ACE2, TMEM27, ATR1 and miR-155 was observed in plaque tissue, while ATR2 was not. In this study, the relative ratio of mRNA expression of ACE/ACE2 in human plaques was significantly reduced compared to control tissue, 3.4 fold in males and 2.7 fold in female patients. The relative mRNA expression level of ACE compared to the level of ACE2 was significantly decreased in plaques. The relative mRNA expression levels of ACE and ATR1 were not significantly different according to genotypes of the ACE I/D and ATR1 A1166C gene polymorphisms. The relative expression level of miR-155 was significantly different in regard to A1166C gene polymorphism genotypes in female patients group. The CC genotype according to the recessive model of inheritance was significantly associated with higher level of miR-155. The relative level of ACE, ACE2, ATR1 and TMEM27 mRNA expression were not significantly different between SP and USP. The ATR1 protein expression level was significantly higher in USP compared to SP, whereas protein levels of ACE2 and ATR2 did not significantly differ between these phenotypes. The expression levels of proteins ATR1 and ATR2 were not significantly different according to the investigated polymorphisms, A1166C and A/G -1332.

The examined genetic markers of RAS in CA could have clinical importance as factors that modulate the origin and course of the disease, which unknown so far. The association of genetic markers with clinical parameters in various subgroups of patients with CA could have potential application in the prevention and treatment of disease in the near future.

Key words:

RAS, ACE, ACE2, ATR1, ATR2, TMEM27, miR-155, A1166C, I/D, A/G -1332, gene polymorphism, mRNA expression, protein expression, carotid atherosclerosis, SP, USP, TIA; CVI

Scientific field: Molecular biology

Special topic: Molecular genetics of atherosclerosis

UDC Number: 577.21 : [616-004.6 : 611.13] (043.3)

LISTA SKRAĆENICA:

3'UTR -3'-netranslatujući region	LDLR - LDL receptor
5'UTR -5'-netranslatujući region	LDLR^{-/-} - transgeni miševi sa izbačenim genom za LDLR
A -adenin	LD -neslučajna asocijacija polimorfizama u istom genu
ACE2 - homolog angiotenzin-konvertujućeg enzima	LOX-1 - lektinu sličan receptor za oxLDL 1
ACE2^{-/-} -transgeni miševi sa izbačenim genom za ACE2	LDLR - LDL receptor
ACE -angiotenzin-I konvertujući enzim	Lp (a) -lipoprotein (a)
ACEI -inhibitori ACE enzima	MCP-1 -protein koji privlači monocite
ADAM17 -metaloproteaza ADAM17	M-CSF -faktor stimulacije kolonija makrofaga
AFs -adventicijalni fibroblasta pacova	MHC II -proteini glavnog histokompatibilnog kompleksa klase II
AK -aminokiseline	Lp (a) -lipoprotein (a)
Ang (1-7) - angiotenzin (1-7)	MCP-1 -protein koji privlači monocite
Ang I - angiotenzin I	mikroRNK -male nekodirajuće RNK
Ang II - angiotenzin II	miRSNPs -polimorfizmi u vezujućim mestima za mikroRNK
ANG -angiotenzinogen	MMP-1 -metaloproteinaza matriksa 1
APČ -antigen prezentujuće ćelije	MMP-2 - metaloproteinaza matriksa 2
ApoB - lipoprotein LDL partikula	MMP-8 - metaloproteinaza matriksa 8
ApoE^{-/-} -transgeni miševi sa izbačenim genom za ApoE	MMP-9 - metaloproteinaza matriksa 9
ARBS -blokatori receptora ATR1	MMPs - familija metaloproteinaza matriksa
ATR1 -angiotenzin II receptor tipa 1	MW - molekulska težina
ATR2^{-/-} -transgeni miševi sa izbačenim genom za ATR2	NADP(H) oksidaza - nikotinamid-adenindinukleotid-fosfat oksidaza
ATR2 - angiotenzin II receptor tipa 2	NAP -nestabilan karotidni aterosklerotski plak
B1R -bradikininski receptor tipa I	NEP -neutralna endopeptidaza
B2R - bradikininski receptor tipa II	NF-κB -nuklearni faktor κB

BMI -indeks telesne mase	NO -azotoksid
CAKUT -kongenitalne anomalije urinarnog trakta	oxLDL -oksidovani LDL
CCA -zajedničke karotidne arterije	PAI-1 - inhibitor aktivacije plazminogena
C -citozin	PAOB -periferna arterijska okluzivna bolest
CNS -centralni nervni sistem	PCR -lančana reakcija polimeraze
CRP -C-reaktivni protein	PDGF -trombocitni faktor rasta
CVI -cerebrovaskularni insult	PKC -protein kinaza C
DBP -dijastolni krvni pritisak	PLS3 -plastin 3
DDIM -D dimer	PPARs -familija peroksizomalnih proliferativnih aktiviranih receptora
DNK -dezoksiribonukleinska kiselina	RAS -renin angiotenzin sistem
EC -van ćelijska petlja	REN -renin
ECM -vanćelijski matriks	PLS3 -plastin 3
eNOS -endotelijalna NO sintaza	RFLP - restrikciona analiza sintetisanih fragmenata
ERK1/2 -protein kinaza regulisana ekstraćelijskim signalima	RNK -ribonukleinska kiselina
gACE -germinalna forma ACE enzima	RNU44 -mala nukleolarna RNK
GAPDH -glicerinaldehid trifosfat dehidrogenaza	ROS -reaktivne vrste kiseonika
G -guanin	sACE -somatska forma ACE enzima
GIPs -GPVR intergujući proteini	SAP -stabilan aterosklerotski plak
GMĀ -glatke mišićne ćelije	SBP - sistolni krvni pritisak
	SDS -natrijum-dodecil sulfat
GPVR -familija G protein vezujućih receptora	SDS-PAGE - SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
H₂O₂ - vodonik peroksid	SHRSP - transgeni model pacova sa hipertenzijom sklonih šlogu
HDL - lipoproteini visoke gustine	SLC6A14 - član familije proteina kojii učestvuju u transportu neurotransmitera zavisnih od Na ⁺ i Cl ⁻ i transportu AK
HMEC-1 -ćelijska linija mikrovaskularnih endotelnih ćelija	SNAP-25 - sinaptozomalni vezani protein od 25 kDa
HNF1-α -hepatocitni nuklearnim faktorom- α	SNARE -solubilni proteinski kompleks
hnRNPA1 -heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A1	snoRNK -mala nukleolarne RNK

HO-1 -hem-oksigenaza-1	SNP -tačkasti polimorfizam
HT -hipertenzija	SS -ukupan stepen stenozе
HuR - humani antigen R	TF -tkivni faktor
HUVEC -kultura venskih endotelnih ćelija izolovana iz pupčane vrpce čoveka	THP-1 -ćelijska linija monocita čoveka
HWE - <i>Hardy-Weinberg</i> -ova ravnoteža	TIA -prolazni ishemijski događaj
HuR - humani antigen R	TMEM27 -kolektrin
I/D -inercija/delecija	TM -transmembranski domen
ICA - interna karotidna arterija	TNF-α -faktor nekroze tumora-alfa
IC -unutar ćelijska petlja	T -timin
IFN-γ -interferon- γ	U -uracil
IGF-1 - insulinu sličan faktor rasta 1	VCAM-1 -vaskularni adhezioni molekul
IL-1-α - interleukin-1 α	VEGF -vaskularni endotelijalni faktor rasta
IL-1-β - interleukin-1 β	VIIF - faktor koagulacije VII
IL-6 -intereukin 6	vWF -von Vilebrandov faktor
IL-8 - interleukin 8	
IM -infarkt miokarda	
IMZ -zadebljanje intima medije	
IRES -inicijacija translacije unutrašnjim ulazom ribozoma	
iRNK -informaciona RNK	
KA -karotidna ateroskleroza	
KVB -kardiovaskularne bolesti	
LDL -lipoproteini niske gustine	

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. ATEROSKLEROZA	1
1.1.1. Nastanak i progresija ateroskleroze	2
1.1.1.1. Disfunkcija endotela	2
1.1.1.2. Formiranje masnih pruga.....	2
1.1.1.3. Formiranje uznapredovale lezije, plaka.....	2
1.1.1.4. Fenotip nestabilnog (vulnerabilnog) aterosklerotskog plaka	4
1.2. TKIVNI (LOKALNI) RAS	8
1.3. RAS U INFLAMATORNOJ OSNOVI ATEROSKLEROZE	9
1.3.1. Efekti RAS na nastanak ateroskleroze.....	10
1.3.2. Efekti RAS na povećanje oksidativnog stresa i remodelovanje unutar zida krvnog suda.....	12
1.3.3. Uloga ATR2 u aterosklerozi i remodelovanju zida krvnog suda	14
1.4. MOLEKULI RAS SISTEMA	15
1.4.1. Angiotenzin I-konvertujući enzim (ACE) i njegova funkcija	15
1.4.1.1. Molekulska struktura sACE	16
1.4.1.2. Struktura gena za ACE	17
1.4.1.3. Polimorfizam insercija/delecija (I/D) u genu za ACE.....	17
1.4.1.4. Regulacija ekspresije gena za ACE polimorfizmom I/D	18
1.4.1.5. Studije asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE u karotidnoj aterosklerozi	19
1.4.2. Angiotenzin konvertujući enzim homolog (ACE2) i njegova funkcija.....	20
1.4.2.1. Molekulska struktura ACE2	20
1.4.2.2. Struktura gena za ACE2	21
1.4.2.3. Tkivna distribucija ACE2.....	22
1.4.2.4. Model sistemi za ispitivanje funkcije ACE2 u kardiovaskularnim bolestima i aterosklerozi.....	23
1.4.3. Kolektrin, tkivna distribucija i funkcija.....	24
1.4.3.1. Molekulska struktura kolektrina.....	25
1.4.3.2. Struktura gena za kolektrin.....	26
1.4.4. Angiotenzin II receptor tipa 1 (ATR1)	26
1.4.4.1. Molekulska struktura ATR1	26
1.4.4.2. Struktura gena za ATR1	26
1.4.4.3. Regulacija ekspresije gena za ATR1 preko alternativnog iskrajanja	27
1.4.4.4. Regulacija ekspresije ATR1 različitim faktorima	28
1.4.4.5. Postranskripciona regulacija iRNK za ATR1	30

1.4.4.5.1	Regulacija ekspresije gena za ATR1 preko vezivanja regulatornih proteina	30
1.4.4.5.2	Regulacija ekspresije gena za ATR1 malim nekodirajućim mikroRNK	31
1.4.4.6.	Značaj genetičkih varijanti u regulatornom 3' UTR u procesima regulacije ekspresije gena za ATR1	31
1.4.4.6.1	MikroRNK (miR-155) i postranskripciona regulacija ekspresije ATR1 sa miR-155 u kardiovaskularnim bolestima	32
1.4.4.7.	Polimorfizam A166C u genu za ATR1 i regulacija ekspresije gena za ATR1 u funkcionalnim studijama i kardiovaskularnim bolestima	33
1.4.4.8.	Studije asocijacije genetičke varijante A1666C gena za ATR1 u kardiovaskularnim bolestima	34
1.4.5.	Angiotenzin II receptor tipa 2 (ATR2)	35
1.4.5.1.	Molekulska struktura ATR2	35
1.4.5.2.	Struktura gena za ATR2	36
1.4.5.3.	Regulacija ekspresije ATR2 različitim faktorima	37
1.4.5.4.	Alternativne transkripcione varijante iRNK za ATR2 čoveka i njihova tkivna distribucija	37
1.4.5.5.	Regulacija ekspresije gena za ATR2 preko alternativnog iskrajanja	38
1.4.5.6.	Polimorfizam A/G -1332 (rs1403543) u genu za ATR2 i regulacija ekspresije	38
1.4.5.7.	Regulacija alternativnog iskrajanja preko polimorfizma A/G u intronu gena za ATR2	39
1.4.5.8.	Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 i asocijacija sa kardiovaskularnim bolestima	39
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	40
3.	MATERIJAL I METODE	42
3.1.	MATERIJAL	42
3.2.	METODE	44
3.2.1.	Ultrazvučna karakterizacija plaka	44
3.2.2.	Izolacija i merenje koncentracije DNK iz ćelija krvi	46
3.2.3.	Genotipizacija polimorfizama DNK <i>in vitro</i> (PCR).....	47
3.2.3.1.	Genotipizacija polimorfizma I/D u genu za ACE reakcijom amplifikacije DNK <i>in vitro</i>	47
3.2.3.2.	Genotipizacija polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2 u jednoj tubi reakcijom amplifikacije DNK <i>in vitro</i>	48
3.2.4.	Restrikciona analiza sintetisanih fragmenata (RFLP)	50
3.2.5.	Izolacija, merenje i provera kvaliteta ukupne ćelijske RNK	51
3.2.5.1.	Izolacija ukupne ćelijske RNK iz karotidnog aterosklerotskog plaka	51
3.2.6.	Obrada uorka RNK i reverzna transkripcija	51

3.2.7.	Detekcija iRNK za ACE, ACE2, ATR1, ATR2, kolektrin (TMEM27) i miR-155 amplifikacijom određenih molekula cDNK (Real-time PCR)	52
3.2.8.	Western blot.....	53
3.2.8.1.	Priprema uzoraka tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka za izolaciju proteina.....	53
3.2.8.2.	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	54
3.2.9.	Statistička obrada podataka	56
4.	REZULTATI	58
4.1.	OSNOVNE KARAKTERISTIKE KONTROLNOG UZORKA UZORKA PACIJENATA SA KAROTIDNOM ATEROSKLEROZOM (KA).....	58
4.2.	GENETIČKO-EPIDEMIOLOŠKA ANALIZA.....	65
4.2.1.	Polimorfizmi DNK u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) i ATR2 (A/G - 1332) u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa KA	65
4.2.1.1.	Detekcija polimorfizma I/D u genu za ACE	65
4.2.1.2.	Detekcija polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i polimorfizma A/G - 1332 u genu za ATR2.....	66
4.2.1.3.	Distribucija genotipova u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa karotidnom aterosklerozom i njihov efekat na nastanak bolesti	67
4.2.2.	Polimorfizmi DNK u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) i ATR2 (A/G - 1332) u odnosu na tip aterosklerotskog plaka i klinički događaj	69
4.2.2.1.	Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka	69
4.2.2.2.	Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)	70
4.2.2.3.	Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA).....	71
4.2.2.4.	Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku	72
4.2.2.5.	Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)	73
4.2.2.6.	Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)	77
4.2.2.7.	Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA).....	77

4.2.2.8.	Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku	77
4.2.2.9.	Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka (SAP i NAP).....	78
4.2.2.10.	Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog).....	79
4.2.2.11.	Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA).....	80
4.2.2.12.	Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku.....	81
4.3.	ANALIZA EKSPRESIJE iRNK ZA KOMPONENTE RAS I REGULATORNE MIR-155 U TKIVU KAROTIDNOG ATEROSKLEROTSKOG PLAKA.....	83
4.3.1.	Ekspresija iRNK za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka	85
4.3.1.1.	Relativni nivoi iRNK za ACE	85
4.3.1.2.	Ekspresija iRNK za ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)	88
4.3.1.3.	Ekspresija iRNK za ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka u odnosu na genotip polimorfizma I/D u genu za ACE.....	88
4.3.2.	Ekspresija iRNK za angiotenzin-konvertujući enzim homolog (ACE2) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka.....	89
4.3.2.1.	Relativna kvantifikacija ekspresije gena za ACE2.....	89
4.3.2.2.	Ekspresija iRNK za ACE2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na tip plaka (SAP i NAP).....	91
4.3.3.	Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka	94
4.3.4.	Ekspresija iRNK za kolektrin (TMEM27) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka	95
4.3.4.1.	Relativni nivoi iRNK za kolektrin (TMEM27) u odnosu na tip plaka (SAP i NAP).....	95
4.3.5.	Ekspresija iRNK za ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima	95
4.3.5.1.	Relativni nivoi iRNK za ATR1 u odnosu na tip plaka (SAP i NAP).....	95
4.3.5.2.	Ekspresija iRNK za ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1	95
4.3.6.	Ekspresija mikroRNK miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka	96

4.3.6.1.	Relativni nivoi miR-155 u odnosu na tip plaka (SAP i NAP).....	96
4.3.6.2.	Ekspresija miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1.....	97
4.3.7.	Ekspresija iRNK za ATR2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka.....	99
4.4.	EKSPRESIJA PROTEINA RAS	100
4.4.1.	Ekspresija proteina ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima	100
4.4.1.1.	Detekcija proteina ATR1 Western Blot-metodom.....	100
4.4.2.	Ekspresija proteina ATR2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka.....	102
4.4.2.1.	Detekcija proteina ATR2 Western Blot-metodom.....	102
4.4.3.	Ekspresija proteina ACE2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima	103
4.4.3.1.	Detekcija proteina ACE2 Western Blot-metodom.....	103
4.4.4.	Ekspresija proteina ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima	103
4.4.4.1.	Detekcija proteina ACE Western Blot-metodom.....	103
5.	DISKUSIJA	105
6.	ZAKLJUČCI	128
7.	LITERATURA	130

1. UVOD

1.1. ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je sistemska, kompleksna, multifaktorijalna, hronična inflamatorna bolest zida arterijskih krvnih sudova (Ludewig i sar., 2002; Hansson GK, 2005). Karakteriše se disfunkcijom endotela usled povrede zida krvnog suda, proliferacijom glatkih mišićnih ćelija (GMĆ), akumulacijom lipida, sintezom vanćelijskog matriksa (Libby P, 2002), hroničnom inflamacijom; infiltracijom, diferencijacijom inflamatornih ćelija (monocita, makrofaga) i aktivacijom ćelija imunskog odgovora (T-limfocita) (Hansson GK, 2009). To za posledicu ima remodelovanje zida krvnog suda, stvaranje aterosklerotskog plaka, akutnu ili hroničnu obstrukciju lumena, poremećaj protoka krvi i smanjeno snabdevanje ciljnih organa kiseonikom (ishemija) (Libby i Ridker, 2006). Progresija bolesti doprinosi patogenezi vrlo ozbiljnih kardiovaskularnih oboljenja čiji krajnji ishod može biti srčani udar (infarkt miokarda) (IM) ili šlog (cerebralna ishemija) (Libby i sar., 2011).

Prema podacima svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) broj umrlih od kardiovaskularnih bolesti (KVB) u koje se ubrajaju: bolesti srca (poremećaji nastali u koronarnim krvnim sudovima; IM, reumatske bolesti srca, kongenitalne bolesti srca), cerebrovaskularne bolesti (šlog), povišeni krvni pritisak hipertenzija (HT) i periferna arterijska bolest, je do 2008. godine procenjen na 17.3 miliona ljudi, što je 30 % od ukupnog broja smrtnih slučajeva u svetu. Od tog broja 7.3 miliona je umrlo od koronarnih bolesti srca, a 6.2 miliona od šloga. Preko 80 % umrlih od KVB u svetu je iz zemalja sa niskim i vrlo niskim životnim standardom, sa približno istom zastupljenošću smrtnih slučajeva kod oba pola (http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).

1.1.1. Nastanak i progresija ateroskleroze

1.1.1.1. *Disfunkcija endotela*

Disfunkcija endotela je prvi korak u nastanku ateroskleroze. Dva ključna signala u tom procesu su gubitak endotelijum-zavisne vazodilatacije i povećanje ekspresije endotelinih i leukocitnih adhezivnih molekula (Newby i sar., 2000). Može biti izazvana različitim faktorima kao što su: bakterijske i virusne infekcije; oksidativni stres- usled povećane sinteze reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) kod npr., pušenja; mehaničkih sila (turbulentni tok krvi i sila trenja); povišeni nivo lipoproteina niske gustine holesterola (LDL) i homocisteina; HT i šećerne bolesti (Ross R, 1999). Gubitak biološke aktivnosti endotela narušava sintezu azotoksida (NO) i udružen je sa povećanjem ekspresije protrombotičkih faktora, proinflamatornih adhezivnih molekula, citokina i faktora hemostaze. Citokini mogu smanjiti dostupnost NO i povećati sintezu ROS (Stocker i Keaney, 2004.).

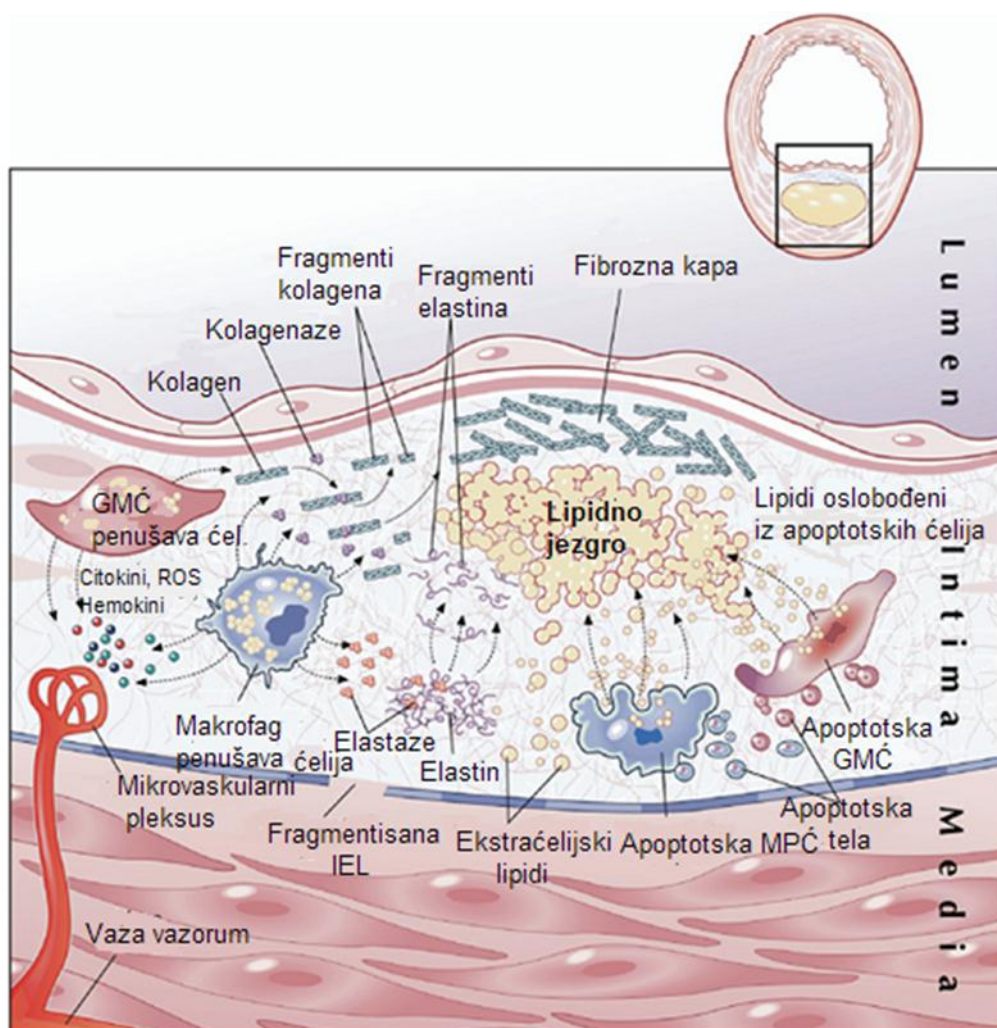
1.1.1.2. *Formiranje masnih pruga*

Pojava prvih aterosklerotskih lezija je udružena sa pojavom masnih pruga (eng. *fatty streak*). Tokom života masne pruge se javljaju već u detinjstvu i adolescenciji. Inicijalni događaj u njihovom nastajanju je akumulacija lipida (zadržavanje Apo-B – lipoproteina LDL partikula) u subendotelijalnom prostoru vezivanjem za komponente vanćelijskog matriksa (Williams i sar., 2001; Tabas i sar., 2007).

1.1.1.3. *Formiranje uznapredovale lezije, plaka*

Tranzicija relativno jednostavnih masnih pruga u daleko komplikovanije, kompleksnije, aterosklerotske lezije se karakteriše imigracijom GMĆ iz medijalnog sloja kroz internu elastičnu laminu u intimalni sloj ili u subendotelni prostor (Glass i Witztum, 2001). U odgovoru na povredu, citokine i faktore rasta GMĆ menjaju fenotip, naime prelaze iz stanja mirovanja tkz., "kontraktilnog fenotipa" u aktivni "sintetički proliferativni fenotip" tip ćelija koji migriraju i proliferišu (Frid i sar., 1997;

Gittenberger-de Groot i sar., 1999; Schaper i Ito, 1996). Kontraktilni fenotip GMC zdravog krvnog suda reguliše njegov dijametar (vazokonstrikcijom ili vazodilatacijom) (Schaper i Ito, 1996). Za razliku od kontraktilnog sintetički fenotip u aterosklerozi je odgovoran za remodelovanje zida krvnog suda. GMC sintetišu komponente vanćelijskog matriksa (intersticijalni kolagen, elastin, glikozaminoglikane) (Ross i sar., 1999; Schwartz i sar., 2000). Na taj način, tokom progresije bolesti, aterosklerotske lezije zadobijaju karakterističnu formu ateroma (plaka) sa fibroznom kapom (slika 1.1.).



Slika 1.1. Sazrevanje aterosklerotskih lezija. Uznappedovale aterosklerotske lezije sadrže fibroznu kapu koja se sastoji od gustog vanćelijskog matriksa, od kolagena i elastina. Ispod fibrozne kape nalazi se lipidno jezgro sa mnoštvom makrofaga i GMC u procesu ćelijskog umiranja po tipu apoptoze, ostataka apoptotskih tela i lipida. Proinflamatorni medijatori iz endotelnih ćelija, limfocita i GMC dodatno favorizuju ćelijsku smrt apoptozom. Fibrozna kapa plaka slabi usled aktivnosti intersticijalnih kolagenaza koje degraduju komponente vanćelijskog matriksa. Elastaze dodatno degraduju elastin koji je neophodan za migraciju ćelija unutar lezija. Tokom ove faze aterogeneze formiraju se novi krvni sudovi nastali

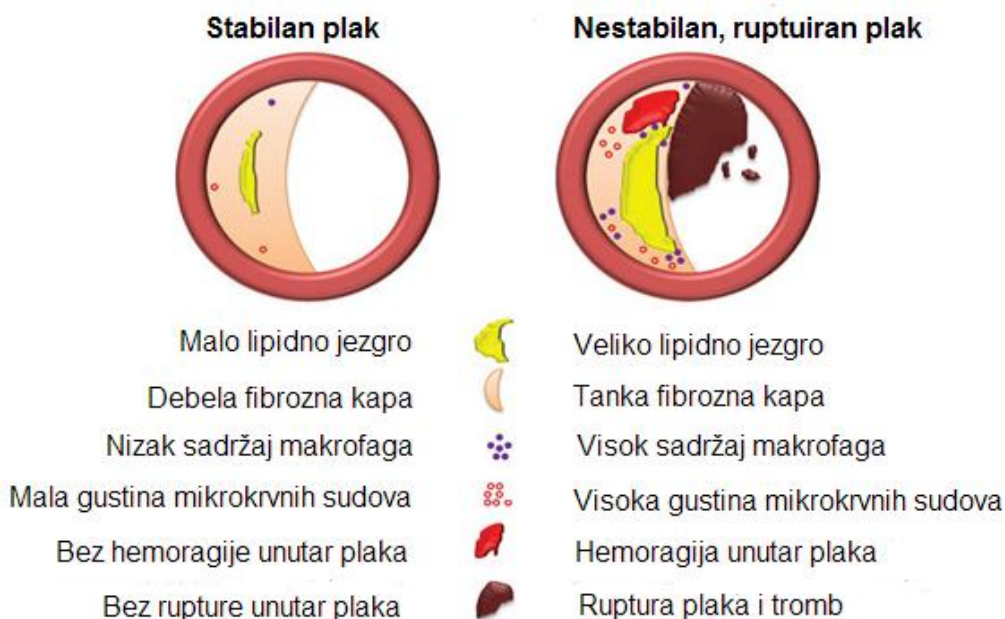
ekstenzijom postojećih *vasa vasorum* poreklom iz adventicijalnog sloja IEL- interna elastična lamina; MPC-makrofagi, penušave ćelije; ROS-reaktivne vrste kiseonika) (modifikovano Libby i Ridker, 2006).

Tokom formiranja ateroma mononuklearni fagociti (makrofagi) kontinuirano fagocituju lipidne depozite (oxLDL) putem receptora čistača i zadobijaju karakterističnu formu penušavih ćelija (Glass i Witztum, 2001; Libby P, 2002). Makrofagi sekretuju proinflamatorne citokine (hemokine), faktore rasta, metaloproteinaze matriksa (MMPs), ROS i tkivni faktor (TF). Tkivni faktor amplifikuje lokalni imunski odgovor unutar lezija i doprinose komplikaciji aterosklerotskih lezija odnosno trombozi. Privučeni hemokinima interleukinom-8 (IL-8) i proteinom koji privlači monocite (MCP-1), limfociti se vezuju za adhezivne molekule eksprimirane na endotelnim ćelijama kao što je vaskularni adhezivni molekul (VCAM-1) i P-selektin (Hansson i Libby, 2006).

1.1.1.4. Fenotip nestabilnog (vulnerabilnog) aterosklerotskog plaka

Pojam "vulnerabilan plak" označava leziju koja je odgovorna za nastanak akutnog koronarnog sindroma (Muller i sar., 1994). Označava aterosklerotski plak sa velikim lipidnim jezgrom, visokim sadržajem makrofaga, malim udelom GMC i tankom fibroznom kapom sklonom rupturi (Davies MJ, 1996). Glavni mehanizmi koji dovode do rupture plaka su ekspresija faktora koji slabe fibroznu kapu, fizička sila koju trpi usled pritiska lipidnog jezgra i novo formirani krvni sudovi (*vasa vasorum*) unutar plaka koji predstavljaju rizik za nastanak tromba (Shah PK, 2003). Tromboza u arterijskim krvnim sudovima smatra se događajem koji je neposredno odgovoran za najveći deo ishemijskih sindroma (incidenata) koji nastaju kao posledica ateroskleroze (Spagnoli i sar., 2004; Van der Wall i sar., 1994; Virmani i sar., 2006; Mauriello i sar., 2005). Veći deo trombova (60 %-80%) nastaje usled rupture- istanjene fibrozne kape, dok se ostatak formira preko mesta površinske erozije plaka (Farb i sar., 1996).

Šematska ilustracija stanovišta stabilnih i nestabilnih aterosklerotskih plakova prikazana je na slici 1.2. (W van Lammeren i sar., 2011).



Slika 1.2. Šematski prikaz stabilnih i nestabilnih aterosklerotskih plakova (modifikovano W van Lammeren i sar., 2011)

Lipidno jezgro

Formiranje lipidnog jezgra glavna je karakteristika u razvoju vulnerabilnih plakova. Kako ćelijska smrt po tipu nekroze ima ulogu u formiranju lipidnog jezgra, ono se označava i kao nekrotično jezgro. Pretpostavlja se da lipidno jezgro nastaje kao rezultat spajanja (kombinovanja) manjih pulova akumuliranih lipida u veće, koje postaje acelularno usled apoptoze i nekroze GMC i makrofaga-penušavih ćelija (Glass i Witztum, 2001; Libby P, 2002; Hansson GK, 2005). Rezultati studija koje su za temu imale ispitivanje uloge komponenata aterosklerotskih lezija u trombozi, pokazale su da je lipidno jezgro do šest puta više doprinelo rupturi plaka u odnosu na ostale delove (Fernandez-Ortiz i sar., 1994). U vulnerabilnim plakovima koronarnih arterija lipidno jezgro čini 29 %-34 % površine plaka (Virmani i sar., 2000; Cheruvu i sar., 2007). U karotidnim arterijama simptomatskih pacijenata pred endarterektomiju lipidno jezgro čini 40 % površine plaka (Grønholdt i sar., 2002).

Tanka fibrozna kapa

Fibrozna kapa je vezivno tkivo koje prekriva lipidno jezgro. U njenom formiranju učestvuju GMC koje sintetišu komponente vanćelijskog matriksa (kolagen i proteoglikane) (Virmani i sar., 2000). Sadrži i inflamatorne ćelije među kojima dominiraju makrofagi-penušave ćelije (Thim i sar., 2008). Ključnu ulogu u stabilnosti fibrozne kape određuje balans između sinteze kolagena od strane GMC (sintetički fenotip) i razlaganje kolagena usled aktivnosti MMPs. Neke studije sugerišu da su inflamatorni citokini odgovorni za regulaciju ovog balansa. Pored toga što indukuju apoptozu GMC i aktiviraju endotelne ćelije i makrofage, takođe povećavaju ekspresiju MMPs u ovim ćelijama (Galis i sar., 1994; Walsh i sar., 2000). Ruptura plaka se upravo javlja na mestima stanjene fibrozne kape (Van der Wal i sar., 1994).

Inflamacija

Inflamacija kontinuirano prati aterosklerozu, a stepen inflamacije unutar plaka može ukazivati na rizik za rupturu (Libby P, 2002). Međutim, nisu svi delovi nestabilnog plaka podjednako izloženi inflamaciji. Lipidno jezgro je acelularno, a veliki deo regiona plaka čini fibrozno i kalcifikovano tkivo. Analiza endarterektomisanih uzoraka plakova iz koronarnih krvnih sudova pacijenata sa anginom pektoris i akutnim koronarnim sindromom pokazala je da makrofagi čine 12 % (Moreno i sar., 2000), odnosno 26 % površine plaka (Virmani i sar., 2000). Ultrazvukom je utvrđeno da u karotidnim plakovima pacijenata pred endarterektomiju taj procenat iznosi 1 % (Grønholdt i sar., 2002). Za razliku od lipidnog jezgra ruptuirana fibrozna kapa je zahvaćena inflamacijom (Badimon i sar., 2012).

Angiogeneza

Angiogeneza unutar plaka igra važnu ulogu u nastanku komplikacija tokom aterogeneze. *Vasa vasorum* zdravog krvnog suda obezbeđuje neophodne nutritijente za ishranu intima medije, dok u aterosklerozi usled hipoksije može doprineti rastu lezija (Moreno i sar., 2006). U uznapredovalim aterosklerotskim plakovima kontinuirana aktivacija pro-angiogenih citokina rezultuje formiranjem novih nezrelih (fragilnih) krvnih sudova ili penetracije postojećih iz adventicije u intimu koji mogu dovesti do hemoragije (Kolodgie i sar., 2003; Virmani i sar., 2005). Hemoragija unutar plaka uzrokuje iznenadno povećanje volumena plaka i pritiska u njemu, što uzrokuje njegovu nestabilnost. Angiogeneza je dvostruko do četvorostruko veća u plakovima sklonim rupturi (nestabilnim) u poređenju sa stabilnim lezijama u koronarnim krvnim sudovima (Von Birgelen i sar., 2001; Schoenhagen i sar., 2000). Slično je uočeno i u karotidnim aterosklerotskim plakovima gde hemoragija doprinosi progresiji lezija (Takaya i sar., 2005; Saam i sar., 2006).

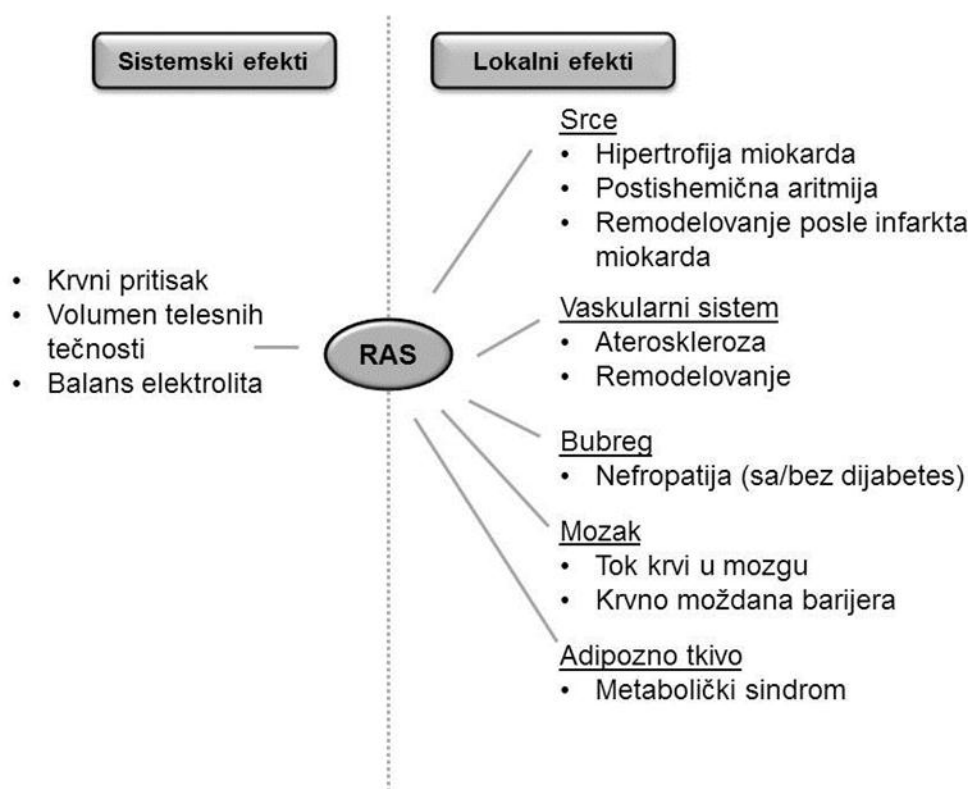
1.2. TKIVNI (LOKALNI) RAS

Klasičan koncept "cirkulišućeg" renin-angiotenzin sistema (RAS) proširen je saznanjima njegovog delovanja na tkivnom (lokalnom) nivou (Re RN, 2004). Cirkulišući RAS samo je jedan od entiteta sveobuhvatnog RAS sistema i tkivnih RAS koji mogu da funkcionišu nazavisno od cirkulišućeg (Paul i sar., 2006) (slika 1.3.).

Tkivni RAS karakteriše se prisustvom svih komponenti sistema, renin (REN), angiotenzinogen (ANG), angiotenzin konvertujući enzim (ACE), angiotenzin I (Ang I), angiotenzin II (Ang II) i angiotenzinskih receptora u srcu, krvnim sudovima, bubrezima, adrenalnim žlezdama, pankreasu, centralnom nervnom sistemu (CNS), reproduktivnom sistemu, limfnom i adipoznom tkivu, hematopoeznim tkivima (Baltatu i sar., 2011; Pérez-Díaz i sar., 2011; Siragy i Carey, 2010; Thatcher i sar., 2009; Fukuda i Sata, 2008; Cassis i sar., 2008; Park i Zambidis, 2009).

Iako je ustanovljeno da se tkivni Ang II sintetiše od lokalno dostupnog Ang I, i dalje nije jasno da li se tkivni REN sintetiše lokalno i da li tkiva preuzimaju REN iz cirkulacije poreklom iz bubrega. REN može lokalno da se sekretuje u bubregu, adrenalnim žlezdama i mozgu, ali se smatra da je u krvnim sudovima i srcu uglavnom primarno poreklom iz bubrega (Nguyen Dinh Cat i Touyz., 2011).

Lokalni RAS funkcioniše na endokrini, parakrini i autokrini/intrakrini način. Povišeni tkivni nivoi komponenata RAS javljaju se u KVB nezavisno od povišenog nivoa krvnog pritiska, u aterosklerozi, infarktu miokarda, u srcu čiji je rad poremećen, dijabetesu, bolestima bubrega (Raizada i sar., 2007). Do sada su dobro okarakterisani tkivni RAS sistemi u mozgu, bubregu, srcu (Re RN, 2004; Bader i Ganten, 2008; Beyazit i sar., 2010; De Mello i sar., 2011; Zhuo i Li, 2011).



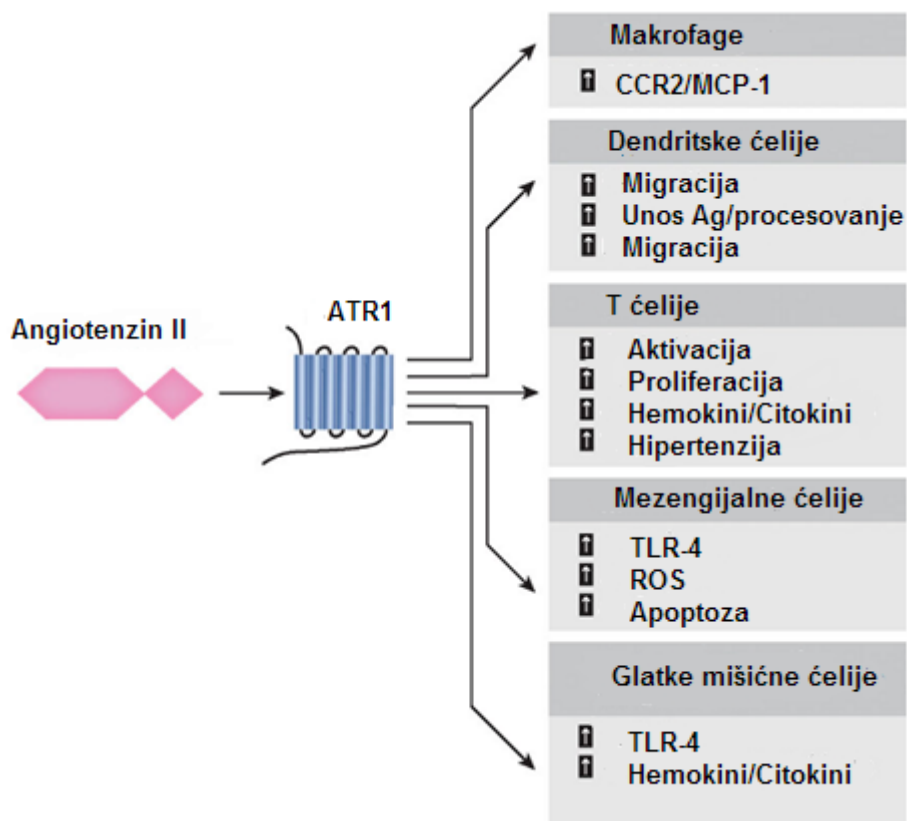
Slika 1.3. Šematski prikaz sistemskih i lokalnih efekata RAS sistema. RAS sistem ima ključnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska, volumenu telesnih tečnosti i balansu elektrolita. Pored toga što ima sistemske efekte, lokalno, RAS doprinosi adaptaciji ćelija na stimuluse, obnovi organa posle povrede i tkivnom remodelovanju (modifikovano Fukuda i Sata, 2008).

1.3. RAS U INFLAMATORNOJ OSNOVI ATEROSKLEROZE

RAS ima ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze, kroz aktivaciju inflamacije i proliferacije ćelija (Phillips i Kagiya, 2002; Grote i sar., 2004; Petnehazy i sar., 2006).

Pošto je ateroskleroza hronična, inflamatorna bolest, multifaktorijalne etiologije, kontinuirano regrutovanje imunih ćelija iz cirkulacije igra ključnu ulogu tokom aterogeneze. Inflamatorni odgovor se odvija u tri koraka: 1) povećanje **vaskularne propustljivosti** 2) **infiltraciju leukocita** i 3) **tkivno remodelovanje** (Cheng i sar., 2005). Brojne studije su pokazale da Ang II kao inflamatorni medijator RAS, moduliše imunski odgovor na svakom od ovih koraka i posreduje u nekoliko ključnih

dogadaja tokom procesa inflamacije (Cheng i sar., 2005; Marchesi i sar., 2008) (slika 1.4.). Pored hemodinamskih efekata na zid krvnog suda, Ang II ispoljava značajne efekte na ćelije zida krvnog suda što ima za posledicu poremećenu homeostazu i nastanak ateroskleroze (Brasier i sar., 2002).



Slika 1.4. Uloga Ang II posredovana njegovim vezivanjem za ATR1 u tkivnoj inflamaciji. Ang II vezivanjem za receptor ATR1, aktivira signalne puteve u ćelijama imunskog sistema i doprinosi lokalizovanoj aktivaciji imunog sistema (modifikovano Benigni i sar., 2010)

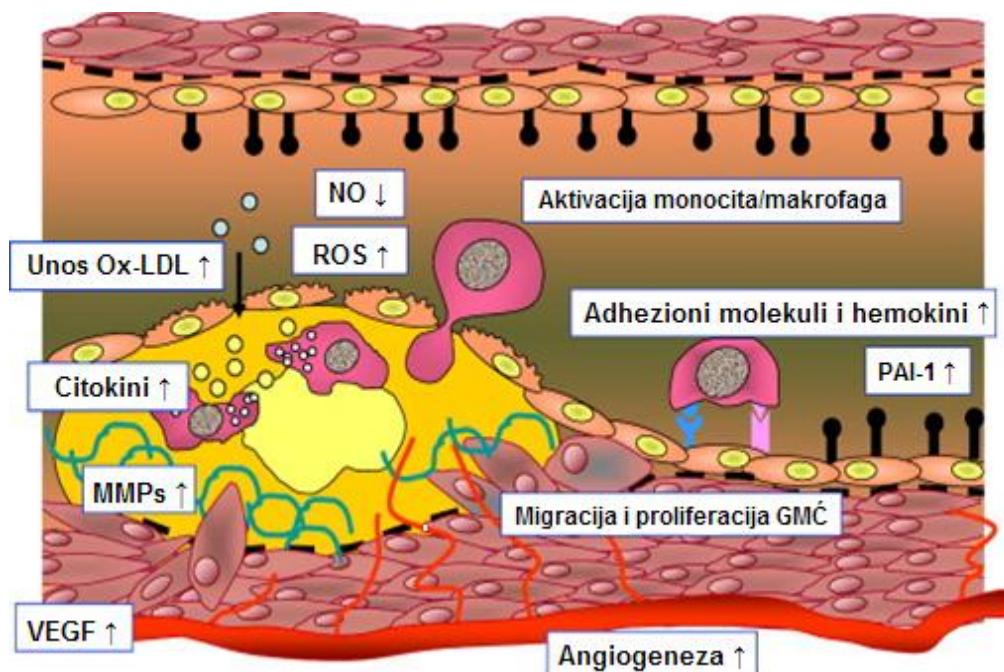
1.3.1. Efekti RAS na nastanak ateroskleroze

Za Ang II, glavni efektorski peptid RAS, utvrđeno je da učestvuje u svim fazama tokom aterogenog procesa. Unutar zida krvnog suda Ang II povećava vaskularnu propustljivost aktivacijom vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) (Suzuki i sar., 2003; Cheng i sar., 2005). Rekrutovanjem monocita iz krvi dodatno promovira inflamaciju (Touyz RM, 2005). Pored monocita aktivira i druge imunokompetentne ćelije iz krvi kao što su T limfociti i visoko specijalizovane antigen prezentujuće ćelije (APC) (Lapteva i sar., 2001; Nahmod i sar., 2003). T limfociti poseduju endogeni RAS

koji dalje može da moduliše inflamatorni odgovor (Jurewicz i sar., 2007; Hoch i sar., 2009).

Konstantnu inflamaciju unutar zida krvnog suda Ang II promoviše aktivacijom nekoliko pro-inflamatornih transkripcionih faktora. To su nuklearni faktor κ B (NF- κ B), jedan od glavnih transkripcionih faktora za koji je utvrđeno da pojačava ekspresiju brojnih gena u hroničnim inflamatornim bolestima (Barnes i Karin, 1997). S druge strane Ang II indukovana inflamacija je smanjila ekspresiju transkripcionih faktora iz familije peroksizomalnih proliferativnih aktiviranih receptora (PPARs) (eng. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR), koji za razliku od NF- κ B imaju protektivne efekte (Tham i sar., 2002). Ang II indukovana inflamacija i remodelovanje zida krvnog suda kontrolisana je i aktivacijom transkripcionih faktora iz familije ETS transkripcionih faktora (Ets-1) (Zhan i sar., 2005).

Dokazi da Ang II promoviše nastanak aterosklerotskih lezija pokazani su u animalnim modelima bolesti kod miševa deficijentnih za ApoE (ApoE^{-/-}) i receptor za LDL (LDLR^{-/-}), u kojima je hiperholesterolemija stimulisala sintezu angiotenzinskih peptida (Daugherty i sar., 2004). U uznapredovalim aterosklerotskim lezijama Ang II je stimulisao ekspresiju MMPs (Galis i Khatri, 2002; Luchtefeld i sar., 2005) i inhibitora aktivacije plazminogena (PAI-1) koji su destabilizovale aterosklerotski plak i dovele do promene balansa fibrinolize (Vaughan i sar., 1995). Aktivacijom VEGF Ang II je promovisao adventicijalnu angiogenezu (Cheng i sar., 2005; Moreno i sar., 2006) (slika 1.5). Svoje efekte u aterosklerozi Ang II ispoljava vezivanjem za Ang II receptore tipa 1 (ATR1) i tipa 2 (ATR2) (Sayeski i Bernstein, 2001; Nouet i Nahmias, 2000). Aterogena funkcija Ang II u zidu krvnog suda u najvećoj meri je posredovana aktivacijom ATR1 (Braisler i sar., 2002). Rezultati farmakoloških studija inhibicije ATR1 u animalnim modelima ateroskleroze pokazali su niži stepen razvoja bolesti (Li i sar., 2004; Wassmann i sar., 2004a). Smatra se da protektivni efekti blokade ATR1 posreduju u smanjenju oksidativnog stresa, smanjenju stepena inflamacije i poboljšanju funkcije endotelijuma (Wassmann i sar., 2004a). Farmakološka blokada ATR1 je smanjila akumulaciju lipida i povećala nivo kolagena unutar ateroma i samim tim stabilizovala aterosklerotske plakove u animalnim modelima ateroskleroze kod miševa kod kojih je gen za ApoE izbačen (Fukuda i sar., 2008).



Slika 1.5. Uloga Ang II-ATR1 puta u aterosklerozi. Receptor ATR1 eksprimiran je u vaskularnim i inflamatornim ćelijama. Indukcijom sinteze reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), stimulacijom ekspresije adhezivnih molekula i hemokina Ang II dovodi do disfunkcije endotela, infiltracije inflamatornih ćelija i skladištenje lipida. Ang II takođe promoviše proces patološke angiogeneze u vasa vasorum putem povećane sinteze vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) (modifikovano Fukuda i Sata, 2008)

1.3.2. Efekti RAS na povećanje oksidativnog stresa i remodelovanje unutar zida krvnog suda

Pokazano je da vezivanje Ang II za ATR1 unutar zida krvnog suda povećava oksidativni stres tako što indukuje aktivnost enzima nikotinamid-adenin dinukleotid-fosfat oksidaze (NAD(P)H oksidaza) (Warnholtz i sar., 1999). Njenom aktivnošću nastaju ROS koje su aktivno uključene u transdukciju mnogobrojnih signala Ang II (Griendling i Ushio-Fukai, 2000). Pri tom nastaju superoksidni anjoni i vodonik peroksid (H_2O_2) koji u zidu krvnog suda deluju na dva načina : 1) ekstraćelijski tako što modulišu endotelijum zavisne promene vaskularnog tonusa i 2) intraćelijski kao sekundarni glasnici koji utiču na dugotrajne fenotipske promene ćelija (Griendling i Ushio-Fukai, 2000). Efekat oksidativnog stresa se ogleda već u prvim fazama aterogeneze tokom formiranja masnih pruga gde je Ang II favorizovao unos oxLDL-a u makrofage (Keidar i sar., 2001). U endotelnim ćelijama Ang II je povećao ekspresiju

lektinu sličnog receptora za oksidovani LDL (LOX-1), koji dalje potpomaže unos oxLDL-a unutar lezija (Morawietz i sar., 1999).

Kao deo odgovora na povredu, krvni sud teži da se obnovi kroz procese vaskularnog remodelovanja (Touyz RM, 2005; Marchesi i sar., 2008). Ang II je imao ulogu faktora rasta tokom remodelovanja *in vivo* tako što je stimulisao hiperplaziju i hipertrofiju GMC, transaktivacijom receptora trombocitni faktor rasta (PDGF) (Kelly i sar., 2004). Zajedno sa faktorom nekroze tumora- α (TNF- α) u endotelnim ćelijama indukovao je sintezu MMP-2 (Arenas i sar., 2004). Zna se da je ekspresija MMP-2 i MMP-9 u aterosklerozi udružena sa rupturom aterosklerotskog plaka (Heo i sar., 2011). Povećan nivo Ang II tokom remodelovanja zida krvnog suda posledica je i aktivnosti MMP-8 koja konvertuje Ang I u Ang II (Laxton i sar., 2009). Pokazano je da ATR1 i ATR2 imaju suprotne efekte u vaskularnom remodelovanju (Brassard i sar., 2005). Inhibicija ATR1 blokatorima (ARBS) imala je protektivni efekat na vaskularno remodelovanje kod transgenih miševa sa izbačenim genom za ATR2 (ATR2^{-/-}) u kojima je indukovana povreda (Wu i sar., 2001). Blokada ATR1 smanjila je oksidativni stres i imala antiaterosklerotske efekte kod miševa kod kojih su geni za ATR2 i ApoE izbačeni (Iwai i sar., 2005). Inhibicija ATR1 selektivnim antagonistima smanjila je hipertenziju, povećala ekspresiju ATR2 i favorizovala vaskularno remodelovanje u šećernoj bolesti (Savoia i sar., 2007). Najčešće korišćena terapija u remodelovanja vaskularnog tkiva jesu ARBS, inhibitori ACE enzima (ACEI) u kombinaciji sa drugim medikamentima (Cipollone i sar., 2004; Koh i sar., 2010).

Podatak da je ekspresija ACE registrovana u inflamatornim regionima karotidnih aterosklerotskih plakova (Fukuhara i sar., 2000), kao i eksperimentalni dokazi da tokom progresije bolesti u pojedinim regionima aterosklerotskog plaka karotida (makrofagi) gube sekretornu aktivnost sinteze ACE (Morioka i sar., 2004), ukazala je da RAS ima kritičnu ulogu u ovoj bolesti. Istovremeno otkriće novih komponenti sistema kao što je angiotenzin konvertujući enzim homolog (ACE2) suprotnog regulatora ACE, dovela su do preovlađujućeg koncepta o postojanju dva sistema koji imaju suprotne efekte u regulaciji vaskularne homeostaze i vaskularne funkcije (Rabelo i sar., 2011). To su aktivirajuća kaskada koju čine ACE/Ang II/ATR1 i deaktivirajuća kaskada koji čine ACE2, Angiotenzin (1-7) i Mas receptor (ACE2/Ang (1-7)/Mas) (Santos i sar., 2008; Rabelo i sar., 2011; Clarke i sar., 2013). Pitanje koje se

postavlja jeste da li patološko remodelovanje unutar zida krvnog suda u krajnjim fenotipovima ateroskleroze kod čoveka zavisi od aktivacije/deaktivacije RAS sistema kroz odnos ekspresije ACE/ACE2 i/ili aktivacije/deaktivacije ekspresionog nivoa receptora ATR1/ATR2.

1.3.3. Uloga ATR2 u aterosklerozi i remodelovanju zida krvnog suda

Postoje oprečni rezultati uloge ATR2 u aterosklerozi. Sugerisana je antiinflamatorna uloga ATR2 tokom progresije ateroskleroze (Savoia i sar., 2011). Direktna stimulacija ATR2 agonistom (supstanca 21) u kulturi fibroblasta je smanjila sintezu proinflamatornih citokina (Rompe i sar., 2010). Indukcija sinteze ATR2 je indukovala smanjenje nivoa ekspresije informacione RNK (iRNK) za MMP-2 koja ima ulogu u rastu neointime posle povrede (Jing i sar., 2009). U animalnim modelima ateroskleroze transgeni miševi sa izbačenim genom za LDLR u kojima je adenovirusnim vektorom uspostavljena ekspresija ATR2 pokazala je da ovi miševi imaju manji stepen aterogeneze u aorti, smanjenu akumulaciju kolagena, smanjeni ekspresioni nivo i aktivnost MMP-aza (MMP-2, MMP-9) u regionima aterosklerotskih lezija (Dandapat i sar., 2008). U istom modelu miševa pokazano je da prisustvo ATR2 moduliše oksidativni stres, povećava ekspresiju endotelijalne NO sintaze (eNOS) i hemooksigenaze-1 (HO-1) i proinflamatorne procese putem fosforilacije Akt-1 kinaze (Hu i sar., 2008).

Kod miševa sa izbačenim genom za ApoE polni hormoni su kod mužjaka imali ulogu u razvoju aterosklerotskih lezija (aneurizmi) indukovano Ang II (Henriques i sar., 2004), dok su ženke bile zaštićene (Daugherty i sar., 2001). Kod ženki je infuzija Ang II i primena blokatora ATR2 menjala tok bolesti (Daugherty i sar., 2001). U istom modelu Ang II i ishrana bogata holesterolom, u aterosklerotskom plaku je dovela do povećanja ekspresije ATR2 na nivou iRNK i proteina (Johansson i sar., 2005). Blokada receptora ATR1 i inhibicija receptora ACE nije imala efekte na distribuciju i kompoziciju aterosklerotskih lezija kod čoveka (Johansson i sar., 2008). Miševi koji su dupli nokauti, deficitarni za ApoE i ATR2, na ishrani bogatoj holesterolom su razvili ateroskleroza (Sales i sar., 2005; Iwai i sar., 2005). ATR2 je modulisao oksidativni stres i imao kontraregulatornu ulogu u odnosu na ATR1 u uslovima kada je ATR1 blokiran (Sohn i

sar., 2000). Posle 16 nedelja ishrane bogate holesterolom sojevi miševa sa ATR2 genom imali su značajno manji broj makrofaga, GMC, lipida i kolagena u plakovima usled apoptoze, dok ovaj efekat nije bio vidljiv posle 10 nedelja ove ishrane (Sales i sar., 2005). ATR2 ima funkciju glavnog antiinflamatornog medijatora u animalnim modelima povrede krvnih sudova (Wu i sar., 2001). U eksperimentalnom modelu povrede karotidne arterije (eng. *balloon injury*) pokazano je da indukovana ekspresija ATR2 inhibira hiperplaziju i proliferaciju GMC (Tang i sar., 2011) i reguliše formiranje nove intime (neointime) (Wu i sar., 2001). Ukoliko je u ovim modelima izbačen gen za ATR2 dolazilo je do zadebljanja medijalnog sloja usled smanjene apoptoze ćelija (Yamamoto i sar., 2008). Ekspresija ATR2 zabeležena je u endotelnim ćelijama, makrofagama u aterosklerotskom plaku i ćelijama novoformirane intime (neointime) kod zečeva sa aterosklerozom (Zulli i sar., 2006).

Postoje i oprečni dokazi u kulturi monocita čoveka: stimulacija ATR2 Ang II je pojačala sintezu prostaglandina (PGE₂) i MMP-1, za koju je pokazano da učestvuje u inflamatornom procesu u rupturi aterosklerotskih plakova (Kim i sar., 2005). U LDLR^{-/-} modelu miševa deficijencija gena za ATR2 nije imala efekte na tok i veličinu aterosklerotskih lezija (Daugherty i sar., 2004).

Pokazano je da je ATR2 eksprimiran u makrofagama aterosklerotskih plakova čoveka (Johansson i sar., 2008). To je jedina komponenta RAS sistema čiji nivo ekspresije (iRNK i protein) nije bio povišen u drugim tipovima aterosklerotskih lezija (aneurizme) zahvaćenih bolešću (Kaschina i sar., 2009).

1.4. MOLEKULI RAS SISTEMA

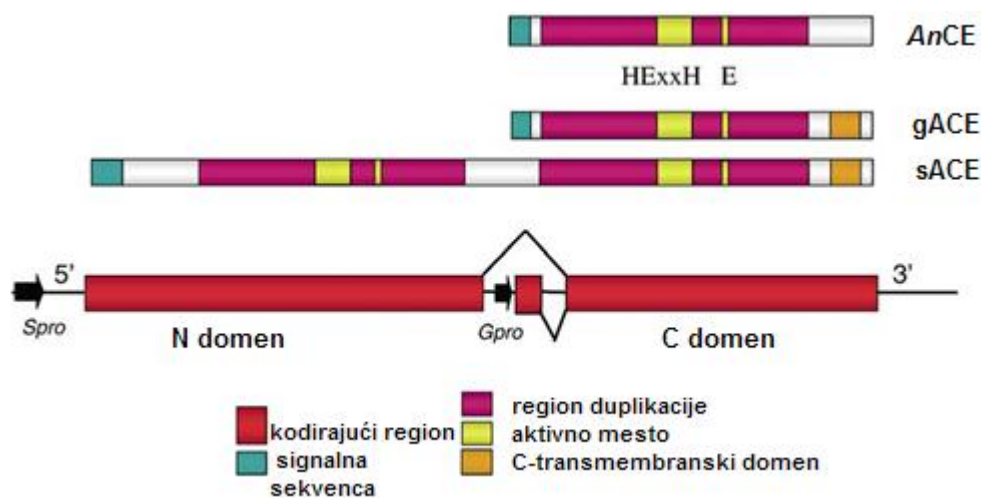
1.4.1. Angiotenzin I-konvertujući enzim (ACE) i njegova funkcija

Kod čoveka ACE je peptidil dipeptidaza (karboksipeptidaza) koja uklanja po dve aminokiseline (AK) sa karboksilnog kraja proteina čiju hidrolizu katalizuje. Svojom aktivnošću, ACE vrši konverziju Ang I i tako generiše Ang II. Postoji u dve forme: somatska zastupljena u mnogim tkivima (sACE) i germinalna (testikularna) (gACE) forma prisutna samo u testisima. Obe izoforme pripadaju grupi transmembranskih ektoenzima (Corvol i sar., 1995a; Corvol i sar., 1995b) sa ekstraćelijskim

ektodomenom, hidrofobnim (transmembranskim) delom i kratkim citoplazmatičnim "repom" (slika 1.6). Obe forme enzima imaju signalnu sekvencu na N-kraju, potrebnu za prolaz u endoplazmatični retikulum (Coates D, 2003).

1.4.1.1. Molekulska struktura sACE

sACE enzima kod čoveka je peptid, koji ima molekulsku težinu (eng. *molecular weight*, MW) 140 kDa (glokozilovana forma ima MW 150-180 kDa) (Coates D, 2003). Somatska forma ima 1306 AK (slika 1.8.) i sadrži dva homologa katalitička domena koji su 60 % identični, označeni kao N- i -C, prema tome da li su bliže N ili C kraju proteina (Danser i sar., 2007). gACE sadrži samo jedan domen koji je identičan C domenu sACE. Funkcionalne jedinice svakog domena su Zn^{2+} zavisni aktivni motivi (His-Glu-X-X-His). Joni Zn^{2+} čine važnu katalitičku komponentu aktivnog centra za koju se vezuju ACEI (Natesh i sar., 2003).



Slika 1.6. Struktura gena i proteina ACE. sACE nastala je tandemskom duplikacijom gena koji kodiraju informaciju za dva domena, -N i -C domen proteina i koji se transkribuje sa somatskog promotora (oznaka Spro u genu). gACE se transkribuje sa drugog specifičnog unutrašnjeg promotora (Gpro). Proteini u okviru osnovnog regiona pokazuju visok stepen homologije (označeno ružičasto). Aktivna mesta za koja se vezuju joni Zn^{2+} su označena žuto. Obe forme enzima sadrže N terminalnu signalnu sekvencu (označeno zeleno). Kičmenjaci u proteinu sadrže hidrofobnu (transmembransku) C-terminalnu sekvencu (označeno narandžasto), dok kod beskičmenjaka (AnCE) nedostaje transmembranski region i protein postoji samo u solubilnoj ekstraćelijskoj formi (modifikovano Coates D, 2003).

1.4.1.2. *Struktura gena za ACE*

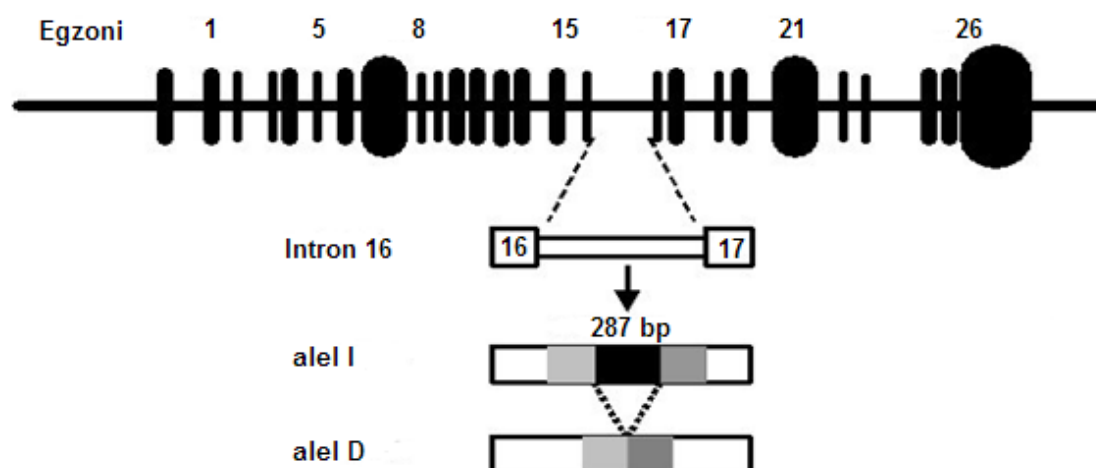
Gen za humani ACE lociran je na hromozomu 17 (Mattei i sar., 1989) u regionu q22-q24 (Jeunemaitre i sar., 1992). Gen je dug 21 kb i sadrži 26 egzona. Informaciona RNK (iRNK) za sACE i gACE transkribuju se sa dva različita promotora (Hubert i sar., 1991; Langford i sar., 1991).

Somatski promotor je lokalizovan na 5'-kraju prvog egzona i kontroliše transkripciju svih egzona izuzev egzona broj 13. Egzon 13 kodira za 67 dugu AK sekvencu koja odgovara N-terminalnom kraju gACE. Primarni transkript se alternativno iskraja te postoje duže i kraće forme iRNK (4.3 i 3.5 kb) (Hubert i sar., 1991; Sugimura i sar., 1998). Funkcionalna analiza promotora gena za ACE kod čoveka pokazala je da u promotoru postoje dva pozitivna i dva negativna regulatorna elementa (Testut i sar., 1993). Proksimalni pozitivni regulatorni element se nalazi 132 bp uzvodno od starta transkripcije, a negativni regulatorni elementi nađeni su na poziciji -472 bp i između -343 bp i -132 bp (Testut i sar., 1993).

Germinalni promotor nalazi se u intronu 12 (Langford i sar., 1991) te je iRNK za gACE kraća duga 3 000 nukleotida (Hubert i sar., 1991).

1.4.1.3. *Polimorfizam insercija/delecija (I/D) u genu za ACE*

Polimorfizam insercija/delecija (I/D) ispoljava se kroz prisustvo (alel I) odnosno odsustvo (alel D) Alu-palindromske sekvence duge 287 bp u intronu 16 (slika 1.7.). Analiza strukture sekvence alela I i alela D gena u genu za ACE pokazala je identičnu palindromsku sekvencu od 14 bp na oba kraja insercije (Hunley i sar., 1996). Spajanje ova dva ponovka sugeriše mogući nastanak alela D. Tokom mejoze jedan od ta dva ponovka bi mogao da se postavi da bude komplementaran drugom i tako stvori petlju koja bi mogla da izbaci insercioni fragment (Yoshida i sar., 1996). Ovaj način potencijalnog nastanka polimorfizma u lokusu gena za ACE sugeriše da je mutacioni događaj koji je doveo do nastanka polimorfizma delecija, a ne insercija (Yoshida i sar., 1996).



Slika 1.7. Šematski prikaz strukture genaza ACE. Polimorfizam I/D nalazi se u intronu 16 i manifestuje se prisustvom (insercija) ili odsustvom (delecija) sekvence duge 287 bp (modifikovano http://www.nieronline.org/uploads/5/53/Lely_Fig2.jpg)

1.4.1.4. *Regulacija ekspresije gena za ACE polimorfizmom I/D*

Prisustvo polimorfizma I/D predstavlja genetičku determinantu koja određuje koncentraciju solubilne forme ACE u serumu (Rigat i sar., 1990). Jasna veza između polimorfizma I/D u genu za ACE i nivoa ACE enzima u serumu nađena je u populaciji Kavkazoida i Pima Indijanaca. Subjekti sa alelom D su imali viši nivo ACE u plazmi nego subjekti sa alelom I (Rigat i sar., 1990; Foy i sar., 1996). U populaciji zdravih Kavkazoida, efekat polimorfizma I/D je kodominantan, što znači da osobe sa genotipom II imaju najniži nivo enzima ACE, a osobe sa genotipom DD najviši nivo, kod osoba sa genotipom ID ovaj nivo je intermedijalan. Polimorfizam I/D je povezan sa oko 47 % interindividualne varijabilnosti u nivou ACE enzima u plazmi (Rigat i sar., 1990).

U populaciju Negroida, za razliku od Kavkazoida, polimorfizam nije u asocijaciji sa aktivnosti ACE u serumu u populaciji zdravih, kod dece i adolescenata (Bloem i sar., 1996). Ovi nalazi ukazuju da je regulacija serumske aktivnosti ACE asocirana sa polimorfizmom I/D i da je različita u različitim etničkim grupama.

U T-limfocitima nosioci genotipa DD polimorfizma I/D u genu za ACE imali su najviši nivo intracelularnog ACE (Costerousse i sar., 1993). U leukocitima nivo ekspresije iRNK za ACE bio je povišen kod nosilaca alela D (Suehiro i sar., 2004). Ista relacija polimorfizma i ekspresije iRNK nađena je u tkivu bubrega (Mizuiru i sar., 2001). U tkivu komore srca najveća aktivnost ACE enzima bila je zabeležena kod nosilaca

genotipa DD (Danser i sar., 1995). U tkivu pretkomore srca čoveka sa ventrikularnom hipertrofijom nivo ekspresije iRNK po genotipu polimorfizma I/D se nije statistički značajno razlikovao (Spruth i sar., 1999).

Ispitivanje asocijacije između polimorfizma I/D i nivoa sACE enzima u semenoj tečnosti i aktivnosti gACE u spermatozoidima nije nađena (Williams i sar., 1995). Transkripcija iRNK za gACE nije modulirana polimorfizmom I/D već je pod kontrolom germinalnog promotora (Williams i sar., 1995). Ovi nalazi ukazuju da postoji tkivna specifičnost regulacije ekspresije ACE.

Funkcionalnost ACE enzima se dugi niz godina unazad intenzivno istraživala u relaciji sa polimorfizmom I/D, naročito u KVB. Međutim, ispitivanja ekspresije ACE u tkivima i/ili polimorfizmom regulisane ekspresije su retka. U tkivu aterosklerotkog plaka *ex vivo*, naročito u karotidnoj aterosklerozi ova ispitivanja nisu izvršena.

1.4.1.5. Studije asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE u karotidnoj aterosklerozi

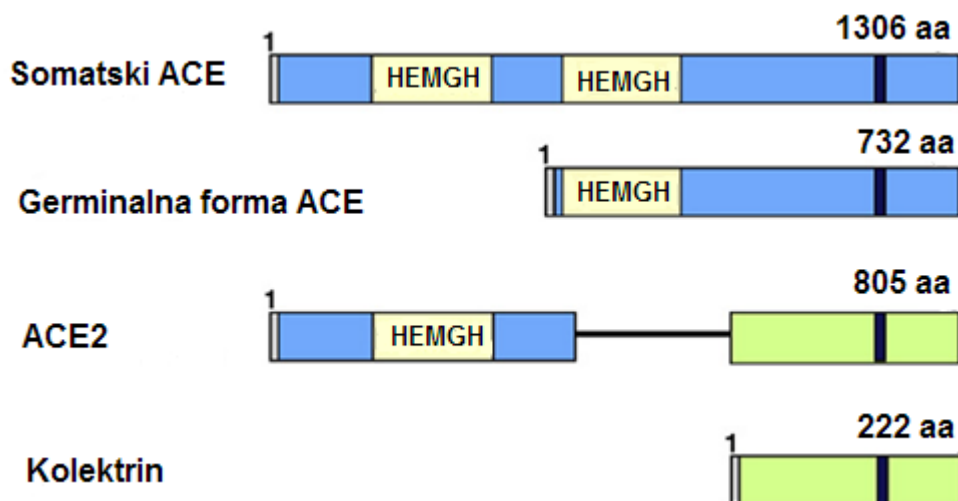
Studije koje su bavile ispitivanjem potencijalne asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE sa karotidnom aterosklerozom su bile koncipirane na asocijaciju sa subkliničkim parametrima ateroskleroze kao što je zadebljanje intima medije (IMZ), fenotipom koji se manifestuje na početku bolesti. Rezultati ovih studija nisu konzistentni. Velika meta analiza koja je sprovedena 2003. i koja je obuhvatila više od 20 studija, od kojih je većina sačinjena od populacija zdravih i bolesnih pokazala je umerenu asocijaciju alela D polimorfizma I/D sa IMZ (Sayed-Tabatabaei i sar., 2003). Studije koje su se bavile ispitivanjem asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE sa uznapredovalom aterosklerozom, sa fenotipom karotidnog aterosklerotskog plaka su retke (Kolaković i sar., 2012).

1.4.2. Angiotenzin konvertujući enzim homolog (ACE2) i njegova funkcija

ACE2 ima sličnost sa ACE, ali drugačije hidrolizuje supstrate čime sintetiše i uklanja drugačije efektorne molekule RAS. ACE2 ima ulogu negativnog enzimskog regulator RAS (Donoghue i sar., 2000; Tipnis i sar., 2000). ACE2 je cink metalopeptidaza kao i ACE koja ima jone Zn^{2+} u katalitičkom domenu (Donoghue i sar., 2000; Tipnis i sar., 2000; Turner i Hooper, 2002). ACE2 ima jedno katalitičko mesto i funkcioniše kao karboksimonopeptidaza koja uklanja po jednu AK sa C-kraja supstrata (Vickers i sar., 2002). Sa ACE ima 61% sličnosti i 41.8 % identičnosti sekvence u katalitičkom domenu (Tipnis i sar., 2000; Donoghue i sar., 2000; Turner i Hooper, 2002). Enzim nije osetljiv na inhibitore ACE enzima (Rice i sar., 2004). C-terminalni domen ACE2 pokazuje 48% identičnosti sa kolektrinom (Zhang i sar., 2001), još jednim proteinom iz familije ACE. ACE2 hidrolizuje dekapeptid Ang I u Angiotenzin (1-9) (Ang (1-9)) (Donoghue i sar., 2000) i oktapeptid Ang II u Ang (1-7) (Vickers i sar., 2002; Imai i sar., 2010). Za ACE2 je ustanovljeno da ima \approx 400 puta veći afinitet za katalizu Ang II nego za Ang I (Vickers i sar., 2002).

1.4.2.1. Molekulska struktura ACE2

ACE2 je transmembranski glikoprotein tipa I, koji ima 805 AK (slika 1.8.). Poput ACE ima dva domena, katalitički domen na N-kraju proteina (pozicija 147-555) i C-terminalni domen. Na N-kraju proteina nalazi se signalna sekvenca duga 17 AK, potom sledi motiv HEMGH-katalitički domen, hidrofobni transmembranski region od 22 AK i citosolni domen dug 42 AK (Tipnis i sar., 2000). Ekstraćelijski domen sadrži sedam N-potencijalnih mesta glikozilacije. Solubilna forma, sekretovana forma enzima, kojoj nedostaje transmembranski i citosolni domen je glikozilovana na N-kraju i njena MW iznosi 120 kDa (Tipnis i sar., 2000; Eriksson i sar., 2002). Deglikozilacija smanjuje molekulska težinu proteina na 85 kDa.



Slika 1.8. Šematski prikaz strukturnih domena ACE, ACE2 i kolektrina. Svaki protein je integralni protein tipa I sa signalnom sekvencom (označeno sivom bojom) i transmembranskim regionom (označeno crno). ACE ima dva Zn^{2+} vezujuća (HEMGH) katalitička domena, dok ACE2 ima jedan katalitički domen (označeno žuto). Homologi regioni između ACE2 i kolektrina su označeni zeleno. Brojevima je označeno koliko AA sadrži svaki protein. (modifikovano Kuba i sar., 2010).

Oslobađanje katalitičkog ektodomena (solubilne forme enzima) proteolitičko sečenje je posredovano aktivnošću dezintegrina i metaloproteaze (ADAM17) (Lambert i sar., 2005; Iwata i sar., 2009). Ovaj proces dešava se konstitutivno u niskom stepenu, a može biti i indukovano forbil estrima. Mesto sečenja ACE2 se nalazi u jukstamembranskoj sekvenci na poziciji između Arg⁷⁰⁸ i Ser⁷⁰⁹ (Jia i sar., 2009). Citoplazmatični domen ACE2 kao i ACE sadrži vezujuća mesta za kalmodulin koji ima efekte na regulaciju i sečenje katalitičkog ektodomena (Lambert i sar., 2008). Pokazano je da ACE2 interaguje sa β -integrinom u lizatu srca i pretpostavlja se da ova interakcija predstavlja regulatorni mehanizam aktivnosti i kolokalizacije ACE2 (Lin i sar., 2004).

1.4.2.2. *Struktura gena za ACE2*

Gen ACE2 čoveka sadrži 18 egzona od kojih neki imaju sličnosti sa prvih 17 egzona gena za ACE (Tipnis i sar., 2000). Mada su mnogi egzoni identične veličine, egzoni 5 i 6 razlikuju se i odgovaraju egzonu 5 gena ACE. Egzon 9 u genu za ACE2 koji kodira za motiv His-Glu-X-X-His (gde je X bilo koja AA) odgovara egzonu 8 u genu za ACE (Turner i Hooper, 2002). Egzoni na 3' kraju koji kodiraju za jukstamembranske, transmembranske i citosolne domene proteina su slični egzonomima

kolektrina (Zhang i sar., 2001). Gen je mapiran na Xp22 hromozomu i prostire se na oko 40 kb genomske DNK. Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina (cDNK) za ACE2 se sastoji iz 3405 nukleotida od kojih je 103 nukleotida u 5'-nekodirajućoj sekvenci, 2418 nukleotida u otvorenom okviru čitanja i 884 nukleotida u 3'- regionu koji se ne prepisuje (Tipnis i sar., 2000). Northern blot analiza pokazala je da iRNK za ACE2 duga 3.400 nukleotida i da je ova transkripciona varijanta eksprimirana u najvišem nivou u srcu, bubregu i testisima od ukupno 23 tkiva čoveka gde je ispitivana njena ekspresija (Donoghue i sar., 2000). Prisustvo duže transkripcione varijante od ≈ 8 kb je pokazano samo u bubregu (Donoghue i sar., 2000). Detektovana je i transkripciona varijanta duga 5.900 nukleotida zastupljena u bubregu i testisima (Tipnis i sar., 2000). Iz tkiva pluća je 2005. godine klonirana cDNK za ACE2 i utvrđeno je da postoji alternativno iskrajanje. Pri tom je identifikovan alternativni 5' netranslatujućo egzon u plućima, testisu, gastrointestinalnom traktu (Itoyama i sar., 2005).

1.4.2.3. Tkivna distribucija ACE2

Za razliku od ACE koji je široko eksprimiran u tkivima čoveka, ekspresija ACE2 je tkivno specifična i imunohistohemijski potvrđena u endotelnim ćelijama koronarnih arterija, arteriola i venula miokarda srca (Tipnis i sar., 2000). Pokazano je da je ACE2 eksprimiran u epitelijumu tubula bubrega, u GMC^ć bubrežnih arterija (Donoghue i sar., 2000).

U tkivu bubrega epitelijuma tubula (polarizovanih ćelija) utvrđena je lokalizacija ACE2 u apikalnim membranama za razliku od ACE koji je distribuiran u bazolateralnim membranama (Warner i sar., 2005). Studija koja je ispitivala ekspresiju ACE2 u tkivima čoveka potvrdila je ekspresiju ACE2 u 72 tkiva sa najvišim nivoom ekspresije u srcu, bubrezima, testisima potom svim delovima gastrointestinalnog trakta naročito u ileumu. U centralnom nervnom sistemu i limfnim tkivima utvrđen je relativno nizak nivo ekspresije ACE2 (Harmer i sar., 2002).

1.4.2.4. Model sistemi za ispitivanje funkcije ACE2 u kardiovaskularnim bolestima i aterosklerozi

Prvo istraživanje funkcije molekula ACE2 bilo je vršeno na transgenim miševima kojih je gen inaktiviran, transgeni miševi sa izbačenim genom (ACE2^{-/-}) (Crackower i sar., 2002). Ovi miševi bez obzira na pol, imali su poremećenu funkciju srca, smanjenu kontraktilnost i povišen nivo Ang II. Kontraktilna disfunkcija i dilatacija srca ovih miševa, odsustvo fibroze i hipertrofije, ličilo je na srčanu slabost kod čoveka. U srcu ovih miševa detektovana je povećana ekspresija inducibilnih markera hipoksije, BNIP3 i PAI-1 (Crackower i sar., 2002), pa se smatra da ACE2 ima ulogu u snabdevanju kiseonikom u vaskularnim endotelnim i GMC srca. U transgenim modelima hipertenzije kod pacova sklonih šlogu (eng. *spontaneously hypertensive stroke-prone rats*, SHRSP) koji eksprimiraju humani ACE2 u GMC (Rentzsch i sar., 2008) primećena je bolja funkcija endotelijuma i smanjena vazokonstrikcija u odgovoru na Ang II. Potencijalni mehanizam koji objašnjava ovu funkciju je smanjeni oksidativni stres i/ili povećanje nivoa Ang (1-7).

U aterosklerozi ACE2 je štitio endotelne ćelije od Ang II posredovane infiltracije monocita i oksidativnog stresa tako što uklanjao Ang II, a generisao Ang (1-7) (Lovren i sar., 2008; Guo i sar., 2008). Kod transgenih miševa sa izbačenim genom za ApoE tretman Ang (1-7) imao je ateroprotektivne efekte (Tesanovic i sar., 2010). Deficijencija gena ACE2 kod transgenih miševa za ApoE je potpomogla formiranje aterosklerotskih plakova, što se manifestuje pojačanom ekspresijom medijatora aterogeneze, citokina i adhezionih molekula i adhezivnošću leukocita za endotelijum (Thomas i sar., 2010). U eksperimentima na zečevima u kojima je adenovirusom indukovana ekspresija gena ACE2 (rekombinantni ACE2) registrovana je pojava stabilnih aterosklerotskih plakova (Dong i sar., 2008). S druge strane u stabilnim karotidnim aterosklerotskim plakovima čoveka zabeležena je smanjena ekspresija ACE2 u poređenju sa lezijama sklonih rupturi (Sluimer i sar., 2008). Transfekcija ACE2 u kulturi endotelnih ćelija (eng. *human umbilical vein endothelial cell*, HUVEC) i GMC ćelija čoveka, umanjuje TNF- α indukovanu adheziju monocita i migraciju i proliferaciju GMC, respektivno (Lovren i sar., 2008; Zhang i sar., 2010).

1.4.3. Kolektrin, tkivna distribucija i funkcija

Kolektrin predstavlja još jedan novootkriveni molekul iz familije ACE kod čoveka. Međutim za razliku od ACE i ACE2 u kolektrinu odsustvuju katalitički domeni, što ukazuje na to da nema enzimsku funkciju. Posедуje homologiju sa C- domenom ACE2, tako da se može nazvati homologom ACE2 (slika 1.9.) (Lambert i sar., 2008). Otkriven je 2001. godine i označen imenom (TMEM27) u tkivu bubrega (u citoplazmi i apikalnoj membrani endotelnih ćelija sabirnih kanalića i proksimalnih tubula) kod parcijalno nefrektomisanih pacova (Zhang i sar., 2001). Kolektrin je transmembranski glikoprotein koji ima kratak ekstraćelijski domen koji dimerizuje, glikoziluje i podleže katalitičkoj obradi (Akpınar i sar., 2005). Kasnije je okarakterisan u nekoliko drugih tkiva i u srcu (Danilczyk i sar., 2006; Fukui i sar., 2005; Akpınar i sar., 2005).

Studije životinjskih modela kod kojih je izbačen gen za kolektrin su pokazale da miševi imaju poremećaj u transportu AK (Danilczyk i sar., 2006; Malakauskas i sar., 2007; Verrey i sar., 2009). Poremećen transport AK ima uticaja na promenu u metabolizmu AK, a svaka takva promena je kritična za homeostazu kod sisara, u kojoj AK služe i kao signalni molekuli i kao supstrati za različite metaboličke puteve (Marshall S, 2006). Kolektrin ima ulogu u hipertenziji indukovanoj visokim unosom NaCl, mehanizmom nezavisnim od aldosteronske regulacije, preko membranskih proteinskih kompleksa (Yasuhara i sar. 2008).

Funkcija kolektrina je drugačija od ostalih njemu homologih molekula RAS i ostvaruje se nezavisno od njihovih enzimskih funkcija. Kolektrin se vezuje za snapin protein (eng. *synaptosomal associated protein of 25 kDa*, SNAP-25) čime uspostavlja formiranje solubilnog proteinskog kompleksa (eng. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, SNARE) (Fukui i sar., 2005; Yasuhara i sar. 2008; Zhang i sar., 2007). Preko ovog proteinskog kompleksa kolektrin posreduje u vezikularnom transportu apikalnih membranskih proteina, AK, transportu Na⁺ i vode u hipertenziji (Yasuhara i sar. 2008). Pretpostavlja se da je njegova uloga u regulaciji homeostaze (Malakauskas i sar., 2009).

1.4.3.1. Molekulska struktura kolekrina

Protein kolekrina kod čoveka ima 222 AK (slika 1.9.) i molekulska masu od 25 kDa. Posедуje dva hidrofobna domena: hidrofobni domena N-kraju proteina (AK 1-14) koji čini signalnu sekvencu i transmembranski domen koji se pruža od 142. do 164. AK. Potencijalno mesto proteolitičke obrade je na poziciji između 14 i 15 AK. Ekstraćelijski domen sadrži 127 AK sa dva mesta glikozilacije (Zhang i Wada, 2007; Zhang i sar., 2007). Sa C-krajem ACE2 deli 47.8 % identičnosti (Altschul i sar., 1997). Potencijalna kalmodulinska sekvencа nalazi se na C-kraju pored transmembranske sekvence i sugeriše na njegovo ektodomensko isecanje (Akpınar i sar., 2005). To ukazuje na moguću ulogu kalmodulina u regulaciji ekspresije kolekrina na ćelijskoj površini i njegovog vanćelijskog oslobađanja, slično kao kod ACE2, gde interakcija sa kalmodulinom inhibira isecanje njegovog ektodomena (slika 1.9.) (Lambert i sar., 2008). Na osnovu homologije kolekrina i ACE2 može se pretpostaviti da kalmodulin reguliše oslobađanje ektodomena kolekrina (Lambert i sar., 2008).



Slika 1.9. Kolekrin, homolog ACE2 sadrži vezujuće mesto za kalmodulin. Poravnanje peptidnih sekvenci ACE2 i kolekrina pokazuje da su ove sekvence konzervisane i predstavljaju potencijalne domene za vezivanje kalmodulina. Zvezdicama su obeleženi katalitički domeni, crni pravougaonici predstavljaju transmembranske domene, a beli pravougaonici označeni zvezdicom predstavljaju potencijalne domene za vezivanje kalmodulina (modifikovano Lambert i sar., 2008).

1.4.3.2. Struktura gena za kolektrin

Gen koji kodira za kolektrin (TMEM27) nalazi se na Xp22 hromozomu, 26 kb udaljenosti od gena za ACE2. Gen sadrži 4 egzona. iRNK za kolektrin je duga 1.800 nukleotida i prvo je detektovana u bubregu (Zhang i sar., 2001). *In vitro* studije su utvrdile da je gen za kolektrin transkripciono regulisan hepatocitnim nuklearnim faktorom- α (HNF1- α) u ćelijama pankreasa (Fukui i sar., 2005).

1.4.4. Angiotenzin II receptor tipa 1 (ATR1)

1.4.4.1. Molekulska struktura ATR1

ATR1 je protein molekulske težine 41 kDa i sadrži 359 aminokiselina (Bergsma i sar., 1992). Pripada familiji G protein vezujućih receptora (GPVR), sa 7 transmembranskih domena (TM-I–TM-VII) i aktivira G proteine (guanin nukleotid vezujući proteini). TM domeni su α -heliksima povezani sa tri vanćelijske (EC1, EC2, EC3) i tri unutarćelijske petlje (IC1, IC2, IC3). Svaki vanćelijski domen sadrži ostatke AK cisteina koji međusobno formiraju disulfidne veze čime se stabilizuje terciјerna struktura receptora (Ohyama i sar., 1995). Vanćelijski domen na N-kraju proteina ima tri mesta N-glikozilacije i mutacije u ovim mestima nemaju efekta na vezivanje agonista (Jayadev i sar., 1999). Treća intraćelijska petlja receptora (IC3) ima bitnu ulogu u aktivaciji signalnih puteva (Daviet i sar., 2001). Domen na C-kraju sadrži ostatke AK serina koje predstavlja regulatorno mesto molekula, mesto fosforilacije i regulacije signalnog puta receptora. Pokazano je da ovaj domen ATR1 interaguje sa GPVR intergujućim proteinima (GIPs) koji regulišu receptorsku funkciju (Mogi i sar., 2007).

1.4.4.2. Struktura gena za ATR1

Gen koji kodira za ATR1 u genomu čoveka mapiran je na hromozomu 3 u regionu q21-3q25 hromozomu i zastupljen je samo u jednoj kopiji (Curnow i sar., 1992; Guo i sar., 1994). Gen se sastoji od najmanje 4 egzona (5'UTR) i 3 introna i ima dužinu veću od 60 kb. Kompletna kodirajuća sekvenca je u poslednjem egzonu, a egzoni koji

mu prethode se nalaze u 5'-netranslatujućem regionu (Curnow i sar., 1995; Martin i sar., 2001b; Elton i Martin., 2003).

1.4.4.3. Regulacija ekspresije gena za ATR1 preko alternativnog iskrajanja

Transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 odgovorni su za regulaciju bazalnog nivoa ekspresije ATR1 u *in vitro* ćelijskim linijama (Zhao i sar., 2000; Zhao i sar., 2001; Martin i sar., 2001a; Duffy i sar., 2004). Za ATR1 je identifikovano 4 transkripta koji potiču od istog gena (Su i sar., 1994; 1996). Transkripcione varijante iRNK za ATR1 nastaju kombinovanjem prva tri egzona sa četvrtim. Izoforma označena kao “dugi” ATR1 duža je za 32 AK na N-kraju proteina, može biti sintetisana sa transkripcione varijante C i D, a “kratki” ATR1 je receptorska izoforma koja je kodirana od strane varijante A i B (Elton i Martin, 2003).

Egzon 1 u transkripcionim varijantama ATR1 je bogat GC-parovima (74.8 %) i obrazuje stabilnu sekundarnu strukturu (eng. *stem loop structure*). Smatra se da u *in vitro* uslovima inhibira translaciju ATR1 dok u *in vivo* aktivira sintezu proteina (Curnow i sar., 1995). Utvrđeno je da 5'UTR transkripcionih varijanti sa egzonom 1 za ATR1, sadrži sekvence IRES (inicijacija translacije unutrašnjim ulazom ribozoma) 40 bp proksimalno od prvog egzona (Curnow i sar., 1995; Martin i sar., 2003). Smatra se da su IRES sekvence bitne za održavanje sinteze krucijalnih proteina (u hipoksiji, apoptozi, gladovanju, infekciji virusima) (Hellen i Sarnow, 2001), kao što je ATR1 koji je uključen u procese rasta i proliferacije ćelija.

Curnow i saradnici su pokazali da egzon 2 inhibira prepisivanje iRNK za ATR1 u protein (Curnow i sar., 1995). Studija na uzorcima srca sa srčanom slabošću je pokazala da je ekspresija transkripcione varijante A (bez 2. egzona) povećana, a transkripcione varijante B i D smanjena (Warnecke i sar., 1999a).

Transkripcione varijante C i D koje sadrže egzon 3 imaju start kodon AUG koji je u okviru nizvodnog ORF u egzonu 4 (Curnow i sar., 1995; Martin i sar., 2001b). *In vitro* translacijom je pokazano da se duža izoforma receptora sintetiše sa iRNK koja sadrži 3. egzon i potvrđena je i *in vivo* (Martin i sar., 2001b). Transkripciona varijanta C je dicistronska što znači da kodira i za kraću i za dužu izoformu receptora. Jedno od mogućih objašnjenja ove dicistronske sinteze koja je atipična kod eukariota može biti

kolinearna regulacija ekspresije gena i sinteza proteina koji interaguju jedan sa drugim. Za ATR1 je nađeno da obrazuje homodimere i heterodimere (AbdAlla i sar., 2000; AbdAlla i sar., 2001a; AbdAlla i sar., 2001b). Formiranje heterodimera receptora može biti funkcionalno različit od receptora monomera. Pokazano je da duža izoforma receptora ima 3 puta manji afinitet vezivanja za Ang II u poređenju sa kraćom izoformom (Martin i sar., 2001b). Ovi rezultati su sugerisali da u zavisnosti od koncentracije Ang II zavisi procentualna zastupljenost i aktivacija izoformi, a samim tim i odgovor na Ang II može da varira (Elton i Martin, 2003; Elton i Martin, 2007).

1.4.4.4. Regulacija ekspresije ATR1 različitim faktorima

Nivo ekspresije receptora regulisana je agonistom Ang II. U kulturi GMĆ ćelija pacova Ang II smanjuje ekspresioni nivo receptora (Lassegue i sar., 1995), dok hronična infuzija Ang II povećava nivo iRNK i samog receptora na tkivno specifičan način (Harrison-Bernard i sar., 1999). U hipertenziji ekspresija iRNK i proteina u vaskularnim GMĆ je pozitivno regulisana Ang II i u modelu pacova (Wang i Du, 1998). Kod čoveka senzitivnost krvnih sudova na nivo Ang II modulirana je aktivnošću RAS sistema (Gunther i sar., 1980). Pored Ang II je pokazano da i drugi agonisti u GMĆ modulišu ekspresiju ATR1 (Tabela 1.1.). Modulacija ekspresije ATR1 putem ovih homologih i heterologih puteva doprinosi u jednu ruku adaptaciji RAS sistema na hroničnu stimulaciju agonistima i služi kao objašnjenje za uloge RAS sistema i ATR1 u aterosklerozi i hipertenziji (Griendling i sar., 1993; Lassegue i sar., 1995). U kulturama GMĆ ćelija čoveka je pokazano da ciklosporin i CRP povećavaju ekspresioni nivo ATR1 (Avdonin i sar., 1999; Wang i sar., 2003). U kulturi endotelnih ćelija čoveka pokazano je da povišena sila trenja protoka krvi (eng. *shear stress*, SS) smanjuje ekspresiju receptora i broj vezujućih mesta za Ang II (Ramkhelawon i sar., 2009).

Tabela 1.1. Regulacija ATR1 u kardiovaskularnom sistemu (preuzeto i modifikovano Mehta i Griendling, 2007)

Tip ćelija	Agonisti koji povećavaju ekspresiju receptora	Antagonisti koji smanjuju ekspresiju receptora
GMC	Insulin (Nickenig i Bohm, 1998*)	Ang II (Gunther i sar, 1980; Lassegue i sar; 1995; Harrison-Bernard sar., 1999*)
	LDL (Nickenig i sar., 1997*)	Estrogen (Nickenig i sar, 1998a, 2000*)
	Progesteron (Nickenig i sar, 2000*)	Vitamin A (Takeda i sar., 2000*)
	Eritropoetin (Barrett i sar., 1998*)	HMG CoA reduktaza inhibitori (statini) (Ishiki i sar., 2001*)
	Ciklosporin (Avdonin i sar., 1999)	Faktori rasta (Ullian i sar.,1997; Nickenig i sar., 1994*)
	Faktori rasta (Guo i Inigami., 1994*)	Tireoidni hormon (Fukuyama i sar., 2003*)
	CRP (Wang i sar., 2003)	NO (Ichiki i sar, 1998*)
	IL-6 (Wassmann i sar., 2004b)	Forskolin (Wang i sar., 1997)
	IGF-1 (Muller i sar., 2000*)	Citokini (IL1- α , TNF- α , IFN- γ) (Sasamura i sar., 1997; Ikeda i sar., 1999*)
	NaCl (Wang i Du, 1998; Nickenig i sar., 1998b*)	
EĆ	OxLDL (Li i sar., 2000)	

(*studije kod pacova)

HMG-3-hidroxi-3-methyl-glutaril;LDL-lipoproteini niske gustine;IL1- α -interleukin 1 α , IFN- γ -interferon γ ,CRP-C reaktivni protein, IGF-1-insulinu sličan faktor rasta-1, NaCl-natrijum-hlorid

U tabeli **1.1** prikazana je regulacije ekspresije ATR1 različitim faktorima u GMC i EĆ (preuzeto i modifikovano iz Mehta i Griendling, 2007)

1.4.4.5. *Postranskripciona regulacija iRNK za ATR1*

1.4.4.5.1 *Regulacija ekspresije gena za ATR1 preko vezivanja regulatornih proteina*

U kulturi GMC stimulacija Ang II skraćuje poluživot iRNK sa 6 h na 2 h (Nickenig i sar., 2001). Stimulacija Ang II značajno povećava vezivanje proteina kalretikulina za 3' UTR iRNK. Sekvenca od 2175 bp do 2195 bp sadrži heksamer AUUUA i odgovorna je za inducibilnu degradaciju iRNK. Stimulacija Ang II dovodi do fosforilacije kalretikulina (na AK serin/treonin) i vezivanja za taj region što indukuje povećanu razgradnju iRNK (Nickenig i sar., 2002; Mueller i sar., 2008).

Pored kalretikulina identifikovano je da AUF-1 protein, koji se vezuje za distalnu sekvencu od 231 nukleotida iRNK za ATR1, destabilizuje iRNK i moduliše ekspresiju receptora (Pende i sar., 1999). Pored AUF-1 za 3'-netranslatirajućem regionu gena (3'UTR) vezuju se RNK vezujući proteini, humani antigen R (HuR) i heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A1 (hnRNPA1) (Pende i sar., 2008). Multifunkcionalni protein p100 vezivanjem za 3' UTR region gena preko SN-nalik domena (stafilokoke nalik domena) skraćuje poluživot iRNK za ATR1 i pozitivno reguliše ekspresiju receptora (Pauku i sar., 2008). Utvrđeno je da postoji direktna interakcija 3' UTR regiona gena za ATR1 i glicerinaldehid trifosfat dehidrogenaze (GAPDH), pri čemu ovaj protein interaguje sa endogenim iRNK za ATR1 (Backlund i sar., 2009). Kompjuterska analiza GAPDH vezujućih mesta za 3'UTR gena je pokazala da su ova mesta bogata AU ponovcima (Backlund i sar., 2009). Mapirano je vezujuće mesto za GAPDH (1-100 bp) 3'UTR regiona gena za ATR1. Ekspresija gena za ATR1 je pod kontrolom vezivanja GAPDH molekula. U *in vitro* esejima pokazano je da GAPDH dozno zavisno inhibira translaciju ATR1. Delecija GAPDH vezujućeg mesta za ATR1 povećava luciferaznu aktivnost (reporter gen esej) (Backlund i sar., 2009). U uslovima oksidativnog stresa kada su koronarne GMC u kulturi tretirane sa H₂O₂ sprečeno je vezivanje GAPDH za iRNK za ATR1 pa je povećana ekspresija receptora (Nakajima i sar., 2007). Pored uloge u odgovoru na oksidativni stres, GAPDH reguliše bazalnu ekspresiju ATR1. U tkivima čoveka postoji razlika u ekspresiji molekula GAPDH. Shodno tome postoji tkivno specifična GAPDH indukovana ekspresija gena ATR1 (Barber i sar., 2005).

1.4.4.5.2 *Regulacija ekspresije gena za ATR1 malim nekodirajućim mikroRNK*

Funkcionalna studije *in vitro* u kulturi endotelnih i GMĆ čoveka pokazala je da mikroRNK, miR-155 utišava ekspresiju ATR1 (Martin i sar., 2006). Pored toga *in vivo* je *in situ* hibridizacijom pokazana ekspresija ove mikroRNK na nivou GMĆ i endotelnih ćelija kod čoveka (Martin i sar., 2006). Transfekcija endotelnih ćelija čoveka sa miR-155 stimulisanih Ang II je smanjila ekspresiju ATR1 (Zhu i sar., 2011). U ćelijama adventicijalnih fibroblasta pacova (AFs) transfekcija sa miR-155 smanjila je endogenu ekspresiju ATR1 na proteinskom nivou (Zheng i sar., 2010).

Pored mir-155 funkcionalne studije su pokazale da još neke mikroRNK regulišu ekspresiju ATR1. To je miR-802 za koju je pokazano da može da moduliše ekspresiju ATR1 čoveka u epitelijalnim intestinalnim ćelijama (Sansom i sar., 2010). Funkcionalne studije za miR-132 pokazale su ova mikroRNK prepoznaje sekvence u kodirajućem regionu gena za ATR1 i reguliše ekspresiju receptora (Elton i sar., 2008). *In situ* hibridizacijom u GMĆ ćelijama je pokazano da je miR-132 eksprimirana u GMĆ *in vivo* (Elton i sar., 2008).

1.4.4.6. *Značaj genetičkih varijanti u regulatornom 3' UTR u procesima regulacije ekspresije gena za ATR1*

Gen za ATR1 kod čoveka je vrlo polimorfan i do sada je u ovom genu opisano više od 50 tačkastih polimorfizama (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNPs) (Baudin B, 2005). U 3'-netranslatirajućem regionu gena na poziciji +1166 od start kodona dolazi do transverzije azotne baze adenina u citozin (dsSNP rs5186) (Bonnardeaux i sar., 1994). Utvrđeno je da bazna zamena na poziciji +1255 u 3'UTR rezultuje 3 puta manjom ekspresijom iRNK, dok bazna zamena na poziciji +1166 (A→C) dovodi do 2.5 puta veće ekspresije iRNK (Lehtonen i sar., 2007). Funkcionalna karakterizacija pojedinih delova 3'UTR regiona gena je pokazala da se u 3'UTR regionu nalaze sekvence odgovorne za stabilnost iRNK. Polimorfizmi u vezujućim mestima za mikroRNK (miRSNPs) mogu da utiču na vezivanje mikroRNK i tako regulišu ekspresiju ciljnih gena i posledično da na taj način utiču na nastanak i progresiju bolesti (Abelson i sar., 2005; Mishra i sar., 2007; Adams i sar., 2007). Kompjuterski algoritmi

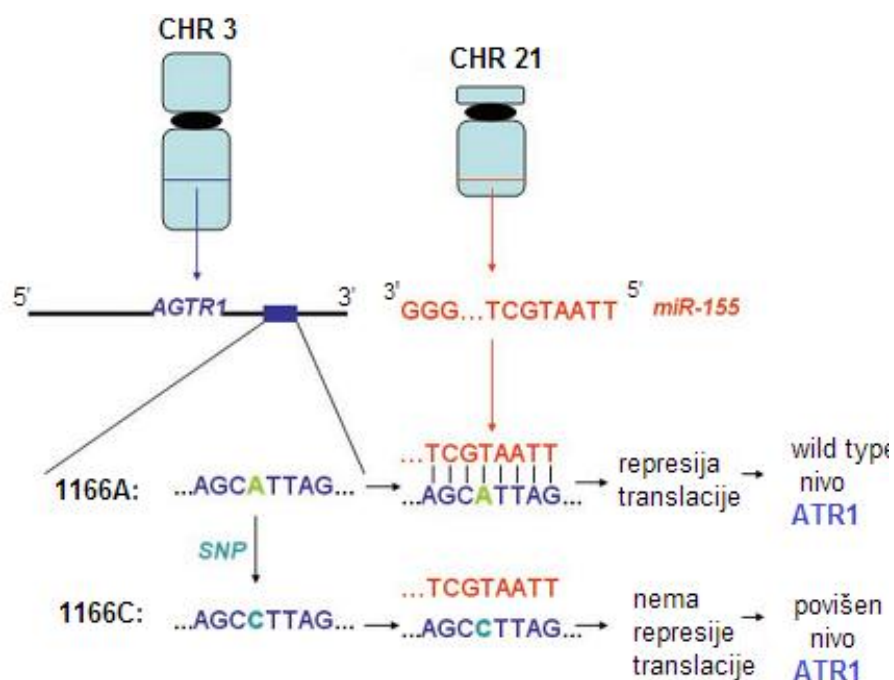
koji predviđaju mesta u 3'UTR regionu gena koja potencijalno interaguju sa mikroRNK i eksperimentalna potvrda ovih interakcija su objedinjeni u bazi podataka (TaRBase 4.0) (Sethupathy i sar., 2006a; Sethupathy i sar., 2006b; Kuhn i sar., 2008a). Tako je predviđeno da u 3'UTR regiona gena za ATR1 postoji 58 vezujućih mesta za mikroRNK (Sansom i sar., 2010). Međutim, jedna novija studija je po prvi put pokazala da i kodirajuće sekvence gena za ATR1 interaguju sa mikroRNK i da mogu da suprimiraju translaciju proteina (Elton i sar., 2008).

1.4.4.6.1 MikroRNK (miR-155) i postranskripciona regulacija ekspresije ATR1 sa miR-155 u kardiovaskularnim bolestima

Gen koji kodira za miR-155 kod čoveka je inicijalno identifikovan u B ćelijskim limfomima (Tam W, 2001; Lagos-Quintana i sar., 2002). Gen je mapiran na hromozomu 21 (Tam W, 2001). Sastoji se od 3 egzona i ima dužinu od 13 kb. Povećana ekspresija miR-155 je zabeležena u različitim vrstama malignih tumora, viralnim infekcijama i kardiovaskularnim bolestima (Faraoni i sar., 2009). Povišen nivo miR-155, uz smanjeni nivo ATR1 zabeležen je u tkivima srca i mozgu fetusa sa Daunovim sindromom (trizomija 21. hromozoma, Ts21) (Kuhn i sar., 2008b; Kuhn i sar., 2010; Sethupathy i sar., 2007). Ekspresija proteina ATR1 (detektovana u mononuklearima) je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom krvnog pritiska, a negativno sa ekspresijom miR-155 u grupi bolesnika sa esencijalnom hipertenzijom u ćelijama mononukleara (eng. *PMNs*) (Ceolotto i sar., 2011). MiR-155 je različito eksprimirana u pojedinim tkivima čoveka što sugeriše da ova mikroRNK specifično reguliše ekspresiju ATR1 na tkivno specifičan način (Martin i sar., 2006).

1.4.4.7. Polimorfizam A166C u genu za ATR1 i regulacija ekspresije gena za ATR1 u funkcionalnim studijama i kardiovaskularnim bolestima

U regionu 3'UTR gena za ATR1 detektovano je mesto za koje se vezuje miR-155 (Saunders i sar., 2007; Sethupathy i sar., 2007). Na tom mestu nalazi se polimorfizam A1166C (slika 1.10.).



Slika 1.10. Model molekularnog mehanizma asocijacije alela C polimorfizma A1166C sa hipertenzijom osoba sa Dunovim sindromom. Alel C polimorfizma A1166C u 3'UTR regionu gena za ATR1 ukida vezivanje miR-155 što indukuje povišen nivo ATR1 proteina. (modifikovano Sethupathy i sar., 2007).

Prisustvo alela A zadovoljava pravilo potpune komplementarnosti sa 5' krajem miR-155 (eng. *seed sequences rule*) u dužini od 7 bp. Suprotno tome, prisustvo alela C u genu prekida pravilan niz komplementarnih baza tako da se termodinamika formiranja dupleksa između miR-155 i iRNK značajno menja (Martin i sar., 2006). Funkcionalne studije su pokazale da transfekcija primarnih ćelija fibroblasta pluća čoveka sa miR-155 (eng. *gain of function mutation*) smanjuje endogenu ekspresiju ATR1 u poređenju sa netransfekovanim ćelijama (Martin i sar., 2006; Faraoni i sar., 2009). Kada su primarne GMC transfekovane sa inhibitorom miR-155 endogena ekspresija ATR1 i Ang II aktivacija ERK1/2 (ekstracelularnim signalom regulisane kinaze) je bila značajno

povećana, što sugerira da miR-155 ima fiziološku ulogu u regulaciji ekspresije ATR1 u ovim ćelijama (Martin i sar., 2006).

U *in vitro* studiji rađenoj na (embrionalnim ćelijama bubrega čoveka) gde su generisani konstrukti u koje su insertovani različiti regioni 3'UTR gena za ATR1 najniža luciferazna aktivnost je zabeležena kod alela A u odnosu na alel C i diletirani fragment 3'UTR gena (Sethupathy i sar., 2007). Prisustvo alela C može imati efekte na ekspresiju receptora jer narušava pravilo potpune komplementarnosti između miR-155 i 3'UTR tako da je tada nivo ekspresije receptora uvek bio veći nego kada je pravilo potpune komplementarnosti bilo ispoštovano (Martin i sar., 2006). Ekspresija miR-155 bila značajno manja kod genotipa CC (Ceolotto i sar., 2011).

Ovi rezultati pokazali su da miR-155 može smanjiti ekspresiju receptora inhibicijom translacije iRNK (Elton i sar., 2010). Povećanje ekspresije receptora ATR1 može biti udruženo sa nastankom ili progresijom KVB (Elton i sar., 2010).

1.4.4.8. Studije asocijacije genetičke varijante A1666C gena za ATR1 u kardiovaskularnim bolestima

Brojne su studije koje su ispitivale asocijaciju polimorfizma A1666C u genu za ATR1 sa koronarnom ili karotidnom aterosklerozom. Ove studije, međutim, nisu konzistentne, a rezultati koji divergiraju bi se mogli pripisati razlikama u dobi, polu, pripadnosti pojedinim populacijama ili etničkim grupacijama, ili različitim negenomskim i drugim spoljašnjim činiocima koji menjaju fiziološki efekat polimorfizma. Polimorfizam A1666C u genu za ATR1 je asociiran sa HT (Bonnardeaux i sar., 1994; Wang i sar., 1997; Kainulainen i sar., 1999; Wang i Staessen, 2000; Jiang i sar., 2001; Hindorff i sar., 2002; Ono i sar., 2003; Kobashi i sar., 2004; Palatini i sar., 2009). U našoj populaciji genotip CC bio je asociiran sa hipertenzijom samo kod muškaraca (Stanković i sar., 2003). Meta analiza asocijacije polimorfizma A1666C sa hipertenzijom, koja je obuhvatila, 16 474 individua pokazala je da nosioci alela C imaju veći rizik za razvoj hipertenzije (Niu i Qi, 2010).

U koronarnoj aterosklerozi ovaj polimorfizam je asociiran sa hipertrofijom u srcu (Osterop i sar., 1998; Makeeva i sar., 2004; Smilde i sar., 2007), infarktom miokarda (Tiret i sar., 1998; Amir i sar., 2009) i povećanim oksidativnim stresom u srčanoj

insuficijenciji (Cameron i sar., 2006). Meta analiza koja je obuhvatila 20 435 bolesnika sa koronarnom aterosklerozom koji su imali IM i 23 674 zdravih individua iz različitih svetskih populacija pokazala je da je polimorfizama A1166C u genu za ATR1 negativno asociran sa nastankom koronarne bolesti (Xu i sar., 2010). Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 je asociran sa smanjenom elastičnošću arterija (eng. *arterial stiffness*) (Benetos i sar., 1996; Lajemi i sar., 2001; Díez i sar., 2003; Plat i sar., 2009) i povećanom vaskularnom reaktivnošću na Ang II (Amant i sar., 1997; Van Geel i sar., 2000; Lim i sar., 2007). Studije koje su analizirale polimorfizam A1166C u karotidnoj aterosklerozi ispitivale su asocijaciju sa zadebljanjem intima medije (IMT) (Castellano i sar., 1996; Girerd i sar., 1998; Tabara i sar., 2001; Chapman i sar., 2001), sa stenozom karotida ($\geq 70\%$) (Sticchi i sar., 2011) i šlogom (Zhang i sar., 2011). Rezultati ovih studija pokazali su da polimorfizam nije asociran sa aterosklerozom karotida. Meta analiza koja je objedinila sve studije asocijacije ovog polimorfizma sa šlogom do 2011. godine u različitim populacijama Kavkazoida i Azijata je pokazala da u populaciji Kavkazoida nosioci redeg genotipa CC nemaju povećan rizik za nastanak šloga (Zhang i sar., 2011). Studije asocijacije polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa karotidnom aterosklerozom, komplikacijama u karotidnoj aterosklerozi i šlogom do sada nisu rađene u populaciji Srbije.

1.4.5. Angiotenzin II receptor tipa 2 (ATR2)

1.4.5.1. Molekulska struktura ATR2

ATR2 pripada superfamiliji GPVR sa hidrofobnim transmembranskim domenom i ekstracelularnim i intracelularnim domenima (Inagami T, 1999; Lazard i sar., 1994). ATR2 ima 7 transmembranskih domena, molekulska težinu od 41 kDa, sastoji se od 363 AK (Guthrie GP Jr., 1995; Unger i sar., 1996). To je glikoprotein koji ima 5 potencijalnih mesta glikozilacije u N-kraju, pri čemu je molekulska masa receptora povećana i nalazi se u rasponu od 60 do 113 kDa (Servant i sar., 1994). Zbog mogućih postranslacionih modifikacija za ATR2 je pokazano da neke ćelijske kulture eksprimiraju protein koji ima molekulska masu 80 kDa koja se smanjuje na 40 kDa posle tretmana N-glikozidazom (Kambayashi i sar., 1993). Druga intraćelijska petlja

receptora sadrži potencijalno mesto fosforilacije protein kinazom C (PKC), a na karboksilnom kraju tri konsenzus mesta fosforilacije PKC kinazom i jedno za fosforilaciju cAMP -zavisnom kinazom (Griendling i sar., 1996). U odnosu na receptor ATR1 razlikuje se po distribuciji, jer je tkivno specifičan, a vezivanjem liganda aktivira drugačije signalne puteve (De Gasparo i sar., 2000). Sa ATR1 deli 34 % sličnosti u strukturi aminokiselinske sekvence i sa sličnim afinitetom vezivanja za ligand Ang II (Wang i sar., 1995). Značajna razlika u strukturi između ova dva receptora je u trećoj intracelularnoj petlji i strukturi C-terminalnog repa (Wang i sar., 1995). U vezivanju za ligand učestvuje treća ekstracelularna petlja i transmembranski domeni (Volpe i sar., 2003).

1.4.5.2. Struktura gena za ATR2

Gen za ATR2 je mapiran na Xq22 hromozomu čoveka, dug je oko 5 kb i sadrži dva kratka 5' nekodirajuća egzona, 152 bp dugi intron 1, 1208 bp dugi intron 2 i egzona 3 u kojem se nalazi kompletna kodirajuća sekvenca (Martin i Elton, 1995).

Promotorski region gena za ATR2 je dug 1.5 kb i ima 90 % identičnosti nukleotidne sekvence sa promotorom gena kod miša (Ichiki i Inagami, 1995), pa se zbog te analogije mnoga regulatorna mesta opisana kod miševa i pacova, mogu primeniti kod čoveka.

U cilju ispitivanja da li gen za ATR2 čoveka sadrži potencijalno cis regulatorne elemente koji regulišu transkripciju, generisani su konstrukti promotora (-271/+100) i promotora sa različitom dužinom nizvodnih sekvenci gena: sa intronom 1, egzonom 2, intronom 2 i egzonom 3 do mesta translacionog starta (-271/+1593). Plazmid koji sadrži promotor i kompletan region koji se transkribuje sa egzona 3 je imao veću luciferaznu aktivnost u odnosu na kontrolni plazmid promotora što je ukazalo da uključivanje introna 2 sugerise na prisustvo pozitivnih *cis* regulatorinih elemenata (Warnecke i sar., 1999b).

1.4.5.3. Regulacija ekspresije ATR2 različitim faktorima

Ekspresija ATR2 zavisi od stimulusa (faktora rasta) i statusa (aktivan rast ili konfluentan sloj) u kojem se ćelije nalaze (Dudley i sar., 1991; Dudley i Summerfelt, 1993). Dodavanje seruma ili faktora rasta u medijum ćelija u konfluentnom stanju rapidno smanjuje ekspresiju receptora (Dudley i Summerfelt, 1993). Brojni faktori modulišu ekspresiju ATR2 (Ichiki i sar., 1995). U promotoru gena za ATR2 se nalaze mnogobrojne cis sekvence, vezujuća mesta za ove faktore, CCAAT vezujuće mesto za interleukin-1 β (IL-1 β), insulin odgovorno mesto, forbil estar, AP-1, AP-2 vezujuća mesta, C/EBP, NF-1, NF-L6, NF- κ B i vezujuća mesta za c-AMP (CRE-vezujuća mesta) (Martin i Elton, 1995).

1.4.5.4. Alternativne transkripcione varijante iRNK za ATR2 čoveka i njihova tkivna distribucija

Alternativnim iskrajanjem gena za ATR2 dobijaju se dve transkripcione varijante: duža koja sadrži sve egzone (1/2/3) i kraća koja sadrži egzon 1 i 3 (1/3). Tkivna distribucija alternativnih transkripcionih varijanti u tkivima čoveka do sada je opisana u tkivu srca sa infarktomiokarda i kardiomiopatijom (Wharton i sar., 1998; Warnecke i sar., 1999a), zatim u tkivu miometrijuma, miomu uterusa (Matsumoto i sar., 1996) i kongenitalnim anomalijama urinarnog trakta (eng. *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) (Stanković i sar., 2010). Transkripciona varijanta sa egzonima 1/2/3 je bila češće zastupljena od transkripcione varijante sa egzonima 1/3 (Wharton i sar., 1998; Warnecke i sar., 1999a; Warnecke i sar., 2005; Stanković i sar., 2010).

1.4.5.5. Regulacija ekspresije gena za ATR2 preko alternativnog iskrajanja

U eksperimentima funkcionalne karakterizacije transkripcionih varijanti ATR2, pokazano je da konstrukti sa sva tri egzona (1/2/3) imaju statistički značajno nižu luciferaznu aktivnost u odnosu na konstrukte sa egzonima 1 i 3 (Warnecke i sar., 1999a). Ovaj podatak se uzima u razmatranje kada se analizira ekspresija ATR2 u različitim patološkim stanjima, u različitim tkivima, kao mehanizam kojim se moduluše ekspresija receptora (Warnecke i sar., 2005). Slično kao i u genu za ATR1 u egzonu 2 je identifikovan start triplet u minicistronu od 42 bp koji se proteže i u 3. egzonu (Warnecke i sar., 1999a). Translacija sa ovog minicistrona rezultovala je peptidom od 14 AA koji bi mogao biti jedan od razloga inhibitornog efekta 2. egzona na ekspresiju transkripcionih varijanti ATR2 u reporter esejima (Warnecke i sar., 1999a).

1.4.5.6. Polimorfizam A/G -1332 (rs1403543) u genu za ATR2 i regulacija ekspresije

Analizom sekvence gena za ATR2 čoveka, u regionu gena -1590 i -1139 bp uzvodno od mesta inicijacionog starta translacije, detektovan je polimorfizam odnosno tranzicija azotnih baza A → G (A/G) na poziciji -1332 u intronu 1, ako se start kodon translacije računa počev od egzona 3 u kom se nalazi kompletan kodirajući region gena (Nishimura i sar., 1999). Sledeće godine isti polimorfizam opisan je ponovo samo sa drugom oznakom +1675 G/A, lociran na poziciji 29 bp pre početka egzona 2 ukoliko se azotne baze broje od početka egzona 1 (Erdmann i sar., 2000). Pretpostavka da polimorfizam reguliše različito alternativno iskrajanje iRNK, a samim tim ekspresiju gena je ukazala na potencijalnu funkcionalnost polimorfizma (Nishimura i sar., 1999). Na osnovu povećane luciferazne aktivnosti u konstruktima sa alelom G koja je bila statistički značajno viša u odnosu na one sa alelom A u ćelijskim linijama izvedena je pretpostavka da bi nosioci alela G mogli imati viši nivo ekspresije proteina (Warnecke i sar., 2005). Jedna od pretpostavki je i efikasnije procesovanje iRNK kod nosilaca alela G (Balmforth AJ, 2010).

1.4.5.7. Regulacija alternativnog iskrajanja preko polimorfizma A/G u intronu gena za ATR2

Analiza sekvence gena je pokazala da se polimorfizam nalazi u okviru 7 nukleotida duge konsenzusne sekvence, locirane na mestu formiranja tačke isecanja (eng. *lariat branch point*, BPS) u 1. intronu gena (Green MR, 1986; Nishimura i sar., 1999). U ćelijskim linijama, *in vitro* polimorfizam je imao efekte na alternativno iskrajanje iRNK za ATR2 i nivo ekspresije iRNK za ATR2 (Nishimura i sar., 1999), dok *in vivo* u nekim tkivima nije imao efekte ni na iskrajanje ni na ekspresiju gena (Warnecke i sar., 2005; Stanković i sar., 2010).

1.4.5.8. Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 i asocijacija sa kardiovaskularnim bolestima

Kontradiktorni rezultati su dobijeni u vezi asocijacije različitih alelnih oblika polimorfizma u patofiziološkim stanjima. Alel G je kod hipertenzivnih bio asociiran sa hipertrofijom leve komore kod muškaraca (Alfakih i sar., 2004), sa pojavom HT kod prerane koronarne bolesti i HT (Alfakih i sar., 2005), sa remodelovanjem srca uz unos natrijumovih soli kod muškaraca sa familijarnom istorijom koronarne bolesti (Kuznetsova i sar., 2004) i sa infarktom miokarda i koronarnom aterosklerozom (Alfakih i sar., 2007). U drugim studijama alel A je kod hipertenzivnih muškaraca bio asociiran sa remodelovanjem leve komore (Schmieder i sar., 2001; Ott i sar., 2007; Orłowska-Baranowska i sar., 2007), sa remodelovanjem srca kod starijih muškaraca (Herrmann i sar., 2002), sa HT i rizikom za rani nastanak bolesti srca (Jones i sar., 2003) i sa rizikom za koronarnu aterosklerozu i progresiju ateroskleroze (Tousoulis i sar., 2010). U nekim studijama kod osoba sa esencijalnom hipertenzijom i bolešću srca polimorfizam nije imao efekte na geometrijske parametre remodelovanja leve komore (Huber i sar., 2010). Studije asocijacije polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 sa karotidnom aterosklerozom, komplikacijama u karotidnoj aterosklerozi i šlogom do sada nisu urađene u populaciji Srbije.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Studija obuhvata genetičko-epidemiološku analizu polimorfizama u genima RAS (ACE, ATR1, ATR2) i analizu ekspresije gena RAS (ACE, ACE2, ATR1, ATR2, TMEM27) i mikroRNK (miR-155), koja reguliše ekspresiju ATR1, u patogenezi karotidne ateroskleroze, u okviru ciljne grupe ispitanika iz Srbije. Studija se bazira na sledećoj hipotezi: geni RAS kod čoveka su uključeni u procese nastanka i progresije ateroskleroze i predstavljaju potencijalne pokazatelje nastanka i/ili komplikacije ateroskleroze (tip aterosklerotskog plaka i pojava i vrsta kliničkih simptoma bolesti). Hipoteza će biti proverena na tri načina: 1) analizom asocijacije polimorfizama u genima za RAS sa nastankom i komplikacijama karotidne ateroskleroze i 2) analizom asocijacije nivoa ekspresije gena RAS (na nivou iRNK i proteina) u tkivu aterosklerotskog plaka čoveka sa nastankom i kliničkim parametrima bolesti i 3) analizom asocijacije polimorfizama (I/D u genu za ACE, A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2) sa nivoom ekspresije gena i proteina RAS i polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa nivoom ekspresije regulatorne mikroRNK (miR-155)).

Postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Utvrditi učestalost alelnih formi i genotipova polimorfizama u genima RAS (I/D u genu za ACE, A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2) u grupi pacijenata sa karotidnom aterosklerozom (KA)
2. Utvrditi da li su ispitani polimorfizmi asociarani sa nastankom KA.
3. Utvrditi da li su polimorfizmi u asocijaciji sa kliničkim i biohemijskim parametrima karotidne ateroskleroze.
4. Utvrditi, kvantifikovati i analizirati ekspresioni nivo iRNK za ACE, ACE2, ATR1, ATR2, kolektin (TMEM27) u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i kontrolnom tkivu arterije, kao i u odnosu na različite tipove aterosklerotskog plaka.
5. Kvantifikovati i analizirati ekspresioni nivo iRNK za ACE i ATR1 u odnosu na genotipove polimorfizama I/D u genu za ACE i A1166C u genu za ATR1.
6. Utvrditi i kvantifikovati ekspresioni nivo mikroRNK (miR-155), koja reguliše ekspresiju ATR1, u odnosu na genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1 i različite tipove plaka.

Ciljevi istraživanja

7. Utvrditi ekspresioni nivo proteina ATR1, ATR2, ACE i ACE2 u tkivu aterosklerotskog plaka i kvantifikovati ih u odnosu na različite tipove aterosklerotskog plaka.
8. Kvantifikovati ekspresioni nivo proteina ATR1 u odnosu genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1 i ekspresioni nivo proteina ATR2 u odnosu genotipove polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Genetičko-epidemiološka studija analize učestalosti ispitivanih polimorfizama DNK u genima RAS sistema kod čoveka i njihove asocijacije sa nastankom i progresijom KA uključila je zdrave individue (kontrolna grupa) i pacijente ukupno (n=512), koji su prema kliničkim i laboratorijskim podacima klasifikovani od strane lekara kao pacijenti sa KA. Jedna grupa pacijenata je u periodu od 2004. do 2005. godine lečena na Klinici za vaskularnu hirurgiju, Instituta za kardiovaskularne bolesti Dedinje u Beogradu, Srbija (n=117). Druga grupa je u periodu od 2006. do 2007. godine lečena na Vojnomedicinskoj Akademiji u Beogradu, Srbija (VMA) (n=79). Treća grupa pacijenata lečena je na Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije (IKVB KCS) u Beogradu, Srbija (n=316). Od svih pacijenata uzeti su uzorci pune periferne krvi iz koje je izolovana DNK, a od njih 270 i tkivo aterosklerotskog plaka. Svi ispitivani pacijenti su Kavkazoidi, srpskog porekla.

Kontrolna grupa za populacionu studiju ispitivanih polimorfizama DNK obuhvatila je zdrave pripadnike srpske populacije (n=285), nasumično izabrane prilikom kontrolnog zdravstvenog pregleda na teritoriji Beograda, starosti od 18 do 80 godina. Od svake osobe uključene u ovu studiju dobijen je pristanak za učešće, uzeti su lični i anamnestički podaci obuhvaćeni upitnikom i uzorci pune periferne krvi za izolaciju DNK. Biohemijske analize urađene su na medicinskim ustanovama u kojima su pacijenti lečeni.

Genetičko-epidemiološka studija analize učestalosti ispitivanih polimorfizama DNK u genima RAS sistema i njihove asocijacije sa nastankom i progresijom karotidne ateroskleroze između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa aterosklerozom karotida je za navedene polimorfizme uključila: za polimorfizam I/D u genu za ACE (246 genotipizovanih kontrola, za polimorfizam A1166C u genu za ATR1 212 i za polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 207 genotipizovanih kontrola) koje su poredene sa 505 pacijenata sa dijagnostikovanom KA. Genetičko-epidemiološka analiza učestalosti ispitivanih polimorfizama u odnosu na tip aterosklerotskog plaka je uključila

298 pacijenata sa stabilnim aterosklerotskim plakom (SAP) i 113 pacijenata sa fenotipom nestabilnog aterosklerotskog plaka (NAP).

U analizi ekspresionog nivoa iRNK za komponente RAS, ACE i kolektrin (TMEM27) u tkivu karotidnog plaka obuhvaćeno je 61 pacijent sa dijagnostikovanom karotidnom aterosklerozom. Od toga, broj pacijenata muškog pola bio je 42 (68.85 %), a 19 (31.15 %). Analiza ekspresije iRNK za ATR1 obuhvatila je 23 pacijenta i to 13 pacijenata (56.52 %) i 8 pacijentkinja (34.78 %). Analiza ekspresije iRNK za ACE2, kao i relativnog nivoa odnosa ekspresije iRNK za ACE i ACE2 obuhvatila je 26 pacijenata sa KA, od togabroj pacijenata muškog pola bio je 17 (65.38 %), a žena 9 (34.62 %).

Za analizu ekspresije mikroRNK (miR-155) u tkivu karotidnog plaka obuhvaćeno je 27 pacijenata sa dijagnostikovanom karotidnom aterosklerozom. Od toga, broj pacijenata muškog pola bio je 14 (51.85 %) , a žena 13 (48.15 %). Po tipu oboljenja podeljeni su na dve podgrupe: pacijenti sa fenotipom stabilnog aterosklerotskog plaka (SAP) i komplikovanim (nestabilnim) plakom (NAP). Uzorci tkiva aterosklerotskog plaka korišćeni u ovoj studiji dobijeni su tokom operacija karotidne endarterektomije u toku 2008. godine izvedenih na IKVB. Kao kontrola korišćena je komercijalna cDNK zdravog tkiva arterije bez znakova ateroskleroze, osobe muškog pola stare 68 godina, proizvedene od strane firme (*BioChain, CA, SAD*).

Analiza ekspresije proteinskog nivoa komponenti RAS u lizatima tkiva aterosklerotskih plakova obuhvatila je 8 uzoraka sa KA. ACE2, ATR1 i ATR2 detekovani su i analizirani u odnosu na beta aktin. ACE je u ukupnom lizatu tkiva aterosklerotskog plaka detektovan, ali nije normalizovan u odnosu na beta aktin te stoga nije uzet u analizu.

Genetičko-epidemiološka analiza polimorfizama DNK, kao i ekspresiona analiza RNK urađeni su u Laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu Genetiku, Instituta "Vinča", Beograd, Srbija.

Detekcija proteina RAS sistema (ACE2, ATR1, ATR2) u proteinskim lizatima aterosklerotskih plakova urađena je u Laboratoriji za Molekularnu biologiju i Endokrinologiju, Instituta "Vinča", Beograd, Srbija.

3.2. METODE

3.2.1. Ultrazvučna karakterizacija plaka

Karakterizacija karotidnih aterosklerotskih plakova vršena je ultrazvučnim pregledom, koji daje dvodimenzionalni slikovni prikaz tzv. B-mode, dopunjen kolorom i pulsni doplerom, korišćenjem aparata Toshiba, Power Vision 6000, 7.5 Mhz (*Riverside, CA*). Doplerografski pregled levih i desnih karotidnih arterija ima dva aspekta merenja: morfološki i funkcionalni. Ultrazvučni pregled omogućava ne samo kvantitativnu analizu plaka (dužina, širina, debljina, stepen stenozе lumena) već i kvalitativnu analizu plaka, građu plaka, površinu plaka, prisustvo tromba). Na osnovu ove analize može se procenti koliko je plak rizičan za pojavu cerebrovaskularne bolesti i da li postoji indikacija za hirurško odstranjivanje (endarterektomiju).

U funkcionalnom smislu pregled daje informacije o karakteristikama protoka krvi koji se može videti u sklopu analize spektra frekvencija i pulsnoг talasa u određenim delovima krvnog suda, u longitudinalnom i transferzalnom preseku. Morfološki aspekt podrazumeva utvrđivanje osobina toka krvi i širine krvnog suda, osobine granjanja (bifurkacije), izgled intime, merenje zadebljanja intima-medije i utvrđivanje eventualnog prisustva aterosklerotskih promena. Pored toga mogu se konstatovati poremećaji toka krvi usled elongacije, krivudavosti (tortuoznosti) ili angulacija (kinking) krvnih sudova. U sagledavanju morfologije aterosklerotskih promena unutar zida krvnog suda odnosno plaka bitno je da se utvrde njegove karakteristike i izmeri stepen stenozе istog. Aterosklerotska suženja su najčešće nalaze u području bifurkacije zajedničke karotidne arterije (CCA) i u početnom segmentu unutrašnje karotidne arterije (ICA). Istraživanje plakova je obuhvatalo distalni deo zajedničke karotidne arterije u dužini od 2 cm (CCA), karotidni bulbus i proksimalni deo unutrašnje karotidne arterije (ICA) u dužini od 2 cm na levoj i desnoj strani vrata.

Plak je definisan kao lokalizovana eho-struktura koji zalazi u lumen krvnog suda i pravi suženje protoka. Pri tom rastojanje između spoja medija-adventicije i površine lezije okrenute lumenu iznosi više od 1.2 mm. Sa povećanjem stepena stenozе struktura plaka postaje više heterogena. Klasifikacija plakova vršena je na osnovu ultrazvučnog pregleda, prema stepenu ehogenosti, unutrašnjoj strukturi i morfologiji. Ehogenost plaka

zavisi od njegovog sastava, usled nakupljanja depozita lipida, fibroznog tkiva, taloženja kalcijuma (prisustva/odsustva kalcifikakata) i prisustva hemoragija. Anehogeni i hipohogeni regioni plaka mogu predstavljati hemoragije, depozite lipida ili nekrotične promene (meko tkivo). Plakove višeg stepena ehogenosti odlikuje veći stepen kalcifikacije. Plakovi mogu da budu homogeni (ujednačene homogene strukture, uniformne ćelijske strukture i glatke površine) ili heterogeni (neujednačne, heterogene eho strukture). Heterogeni plak odlikuje kompleksna ehogena struktura usled prisustva depozita lipida, kalcifikacije ili hemoragije unutar plaka. Lipidni plak je hipo- ili anehogen, fibrozni izo-/hiperehogen bez kalcifikacija, fibrokalcifikovan je hiperehogen sa punktifornim kalcifikacijama, a kalcifikovani onaj kada je više od polovine ili cela površina prekrivena kalcifikatom (Savić i sar., 2010). Na osnovu morfologije plaka, njegove strukture, površine i stepena ehogenosti i/ili eholucentnosti procenjena je aktivnost unutar plaka odnosno njegova stabilnost (European Society of Vascular Surgeons, European Carotid Plaque Study Group, 1995, 2011; Montauban van Swijndregt i sar., 1998; Lammie i sar., 2000; Grønholdt i sar., 2001; Grønholdt i sar., 2002; Cho i sar, 2012). Stoga su plakovi podeljeni u dve podgrupe: nekomplikovane stabilne (ujednačene homogene eho strukture) (SAP) (Widder i sar, 1990) i komplikovane nestabilne (neujednačne, heterogene eho strukture) (NAP) (Gray-Weale i sar., 1988; European Carotid Plaque Study, 1995, 2011). Pored unutrašnje strukture, važan je i izgled površine plaka. Površina plaka može biti glatka, ili narušena ulceracijom (fokalnim depresijama). Kriterijum za ulceraciju plaka je defekt površine i strukture veći od 2 mm. Ulceracije (odvajanje delova plaka; lipidnog jezgra plaka toku krvi; engl. *echoreflexive surface of the plaque*) mogu biti rizik za nastanak šloga. Plakovi glatke površine bez eholucentnog materijala su označeni kao stabilni (Widder i sar, 1990), dok su plakovi kod kojih je egzulcerisana površina (usled ulceracija na mestima gde je došlo do odvajanja lipidnog dela plaka) (European Society of Vascular Surgeons, European Carotid Plaque Study Group, 1995, 2011) ili preovlađuje eholucentni materijal usled hemoragije predstavljaju nestabilne plakove (Grønholdt ML, 1999).

Procena stepena stenozije je urađena merenjem rezidualnog lumena krvnog suda na mestu stenozije i dijametra normalnog dela krvnog suda, po ECST kriterijumima (eng. *European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group*, ECST) kod pacijenata

lečenih u IKVB Dedinje i NASCET kriterijumima (eng. *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*, NASCET) kod pacijenata lečenih u IKVB KCS. Kriterijum za merenje stepena stenozе krvnog suda prema ECST je poređenje odnosa dijametra rezidualnog lumena sa procenjenim dijametrom karotidnog bulbosa, a prema NASCET se uzima u obzir odnos dijametra rezidualnog lumena i dijametra distalnog normalnog segmenta ICA (Wardlow i Lewis., 2005). U slučajevima kada distalni deo normalnog segmenta unutrašnje karotidne arterije nije očuvan arterija je okarakterisana sa stepenom stenozе od 95 %. Stepен stenozе od 70 % po NASCET je isto što i stepен stenozе od 85 % po ECST kriterijumima (Rothwell i sar., 1994). Uzumajući u obzir razliku u načinu procene stepena stenozе prema navedenim kriterijuma, radi adekvatne i korektnе kvantifikacije stepena stenozе, kod svih pacijenata sa dijagnostikovanom aterosklerozom karotida, utvrđene su ekvivalentne vrednosti ukupnog stepena stenozе, merene doplersonografom, prema formuli:

$\% \text{ ECST} = 0,6 \times \% \text{ NASCET} + 40 \%$ (Rothwell i sar., 1994; Donnan i sar., 1998; Wadlaw i Lewis, 2005).

3.2.2. Izolacija i merenje koncentracije DNK iz ćelija krvi

Izolacija DNK iz 5mL krvi čoveka, uzete sa antikoagulansom (Na-citrat ili EDTA), rađena je na dva načina: metodom po Kunkel-u (Kunkel i sar., 1977) i po protokolu za izolaciju DNK na aparatu Abi Prism TM 6100 Nucleic Acid Prepstation (*Applied Biosystems, SAD*).

Merenje koncentracije izolovane DNK

Koncentracija DNK u $\mu\text{g/mL}$ je izračunata iz odnosa:

$A_{260} \times \text{razblaženje u kivetu (100)} \times \text{dužina svetlosnog puta u kivetu u cm (1 cm)} \times \text{faktor apsorpcije za dvolanačanu DNK (50)} / 1000$.

3.2.3. Genotipizacija polimorfizama DNK *in vitro* (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metoda enzimske amplifikacije specifičnih segmenata DNK *in vitro*. Zahteva izuzetno male količine početnog materijala DNK, a reakcija se izvodi pomoću termostabilnog enzima, DNK polimeraze. Umnoženi fragmenti se seku upotrebom komercijalno dostupnih restrikcionih endonukleaza, enzima koji prepoznaju specifične sekvence DNK koje najčešće obuhvataju polimorfno mesto, radi razlikovanja genotipova polimorfizama u genu od interesa (eng. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP metoda).

3.2.3.1. Genotipizacija polimorfizma I/D u genu za ACE reakcijom amplifikacije DNK *in vitro*

Protokol:

Određivanje inserciono/delecionog polimorfizma u genu za ACE rađeno je po prethodno dizajniranoj metodi (Stanković i sar., 1999). Oligonukleotidi korišćeni pri detekciji ovog polimorfizma prikazani su u tabeli 3.1. Komponente PCR reakcije, rađene u 20 µl smeše prikazane su u tabeli 3.2. Svaka serija uzoraka sadržala je obaveznu negativnu (bez DNK) i pozitivnu kontrolu (DNK sa poznatim genotipom).

Tabela 3.1 Oligonukleotidi upotrebljeni za genotipizaciju ACE I/D polimorfizma

Oznaka polimorfizma	Sekvenca amplimera	Oznaka amplimera	Referenca
ACE I/D	5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	SA66	Stanković i sar., 1999
	5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	167	
	5'TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'	ACE3	

U tabeli 3.1 prikazane su sekvence amplimera korišćenih u genotipizaciji polimorfizma I/D u genu za ACE.

Tabela 3.2 Komponente PCR-a za detekciju I/D polimorfizma u genu za ACE

Komponente PCR-a	Finalna koncentracija	Zapremina (μL)
Pufer za PCR (10x)	1x	2
MgCl_2	3.25mM	2.6
DMSO	5 %	1
dNTP	0.25mM	4
Amplimer SA66	0.35 μM	1 (7pmol)
Amplimer 167	1 μM	2 (20pmol)
Amplimer ACE3	0.075 μM	1 (1.5pmol)
Genomska DNK	0.6 μL (200ng)	
Taq polimeraza (0.5U/ μL)	1 μL	
ddH ₂ O	6.4 μL	
ukupno	20 μL	

U tabeli 3.2 prikazane su komponente reakcione smeše PCR reakcije korišćenih u detekciji polimorfizma I/D u genu za ACE

Temperaturni profil PCR reakcije bio je: inicijalna denaturacija 95 °C 3 min; u sledećih 30 ciklusa denaturacija 93 °C 1 min, hibridizacija 65 °C 1.5 min i ekstenzija 72 °C 1.5 min i finalna ekstenzija 74 °C 4 min.

3.2.3.2. Genotipizacija polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2 u jednoj tubi reakcijom amplifikacije DNK in vitro

Prethodno dizajnirana alel specifična metoda za detekciju polimorfizma A1166C u genu za ATR1 je redizajnirana (Stanković i Alavantić, 2002). Ideja metode korišćene u ovoj studiji je bila da se oba polimorfizma, u genima za ATR1 i ATR2 detektuju u jednoj reakciji kako bi se smanjilo vreme i troškovi procesa genotipizacije. Metoda za genotipizaciju polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2 je osmišljena tako da se fragmenti DNK u kojima se nalaze polimorfna mesta u oba

ispitivana gena amplifikuju u jednoj PCR reakciji u istoj tubi (Živkovic i sar., 2005). Oligonukleotidi korišćeni pri detekciji ovih polimorfizama prikazani su u tabeli 3.3. Komponente za PCR reakciju rađenu u 25 µl smeše za detekciju oba polimorfizma prikazane su u tabeli 3.4.

Tabela 3.3 Sekvence amplimera korišćenih za genotipizaciju polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2.

Oznaka polimorfizma	Sekvenca amplimera	Referenca
A1166C	5'-GCAGCACTTCACTACCAAATGGGC-3' AGTR1F 5'-CAGGACAAAAGCAGGCTAGGGAGA-3' AGTR1R	Berge i Berg, 1998
A/G -1332	5'-GGA AGGTAGAACATACATTAAATG-3' AT2S1 5'-AGAGAAACAGCAGCTAAAGAATT-3' AT2AS	Živkovic i sar., 2005

U tabeli 3.3 prikazane su sekvence amplimera korišćenih u genotipizaciji polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2

Tabela 3.4 Komponente PCR-a za detekciju A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2

Komponente PCR-a	Finalna koncentracija	Zapremina (μL)
Pufer za PCR (10x)	1x	2.5
MgCl_2	3.5 mM	3
dNTP	0.125 mM	4
Amplimer AGTR1F	0.44 μM	1.1 (11 pmol)
Amplimer AGTR1	0.44 μM	1.1 (11 pmol)
Amplimer AT2S1	0.8 μM	2 (20 pmol)
Amplimer AT2AS	0.8 μM	2 (20 pmol)
Genomska DNK	0.6 μL ~ (200 ng)	
Taq polimeraza (5U/ μL)	0.4 μL	
ddH ₂ O	8.3 μL	
ukupno	25 μL	

U tabeli **3.4** prikazane su komponente reakcione smeše PCR reakcije korišćenih u detekciji polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2

Temperaturni profil PCR reakcije bio je: inicijalna denaturacija 94°C 3 min; u sledećih 30 ciklusa denaturacija 94 °C 45 s, hibridizacija 58 °C 45 s, i ekstenzija 72 °C 45 s i finalna ekstenzija 72°C 5 min. Svaka serija uzoraka sadržala je obaveznu negativnu kontrolu (bez DNK) i pozitivnu kontrolu (DNK sa poznatim genotipom).

3.2.4. Restrikciona analiza sintetisanih fragmenata (RFLP)

Restrikcijom analizom sintetisanih fragmenata DNK, korišćenjem restrikcioničkih enzima *HaeIII* i *EcoRI*, utvrđeni su genotipovi polimorfizama DNK A1166C u genu za ATR1 i A/G -1332 u genu za ATR2. Ređi alel C polimorfizma A1166C uvodi restrikciono mesto koje prepoznaje enzim *HaeIII*. U slučaju prisustva alela C dobija se fragment od 233 bp, dok je nesečeni fragment u slučaju prisustva alela A (255 bp). Za određivanje genotipa polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 korišćen

je restrikcioni enzim *EcoRI* koji u slučaju prisustva ređeg alela G prepoznaje specifično restrikciono mesto i seče sintetisani fragment DNK. U slučaju prisustva alela A ne dolazi do digestije PCR produkta od 120 bp, a u slučaju prisustva alela G dobijaju se fragmernti od 91 bp i 29 bp. Pošto su fragmenti DNK za oba polimorfizma sintetisani u istoj tubi jednom PCR reakcijom, radi daljeg pojednostavljivanja metode genotipizacije, urađena je i dupla restrikciona digestija u istoj tubi. Enzimi korišćeni za genotipizaciju imaju optimalnu aktivnost na 37 °C, a digestioni pufer je odabran tako da oba enzima imaju maksimalnu efikasnost delovanja u reakciji.

3.2.5. Izolacija, merenje i provera kvaliteta ukupne ćelijske RNK

3.2.5.1. Izolacija ukupne ćelijske RNK iz karotidnog aterosklerotskog plaka

Ukupna RNK izolovana je iz tkiva i pripremljena za RT-PCR. Protokol opisuje proceduru izolacije RNK iz tkiva korišćenjem metode sa TRI Reagent-om po protokolu proizvođača (*Ambion, SAD*). Provera kvaliteta izolovane RNK urađena je po standardnoj proceduri na formaldehidnom gelu.

3.2.6. Obrada uzorka RNK i reverzna transkripcija

Uzorci izolovane RNK tretirani su endonukleazom DNKaza I po protokolu proizvođača (*Fermentas, Lithuania*), pre reakcije reverzne transkripcije, kako bi se uklonili jednolančani i dvolančani molekuli DNK. Reverzna transkripcija (RT-PCR) urađena je po protokolu proizvođača (*RevertAid first strand cDNA synthesis kit, Fermentas, Lithuania*). Za RT-PCR korišćeni su oligo-dT amplimeri, zato što selektivno reverzno prevode poli (A)+RNK i minimizuju nespecifične amplifikacije koje su asociirane sa RT-PCR-om u kojoj se koriste nasumični amplimeri (Goswami i sar., 1997).

3.2.7. Detekcija iRNK za ACE, ACE2, ATR1, ATR2, kolektrin (TMEM27) i miR-155 amplifikacijom određenih molekula cDNK (Real-time PCR)

Provera prisustva određenog molekula cDNK vršena je umnožavanjem cDNK ciljnog regiona pomoću, PCR sa amplimerima i probom specifičnom za spoj dva egzona u ciljnom genu. U ovoj studiji je za detekciju, kao i za relativnu kvantifikaciju transkripata u ispitivanim genima korišćena metoda PCR-a u realnom vremenu (eng. *Real-time PCR*). Komercijalni eseji koji su korišćeni u studiji za detekciju potencijalno eksprimiranih transkripata za ACE, ACE2, ATR2 i kolektrin (TMEM27) su: Hs00174179_m1, Hs00222343_m1, Hs00169126_m1, Hs00252907_m1 (*Applied Biosystems, SAD*) i za 18S Hs99999901_s1 (*Applied Biosystems, SAD*). Komercijalni eseji koji su korišćeni za detekciju potencijalno eksprimiranih transkripata za ATR1 su bili sledeći: Hs00259315_m1 (Varijanta 4), Hs00241341_m1 (Varijanta 2 i 3) i Hs01096942_m1 (Varijanta 1) (*Applied Biosystems, SAD*) (slika 3.1). Kao kontrola korišćena je komercijalna cDNK izolovana iz normalne arterije bez znakova ateroskleroze, Cat No. C1234013-10, *BioChain, SAD*. Komercijalni eseji korišćeni za detekciju mikroRNK u tkivu plaka su Hsa-mir-155 za miR-155 i endogena kontrola za malu nukleolarnu RNK (eng. *small nucleolar RNK, snoRNK*), RNU44 (*Applied Biosystems, SAD*).



Slika 3.1 Šematski prikaz lokacija komercijalnih proba/prajmera u kodirajućoj sekvenci gena za ATR1 koji su korišćeni za detekciju potencijalno eksprimiranih transkripata iRNK za ATR1. Kataloški brojevi proba/prajmera korišćenih u reakciji: Hs00259315_m1, Hs00241341_m1 i Hs01096942_m1 (*Applied Biosystems, SAD*). Probe i prajmeri su dizajnirani od strane proizvođača i nalaze se na granici egzona: i to sens prajmer je komplementaran 5' kraju egzona, a antisens 3' kraju egzona, dok je proba između prajmera.

3.2.8. WESTERN BLOT

3.2.8.1. Priprema uzoraka tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka za izolaciju proteina

Uzorci tkiva aterosklerotskih plakova dobijenih neposredno sa operacija karotidne endarterektomije su odloženi u tečni azot, a zatim na temperaturi od -70°C i tako čuvani do trenutka izolacije proteina. Otopljeni uzorci tkiva aterosklerotskih plakova (100 mg tkiva) su usitnjeni i homogenizovani na ledu u RIPA puferu (50 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 % natrijum-deoksiholat, 0.1 % natrijum-dodecil sulfat (SDS), 1% Triton X-100) u koji je dodat koktel proteaznih inhibitora (2 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin), neposredno pred rad korišćenjem Ultra-

Turrax homogenizera (Dupont i sar., 1998). Zapremina RIPA pufera u kojoj je tkivo homogenizovano bila je 500 µl. Homogenati su centrifugirani 30 min na 13 000 g na temperaturim od 4°C, a zatim su odliveni supernatanti centrifugirani još jedanput na 13 000 g 20 min na temperaturim od 4°C. Višak lipida u vidu sloja na površini supernatanta je uklanjan nastavkom pipetora.

Supernatanti, koji predstavljaju ukupni ćelijski lizat, korišćeni su za Western blot. Uzorci koji su spremljeni za Western Blot skuvani su 5 min na 100 °C u jednakoj zapremini 2 x Laemmli pufera i čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je kolorimetrijskom metodom, korišćenjem komercijalnog kompleta BCA (Smith i sar., 1985). Koncentracija ukupnih proteina očitavala se sa standardne krive, konstruisane na osnovu izmerenih vrednosti apsorbaneci poznatih koncentracija BSA (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 i 2 mg/ml).

3.2.8.2. *Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)*

Kao prvi korak u imuno-blot proceduri primenjena je diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Ova specifična elektroforetska tehnika obezbeđuje razdvajanje proteinskih frakcija u uzorku na osnovu njihove molekulske mase (Laemmli UK, 1970). Kao molekulski marker korišćen je proteinski marker za elektroforezu ProteinPlus Prestained Ladder, koji sadrži 6 proteina različitih molekulskih masa (130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa i 10 kDa, *Fermentas, Vilnius, Lithuania*). Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu.

Imuno blot (Western blot)

Identifikacija ispitivanih proteina u uzorcima vršena je primenom specifičnih antitela. Membrane su inkubirane preko noći na 4° C, sa primarnim antitelima (kozjim poliklonskim antitelima) na epitop na C-terminusu za ACE- (C-20)-sc-12187 i C-terminusu za ACE2-(C-18) (sc-17720) (*Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*) i (zečijim poliklonskim antitelima) za ATR1 i ATR2 i to: AT1-N-10-sc-1173 (*Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*) sa epitopom na N-terminus i AT2R-ab19134-(Abcam, Cambridge, GB) sa epitopom na poziciji počev od 349. do 363. aminokiseline koji odgovara receptoru pacova. Razblaženja primarnih antitela su bila sledeća: ACE, ACE2, ATR1 (1:250), ATR2 (1:5000) u TBST-u. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 5 x 5 min TBST puferom na sobnoj tempearturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1.5 h, uz mešanje, sa sekundarnim anti- zečijim odnosno anti-kozjim antitelom (*Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*) konjugovanim sa peroksidazom rena (eng. *Horseradish Peroxidase*, HRP) (razblaženje 1: 10 000 TBST) ili alkalnom fosfatazom (eng. *Alkaline Phosphatase*, ALP) (razblaženje 1: 5000, TBST). Nakon inkubacije, membrane su ispirane 5 x 5 min u TBST-u. Radi vizuelizacije traka, na membrane je nanošen supstrat za hemiluminiscenciju (eng. *enhanced chemiluminescence*, ECL) (*Amersham Biotech, Pittsburgh, PA, SAD*) ili supstrat za alkalnu fosfatazu (BCIP/NBT).

Intenziteti signala, odnosno koncentracije ispitivanih proteina, određivane su denzitometrijski. Filmovi su skenirani, a optička gustina detektovanih proteinskih traka kvantifikovana je pomoću računarskog program Image J 1.37 V. software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

3.2.9. Statistička obrada podataka

Učestalosti genotipova i alela određene su metodom prebrojavanja (eng. *gene counting method*). Za ispitivanje slaganja distribucija dobijenih učestalosti genotipova u populaciji sa očekivanim vrednostima, po *Hardy-Weinberg*-ovoj ravnoteži (HWE), korišćen je χ^2 test. Normalna distribucija parametara sa kontinualnim vrednostima testirana je Kolmogorov-Smirnov-im testom sa Lilliefors-ovom korekcijom. Za utvrđivanje razlike srednjih vrednosti kontinualnih parametara između dve grupe koji su u normalnoj raspodeli korišćen je Studentov t-test za nezavisne uzorke, ili neparametrijski Man-Vitni U test (eng. *Mann-Whitney*), za varijable čije vrednosti nisu u normalnoj raspodeli. Vrednosti fenotipskih varijabli su predstavljene brojčano i procentualno, ili kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (SV \pm SD). Analiza razlike u distribuciji učestalosti genotipova između posmatranih grupa rađena je Pirsonovim χ^2 testom. Analiza asocijacije genotipova i kombinacija genotipova sa fenotipom rađena je univarijantnom regresionom analizom, praćena multivarijantnom regresijom. Mera asocijacije genotipova sa fenotipom od interesa izražena je kao korigovani odnos šansi OR (eng. *odds ratio*) sa intervalom pouzdanosti 95 % (eng. *confidence interval*, \pm 95% CI). Sve statističke analize su urađene korišćenjem programskog paketa STATISTICA 8.0 Software (<http://www.statsoft.com>).

Kvantitativna analiza genske ekspresije je rađena u programu REST (*REST Software, QIAGEN*) (Pfaffl i sar., 2002) na osnovu odgovarajućih ulaznih vrednosti: Ct i efikasnosti PCR amplifikacije za svaki ispitivani gene i endogenu kontrolu u okviru ispitivanih grupa uzoraka. Cilj primene programa REST08 je da se utvrdi da li postoji značajna razlika u ekspresiji odgovarajućeg gena između grupe ispitivanih uzoraka i grupe kontrola, uzimajući u obzir efikasnost reakcije i normalizaciju na referentni gen-endogenu kontrolu. Testiranjem hipoteze provereno je da li je rezultat statistički značajan, na osnovu vrednosti p ($p < 0,05$ predstavlja značajnu razliku). U relativnoj kvantifikaciji genske ekspresije vrednosti su normalizovane na nivo ekspresije endogene kontrole RNU44, male nukleolarne RNK koja u tkivima čoveka ima relativno stabilnu ekspresiju (Kiss T, 2002) i u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (Raitoharju i sar., 2011). Kvantitativna analiza ekspresije gena RAS i miR-155 urađena

je u programu GraphPad (<http://www.graphpad.com>) metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen i Livak, 2008).

4. REZULTATI

4.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE KONTROLNOG UZORKA UZORKA PACIJENATA SA KAROTIDNOM ATEROSKLEROZOM (KA)

Tabela 4.1. Osnovne karakteristike kontrolnog uzorka i uzorka pacijenata sa karotidnom aterosklerozom (KA)

Parametar	Kontrolna grupa	Pacijenti sa KA	p
Pol m/ž n (%)	144 (50.53) /141(49.47)	322 (62.89) /190 (37.11)	<0.001
Dob (godine) *	40.74±14.82	66.52±9.25	<0.001
Pušački status n (%)	148 (51.93)	305 (59.58)	<0.001
Hipertenzivni status	33 (11.58)	358 (69.92)	<0.001
BMI (kg/m ²)*	24.17 ± 3.56	26.26 ± 3.15	<0.001
Ukupni holesterol (mmol/L)*	5.85±1.37	5.82 ±1.53	ns
LDL-C (mmol/L)*	3.69±1.11	3.74±1.09	ns
HDL-C (mmol/L)*	1.32±0.36	1.20±0.35	<0.001
Trigliceridi (mmol/L)*	1.56±1.25	1.99±2.13	<0.001
Lp (a) mg/dL *	20.91±22.61	45.24±42.34	<0.001
Ukupno (n)	285	512	

Vrednosti kontinualnih varijabli su prikazane kao srednje vrednosti±standardna devijacija (SD); diskretne varijable su prikazane brojačno i procentualno (%); statistička analiza distribucije kategorijskih parametara utvrđena je *Pearson χ^2 testom*; statistički analiza srednjih vrednosti parametara koji su u normalnoj raspodeli utvrđena je *Studentovim t- testom*, a kod parametara koji nisu u normalnoj raspodeli (*) neparametrijskim *Mann-Whitney U testom*. BMI-indeks telesne mase (eng. *body mass index*) SBP-sistolni krvni pritisak, DBP-dijastolni krvni pritisak, LDL-C-LDL holesterol, HDL-C-HDL holesterol, Lp (a)-lipoprotein (a).

U **tabeli 4.1.** prikazane su osnovne biohemijske i kliničke odlike ispitivane kontrolne i grupe pacijenata sa KA, iz Srbije kod kojih su utvrđene relativne frekvencije genotipova polimorfizama u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) i ATR2 (A/G -1332). Vrednosti standardnih biohemijskih parametara u kontrolnoj grupi bili su u granicama normalnih vrednosti. Kod pacijenata sa karotidnom aterosklerozom je uočen statistički značajno veći broj pušača i hipertenzivnih osoba u poređenju sa kontrolnom grupom. U odnosu na kontrolu pacijenti sa karotidnom aterosklerozom su se statistički značajno razlikovali po godinama starosti, imali su više vrednosti indeksa telesne težine (BMI),

Rezultati

veću koncentraciju triglicerida i lipoproteina i nižu koncentraciju HDL holesterola. U grupi pacijenata sa KA statistički značajno više ima muškaraca u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 4.2. Osnovne karakteristike uzorka pacijenata sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na podtipove aterosklerotskog plaka, stabilni aterosklerotski plak (SAP) i nestabilni aterosklerotski plak (NAP)

Parametar	Stabilan plak (SAP)	Nestabilan plak (NAP)	p
Pol M/Ž n (%)	178 (59.33) /122(40.67)	81 (71.68) / 32 (28.32)	p<0.05
Pušenje n (%)	213 (71.00)	82 (72.57)	ns
Hipertenzija n (%)	258 (86.00)	101 (89.38)	ns
Dob (godine)*	66.71 ± 9.21	67.57 ± 7.54	ns
BMI (kg/m ²)	26.04 ± 2.65	26.79 ± 3.74	ns
Ukupan holesterol (mmol/L)	5.79 ± 1.21	5.67 ± 1.20	ns
LDL-C (mmol/L)	3.76 ± 1.05	3.61 ± 1.07	ns
HDL-C (mmol/L)	1.22 ± 0.35	1.19 ± 0.36	ns
Trigliceridi (mmol/L)*	1.88 ± 0.94	1.85 ± 1.12	ns
Lp (a) (mg/dL)*	35.96 ± 40.76	28.84 ± 33.16	ns
ApoA1 (g/L)*	1.59 ± 0.47	1.49 ± 0.39	ns
ApoA2 (mg/L)	333.89 ± 73.31	332.05 ± 64.79	ns
ApoB (g/L)*	1.16 ± 0.30	2.20 ± 10.42	ns
VIIIF (g/L) *	96.47 ± 41.38	98.93 ± 34.43	ns
vWF (IU/dL)*	159.98 ± 85.85	168.52 ± 73.73	ns
DDIM (µg/L)*	179.16 ± 163.69	221.74 ± 266.82	ns
PAI (U/mL)	3.78 ± 1.28	3.02 ± 1.38	p<0.001
Plazminogen (g/L)	130.27 ± 19.78	119.73 ± 26.84	p<0.001
CRP (mg/dL)*	7.83 ± 15.52	4.08 ± 5.63	ns
IL-6 (pg/mL)*	5.72 ± 11.25	5.20 ± 10.84	ns
Leukociti (10 ⁹ /L)	7.60 ± 1.78	7.95 ± 2.05	ns
Trombociti (10 ⁹ /L)*	265.45 ± 81.03	244.40 ± 68.70	p<0.05
Stepen stenozе (%) *	90.07 ± 7.61	88.04 ± 15.51	ns
Ukupno	300	113	

Vrednosti kategorijskih parametara predstavljene su brojačno i procentualno (%), a vrednosti kontinualnih varijabli kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); statistička analiza distribucije kategorijskih parametara utvrđena je *Pearson χ² testom*; statistička analiza srednjih vrednosti parametara koji su u normalnoj raspodeli utvrđena je *Studentovim t-testom*, a kod parametara koji nisu u normalnoj raspodeli (*) neparametrijskim *Mann-Whitney-U testom*; VIIIF- faktor koagulacije VII; DDIM-D dimer; PAI-inhibitor aktivacije plazminogena; vWF-von Vilebrandov faktor; CRP-C reaktivni protein; IL-6-interleukin-6; ns-nije detektovana statistički značajna razlika

U **tabeli 4.2.** predstavljene su osnovne odlike grupe pacijenata sa karotidnom aterosklerozom, podeljene prema fenotipu plaka na pacijente sa stabilnim (SAP) i nestabilnim (NAP) aterosklerotskim plakom. Analiza varijanse ukupnog stepena stenozе (SS) je urađena po ECST (eng. *European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group*, ECST) kriterijumima. Svi pacijenti imaju visok stepen stenozе (>70 %). Registrvan je veći broj pacijenata sa fenotipom stabilnog aterosklerotskog plaka. Pacijenti sa nestabilnim plakom imali su statistički značajno niže vrednosti koncentracije plazminogena i PAI i manji broj trombocita u plazmi. Nestabilan plak se češće formirao kod muškaraca, nego kod žena, pri čemu je ta razlika bila statistički značajna ($p < 0.05$).

Rezultati

Tabela 4.3. Osnovne karakteristike uzorka pacijenata sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na podtipove aterosklerotskog plaka, stabilni aterosklerotski plak (SAP) i nestabilni aterosklerotski plak (NAP) kod muškaraca

Muškarci n=259	Stabilan plak (SAP)	Nestabilan plak (NAP)	p
n (%)	178 (68.73)	81 (31.27)	
Pušenje n (%)	136 (77.71)	61 (75.31)	ns
Hipertenzija n (%)	153 (87.43)	72 (88.89)	ns
Dob (godine)*	65.93 ±9.85	67.72±6.94	ns
BMI (kg/m ²)	25.52 ±2.24	26.64 ± 3.93	ns
Ukupan holesterol (mmol/L)	5.69 ± 1.27	5.53 ±1.08	ns
LDL-C (mmol/L)	3.71 ±1.08	3.55 ±0.98	ns
HDL-C (mmol/L)	1.16 ±0.29	1.15 ±0.36	ns
Trigliceridi (mmol/L)*	1.91±1.04	1.78 ±1.19	ns
Lp (a) (mg/dL) *	35.29 ±40.59	28.36 ±29.59	ns
ApoA1 (g/L)	1.54 ±0.39	1.45±0.36	ns
ApoA2 (mg/L)	328.27 ± 72.86	326.98 ±71.84	ns
ApoB (g/L)	1.16 ± 0.32	1.09 ±0.25	ns
VIIIF (g/L)*	94.61 ±41.72	96.82 ± 39.18	ns
vWF (IU/dL)*	165.90± 90.13	168.55 ± 78.20	ns
PAI (U/mL)	3.59 ±1.23	2.99 ±1.32	p<0.05
Plazminogen (g/L)	127.78 ±19.19	119.95 ±30.02	p<0.05
CRP (mg/dL)*	6.47±11.93	4.47±6.47	ns
IL-6 (pg/mL)*	6.22±13.28	6.22±12.68	ns
Leukociti (10 ⁹ /L)	7.59±1.80	7.95±2.25	ns
Trombociti (10 ⁹ /L)*	255.85±79.70	238.07±63.89	ns
Stepen stenozе (%)*	90.57 ±7.04	90.38±9.08	ns

Vrednosti kategorijskih parametara predstavljene su brojačano i procentualno (%), a vrednosti kontinualnih varijabli kao srednja vrednost ±standardna devijacija (SD); statistička analiza distribucije kategorijskih parametara utvrđena je *Pearson χ^2 testom*; statistički analiza srednjih vrednosti parametara koji su u normalnoj raspodeli utvrđena je *Studentovim t-testom*, a kod parametara koji nisu u normalnoj raspodeli (*) neparametrijskim *Mann-Whitney-U testom*; VIIIF- faktor koagulacije VII; DDIM-D dimer; PAI-inhibitor aktivacije plazminogena; vWF-von Vilebrandov faktor; CRP-C reaktivni protein; IL-6-interleukin-6; ns-nije detektovana statistički značajna razlika

U **tabeli 4.3.** predstavljene su osnovne odlike pacijenata sa KA, podeljeni prema fenotipu plaka kod muškaraca. Zabeležen je veći broj pacijenata sa fenotipom stabilnog aterosklerotskog plaka. Kod muškaraca su uočene statistički značajno niže vrednosti nivoa PAI i plazminogena u fenotipu nestabilnog aterosklerotskog plaka.

Rezultati

Tabela 4.4. Osnovne karakteristike uzorka pacijenata sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na podtipove aterosklerotskog plaka, stabilni aterosklerotski plak (SAP) i nestabilni aterosklerotski plak (NAP) kod žena

Žene n=154	Stabilan plak (SAP)	Nestabilan plak (NAP)	p
n (%)	122 (79.22)	32 (20.78)	
Pušenje n (%)	77 (63.11)	21 (65.63)	ns
Hipertenzija n (%)	105 (86.07)	29 (90.63)	ns
Dob (godine)	67.82 ± 8.12	67.19 ± 9.05	ns
BMI (kg/m ²)	26.69 ± 3.00	27.21 ± 3.28	ns
SBP (mmHg) *	139.58 ± 18.76	138.13 ± 12.37	ns
DBP (mmHg)*	86.11 ± 10.15	85.00 ± 9.66	ns
Ukupan kolesterol (mmol/L)	5.93 ± 1.12	5.97 ± 1.40	ns
LDL-C (mmol/L)	3.83 ± 1.01	3.75 ± 1.25	ns
HDL-C (mmol/L)	1.30 ± 0.40	1.29 ± 0.36	ns
Trigliceridi (mmol/L)*	1.83 ± 0.80	2.04 ± 0.93	ns
Lp (a) (mg/dL)*	36.86 ± 41.17	30.01 ± 41.14	ns
ApoA1 (g/L)*	1.65 ± 0.54	1.56 ± 0.44	ns
ApoA2 (mg/L)	342.40 ± 73.72	344.73 ± 42.36	ns
ApoB (g/L)*	1.15 ± 0.28	4.89 ± 19.21	ns
VIIF (g/L)	98.98 ± 41.04	104.06 ± 18.03	ns
vWF (IU/dL)*	151.70 ± 79.29	168.45 ± 62.30	ns
DDIM (μg/L)*	179.17 ± 170.13	212.85 ± 365.92	ns
PAI (U/mL)	4.06 ± 1.32	3.07 ± 1.35	p<0.05
Plazminogen (g/L)	133.75 ± 20.16	119.20 ± 17.48	p<0.05
CRP (mg/dL)*	9.63 ± 19.19	3.08 ± 2.08	ns
IL-6 (pg/mL)*	5.00 ± 7.27	2.61 ± 1.60	ns
Leukociti (10 ⁹ /L)	7.63 ± 1.76	7.94 ± 1.49	ns
Eritrociti (10 ¹² /L)	4.39 ± 0.47	4.26 ± 0.54	ns
Hemoglobin (g/L)	131.90 ± 11.05	129.86 ± 15.49	ns
Trombociti (10 ⁹ /L)*	278.23 ± 81.41	259.75 ± 78.31	ns
Stepen stenozе (%) *	89.30 ± 8.42	82.28 ± 24.47	ns

Vrednosti kategorijskih parametara predstavljene su brojčano i procentualno (%), a vrednosti kontinualnih varijabli kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); statistička analiza distribucije kategorijskih parametara utvrđena je *Pearson χ² testom*; statistički analiza srednjih vrednosti parametara koji su u normalnoj raspodeli utvrđena je *Studentovim t-testom*, a kod parametara koji nisu u normalnoj raspodeli (*) neparametrijskim *Mann-Whitney-U testom*; VIIF- faktor koagulacije VII; DDIM-D dimer; PAI-inhibitor aktivacije plazminogena; vWF-von Vilebrandov faktor; CRP-C reaktivni protein; IL-6-interleukin-6; ns-nije detektovana statistički značajna razlika

Rezultati

U **tabeli 4.4.** predstavljene su osnovne karakteristike pacijenata sa KA, podeljenih prema fenotipu plaka kod žena. Zabeležen je veći broj pacijentkinja sa fenotipom stabilnog aterosklerotskog plaka. Pacijentkinje sa nestabilnim plakom imale su statistički značajno niže vrednosti koncentracije plazminogena i PAI.

Tabela 4.5. Osnovne karakteristike uzorka pacijenata sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)

Parametar	Bez CVI n (%)	sa CVI n (%)	p
Pol M/Ž n (%)	227 (57.32)/ 171 (42.68)	74 (63.79) /42 (36.21)	ns
Pušenje n (%)	284 (71.54)	73 (62.93)	ns
Hipertenzija n (%)	339 (85.39)	102 (87.93)	ns
Dob (godine)*	65.88±8.48	67.63±9.74	ns
BMI (kg/m ²)*	26.47±3.12	27.96 ± 11.02	ns
Ukupan holesterol (mmol/L)*	5.84±1.54	5.96± 1.35	ns
LDL-C (mmol/L)	3.74±1.11	3.94±1.06	ns
HDL-C (mmol/L)*	1.22±0.33	1.23±0.41	ns
Trigliceridi (mmol/L)*	1.97±2.12	1.91±1.90	ns
Lp (a) (mg/dL)*	36.35±40.71	34.10±38.28	ns
ApoA1 (g/L)*	1.60±0.45	1.43±0.37	p<0.05
ApoA2 (mg/L)	332.17±72.76	341.62±81.48	ns
ApoB (g/L)*	1.17 ±0.37	2.21±10.42	ns
VIIIF (g/L)*	99.74±33.16	85.79±55.76	p<0.05
vWF (IU/dL)*	162.72±76.88	130.05±93.91	p<0.05
DDIM (μg/L)*	188.53±200.03	209.96±154.01	p<0.05
PAI (U/mL)	3.57±1.27	3.39±1.56	ns
Plazminogen (g/L)	127.86± 21.70	125.75±26.07	ns
CRP (mg/dL)*	5.10±7.53	12.37±23.42	ns
IL-6 (pg/mL)*	4.84±7.22	5.29±8.77	ns
Leukociti (10 ⁹ /L)*	7.43± 1.93	8.14±2.13	p<0.05
Trombociti (10 ⁹ /L)*	256.45±77.41	259.59±77.79	ns
Stepen stenozе (%) *	89.64±10.78	89.66±9.23	ns
Ukupno	396	116	

Vrednosti kategorijskih parametara predstavljene su brojačano i procentualno n (%), a vrednosti kontinualnih varijabli kao srednja vrednost ±standardna devijacija (SD); statistička analiza distribucije kategorijskih parametara utvrđena je *Pearson χ² testom*; statistički analiza srednjih vrednosti parametara, koji su u normalnoj raspodeli utvrđena je *Studentovim t-testom*, a kod parametara koji nisu u normalnoj raspodeli (*) neparametrijskim *Mann-Whitney-U testom*; VIIIF- faktor koagulacije VII; DDIM-D dimer; PAI-inhibitor aktivacije plazminogena; vWF-von Vilebrandov faktor; CRP-C reaktivni protein; IL-6-interleukin-6; ns-nije detektovana statistički značajna razlika

Rezultati

U **tabeli 4.5.** predstavljene su osnovne karakteristike grupe pacijenata sa KA, podeljenih u odnosu na to da li su imali cerebrovaskularni insult (šlog) ili ne. Pacijenti koji su imali šlog su u odnosu na pacijente koji nisu imali šlog, pokazali niže vrednosti nivoa ApoA1, VIIF i vWF i više nivoe DDdimera i broja leukocita u plazmi i te vrednosti su bile statistički značajno različite.

Tabela 4.6. Kliničke karakteristike pacijenata sa karotidnom aterosklerozom

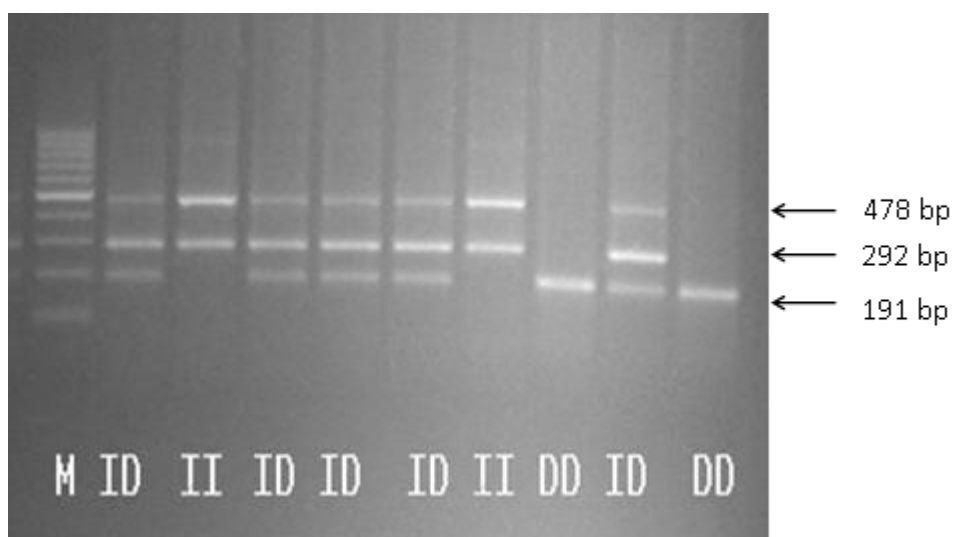
Klinički parametri	(%)
Bez simptoma bolesti	54.49
Prolazni ishemijski događaj	21.29
Šlog	22.66
Nestabilni aterosklerotski plakovi	22.07
Ulceracija	13.48
Tromboza	0.98
Komorbiditet Koronarna bolest	23.24
Istorija bolesti u porodici	9.18
Dijabetes tipa 2	22.46
Periferna arterijska okluzivna bolest (PAOB)	15.04
Terapija	
Upotreba statina	18.55
Antihipertenzivna terapija	28.71
Antikoagulaciona terapija	2.15
Antiagregaciona terapija	50.98

U **tabeli 4.6.** prikazana je procentualna zastupljenost kliničkih parametara pacijenata sa KA (n=512). Procentualna zastupljenost nestabilnog karotidnog plaka u grupi pacijenata bila je 22.07 %. Ukupan broj pacijenata koji su imali šlog bio je 116 (22.66 %). Procenat pacijenata koji su imali dijabetes tipa 2 je bio 22.46 %. Procentualni udeo pacijenata koji su zajedno sa KA imali i koronarnu aterosklerozu je bio 23.24 %

4.2. GENETIČKO-EPIDEMIOLOŠKA ANALIZA

4.2.1. Polimorfizmi DNK u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) i ATR2 (A/G -1332) u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa KA

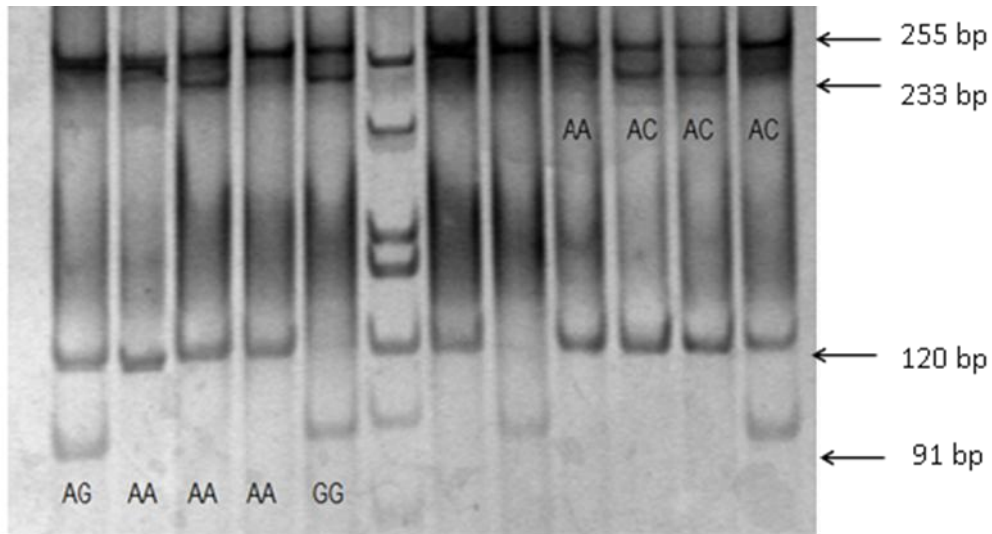
4.2.1.1. Detekcija polimorfizma I/D u genu za ACE



Slika 4.1 Prikaz genotipizacije polimorfizma I/D u genu za ACE na 1.8 % agaroznom gelu. M-DNK marker 100 bp

Na **slici 4.1** prikazan je izgled agaraznog gela u genotipizaciji polimorfizma I/D u genu za ACE.

4.2.1.2. Detekcija polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i polimorfizma A/G - 1332 u genu za ATR2



Slika 4.2 Prikaz genotipizacije polimorfizama A1166C i A/G -1332 u genima za ATR1 i ATR2 na 8 % poliakrilamidnom gelu, M-DNK marker Φ x174.

Na **slici 4.2** prikazan je izgled poliakrilamidnog gela u genotipizaciji polimorfizma A1166C u genu za ATR1 i polimorfizma A/G-1332 u genu za ATR2

4.2.1.3. Distribucija genotipova u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa karotidnom aterosklerozom i njihov efekat na nastanak bolesti

Tabela 4.7. Distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) kod kontrola i pacijenata sa KA ukupno i podeljenih po polu

Polimorfizam	Kontrole	Pacijenti	p	Polimorfizam	Kontrole	Pacijenti	p
ACE	n (%)	n (%)	(χ^2)	ATR1	n (%)	n (%)	(χ^2)
I/D				A1166C			
Svi #				Svi #			
II	48 (19.51)	93 (18.42)		AA	120 (56.60)	275 (54.46)	
ID	127 (51.63)	255 (50.50)	ns	AC	78 (36.79)	185 (36.49)	ns
DD	71 (28.86)	157 (31.09)		CC	14 (6.60)	45 (8.88)	
Ukupno	246	505		Ukupno	212	505	
Alel I	0.45	0.44	ns	Alel A	0.75	0.73	ns
Alel D	0.55	0.56		Alel C	0.25	0.27	
Muškarci §				Muškarci ψ			
II	29 (20.28)	54 (16.67)		AA	65 (59.63)	177 (54.46)	
ID	69 (48.25)	166 (51.23)	ns	AC	40 (36.70)	116 (35.69)	ns
DD	45 (31.47)	104 (32.10)		CC	4 (3.67)	32 (9.85)	
Ukupno	143	324		Ukupno	109	325	
Alel I	0.44	0.42	ns	Alel A	0.78	0.68	ns
Alel D	0.56	0.58		Alel C	0.22	0.32	
Žene *				Žene *			
II	19 (18.45)	39 (21.79)		AA	55 (53.40)	98 (54.44)	
ID	58 (56.31)	87 (48.60)	ns	AC	38 (36.89)	69 (38.33)	ns
DD	26 (25.24)	53 (29.61)		CC	10 (9.71)	13 (7.22)	
Ukupno	103	179		Ukupno	103	180	
Alel I	0.47	0.46		Alel A	0.72	0.74	ns
ns				Alel C	0.28	0.26	
Alel D	0.53	0.54					

#, §, *-ispitivani uzorak je u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži; ψ -ispitivani uzorak u grupi pacijenata nije u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži; p-Pearson χ^2 test

U tabeli 4.7. predstavljene su relativne učestalosti genotipova i alela polimorfizama u genima za ACE (I/D) i ATR1 (A1166C) kod kontrola i pacijenata sa KA ukupno i podeljenih po polu. Distribucija učestalosti genotipova nije odstupala od HWE u kontrolnoj populaciji ($p > 0.05$), ali odstupala je od HWE u grupi pacijenata sa KA muškog pola za polimorfizam A1166C u genu za ATR1 ($p < 0.05$). Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama između kontrola i pacijenata sa KA ukupno i podeljenih po polu.

Rezultati

Tabela 4.8. Distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama u genu za ATR2 (A/G -1332) kod kontrola i pacijenata sa KA podeljenih po polu

Genotip ATR2 A/G -1332	Kontrole n (%)	Pacijenti n (%)	p (χ^2)	Genotip ATR2 A/G -1332	Kontrole n (%)	Pacijenti n (%)	p (χ^2)
Muškarci #				Žene *#			
(A/-)	61 (57.55)	178 (54.94)	ns	AA	31 (30.69)	58 (32.04)	ns
(G/-)	45 (42.45)	146 (45.06)		AG	53 (52.48)	76 (41.99)	
Ukupno	106	324		GG	17 (16.83)	47 (25.97)	
Alel A	0.58	0.55	ns	Ukupno	101	181	ns
Alel G	0.42	0.45		Alel A	0.57	0.53	
				Alel G	0.43	0.47	

*-ispitivani uzorak je u *Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži*; #-pacijenti oba pola kao i muškarci u kontrolnoj grupi nisu u *Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži*

U **tabeli 4.8.** predstavljene su relativne učestalosti genotipova i alela polimorfizama A/G -1332 u genu za ATR2 u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa KA podeljenih po polu. Kod žena nije zabeležena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela spomenutog polimorfizma. Uočena je veća učestalost genotipa GG polimorfizma A/G -1332 kod pacijentkinja sa KA u poređenju sa kontrolnom populacijom.

4.2.2. Polimorfizmi DNK u genima za ACE (I/D), ATR1 (A1166C) i ATR2 (A/G -1332) u odnosu na tip aterosklerotskog plaka i klinički događaj

4.2.2.1. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka

Razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE prema fenotipu plaka kod ukupnog broja pacijenata sa karotidnom aterosklerozom i kod žena nije bila statistički značajna.

Tabela 4.9. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE kod pacijenata muškog pola u odnosu na tip aterosklerotskog plaka (SAP i NAP)

Polimorfizam	SAP n (%)	NAP n (%)	p
ACE (I/D)			
II	21 (11.93)	19 (23.46)	ns
ID	91 (51.70)	38 (46.91)	
DD	64 (36.36)	24 (29.63)	
Alel I	0.38	0.47	p<0.05
Alel D	0.62	0.53	
Ukupno (n)	176	81	
Grupisani genotip			
II	21 (11.93)	19 (23.46)	p<0.05
ID+DD	155 (88.07)	62 (76.54)	

Podela pacijenata je izvršena prema tipu aterosklerotskog plaka: SAP-stabilni aterosklerotski plak, NAP-nestabilni aterosklerotski plak. Vrednosti su predstavljene brojčano i procentualno- n (%). Statistička analiza distribucije genotipova između podgrupa pacijenata analizirana je *Pearson-ovim* χ^2 testom. ns- nije utvrđena statistički značajna razlika

U **tabeli 4.9.** prikazana je distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA prema tipu aterosklerotskog plaka kod muškaraca. Nije bilo statistički značajne razlika u distribuciji genotipova polimorfizma prema tipu aterosklerotskog plaka, ali je uočen trend razlike u distribuciji (p=0.06). Razlika u distribuciji alela navedenog polimorfizma prema tipu aterosklerotskog plaka bila je

statistički značajna ($p=0.02$). Alel I je statistički značajno češći u grupi muškaraca sa nestabilnim tipom plaka u odnosu na muškarce sa stabilnim. Po dominantnom modelu za alel D (II vs ID+DD) uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova navedenog polimorfizma ($p=0.02$). Po recesivnom modelu za alel D (II+ID vs DD) nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova (rezultat nije prikazan).

Tabela 4.10. Odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka kod pacijenata muškog pola sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na genotipove polimorfizma I/D u genu za ACE

Model polimorfizma	Nekorrigovani OR	95 % CI	p	Korigovani OR	95 % CI	p
ACE (I/D)						
ID+DD vs II	2.26	1.13-4.51	$p < 0.05$	2.52	1.23-5.16	$p < 0.05$

Vrednosti odnosa šansi prikazane su kao OR sa 95% CI

U **tabeli 4.10** prikazani su rezultati regresione analize koji ukazuju da su nosioci genotipa II polimorfizma I/D u genu za ACE imali 2.52 puta veći odnos šansi a formiranje nestabilnog plaka u odnosu na muškarce nosioce genotipova ID i DD nezavisno od faktora rizika: dob, pušenje i hipertenziju ($p < 0.05$).

4.2.2.2. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE u odnosu na cerebrovaskularni insult kod ukupnog broja pacijenata sa KA, a ni kod pacijenata podeljenih po polu.

4.2.2.3. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA)

Razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE u odnosu na prolazni ishemijski događaj nije bila statistički značajna kod ukupnog broja pacijenata i pacijenata ženskog pola.

Tabela 4.11. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE kod pacijenata muškog pola u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja

Polimorfizam	Bez prolaznog ishemijskog događaja n (%)	Sa prolaznim ishemijskim događajem n (%)	p
ACE (I/D)			
II	41 (17.52)	8 (12.31)	p<0.05
ID	124 (52.99)	27 (41.54)	
DD	69 (29.49)	30 (46.15)	
Alel I	0.44	0.33	p<0.05
Alel D	0.56	0.67	
Ukupno (n)	234	65	
Grupisani genotip			
II+ID	165 (70.51)	35 (53.85)	p<0.05
DD	69 (29.49)	30 (46.15)	

U **tabeli 4.11.** prikazane su relativne frekvencije genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE kod pacijenata muškog pola u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja. Razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE kod muškaraca bila je statistički značajna ($p=0.04$, $p=0.01$; prvo navedeno, drugo navedeno). Alel D bio je statistički značajno češći u grupi muškaraca koji su imali prolazni ishemijski događaj u odnosu na muškarce koji nisu. Po recesivnom modelu za alel D (DD vs II+ID) uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između pacijenata koji nisu i koji jesu imali prolazni ishemijski događaj ($p=0.01$).

Tabela 4.12. Odnos šansi za prisustvo prolaznog ishemijskog događaja kod pacijenata muškog pola sa karotidnom aterosklerozom, u odnosu na genotipove polimorfizma I/D u genu za ACE

Model polimorfizma	Nekorigovani OR	95% CI	p	Korigovani OR	95% CI	p
ACE (I/D)						
II+ID vs DD	2.05	1.16-3.61	p<0.05	2.22	1.24-4.00	p<0.05

Vrednosti odnosa šansi prikazane su kao OR sa 95% CI.

U **tabeli 4.12.** prikazani su rezultati regresione analize koji pokazuju da su po recesivnom modelu za alel D nosioci DD genotipa imali 2.22 puta veći odnos šansi za nastanak prolaznog ishemijskog događaja nezavisno od faktora rizika: dob, pušenje i hipertenzija (p<0.05).

4.2.2.4. Distribucija genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku.

4.2.2.5. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Tabela 4.13. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata u odnosu na tip aterosklerotskog plaka

Polimorfizam	SAP n (%)	NAP n (%)	p
ATR1 (A1666C)			
AA	175 (58.72)	50 (44.25)	p<0.05
AC	102 (34.23)	51 (45.13)	
CC	21 (7.05)	12 (10.62)	
Alel A	0.76	0.66	p<0.05
Alel C	0.24	0.34	
Ukupno (n)	298	113	
Grupisani genotip			
AA	175 (58.72)	50 (44.25)	p<0.05
AC+CC	123 (41.28)	63 (55.75)	

Podela pacijenata je izvršena prema tipu aterosklerotskog plaka: SAP-stabilni aterosklerotski plak, NAP-nestabilni aterosklerotski plak. Vrednosti su predstavljene brojučano i procentualno- n (%); statistička analiza distribucije genotipova između podgrupa pacijenata utvrđena je *Pearson-ovim* χ^2 testom.

U **tabeli 4.13.** prikazana je distribucija genotipova i alela polimorfizma A1666C u genu za ATR1 kod pacijenata sa KA prema fenotipu plaka. Razlika u distribuciji genotipova polimorfizma A1666C bila je statistički značajna (p=0.03). Utvrđena je značajna razlika i u distribuciji alela polimorfizma A1666C u genu za ATR1. Alel C je statistički značajno češći kod pacijenata sa nestabilnim plakom, u odnosu na pacijente sa stabilnim aterosklerotskim plakom (p=0.002).

Rezultati

Tabela 4.14. Odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka kod pacijenata sa karotidnom aterosklerozom u odnosu na genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1

Model polimorfizma	Nekorigovani OR	95% CI	p	Korigovani OR	95% CI	p
ATR1 (A1166C)						
AA vs AC+CC	1.77	1.14-2.74	p<0.05	1.94	1.18-3.20	p<0.05

Vrednosti odnosa šansi prikazane su kao OR sa 95% CI.

U tabeli **4.14.** prikazani su rezultati regresione analize gde je pokazano da su nosioci genotipova koji sadrže alel C po dominantnom modelu za alel C (AC+CC vs AA) imali 1.77 puta veći odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka (p=0.01). Posle korekcije na faktore rizika i biohemijske parametre koji su se razlikovali između fenotipa stabilnog i nestabilnog plaka (pol, dob, hipertenziju, pušenje, broj trombocita) ta vrednost ostala je statistički značajna (OR=1.94, CI 95 % (1.18-3.20), p=0.009).

Tabela 4.15. Distribucija genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1 u grupi pacijenata muškog pola u odnosu na tip aterosklerotskog plaka

Polimorfizam	SAP n (%)	NAP n (%)	p
ATR1 (A1166C)			
AA	103 (58.19)	37 (45.68)	ns
AC	59 (33.33)	36 (44.44)	
CC	15 (8.47)	8 (9.88)	
Alel A	0.75	0.68	p<0.05
Alel C	0.25	0.32	
Ukupno (n)	177	81	
Grupisani genotip			
AA	103 (58.19)	37 (45.68)	ns
AC+CC	74 (41.81)	44 (54.32)	

U tabeli **4.15.** prikazana je distribucija genotipova kod pacijenata muškog pola prema fenotipu plaka kod muškaraca. Razlika u distribuciji genotipova polimorfizma A1166C nije bila statistički značajna, ali je ipak registrovana veća učestalost genotipa CC kod pacijenata sa nestabilnim plakom. Alel C bio je češći kod pacijenata sa nestabilnim

Rezultati

plakom, u odnosu na pacijente sa stabilnim aterosklerotskim plakom i ta vrednost je bila statistički značajna ($p=0.04$). Po dominantnom modelu za alel C (AA vs AC+CC) nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između pacijenata sa različitim tipom aterosklerotskog plaka ($p=0.06$). Odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka po ovom modelu kod muškaraca bio je 1.66 puta veći, ali ta vrednost nije bila dostizala statističku značajnost ($p=0.06$). Po recesivnom modelu za alel C (AA vs AC+CC) nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova za nastanak nestabilnog aterosklerotskog plaka.

Tabela 4.16. Distribucija genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1 u grupi pacijenata ženskog pola u odnosu na tip aterosklerotskog plaka

Polimorfizam	SAP n (%)	NAP n (%)	p
ATR1 (A1166C)			
AA	72 (59.50)	13 (40.63)	ns
AC	43 (35.54)	15 (46.88)	
CC	6 (4.96)	4 (12.50)	
Alel A	0.77	0.64	$p<0.05$
Alel C	0.23	0.36	
Ukupno (n)	121	32	
Grupisani genotip			
AA	72 (59.50)	13 (40.63)	ns
AC+CC	49 (40.50)	19 (59.38)	

U **tabeli 4.16.** prikazana je distribucija genotipova kod pacijenata sa KA prema fenotipu plaka kod žena. Razlika u distribuciji genotipova polimorfizma A1166C nije bila statistički značajna. Uočena je veća frekvencija alela C kod žena pacijenata sa nestabilnim aterosklerotskim plakom ($p=0.01$). Po dominantnom modelu za alel C (AA vs AC+CC) registrovana je veća frekvencija alela C kod pacijentkinja sa nestabilnim plakom, ali ta vrednost nije dostigla statističku značajnost ($p=0.055$).

Rezultati

Tabela 4.17. Odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka kod pacijenata ženskog pola u odnosu na genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1

Polimorfizam	Nekorigovani OR	95% CI	p	Korigovani OR	95% CI	p
ATR1 (A1166C)						
AA	Referentni genotip					
AC	1.93	1.04-3.55	p<0.05	2.60	1.04-6.53	p<0.05
CC	3.71	1.09-12.63		6.78	1.07-42.66	
Alel A	Referentni alel		p<0.05			
Alel C	1.91	1.05-3.45				
Grupisani genotip						
AA vs AC+CC	2.15	0.97-4.78	ns	3.27	0.94-11.37	ns

U **tabeli 4.17.** prikazani su rezultati regresione analize gde je pokazano da su žene nosioci heterozigota imali 1.9 veći odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka u odnosu na nosioce genotipa AA, a nosioci genotipa CC 3.7 puta veći odnos šansi za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka AA ($p=0.03$). Posle korekcije na faktore rizika i biohemijske parametre koji su se razlikovali između fenotipa stabilnog i nestabilnog plaka kod žena (dob, hipertenziju, pušenje, nivo plazminogena i PAI) ta vrednost je ostala statistički značajna respektivno (OR=2.60 CI 95% (1.04-6.53); OR=6.78 CI 95% (1.07-42.66) ($p=0.04$). Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji alela analiziranog polimorfizma, tako da su nosioci alela C imali 1.9 puta veći odnos šansi za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka ($p=0.03$). Po dominantnom modelu nasleđivanja za alel C (AA vs AC+CC) nosioci genotipova koji sadrže alel C imali su 2.15 puta veći odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka. Dobijna vrednost bila je na granici statističke značajnosti ($p=0.056$). Posle korekcije na faktore rizika i biohemijske parametre koji se razlikuju između fenotipa stabilnog i nestabilnog plaka kod žena (dob, hipertenziju, pušenje, nivo plazminogena i PAI) ta vrednost nije bila statistički značajna. Po recesivnom modelu za alel C nije utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova.

4.2.2.6. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)

Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji genotipova i alela polimorfizma A1666C u odnosu na šlog kod ukupnog broja pacijenata, a ni kod pacijenata podjeljenih po polu.

4.2.2.7. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA)

Razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u odnosu na prolazni ishemijski događaj nije bila statistički značajna ni u ukupnom broju pacijenata niti podjeljenih po polu.

4.2.2.8. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku

Tabela 4.18. Distribucija genotipova polimorfizma A1666C u genu za ATR1 u grupi pacijenata u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku

Polimorfizam	Odsustvo ulceracije n (%)	Prisustvo ulceracije n (%)	p
ATR1 (A1666C)			
AA	237 (55.63)	30 (43.48)	ns
AC	157 (36.85)	32 (46.38)	
CC	32 (7.51)	7 (10.14)	
Alel A	0.74	0.67	p<0.05
Alel C	0.26	0.33	
Ukupno (n)	426	69	
Grupisani genotip			
AA	237 (55.63)	29 (43.48)	ns
AC+CC	189 (44.37)	39 (56.52)	

U **tabeli 4.18.** prikazane su relativne frekvencije genotipova DNK polimorfizma u A1666C u genu za ATR1 u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova analiziranog polimorfizma u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku. Uočena je

veća frekvencija alela C kod pacijenata sa ulceracijom i ta vrednost je bila statistički značajna ($p=0.03$). Po dominantnom modelu za alel C (AA vs AC+CC) nije primećena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova.

4.2.2.9. Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Podela grupe pacijenata je izvršena prema tipu aterosklerotskog plaka: SAP-stabilni aterosklerotski plak, NAP-nestabilni aterosklerotski plak. Vrednosti su predstavljene brojačano i procentualno- n (%). Obzirom na to da žene imaju dve kopije X hromozoma, one su nosioci G alela u homozigotnom i heterozigotnom stanju pa su u populaciji prisutna sva tri genotipa; AA, AG i GG. S druge strane kod muškaraca je prisutna samo jedna kopija X hromozoma, stoga su oni hemizigoti (A- ili G-navedeno u zagradi). Analiza distribucije genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na tip plaka nije utvrdila statistički značajnu razliku.

Tabela 4.19. Relativne frekvencije genotipova polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na prisustvo/odsustvo/alela -1332 G u grupi pacijenata

ATR2 (A/G-1332)	Žene	Muškarci	Ukupno
	n (%)	n (%)	n
Alel A/ -	45 (29.41)	139 (53.88)	184
Alel G/ -	108 (70.59)	119 (46.12)	227
Ukupno	153 (100 %)	258 (100%)	411

U **tabeli 4.19.** prikazane su relativne frekvencije genotipova polimorfizma u genu za ATR2 u odnosu na prisustvo/odsustvo/alela -1332 G u grupi pacijenata ukupno i po polu. U grupi pacijenata sa KA alel G bio je češći kod žena (žene su nosioci genotipova GG i AG) u poređenju sa muškarcima (muškarci su nosioci genotipaa GG).

4.2.2.10. Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na cerebrovaskularni insult (šlog)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 kod žena koje su imale šlog u odnosu na one koje nisu.

Tabela 4.20. Distribucija hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na cerebrovaskularni insult kod muškaraca

Polimorfizam	Bez CVI n (%)	sa CVI n (%)	p
ATR2 (A/G -1332)			
AA (A/-)	135 (60.00)	31 (42.47)	p<0.05
GG (G/-)	90 (40.00)	42 (57.53)	
Ukupno (n)	225	73	

U **tabeli 4.20.** prikazane su distribucije genotipova i alela polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na cerebrovaskularni insult. Uočena je veća procentualna zastupljenost hemizigota G/- kod pacijenata koji su imali šlog. Razlika u učestalosti genotipova bila je statistički značajna (p=0.009).

Tabela 4.21. Odnos šansi za cerebrovaskularni događaj kod pacijenata muškog pola sa KA u odnosu na hemizigote polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2

Model polimorfizma	Nekorrigovani OR	95% CI	p	Korigovani OR	95% CI	p
ATR2 (A/G -1332)						
G/-	2.03	2.03 (1.19-3.48)	p<0.05	2.67	1.05-6.76	p<0.05

Vrednosti odnosa šansi su predstavljene kao OR sa 95 % CI

U **tabeli 4.21.** prikazan je odnos šansi za cerebrovaskularni događaj kod pacijenata sa KA u odnosu na hemizigote polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 genu. Muškarci hemizigotni nosioci G/- imali su 2.03 puta veći rizik za CVI (OR=2.03, CI 95 % 1.19-3.48) (p=0.009). Posle korekcije na faktore rizika i biohemijske parametre koji odstupali između pacijenata koji nisu i koji jesu imali šlog (dob, hipertenziju, pušenje, nivo

ApoA1, nivo DDdimera, triglicerida i broj leukocita) muškarci su imali 2.7 puta veći odnos šansi za šlog (OR=2.67, CI 95 % 1.05- 6.76, p=0.04)

4.2.2.11. Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA)

Tabela 4.22. Distribucija genotipova polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata ženskog pola u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja

Polimorfizam	Bez prolaznog ishemijskog događaja n (%)	Sa prolaznim ishemijskim događajem n (%)	p
ATR2 (A/G -1332)			
AA	49 (28.99)	14 (32.56)	ns
AG	73 (43.20)	21 (48.84)	
GG	47 (27.81)	8 (18.60)	
Alel A	0.51	0.57	ns
Alel G	0.49	0.43	
Ukupno (n)	169	43	
Grupisani genotip			
AA	49 (28.99)	14 (32.56)	ns
AG+GG	120 (71.01)	29 (67.44)	

U **tabeli 4.22.** prikazane su relativne frekvencije genotipova polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 kod pacijentkinja u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja. Razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 kod pacijentkinja nije bila statistički značajna. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova po dominantnom modelu za alel G (AA vs AG+GG) u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja, ni po recesivnom modelu za alel G (AA+AG vs GG) (rezultat nije prikazan).

Tabela 4.23. Distribucija hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu AGTR2 u grupi pacijenata muškog pola u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja

Polimorfizam	Bez prolaznog ishemijskog događaja n (%)	Sa prolaznim ishemijskim događajem n (%)	p
ATR2 (A/G -1332)			
AA (A/-)	130 (56.03)	36 (54.55)	ns
GG (G/-)	102 (43.97)	30 (45.45)	
Ukupno (n)	232	66	

U **tabeli 4.23.** prikazane su relativne frekvencije hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu ATR2 kod pacijenata muškog pola u odnosu na prisustvo prolaznog ishemijskog događaja. Razlika u distribuciji polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u muškom polu nije bila statistički značajna.

4.2.2.12. Distribucija genotipova i hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata sa KA u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku

Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku kod žena.

Rezultati

Tabela 4.24. Distribucija hemizigota polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u grupi pacijenata muškog pola u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku

Polimorfizam	Odsustvo ulceracije n (%)	Prisustvo ulceracije n (%)	p
ATR2 (A/G -1332)			
(A/ -)	130 (52.42)	34 (68.00)	p<0.05
(G/ -)	118 (47.58)	16 (32.00)	
Ukupno (n)	248	50	

U **tabeli 4.24.** prikazane su relativne frekvencije hemizigota DNK polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku. Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela ispitivanog polimorfizma u odnosu na prisustvo ulceracije u aterosklerotskom plaku kod muškaraca ($p=0.04$, $p<0.05$; prvo navedeno, drugo navedeno). Muškarci hemizigoti A/- bili su statistički značajno češći u grupi pacijenata sa ulceracijom u aterosklerotskom plaku.

Tabela 4.25. Odnos šansi za prisustvo ulceracije kod muškaraca pacijenata sa karotidnom aterosklerozom, u odnosu na hemizigote polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2

Model polimorfizma	Nekorigovani OR	95% CI	p	Korigovani OR	95% CI	p
ATR2 (A/G -1332)						
A/-	1.93	1.01-3.68	0.05	2.03	1.02-4.03	p<0.05

Vrednosti odnosa šansi su predstavljene kao OR sa 95 % CI

U **tabeli 4.25.** prikazan je odnos šansi za prisustvo ulceracije kod pacijenata sa aterosklerozom karotida, u odnosu na hemizigote polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2. Muškarci nosioci hemizigota A/- imali su 1.9 puta veći odnos šansi za nastanak ulceracije ($p=0.045$). Posle korekcije na faktore rizika (dob, pušenje i hipertenziju) ta vrednost je ostala statistički značajna ($p=0.04$).

4.3. ANALIZA EKSPRESIJE iRNK ZA KOMPONENTE RAS I REGULATORNE MIR-155 U TKIVU KAROTIDNOG ATEROSKLEROTSKOG PLAKA

U analiziranom uzorku kao endogene kontrole analizirani su geni: gliceraldehid fosfat dehidrogenaza (GAPDH) i gen za 18S rRNK. Od dve analizirane, za normalizaciju rezultatata relativne ekspresije ciljnih gena, iskorišćena je ona endogena kontrola koja je stabilnije eksprimirana unutar i između ispitivanih grupa pacijenata i kontrola. Za dalju analizu je odabrana 18S rRNK koja je korišćena u normalizaciji rezultatata za analizu ekspresije gena RAS sistema (ACE, ACE2, ATR1, ATR2, kolektrin (TMEM27)).

Tabela 4.26. Uzorci u kojima je uspešno detektovana iRNK za gene RAS kod pacijenata sa KA

Ukupno n (100 %)	ACE	ACE2	ATR1	TMEM27
61 (100 %)	61 (100.00)	26 (42.62)	23 (37.70) *	61(100.00)
Muškarci/ Žene n (%)	42(68.85)/ 19 (31.15)	17(27.87)/ 9(14.75)	13 (21.31)/ 8 (13.11)	42(68.85)/19 (31.15)

*U analizi ekspresije gena za ATR1 dva uzorka u kojima je detektovana iRNK za ATR1 su izbačeni jer su dobijene vrednosti ekspresije značajno odstupale od ostalih dobijenih vrednosti ekspresije gena za ovaj receptor.

U tabeli **4.26.** prikazan je broj i procenat uzoraka u kojima je uspešno detektovan ekspresioni nivo gena RAS sistema. Ekspresioni nivo iRNK za ACE i TMEM27 je uspešno detektovan u svim uzorcima. Ekspresija iRNK za ACE2 je detektovana i analizirana u 26 uzoraka (42.62 %), a iRNK za ATR1 u 23 (37.70 %).

Tabela 4.27. Broj i procenat uzoraka u kojima uspešno detektovana i analizirana iRNK za komponente RAS ukrštenih međusobno.

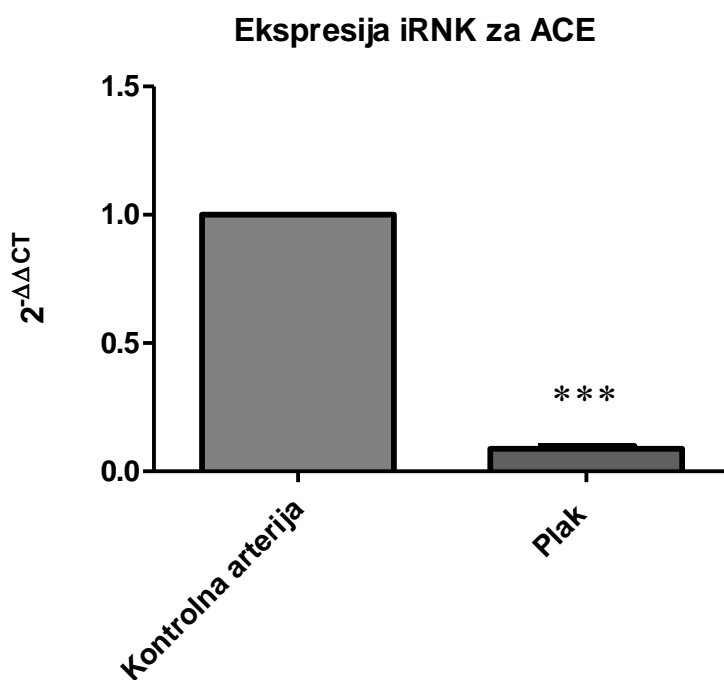
n (%)	ACE	ACE2	ATR1	TMEM27
ACE	-	26 (42.62)	21 (34.43)	61 (100.00)
ACE2	26 (42.62)	-	11 (42.31)	26 (100.00)
ATR1	21 (34.43)	11 (47.83)	-	21 (34.43)
TMEM27	61 (100.00)	26 (42.62)	21 (34.43)	-

U **tabeli 4.27.** prikazan je broj i procenat uzoraka u kojima je uspešno detektovan i analiziran ekspresioni nivo gena RAS sistema. Za ACE i TMEM27 procentualni učinak analizirane ekspresije je bio 100 % i iRNK za ove gene je detektovana i analizirana u svim uzorcima (n=61), dok je za ACE2 i ATR1 taj broj, odnosno procenat iznosio 26 (42.62 %) za ACE2 i 21 (34.43%) za ATR1. Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 (ACE/ACE2), je analiziran u uzorcima tkiva plaka u kojima je uspešno detektovan i analiziran ekspresioni nivo iRNK za ACE2.

4.3.1. Ekspresija iRNK za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

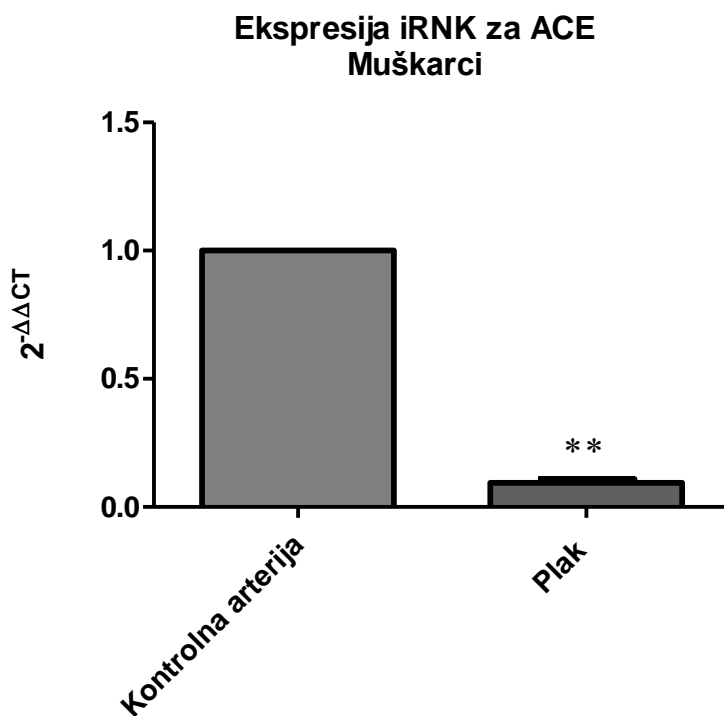
4.3.1.1. Relativni nivoi iRNK za ACE

Grafik 4.1. Ekspresija iRNK za ACE normalizovana na 18S RNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) u kontrolnom tkivu arterije (n=2) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (n=61). Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška; *** značajna razlika (***) $p < 0.05$, REST Software, QIAGEN).



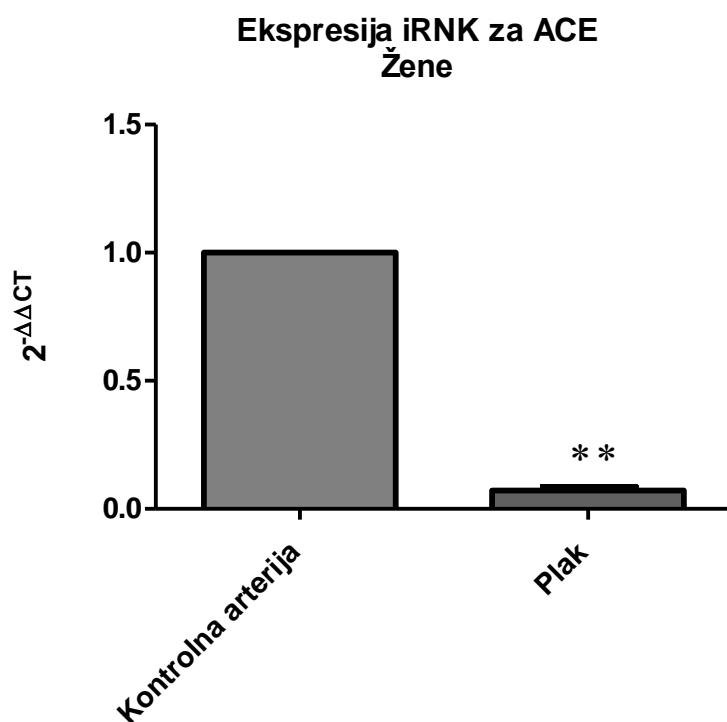
Na **grafiku 4.1.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE u tkivu kontrolne arterije (komercijalno tkivo arterije bez znakova ateroskleroze) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Ekspresioni nivo iRNK za ACE bio je statistički značajno niži u karotidnim karotidnom aterosklerotskom plaku u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije.

Grafik 4.2. Ekspresija iRNK za ACE normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod muškaraca u tkivu kontrolne arterije (n=2) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (n=42). Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška; ** značajna razlika (**p=0.001, *REST Software, QIAGEN*).



Na **grafiku 4.2.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE u tkivu kontrolne arterije (komercijalno tkivo arterije bez znakova ateroskleroze) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod muškaraca. Nivo ekspresije iRNK za ACE bio je statistički značajno manje ekspimiran u karotidnim karotidnom aterosklerotskom plaku u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije.

Grafik 4.3. Ekspresija iRNK za ACE normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod žena u tkivu kontrolne arterije (n=2) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (n=19). Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška. ** značajna razlika) (**p=0.001, *REST Software, QIAGEN*).



Na **grafiku 4.3.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE u tkivu kontrolne arterije (komercijalno tkivo arterije bez znakova ateroskleroze) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod žena. Nivo ekspresije iRNK za ACE bio je statistički značajno manje ekspimiran u karotidnim karotidnom aterosklerotskom plaku u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije.

4.3.1.2. Ekspresija iRNK za ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Ekspresija iRNK za ACE normalizovana na 18S rRNK u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim plakovima (NAP) nije se statistički značajno razlikovala u celom ispitivanom uzorku (SAP, n=45 i NAP, n=16; p=0.53, *Mann-Whitney U-test*); ni podeljenom po polu (muškarci: SAP, n=29 i NAP, n=13; p=0.51, *Mann-Whitney U-test*; žene: SAP, n=16 i NAP, n=3; p=0.29, *Unpaired t test with Welch's correction*).

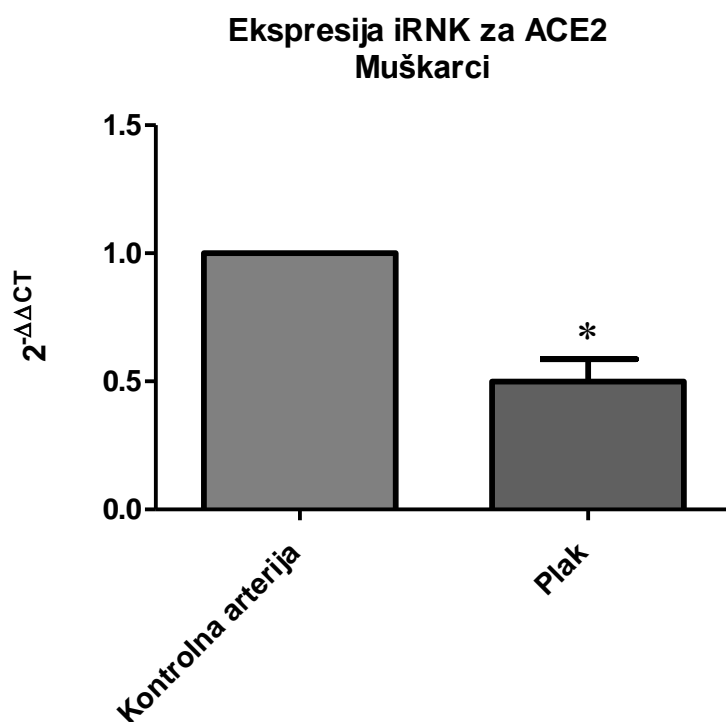
4.3.1.3. Ekspresija iRNK za ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka u odnosu na genotip polimorfizma I/D u genu za ACE

Ekspresija iRNK za ACE normalizovana na 18S rRNK u odnosu na genotip polimorfizma I/D u genu za ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima se nije statistički značajno razlikovala u celom ispitivanom uzorku (II, n=16, ID, n=29, DD, n=16; p=0.91, *Kruskal Waliss ANOVA*), ni podeljenom po polu (muškarci: II, n=11, ID, n=21, DD, n=10; p=0.74, *Kruskal Waliss ANOVA*; žene: II, n=5, ID, n=8, DD, n=6; p=0.76, *Kruskal Waliss ANOVA*).

4.3.2. Ekspresija iRNK za angiotenzin-konvertujući enzim homolog (ACE2) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

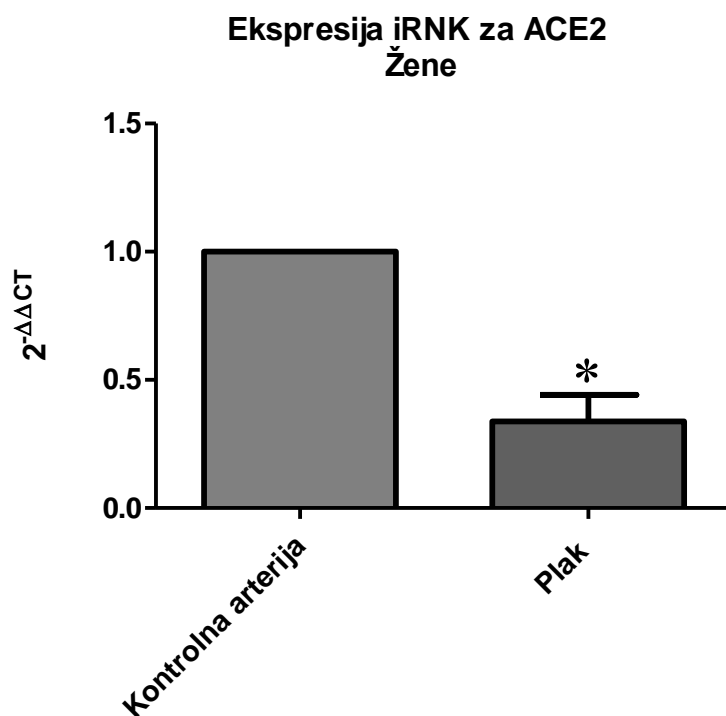
4.3.2.1. Relativna kvantifikacija ekspresije gena za ACE2

Grafik 4.4. Ekspresija iRNK za ACE2 normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod muškaraca u kontrolnom tkivu arterije (n=2) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (n=17). Prikazane su srednje vrednosti±standardna greška; * značajna razlika (*p=0.046, *REST Software, QIAGEN*).



Na **grafiku 4.4.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE2 u tkivu kontrolne arterije (komercijalno tkivo arterije bez znakova ateroskleroze) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod muškaraca. Informaciona RNK za ACE2 je bila statistički značajno manje eksprimirana u karotidnim aterosklerotskim plakovima u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije.

Grafik 4.5. Ekspresija iRNK za ACE2 normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod žena u tkivu kontrolne arterije (n=2) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod žena (n=9). Prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška. *značajna razlika (*p=0.037, *REST Software, QIAGEN*)

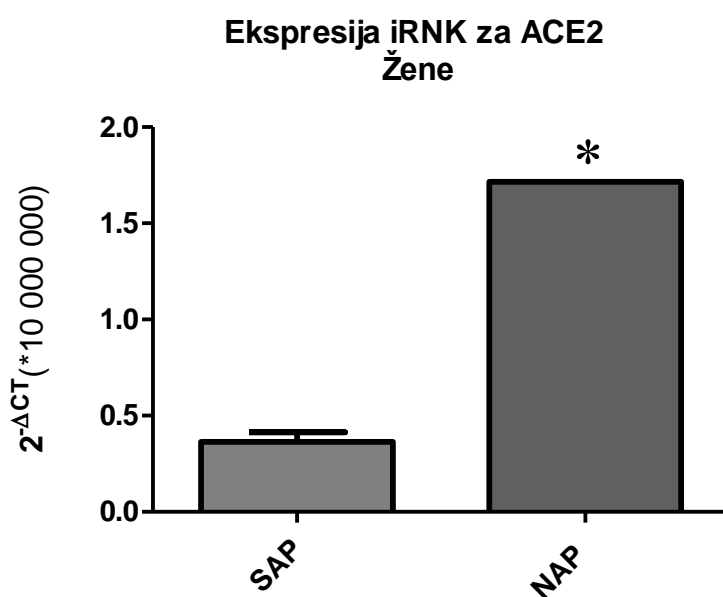


Na **grafiku 4.5.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE2 u tkivu kontrolne arterije (komercijalno tkivo arterije bez znakova ateroskleroze) i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka kod žena. Ekspresija iRNK za ACE2 bila je statistički značajno manje ekspimirana u karotidnim aterosklerotskim plakovima u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije.

4.3.2.2. Ekspresija iRNK za ACE2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

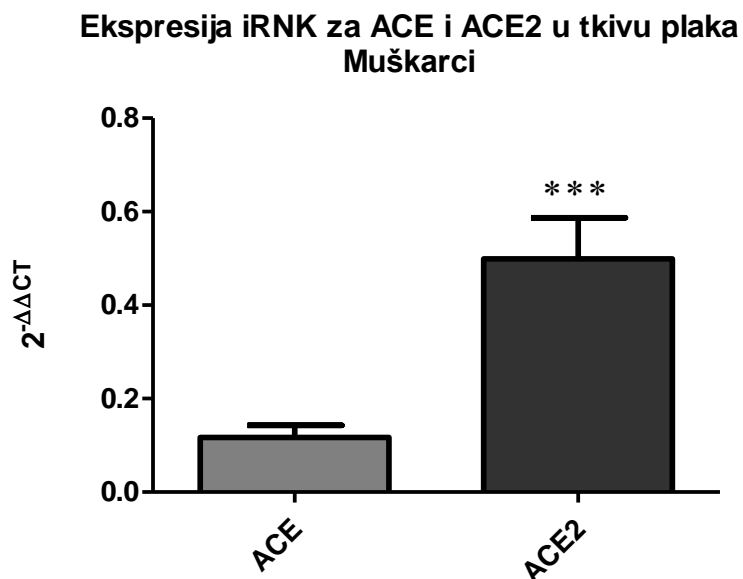
Ekspresija iRNK za ACE2 normalizovana na 18S rRNK u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim aterosklerotskim plakovima (NAP) kod muškaraca se nije statistički značajno razlikovala (SAP,n=11, NAP,n=6; $p=0.88$, *Unpaired t-test with Welch's correction*).

Grafik 4.6. Ekspresija iRNK za ACE2 normalizovana na 18S rRNK u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim aterosklerotskim plakovima (NAP) kod žena. SAP (n=8), NAP (n=1); prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška *značajna razlika (** $p=0.011$, *REST Software, QIAGEN*).



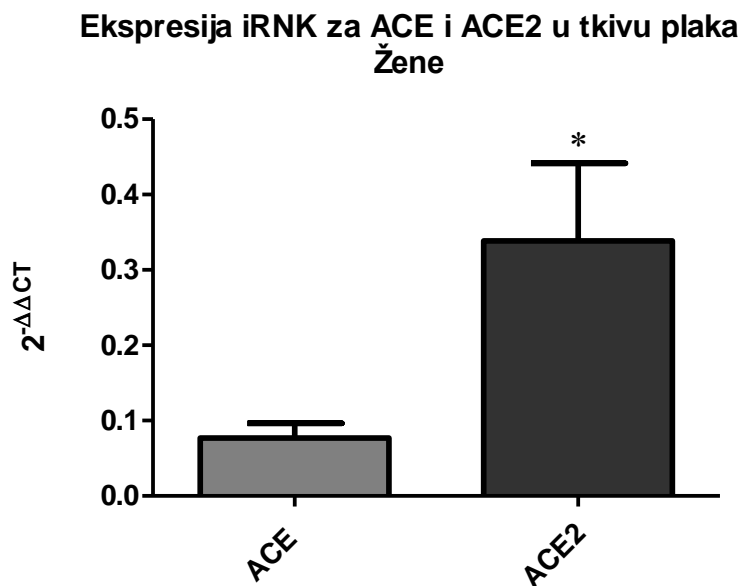
Na **grafiku 4.6.** predstavljena je ekspresija iRNK za ACE2 u stabilnim (SAP) i nestabilnim (NAP) aterosklerotskim plakovima kod žena. Nivo ekspresije iRNK za ACE2 bio je statistički značajno više eksprimiran u tkivu nestabilnog aterosklerotskog plaka u poređenju sa tkivom stabilnog aterosklerotskog plaka.

Grafik 4.7. Ekspresija iRNK za ACE i ACE2 u tkivu karotidnog plaka normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod muškaraca u uzorcima tkiva aterosklerotskog plaka u kojima je uspešno detektovana ekspresija iRNK za ACE2. (n=17); prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška; *značajna razlika (*p<0.05, *Unpaired t test with Welch's correction*).



Na **grafiku 4.7.** predstavljen je relativni nivo ekspresije ACE i ACE2 u karotidnom aterosklerotskom plaku kod muškaraca. Nivo ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u karotidnom aterosklerotskom plaku se u muškom polu statistički značajno razlikovao. Nivo ekspresije iRNK za ACE2 je u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka bio statistički značajno veći u poređenju sa nivoom ekspresije iRNK za ACE.

Grafik 4.8. Ekspresija iRNK za ACE i ACE2 u tkivu karotidnog plaka normalizovana na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod žena u uzorcima tkiva aterosklerotskog plaka u kojima je uspešno detektovana ekspresija iRNK za ACE2 (n=9); prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška *značajna razlika (*p=0.04, *Unpaired t test with Welch's correction*).

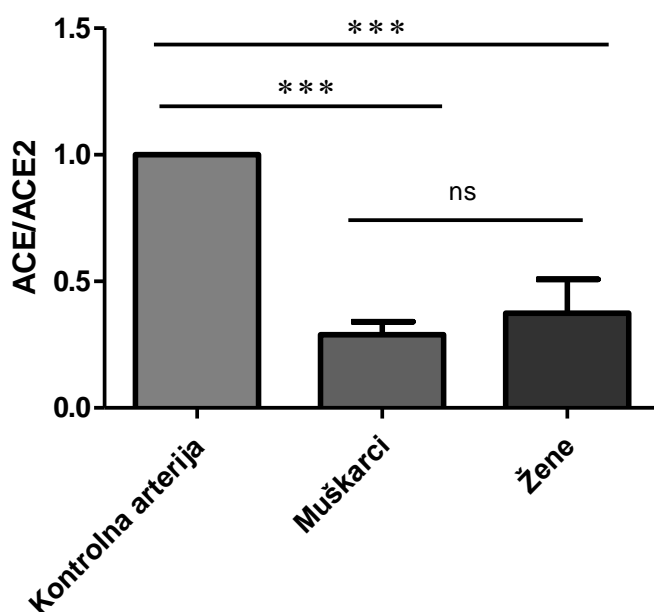


Na **grafiku 4.8.** predstavljen je relativni nivo ekspresije ACE i ACE2 u karotidnom aterosklerotskom plaku kod žena. Nivo ekspresije iRNK za ACE2 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka bio je statistički značajno veći u poređenju sa nivoom ekspresije iRNK za ACE.

4.3.3. Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka

Grafik 4.9. Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u tkivu plaka normalizovan na 18S rRNK i kalibrator (kontrolno tkivo arterije) kod muškaraca (n=17) i žena (n=9) vs kontrolno tkivo arterije. Prikazane su srednje vrednosti±standardna greška; *značajna razlika; ns– nije utvrđena statistički značajne razlike ($p < 0.05$, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u tkivu plaka



Na grafiku 4.9. predstavljen je relativni odnos ekspresije iRNK za ACE i ACE2 u tkivu karotidnog plaka. Relativni odnos ekspresije iRNK (ACE/ACE2) u odnosu na kontrolno tkivo arterije bio je statistički značajno niži i to 3.4 kod muškaraca odnosno 2.7 puta kod žena. Relativni odnos ekspresije iRNK za ACE/ACE2 je kod žena u poređenju sa muškarcima bio viši, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

4.3.4. Ekspresija iRNK za kolektrin (TMEM27) u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

4.3.4.1. Relativni nivoi iRNK za kolektrin (TMEM27) u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Ekspresija iRNK za kolektrin normalizovana na 18S rRNK u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim aterosklerotskim plakovima (NAP) nije se statistički značajno razlikovala kod muškaraca (SAP, n=29 i NAP, n=13; p=0.24, *Mann-Whitney U test*), ni kod žena (SAP, n=16 i NAP, n=3; p=1.00, *Mann-Whitney U test*).

4.3.5. Ekspresija iRNK za ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima

4.3.5.1. Relativni nivoi iRNK za ATR1 u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Ekspresija iRNK za ATR1 normalizovana na 18S rRNK u stabilnim (SAP) i nestabilnim (NAP) karotidnim aterosklerotskim plakovima se nije statistički značajno razlikovala u ukupnom ispitivanom uzorku (SAP, n=15, NAP, n=6; p=0.97, *Mann-Whitney U test*) ni podeljenom po polu (muškarci: SAP, n=8 i NAP, n=5; p=0.81, *Unpaired t-test with Welch's correction*; žene: SAP, n=7 i NAP, n=1; p=1.00, *Mann-Whitney U test*).

4.3.5.2. Ekspresija iRNK za ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1

Ekspresija iRNK za ATR1 normalizovana na 18S rRNK u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (AA vs AC vs CC) nije se statistički značajno razlikovala u celom ispitivanom uzorku (AA, n=8, AC, n=11, CC n=2; p=0.62, *Kruskal Waliss ANOVA*) ni podeljenom po polu (muškarci: AA

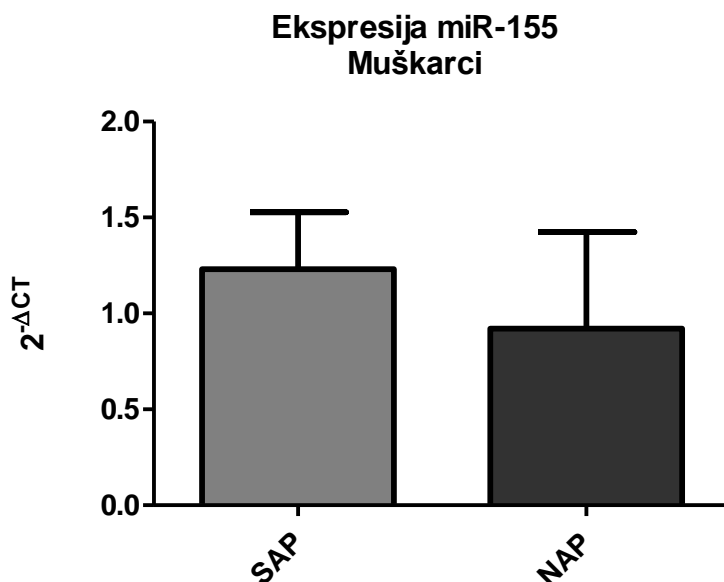
n=4, AC n=7, CC n=2; p=0.69, *One Way ANOVA-Bonferroni's Multiple Comparison Test*; žene: AA n=4, AC n=4, ekspresioni nivo iRNK za ATR1 kod genotipa CC nije utvrđen - CC n=0; p=0.56, *Mann-Whitney U test*).

4.3.6. Ekspresija miRNK miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

4.3.6.1. Relativni nivoi miR-155 u odnosu na tip plaka (SAP i NAP)

Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 se nije statistički značajno razlikovala između žena i muškaraca (žene, n=13 i muškarci, n=14; p=0.72, *Mann-Whitney U test*). Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim plakovima (NAP) se takođe nije statistički značajno razlikovala kako u celom ispitivanom uzorku (SAP, n=20 i NAP, n=7; p=0.36, *Mann-Whitney U test*), tako i u uzorku podeljenom po polu (muškarci: SAP n=9 i NAP n=5; p=0.24, *Mann-Whitney U test*; žene: SAP n=11 i NAP n=2; p=0.86, *Unpaired t-test with Welch' correction*).

Grafik 4.10. Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 u stabilnim (SAP) i nestabilnim karotidnim plakovima (NAP) kod muškaraca. SAP (n=9), NAP (n=5); prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška; (p=0.24, *Mann-Whitney U test*).

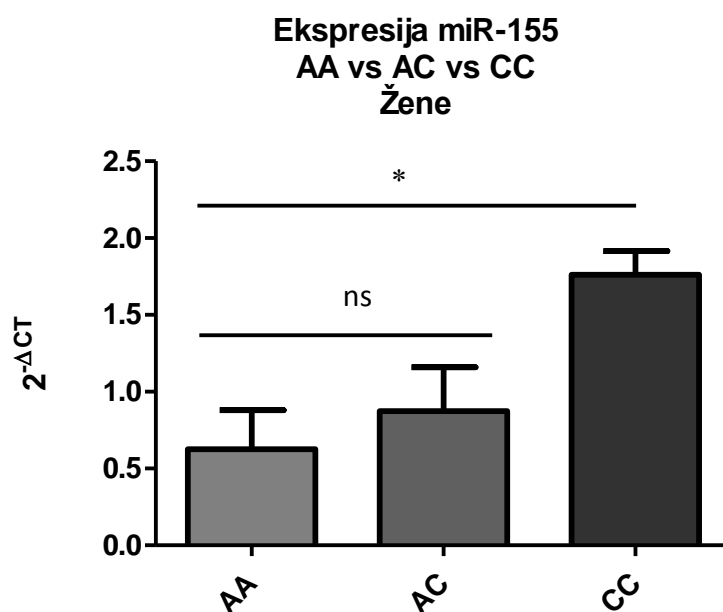


Na **grafiku 4.10.** predstavljena je ekspresija miR-155 u stabilnim (SAP) i nestabilnim (NAP) aterosklerotskim plakovima, kod muškaraca. Ekspresioni nivo miR-155 nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na tip aterosklerotskog plaka.

4.3.6.2. Ekspresija miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1

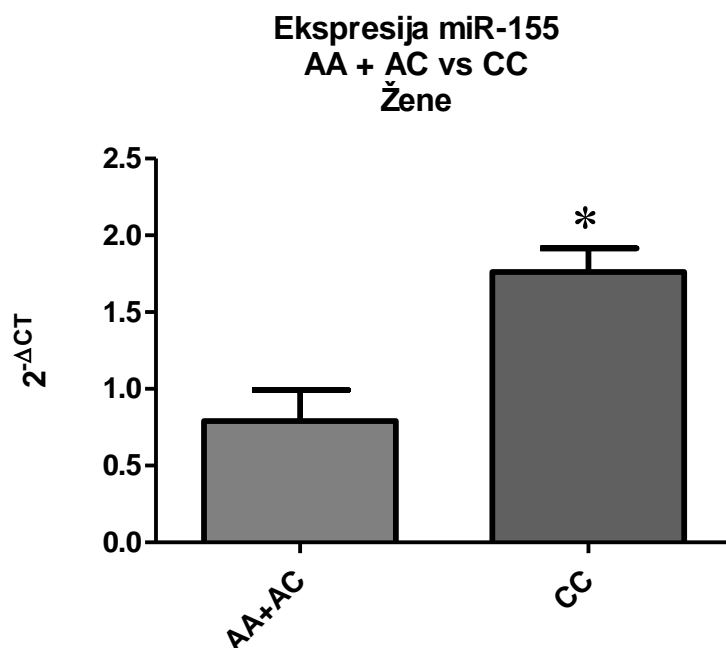
Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (AA vs AC vs CC) se nije statistički značajno razlikovala u celom ispitivanom uzorku (AA n=10, AC n=11, CC n=6; p=0.37, *Kruskal Waliss ANOVA*) i kod muškaraca (AA n=7, AC n=5, CC n=2; p=0.75, *Kruskal Waliss ANOVA*).

Grafik 4.11. Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (AA vs AC vs CC) kod žena AA (n=3), AC (n=6), CC (n=4); prikazane su srednje vrednosti \pm standardna greška. *značajna razlika; ns–nije utvrđena statistički značajna razlika; (*p=0.0429, *One Way ANOVA- Dunnett's Multiple Comparison test*, za poređenje između grupa u odnosu na referentni genotip AA).



Na **grafiku 4.11.** predstavljen je ekspresioni nivo miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod žena, po genotipu polimorfizma A1166C u genu za ATR1. Ekspresioni nivo miR-155 statistički se značajno razlikovao između genotipova AA i CC polimorfizma A1166C u genu za ATR1. Statistički značajna razlika u ekspresionom nivou miR-155 između genotipova AA i AC nije registrovana.

Grafik 4.12. Ekspresija miR-155 normalizovana na RNU44 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (AA+AC vs CC) kod žena. AA+AC (n=9), CC (n=4); prikazane su srednje vrednost±standardna greška; *značajna razlika; (*p=0.0125, *Unpaired t-test-two tailed*).



Na **grafiku 4.12.** predstavljen je ekspresioni nivo miR-155 u karotidnim aterosklerotskim plakovima, po genotipu polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (AA +AC vs CC). Ekspresioni nivo miR-155 se statistički značajno razlikovao između genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1.

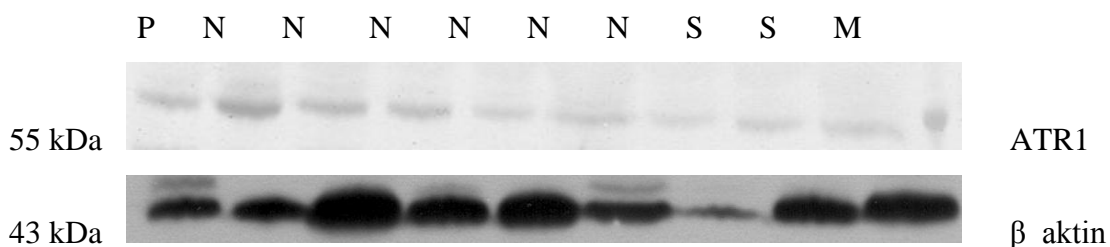
4.3.7. Ekspresija iRNK za ATR2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

Ekspresioni nivo iRNK za ATR2 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka nije utvrđen.

4.4. EKSPRESIJA PROTEINA RAS

4.4.1. Ekspresija proteina ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima

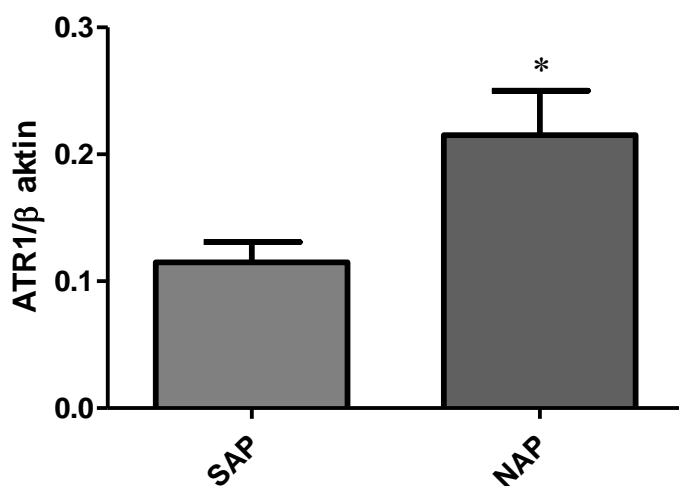
4.4.1.1. Detekcija proteina ATR1 Western Blot-metodom



Slika 4.3. Detekcija proteina ATR1 Western Blot-metodom u karotidnim aterosklerotskim plakovima (S-stabilan plak, N-nestabilan plak), P-pozitivna kontrola za ATR1–miometrijum, M-proteinski marker (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas*). Utvrđena ekspresija ATR1 u ispitivanim tkivima je detektovana alkalnom fosfatazom.

Na **slici 4.3.** predstavljena je ekspresija proteina ATR1 u ispitivanom tkivu aterosklerotskog plaka detektovanog Western Blot metodom.

Grafik 4.13. Ekspresija proteina ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na fenotip plaka. Ukupno SAP (n=3), NAP (n=5) prikazane su srednje vrednosti±standardna greška; *značajna razlika; (*p=0.048, *Unpaired t test with Welch's correction*).

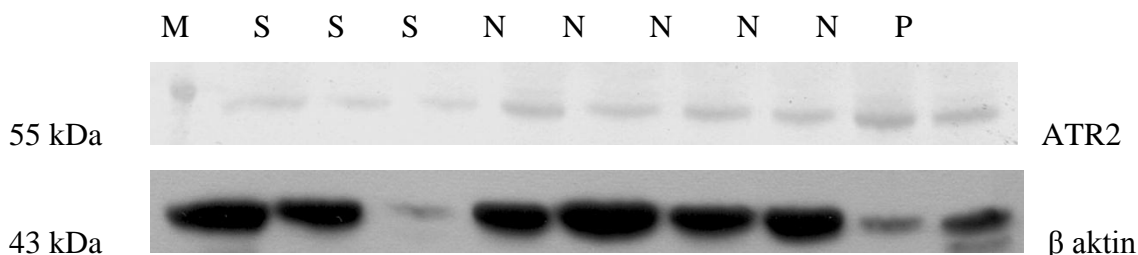


Na **grafiku 4.13.** predstavljena je ekspresija proteina ATR1 u ispitivanom tkivu KA u stabilnim (SAP) i nestabilnim (NAP) aterosklerotskim plakovima. Ekspresija proteina ATR1 bila je statistički značajno više eksprimirana u tkivu nestabilnog aterosklerotskog plaka

Ekspresija proteina ATR1 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 nije se statistički značajno razlikovala u celom ispitivanom uzorku (AA n=4, AC+CC n=4, p=0.23, T-test-two tailed).

4.4.2. Ekspresija proteina ATR2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima kod čoveka

4.4.2.1. Detekcija proteina ATR2 Western Blot-metodom



Slika 4.4. Detekcija proteina ATR2 Western Blot-metodom u karotidnim aterosklerotskim plakovima 1-2-(SAP-M), 3-(SAP-Ž), 4-8-(NAP-M), 9-pozitivna kontrola za ATR2 –miometrijum, M-proteinski marker (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas*).

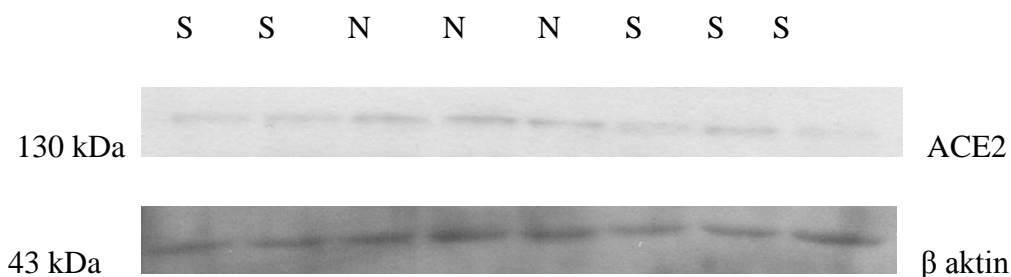
Na **slici 4.4.** predstavljena je ekspresija proteina ATR2 u ispitivanom tkivu aterosklerotskog plaka detektovanog Western Blot metodom.

Ekspresija proteina ATR2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na fenotip plaka kod muškaraca se nije statistički značajno razlikovala (SAP n=2 i NAP n=5; p=0.14, *T-test-two tailed*).

Ekspresija proteina ATR2 u plakovima se u odnosu na hemizigote polimorfizma A/G - 1332 u genu za ATR2 kod muškaraca nije statistički značajno razlikovala (A/- n=3 i G/- n=4; p=0.71, *T-test-two tailed*).

4.4.3. Ekspresija proteina ACE2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima

4.4.3.1. Detekcija proteina ACE2 Western Blot-metodom



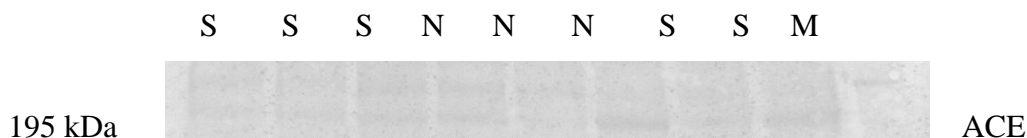
Slika 4.5. Detekcija proteina ACE2 Western Blot-metodom u karotidnim aterosklerotskim plakovima. 1-2 (SAP-Ž), 3-(NAP-Ž), 4-5-(NAP-M), 6-8 (SAP-M) M-proteinski marker (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas*).

Na **slici 4.5.** predstavljena je ekspresija proteina ACE2 u ispitivanom tkivu aterosklerotskog plka detektovanog Western Blot metodom.

Ekspresija proteina ACE2 u karotidnim aterosklerotskim plakovima u odnosu na fenotip plaka kod muškaraca se nije statistički značajno razlikovala (SAP n=3 i NAP n=2; $p=0.32$, *T-test-two tailed*).

4.4.4. Ekspresija proteina ACE u karotidnim aterosklerotskim plakovima

4.4.4.1. Detekcija proteina ACE Western Blot-metodom



Slika 4.6. Detekcija proteina ACE Western Blot-metodom u karotidnim aterosklerotskim plakovima 1-3 (SAP-M), 4-5-(NAP-M), 6-(NAP-Ž), 7-8 (SAP-Ž) –M-proteinski marker (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas*).

Na **slici 4.6.** predstavljena je ekspresija proteina ACE u ispitivanom tkivu aterosklerotskog plaka detektovanog Western Blot metodom.

5. DISKUSIJA

Ateroskleroza je kompleksna, multifaktorijalna, progresivna, hronična inflamatorna bolest zida arterijskih krvnih sudova u čijoj je osnovi poremećena homeostaza ćelija endotelijuma zida krvnog suda. Poremećaj homeostaze endotelijuma, uz prisustvo faktora rizika, dovodi do kontinuirane inflamacije (aktivacije imunog odgovora). Inflamacija ima ključnu ulogu u svim fazama formiranja i rasta aterosklerotskog plaka. Hronična inflamacija dovodi do tranzicije jednostavnih lezija u kompleksne aterosklerotske lezije (plakove) koje mogu dovesti do vrlo teških akutnih stanja kao što su šlog ili infarkt miokarda (Libby i sar., 2011).

Lokalno aktivirani RAS ima važnu ulogu u promociji inflamatornog procesa tokom ateroskleroze (Jacoby i Rader, 2003; Sata i Fukuda, 2010). Ang II kao glavni efektorski peptid sistema koji sintetise glavna enzimska komponenta aktivirajuće kaskade (ACE), aktivira proinflamatorne transkripcione faktore (NF- κ B, AP-1, HIF-1) (Pueyo i sar., 2000; Touyz RM, 2005). Kako RAS sistem funkcioniše na nivou tkiva nezavisno od cirkulacije, ekspresioni odnos njegovih enzimskih komponenti (ACE/ACE2) u tkivu plaka bi mogao da ukaže koji udeo kaskade sistema dominira u fenotipovima lezija pred endarterektomiju. S druge strane aktivacija ATR2 može imati slične (Louis i sar., 2011) ili suprotne efekte od onih koje ima aktivacija ATR1, a to su inhibicija proliferacije i migracije ćelija i apoptoza (Carey RM, 2005). Međutim, malo se zna o razlikama aktiviranog RAS sistema i nivoima ekspresije njegovih komponenti između različitih fenotipova ateroskleroze kod čoveka tokom progresije bolesti (Kaschina i sar, 2009). Studija koje su se bavile ispitivanjem nivoa ekspresije komponenti RAS sistema između fenotipova stabilnih i nestabilnih karotidnih aterosklerotskih plakova kod čoveka gotovo i da nema.

Konvencionalni faktori rizika za nastanak karotidne ateroskleroze. Ateroskleroza kao sistemska bolest arterijskih krvnih sudova bilo da javlja u karotidama ili koronarnim krvnim sudovima, ima zajedničko (konvencionalne) faktore rizika koji kao faktori sredine značajno utiču na tok bolesti. To su hipertenzija, pušenje, starija starosna dob, šećerna bolest, visok nivo triglicerida, LDL-a (Tendera i sar., 2011). U

zavisnosti od tipa krvnog suda, klasični faktori rizika različito deluju krajnji tok bolesti (Kannel WB i sar., 1994; Kannel i Wolf, 2006; Tendera i sar., 2011). U poređenju sa kontrolnom grupom, kod pacijenata sa KA je uočen statistički značajno veći broj pušača i hipertenzivnih osoba. Pacijenti su se u odnosu na kontrole statistički značajno razlikovali po godinama starosti, imali su veće vrednosti BMI, veću koncentraciju triglicerida i Lp (a) u plazmi i nižu koncentraciju HDL-a. To je ukazalo na delovanje faktora rizika koji doprinose razvoju lezija u grupi sa KA. Karotidni aterosklerotski plak javlja se češće posle 65. godine života, kada dolazi do značajne stenozе arterije (Rundek i sar., 2008). Starosna dob kod pacijenata sa KA u našoj studiji bila je > 65 godine života. U jednoj od studija novijeg datuma u populaciji Kavkazoida koja je pratila pacijente sa karotidnom aterosklerozom tokom 13 godina je pokazala da su starosna dob, pušenje, hipertenzivni status, kritične vrednosti LDL značajni markeri za progresiju karotidne ateroskleroze (Herder i sar., 2012).

Klinički parametri i događaji u karotidnoj aterosklerozi. Karotidna ateroskleroza je poznati biomarker asociran sa nastankom budućih cerebrovaskularnih događaja kao što je cerebrovaskularni insult (CVI) (šlog/moždani udar) (Rundek i sar., 2008). U našoj studiji u grupi pacijenata sa KA frekvencija pacijenata koji su imali CVI je bila 22.66 %. U našem uzorku pacijenata sa KA frekvencija TIA bila je 21.29 %. Visok procenat stenozе karotidne arterije (>70 %) važan je faktor rizika i može biti jedan od glavnih uzročnika za nastanak šloga (Rothwell i sar., 2000; Flaherty i sar., 2013). U grupi pacijenata sa dijagnostikovanom aterosklerozom karotida stepen stenozе unutar karotidne arterije je bio (>70 %). Frekvencija pacijenata koji su imali CVI bila je 22.67 %. Progresija ateroskleroze unutar zida karotidne arterije može dovesti do formiranja fenotipova lezija koje nose rizik za rupturu plaka i nastanak tromba (Naghavi i sar., 2003a; Naghavi i sar., 2003b; Mathiesen i sar., 2001). U našoj studiji frekvencija ulceracija je bila 13.48 %.

Genetičko-epidemiološka analiza gena RAS u karotidnoj aterosklerozi kojim se identifikuje prisustvo određenih alelnih varijanti polimorfizama u genima RAS kod ispitanika iz Srbije je imao za cilj da odgovori na pitanje koje su varijante gena RAS prisutne u našoj populaciji, kod zdravih i obolelih, da li su ove varijante gena asocirane sa nastankom bolesti, sa kliničkim parametrima karotidne ateroskleroze i da li njihovo prisustvo uticalo na ekspresioni nivo gena i proteina u tkivu karotidnog aterosklerotskog

plaka. U ovoj studiji su analizirani sledeći (funkcionalni) polimorfizmi u genima RAS: polimorfizam I/D u genu za ACE, polimorfizam A1166C u genu za ATR1 i polimorfizam -1332 A/G u genu za ATR2 u grupi zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od karotidne ateroskleroze sa teritorije Srbije.

Polimorfizam I/D u genu za ACE. U karotidnoj aterosklerozi polimorfizam I/D u genu za ACE je do sada u najvećem broju studija ispitivan sa kliničkim parametrom bolesti, IMZ. Velika meta analiza koja je objedinila 23 studije u kojima je analiziran polimorfizam I/D u genu za ACE između zdravih i obolelih sa dijagnostikovanom subkliničkom KA (»case-control« studije) pokazala je umerenu pozitivnu asocijaciju polimorfizma I/D u genu sa ACE sa IMZ karotidne arterije (Sayed-Tabatabaei i sar., 2003). Studije asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE sa kliničkim parametrima uznapredovale ateroskleroze (prisusvom uznapredovalih lezija u karotidnim krvnim sudu) su retke. U studiji 2008. u koronarnim krvnim sudovima je pokazano da je alel D polimorfizma I/D u genu za ACE statistički značajno uticao na povećanje broja stenoza u srcu, odnosno formiranje aterosklerotskih lezija unutar koronarnog stabla srca (Niemiec i sar., 2008). Studija asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE sa karotidnom aterosklerozom do sada nije rađena u populaciji Srbije. Studija iz 2012. godine je pokazala da je polimorfizam I/D u genu za ACE statistički značajno asociiran sa nastankom karotidne ateroskleroze u našoj populaciji (Kolaković i sar., 2012). U našoj populaciji je utvrđeno da je genotip DD statistički značajno češći u grupi pacijenata sa KA, odnosno alel D bio statistički značajno asociiran sa nastankom KA (Kolaković i sar., 2012). Posle korekcije na faktore rizika: dob, hipertenziju, pušenje i vrednosti HDL-a ta vrednost više nije bila statistički značajna (Kolaković i sar., 2012). Ranije sprovedene studije koje su bavile ispitivanjem asocijacije polimorfizma I/D u genu za ACE sa prisustvom plaka u karotidnim krvnim sudovima su rađene u manjim populacijama u Švedskoj i Japanu (Kostulas i sar., 1999; Watanabe i sar., 1997). U populaciji Švedske alel D je bio statistički značajno asociiran sa prisustvom aterosklerotskog plaka kod pacijenata sa KA u poređenju sa kontrolnom grupom (Kostulas i sar., 1999), dok je u grupi pacijenata iz Japana utvrđeno da je formiranje plakova unutar karotidnog krvnog suda bilo statistički značajno češće kod nosilaca genotipova ID+DD u poređenju sa genotipom II (Watanabe i sar., 1997). U našoj grupi pacijenata sa KA frekvencija alela D je bila slična sa frekvencijama u grupi pacijenata

sa KA iz populacije Italije (Dessi–Fulgheri i sar., 1995) i Švedske (Kostulas i sar., 1999). Studija novijeg datuma u kojoj su upoređivane kontrolna grupa i grupa pacijenata koji su imali visok stepen stenozе karotida ($\geq 70\%$), kao i naši pacijenti, je utvrdila statistički značajnu razliku u distribuciji alela i genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u populaciji Italije, nezavisno od delovanja tradicionalnih faktora rizika (Sticchi i sar., 2011). Naša prethodna studija iz 2002. godine pokazala je da je alel D polimorfizma I/D u genu za ACE u srpskoj populaciji asociran sa hipertenzijom (faktorom rizika) kod muškaraca (Stanković i sar., 2002). Stoga je jedan od ciljeva naše studije iz 2012. godine bio da spomenuti polimorfizam analiziramo, između normotenzivne kontrolne grupe i normotenzivne grupe pacijenata. Analiza poređenja normotenzivne kontrolne grupe i normotenzivne grupe pacijenata, je otkrila, da prethodno dobijena asocijaciju polimorfizma I/D u genu za ACE sa karotidnom aterosklerozom između kontrola i pacijenata nije bila pod uticajem moguće asocijacije polimorfizma I/D u za ACE sa hipertenzijom. Pri tom smo dobili da je polimorfizma I/D u genu za ACE još jače, statistički značajno asociran sa nastankom karotidne ateroskleroze kod normotenzivnih nezavisno od faktora rizika: starosne dobi i nivoa HDL-a (Kolaković i sar., 2012). Dobijena asocijacija genotipa DD sa prisustvom plaka u karotidnom krvnom normotenzivnih može biti vezana za proinflatornu ulogu Ang II nezavisno od regulacije krvnog pritiska (Kolaković i sar., 2012). Prisustvo DD genotipa može da ima značajne efekte na viši nivo lokalno generisanog ACE u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka (Rigat i sar., 1990; Suehiro i sar., 2004).

U doktorskoj tezi polimorfizam I/D u genu za ACE je ispitivan samo deo kontrolnog uzorka zdravih ispitanika u odnosu na spomenutu studiju iz 2012. godine. Uzorak je obuhvatio manju kontrolnu grupu zdravih ispitanika koja je poređena sa grupom pacijenata sa karotidnom aterosklerozom. To je jedan od razloga koji je verovatno uticao na razlike u dobijenim rezultatima. U ispitivanom uzorku učestalost genotipova i alela polimorfizma I/D u genu za ACE se između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa KA se nije statistički značajno razlikovala. Relativne frekvencije alela u kontrolnoj grupi su za alel I bile 45 % i za alel D 55 %, a u grupi pacijenata sa KA, 44 % i 56 %. Dobijeni rezultati u studiji iz 2012. godine su ipak verodostojniji u odnosu na analizirani uzorak ispitivan u uzorku doktorske teze. Dobijeni rezultati sugerišu da je

polimorfizam I/D u genu za ACE značajan nezavistan marker rizika za nastanak karotidne ateroskleroze u populaciji Srbije nezavisno od delovanja faktora rizika.

Polimorfizam I/D u genu za ACE u odnosu na tip aterosklerotskog plaka (SAP/NAP). Do sada su mnogobrojne studije ispitivale asocijaciju ovog polimorfizma sa različitim fenotipovima ateroskleroze. Ipak, mali je broj studija ispitivao asocijaciju polimorfizma sa kliničkim parametrima karotidne ateroskleroze: fenotipom uznapredovalih lezija, SAP/NAP plak. U grupi pacijenata sa KA, polimorfizam I/D u genu za ACE nije bio asociran sa formiranjem nestabilnog aterosklerotskog plaka. Međutim kada se grupa pacijenata podeli prema fenotipu plaka na SAP i NAP i po polu rezultati su drugačiji. U grupi pacijenata muškog pola je pokazano da je genotip II statistički značajno češći u nestabilnom plaku u poređenju sa fenotipom stabilnog plaka. Nosioци ovog genotipa su imali 2.26 puta statistički značajno veći odnos šansi za formiranje nestabilnog plaka u odnosu na nosioce alela D (ID+DD). Posle korekcije na konvencionalne faktore rizika (dob, pušenje i hipertenziju) nosioци genotipa II, su i dalje imali značajno veći odnos šansi za njegovo formiranje. Ovaj rezultat je pokazao da je u grupi pacijenata sa KA sa teritorije Srbije, polimorfizam I/D u genu za ACE kod muškaraca snažan nezavistan faktor rizika za nastanak nestabilnog aterosklerotskog plaka, odnosno genotip II spomenutog polimorfizma je asociran sa 2.5 puta većim odnosom šansi za njegovo formiranje. Samim tim genotip II polimorfizma I/D u genu za ACE bi mogao da reguliše odnosno da utiče na povećanje i/ ili smanjenje transkripcione aktivnosti ACE u plaku. Na taj način polimorfizam I/D bi mogao da nosi rizik za nastanak budućih događaja u karotidnoj aterosklerozi kao što je prolazni ishemijski događaj ili šlog. Kod žena je genotip II bio češći u nestabilnom plaku, ali nije bilo statistički značajno razlike u frekvencijama genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE u poređenju sa stabilnim plakom. Kod žena polimorfizam I/D u genu za ACE nije bio asociran sa formiranjem nestabilnog aterosklerotsog plaka. S obzirom da se strukturna anatomija karotidnih krvnih sudova razlikuje po polu (Goubergrits i sar., 2002), bolest bi mogla verovatno različito da napreduje između žena i muškaraca (Iemolo i sar., 2004). U tom smislu nastanak KA se kod žena odlaže i pomera tako da sama bolest nastupa 10 do 15 godina kasnije tokom života (Lorenzo i sar., 2007). Studija iz 2004. godine je sugerisala da polne razlike mogu biti vezane za efekat polnih hormona na remodelovanje zida krvnog suda tokom ateroskleroze (Iemolo i sar., 2004).

Poznat je protektivan (antinfamatorni) efekat endogenog estrogena na zid krvnog suda, na biohemijske parametre krvi, a samim tim na nastanak ateroskleroze (Perez-Lopez i sar., 2010; Pappa i Alevizaki, 2012). Pored toga za RAS je pokazano da polne razlike mogu definisati nivo ACE i (pro)renina u cirkulaciji, a samim tim molarni odnos krajnjih efektorskih molekula, Ang II i Ang 1-7 (Lynch i sar., 2007; Danser i sar., 1998; Reyes-Engel i sar., 2006). Ove razlike (polni dimorfizam) bi mogle delom objasne zašto određeni genotip RAS, utiče na koncentraciju ACE enzima i nivo Ang II u cirkulaciji i kako je regulacija gena RAS (gen za ACE, renin) pogođena delovanjem steroidnih hormona (testosteronom i estrogenom) (Reyes-Engel i sar., 2006; Danser i sar., 1998; Gallagher i sar., 1999).

Polimorfizam I/D u genu za ACE u odnosu na prisustvo/odsustvo prolaznog ishemijskog događaja (TIA). U grupi pacijenata sa KA polimorfizam I/D u genu za ACE nije bio statistički značajno asociran sa nastankom prolaznog ishemijskog događaja (TIA). Međutim, kada se grupa podeli po polu dobijeni su drugačiji rezultati. Nosioци DD genotipa po recesivnom modelu za alel D (II+ID vs DD) su imali 2.2 puta statistički značajno veći odnos šansi za nastanak prolaznog ishemijskog događaja kod muškaraca nezavisno od dobi, pušenje i hipertenzije. Rezultati naše studije su ukazali da je u grupi pacijenata sa KA kod muškaraca polimorfizam I/D u genu za ACE statistički značajan marker rizika za nastanak ovog događaja. Ovaj rezultat treba prihvatiti sa rezervom jer je broj ispitanika muškog pola koji su imali TIA bio mali (65 ispitanika). Studija koja je ispitivala asocijaciju polimorfizma I/D u genu za ACE sa ovim kliničkim događajem karotidne ateroskleroze nije utvrdila statističku značajnu razliku u frekvencijama genotipova ovog polimorfizma (Del Ser i sar., 2001). S obzirom da je u našoj grupi pacijenata sa KA kod muškaraca polimorfizam I/D u genu za ACE statistički značajno asociran sa formiranjem nestabilnog aterosklerotskog plaka, a kako destabilizacija lezija može da nosi rizik za nastanak TIA, dobijena asocijacija sa nastankom TIA kod muškaraca je očekivana.

Polimorfizam I/D u genu za ACE u odnosu na cerebrovaskularni insult (CVI). U našoj grupi pacijenata sa KA polimorfizam I/D nije bio faktor rizika za CVI. Naš rezultat je u saglasnosti sa rezultatima koje su bile urađene na većini populacija Kavkazoida, gde je pokazano da polimorfizam nije bio statistički značajno asociran sa rizikom za nastanak šloga (Zee i sar., 1999; Peterlin i sar., 2000; Szolnoki i sar., 2001;

Karagiannis i sar., 2004; Pera i sar., 2006; Tuncer i sar., 2006). Ranije sprovedena meta analiza iz 1998. godine, koja je prikupila sve studije do tada, je ukazala da alel D po recesivnom modelu (DD genotip) umereni, nezavisni faktor rizika za nastanak šloga (Sharma P, 1998). Meta analiza novijeg datuma iz 2012. godine koja je objedinila 50 publikacija, pokazala je da su heterozigotni i homozigotni nosioci alela D imali 1.16 odnosno 1.54 puta veći rizik za nastanak šloga (Zhang i sar., 2012). Ova studija je obuhvatila pripadnike različitih populacija (Azijate, Kavkazoide i jednu populacija sa afričkog kontinenta). Posle podele na grupe različite etničke pripadnosti pokazano je da je kod Azijata polimorfizam I/D u genu za ACE asociran sa većim rizikom za nastanak šloga (Zhang i sar., 2012). U studiji iz Koreje je pokazano da je polimorfizam I/D bio značajan marker rizika za nastanak šloga (Hong i sar., 2008). Ipak, dalja istraživanja su neophodna (replikativne studije u populacijama sa većim rizikom; zatim kod Hispanoamerikanaca i pripadnika crnačke populacije) zbog delovanja različitih sredinskih faktora koji u interakciji sa genom mogu da doprinesu riziku za nastanak šloga (Della-Morte i sar., 2013).

Polimorfizama I/D u genu za ACE i analiza ekspresionog nivoa iRNK za ACE u odnosu na genotipove polimorfizma. Za polimorfizam I/D u genu za ACE je pokazano da determiniše nivo enzima u cirkulaciji i može imati efekte na ekspresiju gena za ACE (Rigat i sar., 1990; Turet i sar., 1993; Suehiro i sar., 2004). Studije koje su se bavile ispitivanjem ekspresionog nivoa iRNK za ACE u tkivima, u odnosu na genotipove polimorfizma I/D rađene su u nekoliko studija. U tkivu pretkomora srca pacijenata koji su imali infarkt miokarda nije bilo statistički značajne razlike u nivoima ekspresije iRNK za ACE između genotipova polimorfizma I/D (Spruth i sar., 1999). Međutim u tkivu komore srca je između genotipova polimorfizma I/D u genu za ACE pokazana statistički značajna razlika u aktivnosti ACE enzima, pri čemu je najveća aktivnost zabeležena kod nosilaca DD genotipa u poređenju sa genotipovima ID i II (Danser i sar., 1995). U T limfocitima izolovanim iz mononukleara krvi je pokazano da se ekspresioni nivo/aktivnost enzima razlikovao po genotipu polimorfizma I/D pri čemu je najviši nivo uočen kod nosilaca DD genotipa u odnosu na ID i II genotip (Costerousse i sar., 1993). Studija novijeg datuma koja je ispitivala ekspresioni nivo iRNK po genotipovima polimorfizma I/D u genu za ACE u ćelijama mononukleara izolovanih iz krvi zdravih osoba je pokazala viši nivo iRNK gena za ACE kod nosilaca

alela D u poređenju sa nosiocima alela I (Suehiro i sar., 2004). Ovim je sugerisano da razlika u ekspresiji iRNK za ACE da može biti imati važnu ulogu u patogenezi ateroskleroze. U našoj studiji u tkivu aterosklerotskog plaka u grupi pacijenata sa KA pred endarterektomiju, ekspresioni nivo iRNK za ACE se po genotipu polimorfizma I/D se nije statistički značajno razlikovao. U tkivu nestabilnog aterosklerotskog plaka ekspresija iRNK za ACE se po genotipovima polimorfizma I/D u genu za ACE nije statistički značajno razlikovala.

Polimorfizam A1166C u genu za ATR1. Asocijativne studije polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa KA i kliničkim parametrima bolesti do sada nisu bile urađene u populaciji Srbije. Do sada je u našoj populaciji rađena studija asocijacije ovog polimorfizma sa hipertenzijom (faktorom rizika). U studiji iz 2003. godine smo pokazali da je polimorfizam A1166C u genu za ATR1 asociran sa nastankom esencijalne hipertenzije kod muškaraca (Stanković i sar., 2003). Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 nije bio asociran sa rizikom za formiranje karotidnih aterosklerotskih plakova u populaciji Srbije. Frekvencije genotipova i alela polimorfizma A1166C u genu za ATR1 se između kontrolne grupe zdravih ispitanika i grupe pacijenata sa KA nisu statistički značajno razlikovale. Ovaj rezultat je u skladu sa studijom u populaciji Kavkazoida iz Australije (Chapman i sar., 2001). Studije novijeg datuma u drugim populacijama, iz Italije i Japana su takođe pokazale da polimorfizam A1166C u genu za ATR1 nije bio asociran sa rizikom za nastanak stenozne karotida (Sticchi i sar., 2011; Nakai i sar., 2009). S druge strane u populaciji Kineza je pokazano, da je genotip CC polimorfizma A1166C u genu za ATR1 asociran sa karotidnom aterosklerozom kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom (Zhu i Meng, 2006).

Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 u odnosu na tip aterosklerotskog plaka (SAP/NAP). U okviru grupe pacijenata sa KA je pokazano da je polimorfizam A1166C u genu za ATR1 asociran sa povećanim rizikom za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka (Kolaković i sar., 2011). Kod pacijenata sa KA utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova polimorfizma u odnosu na tip aterosklerotskog plaka. Nosioci genotipa AC i CC, su imali 1.5 i odnosno 2.3 puta veći odnos šansi za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka nezavisno od pola, životne dobi, hipertenzije, pušenja i broja trombocita. Posmatrano odvojeno po polu, u grupi žena je pokazana još veća statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela

ispitivanog polimorfizma. Odnos šansi za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka kod žena je bio 1.9 kod nosilaca AC genotipa odnosno 3.7 kod nosilaca genotipa CC. Posle korekcije na faktore rizika (dob, hipertenziju, pušenje) i faktore fibrinolitičkog sistema koji su se razlikovali između pacijenata sa stabilnim/nestabilnim aterosklerotskim plakom (plazminogen i PAI) odnos šansi je bio još veći i ostao je statistički značajan.

Ovi rezultati su ukazali da je polimorfizam A1166C u genu za ATR1 snažan nezavistan genetički faktor rizika za formiranje nestabilnog aterosklerotskog kod pacijenata sa KA pred endarterektomiju. Verovatno da je u osnovi ovih rezultata različit odgovor krvnih sudova na faktore kao što je Ang II, a u odnosu na genotip polimorfizma 1166C u genu za ATR1. Ranije studije *in vitro* u krvnim sudovima čoveka, su pokazale da genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 značajno utiče na odgovor krvnih sudova na vazokonstriktorne molekule (Ang II), odnosno na njegove vazomotorne osobine (Amant i sar., 1997; Henrion i sar., 1998; Steeds i sar., 1999; Van Geel i sar., 2000). Naime, *in vitro* studije u koronarnim krvnim sudovima pacijenata sa aterosklerozom su pokazale statistički značajnu razliku u odgovoru na stimulaciju Ang II u odnosu na genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (Henrion i sar., 1998; Van Geel i sar., 2000). Statistički značajno veći odgovor je nađen kod genotipa CC u poređenju sa genotipovima AC i AA studija iz 1998 (Henrion i sar., 1998) i u poređenju sa nosiocima genotipova AC+AA (po recesivnom modelu nasleđivanja AA+AC vs CC) u studiji iz 2000. godine (Van Geel i sar., 2000). Ovi nalazi mogu da ukažu da genotip polimorfizma A1166C u genu za ATR1 može značajno da utiče na odgovor krvnih sudova na Ang II, a samim tim na remodelovanje zida krvnog suda i nastanka ateroskleroze. Pored toga prisustvo polimorfizma A1166C u genu za ATR1 (alel C) remeti vezivanje miR-155 za 3' UTR region gena što za posledicu može da ima povećanje ekspresije receptora (Martin i sar., 2006). Studija iz 2009. godine je pokazala pozitivnu asocijaciju alela C sa IMZ karotidne arterije kod žena (Plat i sar., 2009).

Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 u odnosu na cerebrovaskularni insult. U grupi pacijenata sa KA polimorfizam A1166C u genu za ATR1 nije bio asociran sa rizikom za nastanak cerebrovasularnog insulta ukupno, ni odvojeno po polu. To je u saglasnosti sa većinom studija koje su ispitivale asocijaciju polimorfizma sa šlogom.

Velika meta analiza iz 2011. koja je objedinila sve («case-control») studije koje su ispitivale asocijacije ovog polimorfizma sa šlogom je pokazala da u većini populacija ovaj polimorfizam nije bio asociran sa rizikom za nastanak šloga (Zhang i sar., 2011). Negativna asocijacija polimorfizma sa šlogom je potvrđena u grupi Kavkazoida iz Sjedinjenih Američkih Država (Hindorff i sar., 2002). Pozitivna asocijacija alela C sa rizikom za nastanak šloga je pokazana u ostrvskoj populaciji Italije (Sardinija) (Rubattu i sar., 2004) i populaciji iz Mađarske (Szolnoki i sar., 2006b). Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 je bio nezavisni faktor rizika za pojavu ranih lezija u beloj masi mozga u grupi pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom u populaciji Holandije (Henskens i sar., 2005) i nastanak šloga u grupi hipertenzivnih pušača iz Mađarske (Szolnoki i sar., 2006a). Izgleda da se u osnovi pozitivne asocijacije polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa šlogom nalazi hipertenzija kao bitan faktor rizika koji doprinosi njegovom nastanku (Dichgans M, 2007). Pored hipertenzije, povećan rizik za nastanak šloga je nađen u grupi pacijenata sa šećernom bolesti iz Kine (Zhang i sar., 2001). Studija novijeg datuma u Turskoj populaciji nije pokazala asocijaciju polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa rizikom za nastanak šloga (Hulyam i sar., 2013). Razlike u dobijenim rezultatima asocijacije polimorfizma A1166C u genu za ATR1 sa šlogom u populacijama, se mogu objasniti multifaktorijalnom etiologijom bolesti u kojoj faktori rizika u interakciji sa polimorfizmom mogu da doprinesu riziku za nastanak događaja.

Polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i analiza ekspresionog nivoa iRNK za ATR1 u odnosu na genotipove polimorfizma. Funkcionalna karakterizacija 3'UTR regiona gena za ATR1 je utvrdila da ovaj netransirajući region sadrži elemente koji stabilizuju odnosno destabilizuju (smanjuju/povećavaju) nivo ekspresije iRNK za ATR1 (Lehtonen i sar., 2007). Naime, pokazano je da uklanjanje 3'UTR regiona gena povećava nivo ekspresije iRNK za receptor na taj način što produžava njen poluživot (Lehtonen i sar., 2007). Prisustvo polimorfizma A1166C (alel C) u ovom regionu dovodi do delimičnog gubitka efekta koji ovaj region ima na destabilizaciju iRNK za ATR1 jer produžava njen poluživot (Lehtonen i sar., 2007). S druge strane u 3'UTR regionu gena se nalaze vezujuća mesta za proteine koji interaguju sa ovom iRNK, što je dovelo do spekulacija da bi promene u interakcijama RNK-protein mogle da objasne efekat koji polimorfizam A1166C može da ima na ekspresiju gena (Lehtonen i sar.,

2007). U ćelijama mononukleara kod ispitanika sa hipertenzijom mlađih od 40 godina nivo ekspresije iRNK za ATR1 se između genotipova polimorfizma A1166C nije statistički značajno razlikovao (Ceolotto i sar., 2011). Naša studija je pokazala da se nivo iRNK za ATR1 u tkivu aterosklerotskog plaka nije statistički značajno razlikovao po genotipovima polimorfizma A1166C. Međutim, ukoliko grupišemo genotipove po dominantnom modelu za alel C (AA vs AC+CC), utvrđen je trend većeg ekspresionog nivoa iRNK za ATR1 kod nosilaca alela C u poređenju sa nosiocima genotipa AA u celom ispitivanom uzorku i kod muškaraca, ali ta razlika u nivou ekspresije nije bila statistički značajna. Obzirom na to da ekspresija iRNK za ATR1 nije detektovana kod svih ispitivanih uzoraka već samo u 21 uzorku tkiva (34.43 %) dobijene rezultate treba uzeti sa rezervom jer se cela grupa deljenjem na tri genotipa značajno smanjuje, a samim tim se gubi i snaga testa da se utvrdi razlika.

Polimorfizam A1166C u genu za ATR1 i analiza ekspresije proteina ATR1 u odnosu na genotipove polimorfizma. U lizatu tkiva aterosklerotskog plaka nivo ekspresije ATR1 (zrela forma proteina) po genotipu polimorfizma A1166C u genu za ATR1 se nije statistički značajno razlikovao. Do sada je samo jedna studija ispitivala proteinski nivo ATR1 po genotipovima polimorfizma A1166C. U spomenutoj studiji iz 2011. godine koja je pored ekspresionog nivoa iRNK za ATR1 u lizatu mononukleara krvi hipertenzivnih ispitanika ispitivala i nivo ekspresije proteina je pokazala da je nivo proteina kod nosilaca genotipa AC i CC bio statistički značajno viši u odnosu na referentni genotip AA (Ceolotto i sar., 2011).

Polimorfizama A1166C u genu za ATR1 i analiza ekspresionog nivoa miR-155 u odnosu na genotipove polimorfizma. Kako je u *in vitro* studiji pokazano da miR-155 umanjuje endogenu ekspresiju ATR1 i signalni put posredovan Ang II (Martin i sar., 2006), a s obzirom da je potpuno komplementarna 3'UTR regionu gena za ATR1 gde se nalazi polimorfizam A1166C, jedan od ciljeva naše studije je bio da utvrdi ekspresioni nivo ove mikroRNK *ex vivo* u tkivu aterosklerotskog plaka po genotipu polimorfizma A1166C. Prisustvo polimorfizma A1166C u genu za ATR1, utiče na komplementarno vezuje miR-155 za sekvencu iRNK i tako utiče na nivo ekspresije receptora. U našoj studiji nivo ekspresije miR-155 se između genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1 nije statistički značajno razlikovao u tkivu aterosklerotskog plaka. Uočen je trend ka većoj ekspresiji miR-155 kod nosilaca genotipa CC u poređenju sa genotipom AA i

AC, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Kod žena je potvrđen statistički značajno veći nivo miR-155 kod genotipa CC u poređenju sa genotipom AA ispitivanog polimorfizma. Po recesivnom modelu za alel C je kod žena uočena statistički značajna razlika u nivou ekspresije miR-155 kod nosilaca genotipa CC u poređenju sa nosiocima AA+AC ($p=0.034$). Studije novijeg datuma u kojima je potvrđena statistički značajna razlika u nivoima ekspresije miR-155 između genotipova polimorfizma A1166C u genu za ATR1 dobili su Ceolotto i saradnici 2011. godine i Blanco i saradnici 2012. godine. Oni su u ćelijama mononukleara ispitanika sa esencijalnom hipertenzijom starosne dobi mlađih od 40 godina i u grupi ispitanika sa hroničnom bolešću srca (pacijenti sa ventrikularnom aritmijom) našli statistički značajno niži ekspresioni nivo miR-155 kod nosilaca genotipa AC i CC u poređenju sa genotipom AA (Ceolotto i sar., 2011; Blanco i sar., 2012). S obzirom da je u ovim studijama ispitivan ekspresioni nivo miR-155 u cirkulaciji, u ćelijama mononukleara (cirkulišuće miR-155), a mi smo ispitivali složeni konglomerat ćelija u kojem su pored mononukleara prisutne i druge ćelije, delimično neslaganje može da se objasni tkivnom specifičnošću.

Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2. Studije asocijacije polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u KA su retke. Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 nije bio asociran sa rizikom za formiranje karotidnih aterosklerotskih plakova u populaciji Srbije. Frekvencije genotipova polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 se između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa KA nisu statistički značajno razlikovale, ni u muškom ni u ženskom polu. Prethodno urađena studija u našoj populaciji je pokazala da je polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 asociran sa esencijalnom hipertenzijom kod muškaraca starosne dobi > 40 godina (Živković i sar., 2007). U familijarnim studijama (509 familija) polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 je bio asociran sa nastankom prerane koronarne bolesti (Alfakih i sar., 2005). U sličnoj studiji koja je sprovedena u familijama (885 familija) je pokazano da je polimorfizam A/G -1332 bio statistički značajno asociran sa restenozom koronarnih krvnih sudova koji zahtevaju revaskularizaciju (premošćavanje koronarnih krvnih sudova) u poređenju sa kontrolnom grupom (Alfakih i sar., 2007). Autori ove studije sugerišu da prisustvo polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 može značajno da utiče na ekspresioni ATR2 i tako doprinese nastanku aterosklerotskih plakova unutar zida krvnog suda (Alfakih i sar., 2007). Unutar gena za ATR2 je pored polimorfizma A/G -1332 identifikovano još

nekoliko polimorfizama : A1818T u 2. intronu, G4303A i C4599A u 3'UTR regionu gena (Katsuya i sar., 1997; Jin i sar., 2003; Katsuya i Morishita, 2012). Za polimorfizam C4599A je pokazano da je bio asociran sa rizikom za nastanak hipertenzije kod žena (Jin i sar., 2003). U ovoj studiji je pokazano da su polimorfizmi A/G -1332 i C4599A u interakciji odnosno snažnom LD (eng. *linkage disequilibrium*, LD) (Jin i sar., 2003).

Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na tip aterosklerotskog plaka (SAP/NAP) i prisustvo ulceracije u plaku. Razlika u distribuciji genotipova polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na tip plaka, kod žena i kod muškaraca nije bila statistički značajno različita. Međutim kod muškaraca je uočen trend veće frekvence hemizigota A/- kod ispitanika sa nestabilnim plakom. Međutim, muškarci hemizigoti A/- su imali 1.9 puta značajno veći odnos šansi za nastanak ulceracije i posle korekcije na faktore rizika (dob, pušenje i hipertenziju). Modulatorni efekat ovog polimorfizma je ispitivan do sada i u koronarnoj aterosklerozi, gde je pokazano da je alel A asociran sa povećanim rizikom za progresiju bolesti (Tousoulis i sar., 2010). Rezultati iste studije su pokazali da polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 moduliše sistemsku inflamaciju tj. nivoe (IL-6, CRP, VCAM-1) kod hipertenzivnih ispitanika muškog pola (Tousoulis i sar., 2010). U prethodnoj studiji u našoj populaciji je pokazano da su muškarci hemizigoti G/- imali povećan rizik za nastanak hipertenzije u starijoj starosnoj dobi preko 40 godina (Živković i sar. 2007), dok u sadašnjoj studiji, u grupi ispitanika sa KA, nije bilo uticaja polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 na nivo CRP i IL-6.

Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 u odnosu na cerebrovaskularni insult. Studija asocijacije polimorfizma -1332 A/G u genu za ATR2 sa cerebrovaskularnim insultom kod ispitanika sa teritorije Srbije do sada nisu rađene. U našoj grupi pacijenata je pokazano da su nosioci hemizigota G/- muškog pola imali 2.7 puta značajno veći odnos šansi za nastanak cerebrovaskularnog insulta u mozgu korigovan na (dob, hipertenziju, pušenje, nivo ApoA1, nivo DDIM, triglicerida i broj leukocita) (Kolaković i sar., 2013). Studije polimorfizma -1332 A/G u genu za ATR2 sa šlogom gotovo i da nema. S obzirom na modulatorni efekat polimorfizma -1332 A/G u genu za ATR2 koji ima na ekspresiju ATR2, mogući su efekti ovog polimorfizma na ekspresiju ATR2 u mozgu zahvaćenom ishemijom. Istraživanja u životinjskim modelima su ukazala na mogućnost aktivacije ATR2 u promovisanju diferencijacije i regeneracije nervnog tkiva

(Reinecke i sar., 2003; Li i sar., 2007; Mogi i Horiuchi, 2013). U blizini lokusa gena za ATR2 nalazi se gen za plastin 3 (PLS3), aktin vezujući protein i gen za član familije proteina kojii učestvuju u transportu neurotransmitera zavisnih od Na⁺ i Cl⁻ jona i transportu aminokiselina (SLC6A14) (Katsuya i Morishita, 2012). Možda aktivacija ovih gena potpomaže protektivne efekte ATR2 u reparaciji oštećenog tkiva mozga zahvaćenog ishemijom. Studija skorijeg datuma predlaže primenu agonista receptora ATR2 u terapiji akutne ishemije mozga (Dorrance AM, 2012).

Polimorfizam A/G -1332 u genu za ATR2 i analiza ekspresije iRNK za ATR2 i proteina ATR2 u odnosu na genotipove polimorfizma. *In vitro* studije koji su se bavile ispitivanjem funkcionalnih efekata polimorfizma A/G -1332 u genu za ATR2 su sugerisale modulatorni efekat ovog polimorfizma na ekspresiju receptora, na nivou iRNK i na nivou proteina (Nishimura i sar., 1999; Warnecke i sar., 2005). U tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka nije detektovana iRNK za ATR2. U ćelijskim linijama fibroblasta čoveka je utvrđen obrazac ekspresije transkripcionih varijanti gena za ATR2 u odnosu na genotipove polimorfizma -1332 A/G (Nishimura i sar., 1999). Ipak ovaj obrazac ekspresije iRNK za ATR2 u odnosu na genotipove polimorfizma je tkivno zavisano. Naime, u tkivu uretera sa stenozom kod dece sa kongenitalnim anomalijama bubrega (CAKUT) je pokazano da ekspresija različitih transkripcionih varijanti nije regulisana A/G -1332 polimorfizmom (Stanković i sar., 2010). Studija iz 2005. godine je ukazala da prisusvo polimorfizma A/G -1332 u kritičnom regionu gena (1. intronu) moduliše ekspresiju proteina, a ne alternativno iskrajanje iRNK za ATR2 (Warnecke i sar., 2005). Rezultati *in vitro* su utvrdili da je alel G imao statistički značajno veću luciferaznu aktivnost u transfekovanim ćelijskim linijama (Warnecke i sar., 2005). Međutim, nijedna od navedenih studija koje su sugerisale modulatornu ulogu polimorfizma A/G -1332 na ekspresiju proteina (Nishimura i sar., 1999; Warnecke i sar., 2005) nije ispitivala nivo ekspresije ATR2 na proteinskom nivou (Balmforth AJ, 2010). Stoga je jedan od ciljeva našeg rada bio da utvrdi nivo ekspresije proteina ATR2 *ex vivo* u lizatu tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka u odnosu na polimorfizam A/G -1332. Nivo ekspresije proteina je kod muškaraca hemizigota G/- bio niži u poređenju sa hemizigotom A/-, ali ta vrednost nije bila statistički značajna.

Analiza ekspresionog nivoa iRNK za ACE u karotidnoj aterosklerozi. U poređenju sa kontrolnim tkivom arterije ekspresioni nivo iRNK za ACE u tkivu karotidnog plaka

je bio statistički značajno različit. Jedina studija do sada koja se bavila utvrđivanjem ekspresionog nivoa ACE enzima u karotidnim aterosklerotskim lezijama je ukazala na povećanu transkripciju i translaciju ACE enzima u inflamatornim regionima složenih karotidnih aterosklerotskih plakova (Fukuhara i sar., 2000). U ovoj studiji je po prvi put detektovana iRNK za ACE *in situ* hibridizacijom u regionima tkiva komplikovanih (nestabilnih) karotidnih aterosklerotskih plakova dostupnih sa endarterektomija. U ćelijskom infiltratu ovih plakova iRNK za ACE detektovana je na nivou ćelija makrofaga, T limfocita i u intimi novo formiranih krvnih sudova (Fukuhara i sar., 2000). U našoj studiji razlika u ekspresionom nivou iRNK za ACE između tkiva nestabilnog i stabilnog aterosklerotskog plaka nije bila statistički značajna.

Pored ispitivanja nivoa iRNK za ACE u tkivu aterosklerotskog plaka jedan od ciljeva naše studije bio je utvrđivanje ekspresionog nivoa proteina. Protein ACE u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka čoveka je detektovan imunoblot metodom. Međutim, korišćenje poliklonskog antitela nije omogućilo da se preciznije kvantifikuje njegov proteinski nivo u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Prethodno sprovedena studija iz 2008. godine koja je ispitivala aktivnost enzima sugerisala je na slabu aktivnost enzima u karotidnom aterosklerotskom plaku koja je bila ispod nivoa praga detekcije (Sluimer i sar., 2008). Suprotno tome u koronarnim krvnim sudovima čoveka pokazana je povećana aktivnost ACE enzima udružena sa napredovanjem ateroskleroze (Diet i sar., 1996; Ohishi i sar., 1997; Ohishi i sar., 1999). Povećana aktivnost ACE enzima zabeležena u koronarnom aterosklerotskom plaku posle akutnih događaja (akutni koronarni sindrom) bi mogla biti posledica većeg broja inflamatornih ćelija u nestabilnom plaku i usko je vezanu za njegovu destabilizaciju (Hoshida i sar., 2001). Koronarni aterosklerotski plakovi pacijenata sa nestabilnom anginom pectoris su imali veći nivo ekspresije ACE enzima u odnosu na pacijente sa stabilnom plakovima na račun većih regiona zahvaćenih inflamacijom (makrofage) i proliferacije ćelija (GMĆ i endotelne ćelije) (Ribichini i sar., 2006). Nalazi u koronarnim aterosklerotskim plakovima su ukazali da interakcija između RAS sistema i inflamatornog medijatora citokina (IL-6), može imati efekte na balans između faktora koji utiču na stabilnost, odnosno, nestabilnost lezija (Schieffer i sar., 2000). Međutim, studija iz 2004. godine je sugerisala nešto drugačije rezultate. Naime, smanjena ekspresija ACE enzima u pojedinim regionima nestabilnog plaka može biti posledica gubitka sekrecije Ang

II/ACE u ćelijama makrofaga koji može da utiče na smanjenje proliferacije EĆ i GMC, a samim tim na tanjenje fibrozne kape plaka. S jedne strane ACE može biti faktor rizik za formiranje aterosklerotskih plakova u karotidnim krvnim sudovima, s druge strane kritičan marker rizika u krajnjim fazama sazrevanja lezija (regioni tanjenja fibrozne kape plaka). Studija iz 2004. godine je sugerisla da ekspresioni nivo ACE enzima može biti jedan od finalnih faktora koji može dovesti do rupture plaka, odnosno, njegove destabilizacije (Morioka i sar., 2004). Da li je smanjenje i/ili povećanje ACE enzima, faktor rizika u aterosklerozi ostaje da se vidi ubuduće.

Analiza ekspresionog nivoa iRNK za ATR1 i proteina ATR1 u karotidnoj aterosklerozi. U kontrolnom tkivu arterije i tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka čoveka TaqMan esejima smo ispitivali sledeće transkripcione varijante gena za ATR1 koje obuhvataju egzone: 1-4, 1-2-4, 1-2-3-4 i 0-4. U kontrolnom tkivu zdrave arterije ekspresioni nivo ispitivanih transkripcionih varijanti za ATR1 nije utvrđen. U tkivu aterosklerotskog plaka detektovali smo samo transkripcionu varijantu koja sadrži egzone 1-4. U kulturama monocita čoveka (U937 i THP-1 ćelijske linije) nije detektovana nijedna od gore spomenutih ispitivanih transkripcionih varijanti gena za ATR1, međutim u ćelijskoj liniji mikrovaskularnih endotelnih ćelija (HMEC-1) detektovane su sve ispitivane transkripcione varijante ovog gena (Groeschel M, 2009). U ovoj ćelijskoj liniji je pored ispitivanih spomenutih varijanti detektovana i transkripciona varijanta gena koja sadrži egzone 1-3-4 (Groeschel M, 2009). Ostaje da se vidi da li je ova varijanta gena eksprimirana u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Sugerisano je da ćelijske linije monocita u kojima nije detektovana nijedna od gore spomenutih transkripcionih varijanti iRNK za ATR1, verovatno eksprimiraju novu transkripcionu varijantu gena koje se prepisuju sa poslednjeg egzona (protein kodirajućeg regiona gena) (Groeschel M, 2009). Ranije studije *in vitro* i *ex vivo* u tkivima čoveka su pokazale da relativni nivo ekspresije iRNK za ATR1 regulisan na tkivno specifičan način i da se udeo pojedinih alternativnih transkripcionih varijanti funkcionalno razlikuje (Martin i sar. 2001b; Martin i sar. 2003). U tkivu srca čoveka je pokazano da 93-98 % ispitivanih transkripcionih varijanti čine varijanta koje sadrže egzone 1-4 i 1-2-4 (Warnecke i sar., 1999a). Iz biblioteke cDNK tkiva jetre čoveka, je pokazano prisustvo dodatne transkripcione varijante 0-4, koja se prepisuje sa dodatnog egzona dugog 155 bp (označen kao egzon "0") 5'UTR regiona gena (Guo i sar., 1994).

Za transkripcionu varijantu gena koja se prepisuje sa 1. i 4. egzona (1-4) je *in vitro* pokazano da u transfekovanim ćelijama negativno reguliše ATR1 na nivou translacije (Curnow i sar., 1995). S druge strane, smatra se da egzon 1 ima ulogu u regulaciji transkripcije tako što može da pojača promotorsku funkciju gena za ATR1 (Elton i Martin, 2003).

U našoj studiji nivo ekspresije detektovane transkripcione varijante koja sadrži egzone 1-4 se nije statistički značajno razlikovao po tipu aterosklerotskog plaka. Obzirom na to da ekspresija iRNK za ATR1 nije detektovana kod svih ispitivanih uzoraka već samo kod 21 uzorka (34. 43 %) dobijene rezultate treba uzeti sa dozom rezerve jer se snaga testa značajno smanjuje deljenjem ispitivane grupe po tipu plaka. Imajući u vidu činjenicu da u inflamatornom jezgru aterosklerotskog plaka monociti/makrofage predstavljaju dominantni tip ćelija, u ćelijskim linijama monocita (THP-1), a i u endotelnim ćelijama čoveka (HMEC-1) detektovana nova transkripciona varijanta koja se prepisuje sa poslednjeg egzona gena (Groeschel M, 2009) ostaje da se ispita da li je ova transkripciona varijanta eksprimirana *ex vivo* i u tkivu aterosklerotskog plaka. Treba napomenuti da određeni faktori mogu da utiču odnosno da regulišu ekspresioni nivo transkripcionih varijati gena za ATR1, a samim tim i ekspresioni nivo receptora. U ćelijskoj liniji fibroblasta čoveka je pokazano da tretman sa TGFβ-1 pojačava ekspresiju gena za ATR1 (Martin i sar., 2007). Verovatno da u ćelijama tkiva aterosklerotskog plaka neki od faktora inflamacije regulišu ekspresioni nivo ATR1.

Detekcija proteina ATR1 *ex vivo* u lizatu tkiva aterosklerotskog plaka je utvrđena metodom Western blota. Analiza je pokazala da se proteinski nivo ATR1 u lizatu tkiva plaka statistički značajno razlikuje između fenotipova, pri čemu je zabeležen statistički značajno viši nivo ekspresije proteina u nestabilnom plaku ($p=0.05$). *In vitro* i *in vivo* studije su ukazale na interakcija RAS i tromboze. Veći proteinski nivo ATR1 u ćelijama inflamatornog jezgra nestabilnog plaka ukazuje na veću aktivacija ATR1 u ćelijama ovog fenotipa bi mogao da doprinese njegovoj destabilizaciji.

Obimna studija analize ekspresije proteina u karotidnim aterosklerotskim plakovima je pokazala vremenske promene u ekspresiji proinflamatornog citokina IL-6 i ostalih inflamatornih molekula tokom progresije lezija posle akutnih događaja (TIA /šlog) (Peeters i sar., 2009). Kako inflamatorni proces dominira tokom progresije lezija,

povišeni nivoi proinflammatoryh molekula kao što je IL-6 u aterosklerotskom plakovima bi mogli da regulišu ekspresioni nivo ATR1. U studiji *in vitro* u kulturi GMĆ je pokazano da IL-6 pojačava ekspresioni nivo ATR1 na nivou iRNK i proteina (Wassmann i sar., 2004b). U kulturi GMĆ je pokazano da LDL povećava ekspresiju gena postranskripciono tako što stabilizuje nivo iRNK za ATR1 (Nickenig i sar., 1997). Pored toga pokazano je da ox-LDL povećava ekspresiju ATR1 u kulturi endotelijalnih ćelija čoveka (Li i sar., 1999; Li i sar., 2000). Nekoliko studija je ispitivao nivo ekspresije ATR1 u aterosklerotskim tkivima kod čoveka. U koronarnim aterosklerotskim plakovima pacijenata sa nestabilnom anginom pectoris je imunohistohemijom pokazana kolokalizacija IL-6 sa Ang II i ATR1 (Schieffer i sar., 2000). Kod pacijenata sa aterosklerozom u koronarnim krvnim sudovima poreklom sa autopsija pokazana je pozitivna korelacija ekspresije proteina ATR1 sa progresijom bolesti (Gross i sar., 2002). Nivo ATR1 je bio statistički značajno povišen u tkivu aorte zahvaćene aterosklerozom u poređenju sa zdravim tkivom arterije (Kaschina i sar., 2009). U ovoj studiji je pokazano da nivo ekspresije iRNK za ATR1 prati proteinski nivo receptora detektovan imunoblotom. U našoj studiji diskrepanca u nivou ekspresije ATR1 na proteinskom nivou i nivou iRNK u tkivu plaka, bi mogla da se pripiše specifičnostima transkripcione/postranskripcione regulacije receptora koji mogu da utiču na stabilnost iRNK, a koji mogu da utiču na nivo ekspresije proteina ATR1. Pored toga brojni faktori u tkivu plaka pored IL-6 i LDL mogu regulisati ekspresiju ATR1. Zaključak iz ovih studija je da nivo ekspresije gena treba utvrditi na nivou iRNK i na nivou proteina.

Analiza ekspresionog nivoa miR-155 u karotidnoj aterosklerozi. Studije utvrđivanja ekspresije miR-155 u karotidnoj aterosklerozi kod čoveka su retke. Ispitivanje profila ekspresije mikroRNK u aterosklerozi kod čoveka (eng. MicroRNA expression profiling-Human miRNA Microarray) pokazali su da je miR-155 statistički značajno povišena u karotidnom plaku u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije bez znakove ateroskleroze (leva unutrašnja grudna arterija) (Raitoharju i sar., 2011). Ekspresija miR-155 je utvrđena i u cirkulaciji, u ćelijama mononukleara, ispitanika sa koronarnom bolešću koja je bila statistički značajno niža u poređenju sa zdravom (kontrolnom) grupom (Fichtlscherer i sar., 2010). Ipak, ekspresioni nivo miR-155 do sada nije ispitivan po fenotpu karotidnog plaka. U našoj studiji nismo dobili statistički značajnu razliku u

nivou ekspresije miR-155 između stabilnog i nestabilnog plaka. Treba napomenuti da broj uzoraka sa fenotipom nestabilnog plaka bio manji u poređenju sa fenotipom stabilnih lezija. Povećanje broja uzoraka je neophodno za preciznije utvrđivanje moguće uloge miR-155 u progresiji bolesti. Za miR-155 je do sada u nekoliko *in vitro* studija pokazano da ima kritičnu ulogu u inflamatornim procesima u aterosklerozi. U odgovoru na stimulaciju Ang II transfekcija EĆ čoveka sa miR-155 je utišala ekspresiju ATR1, smanjila migraciju i adheziju Jurkatovih T limfocita za ove ćelije (Zhu i sar., 2011). Stimulacija ćelijske linije monocita čoveka (THP-1) oxLDL je dovela do dozno zavisnog povećanja ekspresije miR-155 (Chen i sar., 2009). Međutim, utišavanje miR-155 sa antisense oligonukleotidima je dovelo do povećanja unosa ox-LDL u ove ćelije i formiranje penušavih ćelija (Huang i sar., 2010). Ekspresija miR-155 u cirkulaciji u ćelijama mononukleara ispitanika sa koronarnom bolešću je bila statistički značajno niža u poređenju sa zdravom (kontrolnom grupom) (Fichtlscherer i sar., 2010). Detekcija mikroRNK u cirkulaciji (ekstraćelijski), a pored toga i u drugim telesnim tečnostima (serumu, plazmi) je ukazala da bi ovi molekuli mogli biti značajni prognostički markeri (Gupta i sar., 2010; Fichtlscherer i sar., 2011). Jedan od ciljeva budućih istraživanja bilo bi ispitivanje ekspresije miR-155 u tkivu plaka simultano sa ispitivanjem ekspresije u cirkulaciji.

Analiza ekspresionog iRNK za ATR2 i proteina ATR2. Detektibilan nivo ekspresije iRNK za ATR2 Taq-Man esejima u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka i kontrolnom tkivu arterije nije utvrđen. Činjenica da je ATR2 *in vitro* eksprimiran samo u određenim kulturama ćelija u određenim uslovima (izvor ćelija za kulturu, tip ćelija, broj pasaža, vreme diferencijacije ćelija) ukazala je na senzitivnost detekcije iRNK za ovaj receptor i otežala ispitivanje njegove funkcije (Sohn i sar., 2000; De Gasparo i sar., 2000). Studija koje su ispitivale nivo ekspresije gena za ATR2 u aterosklerozi kod čoveka gotovo i da nema. Jedina studija u kojoj je detektovan ekspresioni nivo gena za ATR2 u aterosklerozi jeste u tkivu aorte. U ovoj studiji nivo ekspresije ATR2 u poređenju sa zdravim tkivom aorte bio je statistički značajno povišen (Kaschina i sar., 2009). Nedetektibilan nivo ekspresije gena za ATR2 u tkivu plaka čoveka bi mogao da bude posledica kratkog poluživota molekula. S obzirom da je poluživot iRNK u nekima kulturama ćelija, R3T3 ćelijska linija fibroblasta miša, kratkotrajan (maksimalno do 20

h) (Csikos i sar., 1998) usled pojačane degradacije iRNK, dobijen rezultat u tkivu plaka nije iznenađujući.

Aktivacija ATR2 na proteinskom nivou zabeležena je u različitim stanjima remodelovanja tkiva koja su udružena sa inflamacijom: u zidu krvnog suda posle povrede, hipertrofiji leve komore srca (Akishita i sar., 2000; Yamamoto i sar., 2008; Steckelings i sar., 2010).

U lizatu tkiva karotidnog aterosklerotskog plaka utvrđen je detektabilni nivo ekspresije proteina ATR2. Ovim smo pokazali da je ATR2 aktiviran u karotidnom aterosklerotskom plaku pred endarterektomiju. U tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka čoveka ATR2 je detektovan imunohistohemijom (Johansson i sar., 2008). Imajući u vidu činjenicu da inflamatorni citokini regulišu ekspresiju ATR2 (Horiuchi i sar., 2000) i njegovu reekspresiju posle povrede zida krvnog suda, nije iznenađujuća detekcija ATR2 u tkivu aterosklerotskog plaka. Proteinski nivo ATR2 u aterosklerozi je Western blot metodom *in vitro* pokazan u ćelijskoj liniji monocita koje su stimulisane Ang II, TNF- α , faktorom stimulacije kolnija makrofaga (M-CSF) (Kim i sar., 2005). Stimulacija ovih ćelija agonistom ATR2, CGP-42112A je dovela do sinteze MMP-1, matriks-metaloproteinaze koja može biti uključena u degradaciju fibrozne kapa plaka, a samim tim u njegovoj rupturi i remodelovanju (Kim i sar., 2005).

Analiza ekspresionog nivoa iRNK za ACE2 i proteina ACE2. U poređenju sa kontrolnim tkivom arterije ekspresioni nivo iRNK za ACE2 u tkivu karotidnog plaka bio je statistički značajno smanjen. Studija novijeg datuma koja je ispitivala ekspresiju ACE2 u koronarnim aterosklerotskim plakovima u dijabetesu tipa II sugerisala je da je ekspresija gena ekstremno niska (Purushothaman i sar., 2013), što je u saglasnosti sa našim rezultatom.

U odnosu na fenotip plaka, stabilni i nestabilni, u našoj studiji ekspresioni nivo iRNK za ACE2 se nije statistički značajno razlikovao. U jedinoj do sada sprovedenoj studiji u karotidnoj aterosklerozi kod čoveka *in situ* hibridizacijom detektovana je iRNK za ACE2 u svim slojevima zida zdravih karotidnih arterija, u ranim lezijama kao i uznapredovalim, stabilnim i nestabilnim karotidnim aterosklerotskim plakovima (Sluimer i sar., 2008). Povećanjem broja uzoraka u našoj studiji i tehnološki savremenijoj karakterizaciji plakova biće omogućeno preciznije definisanje uloge ACE2 u progresiji KA.

U našoj studiji je utvrđen proteinski nivo enzima ACE2 u ukupnom lizatu tkiva aterosklerotskog plaka. Kvantifikovani nivo ekspresije ACE2 po fenotipu plaka kod muškaraca je bio viši u lizatu tkiva nestabilnog plaka u poređenju sa tkivom stabilnog plaka, ali s obzirom na mali broj uzoraka razlika nije dostigla značajnost, ali bi trebalo ispitati ovaj trend na većem broju uzoraka. Studija iz 2008. godine koja je ispitala tkivnu imunodetekciju proteina ACE2 u krvnim sudovima u srca pacijenata koji su imali operaciju premošćavanja krvnih sudova je ukazala na tkivnu specifičnost ekspresije ovog molekula shodno tipu krvnog suda i slojevima zida (Zulli i sar., 2008). U karotidnom aterosklerotskom plaku je pored imunodetekcije ispitivana i detektovana funkcionalna aktivnost enzima ACE2 (Sluimer i sar., 2008). Zabeležena niža aktivnost ACE2 enzima u stabilnim aterosklerotskim lezijama u poređenju sa ranim lezijama i nestabilnim aterosklerotskim lezijama sklonih trombozi je ukazala da u različitim stupnjevima bolesti postoji diferencijalna aktivnost enzima (Sluimer i sar., 2008). U budućim ispitivanjima treba uzeti u obzir i različite faze nastanka i progresije bolesti.

Odnos ekspresije iRNK ACE/ACE2. U tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka u kojima je utvrđen nivo ekspresije iRNK za ACE i ACE2 je pokazano da je relativni nivo ekspresije iRNK za ACE2 u poređenju sa nivoom iRNK za ACE bio statistički značajno viši. Ovaj rezultat može ukazati da je u obolelom tkivu plaka balans ekspresije ova dva ključna enzima RAS pomeren u smeru deaktivirajuće kaskade sistema koju čine ACE2/Ang (1-7)/ Mas. Relativni odnos ekspresije ACE/ACE2 u tkivu plaka je u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije bio statistički značajno niži i to 3.4 puta u muškom polu, dok je kod žena bio niži 2.7 puta. Utvrđeno smanjenje nivoa ekspresije ACE/ACE2 u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije bi moglo da ukaže da u tkivu plaka mogu dominirati drugi enzimi koji učestvuju u generisanju Ang II. Naime u aorti čoveka zahvaćenoj aterosklerozom je pokazano da Ang II može da se generiše nezavisno od ACE enzima, enzimom himazom (Ihara i sar., 1999). Sugerisano je da koekspresija ACE/ACE2 u tkivima čoveka može da predstavlja jedan od primarnih model sistema za izučavanje komparativne ćelijske biologije ACE i ACE2, odnosno njihove opozitne funkcije u remodelovanju tkiva kod čoveka (Guy i sar., 2008). Recipročna ekspresija ACE i ACE2 (povišen nivo jednog enzima, a smanjen nivo drugog enzima) u obolelom bubregu i srcu ispitanika sa hipertenzijom je u poređenju sa zdravim tkivom implicirala na disbalans ova dva enzima (Koka i sar. 2008). Povišen

ekspresioni nivo jednog enzima u poređenju sa drugim a može da determiniše odnos angiotenzinskih peptida koju ovi enzimi generišu (Ang II/Ang (1-7)), a samim tim u ukaže u kom je smeru pomeren balans RAS sistema u tkivu aterosklerotskog plaka.

Analiza ekspresionog nivoa kolektrina (TMEM27). Ekspresija kolektrina u aterosklerotskom plaku do sada nije detektovana. U kontrolnim tkivu arterije zdravog čoveka ekspresioni nivo iRNK za TMEM27 nije detektovan. Međutim u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka je utvrđen ekspresioni nivo TMEM27. S obzirom je uloga TMEM27 vezana za regulaciju homeostaze u tkivima nije iznenađujuća detekcija TMEM27 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Nivo ekspresije iRNK za TMEM27 se između fenotipova plaka nije statistički značajno razlikovao. Nivo ekspresije kolektrina je pod kontrolom visokih koncentracija soli (Yasuhara i sar., 2008). Na taj način bi mogao biti odgovoran u zadržavanju soli i vode i nastanku HT osetljive na količinu unete soli (Yasuhara i sar., 2008). Pacijenti sa KA u našoj studiji kod kojih je detektovan TMEM27 jesu u velikom procentu hipertenzivni (88.5 %).

Genetičko-epidemiološka analiza zajedno sa analizom ekspresije gena RAS je imala za cilj da utvrdi da li je prisustvo alelnih varijanti polimorfizamaba u genima za RAS asocirano sa predispozicijom za nastanak KA, njenim kliničkim karakteristikama i događajima i da li one utiču na nivo ekspresije iRNK za komponente RAS na tkivnom nivou, u aterosklerotskom plaku. Iako su GWAS studije (eng. *genome wide association studies*, GWAS) "mainstream" u otkrivanju genetičkih faktora rizika u bolesti, pristup izučavanja gena kandidata i dalje je aktuelan u genetičkoj epidemiologiji, jer direktno povezuje pojedinačne gene sa fenotipom u bolesti. Genetičko-epidemiološka analiza funkcionalnih polimorfizama u genima RAS u ispitanom uzorku u populaciji Srbije, između kontrolne grupe zdravih ispitanika i pacijenata sa KA, za ispitivane polimorfizme u genima RAS nije pokazala statistički značajnu asocijaciju sa nastankom bolesti. Međutim, u grupi pacijenata sa KA polimorfizam I/D u genu za ACE i A1166C u genu za ATR1 bili su asocirani sa formiranjem NAP. U skladu sa tim ova dva polimorfizma bi se mogla izdvojiti kao značajni prognostički markeri za formiranje nestabilnih lezija. Polimorfizmi, I/D u genu za ACE i A/G -1332 u genu za ATR2 bi kod muškaraca mogli biti markeri koji modulišu tok bolesti u smeru nastanka TIA i CVI. Ipak treba imati u vidu da studije asocijacije pojedinačnih genotipova sa

fenotipovima bolesti u velikom broju slučajeva otkrivaju mali deo totalnog, kombinovanog uticaja više gena ili više polimorfizama unutar istog gena. Stoga je jedan od naših budućih ciljeva u daljem istraživanju da utvrdi kombinovani efekat ovih polimorfizama (epistatičke interakcije) sa fenotipom bolesti koji bi dodatno pomogao bolje definisanje genetičkog profila pacijenata sa KA. Otkrivanje genetičkih markera RAS u KA bi mogla biti od značaja za bolju optimizaciji terapije ateroskleroze u bliskoj budućnosti. U tkivu plaka, polimorfizmi I/D u genu za ACE i A1166C u genu za ATR1 nisu modulirali ekspresiju iRNK za ove molekule. Pokazali smo da je u grupi žena polimorfizam A1166C asociran sa povišenim nivoom miR-155. Nivo ekspresije proteina ATR1 je bio statistički značajno viši u NAP u odnosu na SAP. Interakcija između polimorfizma A1166C u genu za ATR1, nivoa ekspresije miR-155 i proteinskog nivoa ATR1 bi mogla da ima kritičnu ulogu u progresiji karotidne ateroskleroze. Statistički značajno niži odnos ekspresije ACE/ACE2 u tkivu plaka u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije sugerise na veću ekspresiju ACE2 u odnosu na ACE u tkivu aterosklerotskog plaka. To ukazuje na disbalans u sintezi ova dva enzimska molekula u karotidnom aterosklerotskom tkivu u odnosu na odnos koji postoji u kontrolnom tkivu. Utvrđen viši nivo ekspresije ACE2 u tkivu nestabilnog plaka (kod žena) može ukazati na kompenzatornu ulogu ACE2 u procesu remodelovanja tkiva posle rupture u plaku. TMEM27 je prvi put detektovan u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. S obzirom da ovaj molekul može da ukaže na poremećaj metabolizma AK, jedan od ciljeva budućih istraživanja bi bio da utvrdi kakva je korelacija ekspresionog nivoa TMEM27 sa nivoom homocistena, poznatog nezavisnog faktora rizika arteroskleroze.

6. ZAKLJUČCI

1. Polimorfizmi I/D u genu za ACE, A1166C u genu za ATR1 i -1332 A/G u genu za ATR2 nisu asocirani sa rizikom za nastanak karotidne ateroskleroze (KA) u ispitanom uzorku u populaciji Srbije.
2. Polimorfizam I/D u genu za ACE je nezavisni faktor rizika za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka (NAP) u grupi pacijenata muškog pola. Nosioци genotipa II imaju 2.52 puta veći korigovani rizik za formiranje NAP od nosioca genotipova koji sadrže alel D.
3. Polimorfizma A1166C u genu za ATR1 je nezavistan faktor rizika za formiranje nestabilnog aterosklerotskog plaka (NAP). Nosioци alela C, po dominantnom modelu nasleđivanja, imaju 1.94 puta veći korigovani rizik za formiranje NAP od nosilaca genotipa AA.
4. Polimorfizam -1332 A/G u genu za ATR2 nije asociran sa rizikom za formiranje NAP kod pacijenata sa KA.
5. Polimorfizam -1332 A/G u genu za ATR2 je značajan nezavistan faktor rizika za nastanak cerebrovaskularnog insulta (CVI) u grupi pacijenata muškog pola. Hemizigot G/- je asociran sa 2.67 većim korigovanim rizikom za nastanak CVI u odnosu na hemizigot A/-.
6. Polimorfizam I/D u genu za ACE je asociran sa nastankom prolaznog ishemijskog događaja (TIA) u grupi pacijenata muškog pola. Genotip DD, po recesivnom modelu nasleđivanja, asociran je sa 2.2 puta većim korigovanim rizikom za nastanak TIA nego genotipovi koji sadrže alel I.
7. U tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka iRNK za ACE, ACE2, TMEM27 i ATR1 se ekspimiraju, a iRNK za ATR2 se ne ekspimiraju.
8. Utvrđeni ekspresioni nivoi iRNK za ACE i ACE2 bili su značajno sniženi u plaku pacijenata oba pola u odnosu na kontrolno tkivo arterije. Relativni nivo ekspresije iRNK za ACE u poređenju sa nivoom iRNK za ACE2 bio je statistički značajno niži.

9. Relativni odnos ekspresije ACE/ACE2 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka je u poređenju sa kontrolnim tkivom arterije bio 3.4 puta statistički značajno niži kod muškaraca, a 2.7 puta kod žena.
10. Nivoi ekspresije iRNK za ACE i ATR1 se nisu statistički značajno razlikovali po genotipovima ispitivanih polimorfizma I/D i A1166C.
11. U tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka je utvrđena ekspresija mikro-RNK, miR-155. Utvrđeni nivo ekspresije miR-155 se po tipu plaka nije statistički značajno razlikovao.
12. Nivo ekspresije miR-155 se statistički značajno razlikovao u odnosu na genotipove polimorfizma A1166C u genu za ATR1 u grupi pacijenata ženskog pola. Genotip CC je, po recesivnom modelu nasleđivanja, statistički značajno asociran sa višim nivoom ekspresije miR-155.
13. Nivo ekspresije proteina ATR1 bio je statistički značajno viši u NAP u odnosu na stabilni aterosklerotski plak, dok se nivoi proteina ACE2 i ATR2 nisu statistički značajno razlikovali po tipu plaka.
14. Nivoi ekspresije proteina ATR1 i ATR2 nisu statistički značajno razlikovali po genotipovima ispitivanih polimorfizama A1166C i -1332 A/G.

7. LITERATURA

1995. Carotid artery plaque composition--relationship to clinical presentation and ultrasound B-mode imaging. European Carotid Plaque Study Group. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 10, 23-30.
2011. Reprinted article "Carotid artery plaque composition--relationship to clinical presentation and ultrasound B-mode imaging". *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 42, 022.
- ABDALLA, S., LOTHER, H. & QUITTERER, U. 2000. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, 407, 94-8.
- ABDALLA, S., LOTHER, H., ABDEL-TAWAB, A. M. & QUITTERER, U. 2001a. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 276, 39721-6.
- ABDALLA, S., LOTHER, H., EL MASSIERY, A. & QUITTERER, U. 2001b. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 7, 1003-9.
- ABELSON, J. F., KWAN, K. Y., O'ROAK, ABDALLA, S., LOTHER, H., EL MASSIERY, A. & QUITTERER, U. 2001. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 7, 1003-9.
- ADAMS, B. D., FURNEAUX, H. & WHITE, B. A. 2007. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol*, 21, 1132-47.
- AKISHITA, M., HORIUICHI, M., YAMADA, H., ZHANG, L., SHIRAKAMI, G., TAMURA, K., OUCHI, Y., DZAU, VJ. Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiol Genomics*. 2000 Jan 24;2(1):13-20.
- AKPINAR, P., KUWAJIMA, S., KRUTZFELDT, J. & STOFFEL, M. 2005. Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab*, 2, 385-97.
- ALFAKIH, K., BROWN, B., LAWRENCE, R. A., WARBURTON, P., MAQBOOL, A., WALTERS, K., SAMANI, N. J., BALL, S. G., BALMFORTH, A. J. & HALL, A. S. 2007. Effect of a common X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (-1332 G/A) on the occurrence of premature myocardial infarction and stenotic atherosclerosis requiring revascularization. *Atherosclerosis*, 195, 6.
- ALFAKIH, K., LAWRENCE, R. A., MAQBOOL, A., WALTERS, K., BALL, S. G., BALMFORTH, A. J. & HALL, A. S. 2005. The clinical significance of a common, functional, X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in a cohort of 509 families with premature coronary artery disease. *Eur Heart J*, 26, 584-9.
- ALFAKIH, K., MAQBOOL, A., SIVANANTHAN, M., WALTERS, K., BAINBRIDGE, G., RIDGWAY, J., BALMFORTH, A. J. & HALL, A. S. 2004. Left ventricle mass index and the common, functional, X-linked angiotensin II

- type-2 receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in patients with systemic hypertension. *Hypertension*, 43, 1189-94.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- AMANT, C., HAMON, M., BAUTERS, C., RICHARD, F., HELBECQUE, N., MCFADDEN, E. P., ESCUDERO, X., LABLANCHE, J. M., AMOUYEL, P. & BERTRAND, M. E. 1997. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol*, 29, 486-90.
- AMIR, O., AMIR, R. E., PAZ, H., ATTIAS, E., SAGIV, M. & LEWIS, B. S. 2009. Relation between AT1R gene polymorphism and long-term outcome in patients with heart failure. *Cardiology*, 112, 151-7.
- ARENAS, I. A., XU, Y., LOPEZ-JARAMILLO, P. & DAVIDGE, S. T. 2004. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, 26.
- AVDONIN, P. V., COTTET-MAIRE, F., AFANASJEVA, G. V., LOKTIONOVA, S. A., LHOTE, P. & RUEGG, U. T. 1999. Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 55, 2407-14.
- BACKLUND, M., PAUKKU, K., DAVIET, L., DE BOER, R. A., VALO, E., HAUTANIEMI, S., KALKKINEN, N., EHSAN, A., KONTULA, K. K. & LEHTONEN, J. Y. 2009. Posttranscriptional regulation of angiotensin II type 1 receptor expression by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Nucleic Acids Res*, 37, 2346-58.
- BADER, M. & GANTEN, D. 2008. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*, 86, 615-21.
- BADIMON, L., PADRO, T. & VILAHUR, G. 2012. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 1, 60-74
- BALMFORTH, A. J. 2010. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 11, 79-85.
- BALTATU, O. C., CAMPOS, L. A. & BADER, M. 2011. Local renin-angiotensin system and the brain--a continuous quest for knowledge. *Peptides*, 32, 1083-6.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-95.
- BARNES, P. J. & KARIN, M. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 336, 1066-71.
- BARRETT, J. D., ZHANG, Z., ZHU, J. H., LEE, D. B., WARD, H. J., JAMGOTCHIAN, N., HU, M. S., FREDAL, A., GIORDANI, M. & EGGENA, P. 1998. Erythropoietin upregulates angiotensin receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, 16, 1749-57.
- BAUDIN, B. 2005. Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension. *Exp Physiol*, 90, 277-82.
- BENETOS, A., GAUTIER, S., RICARD, S., TOPOUCHIAN, J., ASMAR, R., POIRIER, O., LAROSA, E., GUIZE, L., SAFAR, M., SOUBRIER, F. &

- CAMBIEN, F. 1996. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation*, 94, 698-703.
- BENIGNI, A., CASSIS, P. & REMUZZI, G. 2010. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*, 2, 247-57.
- BERGE, K. E. & BERG, K. 1998. Polymorphisms at the angiotensinogen (AGT) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) loci and normal blood pressure. *Clin Genet*, 53, 214-9.
- BERGSMA, D. J., ELLIS, C., KUMAR, C., NUTHULAGANTI, P., KERSTEN, H., ELSHOUBAGY, N., GRIFFIN, E., STADEL, J. M. & AIYAR, N. 1992. Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 183, 989-95.
- BEYAZIT, Y., PURNAK, T., GUVEN, G. S. & HAZNEDAROGLU, I. C. 2010. Local bone marrow Renin-Angiotensin system and atherosclerosis. *Cardiol Res Pract*, 22, 714515.
- BLANCO, R. R., AUSTIN, H., VEST, R. N., 3RD, VALADRI, R., LI, W., LASSEGUE, B., SONG, Q., LONDON, B., DUDLEY, S. C., BLOOM, H. L., SEARLES, C. D. & ZAFARI, A. M. 2012. Angiotensin receptor type 1 single nucleotide polymorphism 1166A/C is associated with malignant arrhythmias and altered circulating miR-155 levels in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*, 18, 717-23.
- BLOEM, L. J., MANATUNGA, A. K. & PRATT, J. H. 1996. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension*, 27, 62-6.
- BONNARDEAUX, A., DAVIES, E., JEUNEMAITRE, X., FERY, I., CHARRU, A., CLAUSER, E., TIRET, L., CAMBIEN, F., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. 1994. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, 24, 63-9.
- BRASIER, A. R., RECINOS, A., 3RD & ELEDRI, M. S. 2002. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1257-66.
- BRASSARD, P., AMIRI, F. & SCHIFFRIN, E. L. 2005. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension*, 46, 598-606.
- CAMERON, V. A., MOCATTA, T. J., PILBROW, A. P., FRAMPTON, C. M., TROUGHTON, R. W., RICHARDS, A. M. & WINTERBOURN, C. C. 2006. Angiotensin type-1 receptor A1166C gene polymorphism correlates with oxidative stress levels in human heart failure. *Hypertension*, 47, 1155-61.
- CAREY, R. M. 2005. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension*, 45, 840-4.
- CASSIS, L. A., POLICE, S. B., YIANNIKOURIS, F. & THATCHER, S. E. 2008. Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*, 10, 93-8.
- CASTELLANO, M., MUIESAN, M. L., BESCHI, M., RIZZONI, D., CINELLI, A., SALVETTI, M., PASINI, G., PORTERI, E., BETTONI, G., ZULLI, R. & AGABITI-ROSEI, E. 1996. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension*, 28, 1076-80.

- CEOLOTTO, G., PAPPARELLA, I., BORTOLUZZI, A., STRAPAZZON, G., RAGAZZO, F., BRATTI, P., FABRICIO, A. S., SQUARCINA, E., GION, M., PALATINI, P. & SEMPLICINI, A. 2011. Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am J Hypertens*, 24, 241-6.
- CHAPMAN, C. M., PALMER, L. J., MCQUILLAN, B. M., HUNG, J., BURLEY, J., HUNT, C., THOMPSON, P. L. & BEILBY, J. P. 2001. Polymorphisms in the angiotensinogen gene are associated with carotid intimal-medial thickening in females from a community-based population. *Atherosclerosis*, 159, 209-17.
- CHEN, T., HUANG, Z., WANG, L., WANG, Y., WU, F., MENG, S. & WANG, C. 2009. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. *Cardiovasc Res*, 83, 131-9.
- CHENG, Z. J., VAPAATALO, H. & MERVAALA, E. 2005. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*, 11, 25.
- CHERUVU, P. K., FINN, A. V., GARDNER, C., CAPLAN, J., GOLDSTEIN, J., STONE, G. W., VIRMANI, R. & MULLER, J. E. 2007. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: a pathologic study. *J Am Coll Cardiol*, 50, 940-9.
- CHO, K. Y., MIYOSHI, H., KURODA, S., YASUDA, H., KAMIYAMA, K., NAKAGAWARA, J., TAKIGAMI, M., KONDO, T. & ATSUMI, T. 2012. The Phenotype of Infiltrating Macrophages Influences Arteriosclerotic Plaque Vulnerability in the Carotid Artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 26, 020.
- CIPOLLONE, F., FAZIA, M., IEZZI, A., PINI, B., CUCCURULLO, C., ZUCHELLI, M., DE CESARE, D., UCCHINO, S., SPIGONARDO, F., DE LUCA, M., MURARO, R., BEI, R., BUCCI, M., CUCCURULLO, F. & MEZZETTI, A. 2004. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity. *Circulation*, 109, 1482-8.
- CLARKE, C., FLORES-MUNOZ, M., MCKINNEY, C. A., MILLIGAN, G. & NICKLIN, S. A. 2013. Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system. *Future Cardiol*, 9, 23-38.
- COATES, D. 2003. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 769-73.
- CORVOL, P., MICHAUD, A., SOUBRIER, F. & WILLIAMS, T. A. 1995a. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl*, 13, S3-10.
- CORVOL, P., WILLIAMS, T. A. & SOUBRIER, F. 1995b. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol*, 248, 283-305.
- COSTEROUSSÉ, O., ALLEGRI, J., LOPEZ, M. & ALHENC-GELAS, F. 1993. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J*, 290, 33-40.
- CRACKOWER, M. A., SARAO, R., OUDIT, G. Y., YAGIL, C., KOZIERADZKI, I., SCANGA, S. E., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J., DA COSTA, J., ZHANG, L., PEI, Y., SCHOLEY, J., FERRARIO, C. M., MANOUKIAN, A. S., CHAPPELL, M. C., BACKX, P. H., YAGIL, Y. & PENNINGER, J. M. 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 417, 822-8.

- CSIKOS, T., BALMFORTH, A. J., GROJEC, M., GOHLKE, P., CULMAN, J. & UNGER, T. 1998. Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 142-7.
- CURNOW, K. M., PASCOE, L. & WHITE, P. C. 1992. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol*, 6, 1113-8.
- CURNOW, K. M., PASCOE, L., DAVIES, E., WHITE, P. C., CORVOL, P. & CLAUSER, E. 1995. Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms. *Mol Endocrinol*, 9, 1250-62.
- DANDAPAT, A., HU, C. P., CHEN, J., LIU, Y., KHAN, J. A., REMEO, F., CAREY, R. M., HERMONAT, P. L. & MEHTA, J. L. 2008. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 871-7.
- DANILCZYK, U., SARAO, R., REMY, C., BENABBAS, C., STANGE, G., RICHTER, A., ARYA, S., POSPISILIK, J. A., SINGER, D., CAMARGO, S. M., MAKRIDES, V., RAMADAN, T., VERREY, F., WAGNER, C. A. & PENNINGER, J. M. 2006. Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature*, 444, 1088-91.
- DANSER, A. H., BATENBURG, W. W., VAN DEN MEIRACKER, A. H. & DANILOV, S. M. 2007. ACE phenotyping as a first step toward personalized medicine for ACE inhibitors. Why does ACE genotyping not predict the therapeutic efficacy of ACE inhibition? *Pharmacol Ther*, 113, 607-18.
- DANSER, A. H., DERKX, F. H., SCHALEKAMP, M. A., HENSE, H. W., RIEGGER, G. A. & SCHUNKERT, H. 1998. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens*, 16, 853-62.
- DANSER, A. H., SCHALEKAMP, M. A., BAX, W. A., VAN DEN BRINK, A. M., SAXENA, P. R., RIEGGER, G. A. & SCHUNKERT, H. 1995. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*, 92, 1387-8.
- DAUGHERTY, A., MANNING, M. W. & CASSIS, L. A. 2001. Antagonism of AT2 receptors augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 134, 865-70.
- DAUGHERTY, A., RATERI, D. L., LU, H., INAGAMI, T. & CASSIS, L. A. 2004. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation*, 110, 3849-57.
- DAVIES, M. J. *Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995*, *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):2013-20.
- DAVIET, L., LEHTONEN, J. Y., HAYASHIDA, W., DZAU, V. J. & HORIUCHI, M. 2001. Intracellular third loops in AT1 and AT2 receptors determine subtype specificity. *Life Sci*, 69, 509-16.
- DE GASPARO, M., CATT, K. J., INAGAMI, T., WRIGHT, J. W. & UNGER, T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 415-72.
- DE MELLO, W. C. & FROHLICH, E. D. 2011. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. *Peptides*, 32, 1774-9

- DEL SER, T., BORNSTEIN, B., BARBA, R. & CEMILLAN, C. 2001. Relationship of angiotensin converting enzyme genotype with serum triglyceride concentration in stroke patients. *Neurosci Lett*, 316, 21-4.
- DELLA-MORTE, D., GUADAGNI, F., PALMIROTTA, R., FERRONI, P. & RUNDEK, T. 2013. D allele of ACE gene insertion/deletion polymorphism: a marker for risk of ischemic stroke. *Pharmacogenomics*, 14, 16.
- DESSI-FULGHERI, P., CATALINI, R., SARZANI, R., STURBINI, S., SIRAGUSA, N., GUAZZAROTTI, F., OFFIDANI, M., TAMBURRINI, P., ZINGARETTI, O. & RAPPELLI, A. 1995. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and carotid atherosclerosis in a low-risk population. *J Hypertens*, 13, 1593-6.
- DICHGANS, M. 2007. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, 6, 149-61.
- DIET, F., PRATT, R. E., BERRY, G. J., MOMOSE, N., GIBBONS, G. H. & DZAU, V. J. 1996. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation*, 94, 2756-67.
- DIEZ, J., LAVIADES, C., ORBE, J., ZALBA, G., LOPEZ, B., GONZALEZ, A., MAYOR, G., PARAMO, J. A. & BELOQUI, O. 2003. The A1166C polymorphism of the AT1 receptor gene is associated with collagen type I synthesis and myocardial stiffness in hypertensives. *J Hypertens*, 21, 2085-92.
- DONG, B., ZHANG, C., FENG, J. B., ZHAO, Y. X., LI, S. Y., YANG, Y. P., DONG, Q. L., DENG, B. P., ZHU, L., YU, Q. T., LIU, C. X., LIU, B., PAN, C. M., SONG, H. D., ZHANG, M. X. & ZHANG, Y. 2008. Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1270-6.
- DONNAN, G. A., DAVIS, S. M., CHAMBERS, B. R. & GATES, P. C. 1998. Surgery for prevention of stroke. *Lancet*, 351, 1372-3.
- DONOGHUE, M., HSIEH, F., BARONAS, E., GODBOUT, K., GOSSELIN, M., STAGLIANO, N., DONOVAN, M., WOOLF, B., ROBISON, K., JEYASEELAN, R., BREITBART, R. E. & ACTON, S. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, E1-9.
- DORRANCE, A. M. Angiotensin II type 2 receptor agonists as therapies for ischemic stroke, *Hypertension*. 2012 Dec; 60 (6): 1391-2.
- DUDLEY, D. T. & SUMMERFELT, R. M. 1993. Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Regul Pept*, 44, 199-206.
- DUDLEY, D. T., HUBBELL, S. E. & SUMMERFELT, R. M. 1991. Characterization of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Mol Pharmacol*, 40, 360-7.
- DUFFY, A. A., MARTIN, M. M. & ELTON, T. S. 2004. Transcriptional regulation of the AT1 receptor gene in immortalized human trophoblast cells. *Biochim Biophys Acta*, 5, 158-70.
- DUPONT, J., DEROUET, M., SIMON, J. & TAOUIS, M. 1998. Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken. *Am J Physiol*, 274, E309-16.
- ELTON, T. S. & MARTIN, M. M. 2003. Alternative splicing: a novel mechanism to fine-tune the expression and function of the human AT1 receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 66-71.
- ELTON, T. S. & MARTIN, M. M. 2007. Angiotensin II type 1 receptor gene regulation: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension*, 49, 953-61.

- ELTON, T. S., KUHN, D. E., MALANA, G. E., MARTIN, M. M., NUOVO, G. J., PLEISTER, A. P. & FELDMAN, D. S. 2008. Abstract 5247: MiR-132 Regulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression Through a Protein Coding Region Binding Site. *Circulation*, 118, S_513.
- ELTON, T. S., SANSOM, S. E. & MARTIN, M. M. 2010. Cardiovascular Disease, Single Nucleotide Polymorphisms; and the Renin Angiotensin System: Is There a MicroRNA Connection? *Int J Hypertens*, 4, 281692.
- ELTON, T.S., KUHN, D.E., MALANA, G.E., MARTIN, M.M., NUOVO, G.J., PLEISTER, A.P., FELDMAN, D.S. 2008. MiR-132 regulates angiotensin II type 1 receptor expression through a protein coding region binding site. *Circulation*, 18, S513.
- ERDMANN, J., GUSE, M., KALLISCH, H., FLECK, E. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 2000. Novel intronic polymorphism (+1675G/A) in the human angiotensin II subtype 2 receptor gene. *Hum Mutat*, 15, 487.
- ERIKSSON, U., DANILCZYK, U. & PENNINGER, J. M. 2002. Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol*, 12, R745-52.
- FARAONI, I., ANTONETTI, F. R., CARDONE, J. & BONMASSAR, E. 2009. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*, 6, 497-505.
- FARB, A., BURKE, A. P., TANG, A. L., LIANG, T. Y., MANNAN, P., SMIALEK, J. & VIRMANI, R. 1996. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*, 93, 1354-63.
- FERNANDEZ-ORTIZ, A., BADIMON, J. J., FALK, E., FUSTER, V., MEYER, B., MAILHAC, A., WENG, D., SHAH, P. K. & BADIMON, L. 1994. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*, 23, 1562-9.
- FICHTLSCHERER, S., DE ROSA, S., FOX, H., SCHWIETZ, T., FISCHER, A., LIEBETRAU, C., WEBER, M., HAMM, C. W., ROXE, T., MULLER-ARDOGAN, M., BONAUER, A., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*, 107, 677-84.
- FICHTLSCHERER, S., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2011. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 2383-90.
- FLAHERTY, M. L., KISSELA, B., KHOURY, J. C., ALWELL, K., MOOMAW, C. J., WOO, D., KHATRI, P., FERIOLI, S., ADEOYE, O., BRODERICK, J. P. & KLEINDORFER, D. 2013. Carotid artery stenosis as a cause of stroke. *Neuroepidemiology*, 40, 36-41.
- FOY, C. A., MCCORMACK, L. J., KNOWLER, W. C., BARRETT, J. H., CATTO, A. & GRANT, P. J. 1996. The angiotensin-I converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism and ACE levels in Pima Indians. *J Med Genet*, 33, 336-7.
- FRID, M. G., DEMPSEY, E. C., DURMOWICZ, A. G. & STENMARK, K. R. 1997. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 1203-9.
- FUKUDA, D. & SATA, M. 2008. Role of bone marrow renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 118, 268-76.

- FUKUDA, D., SATA, M., ISHIZAKA, N. & NAGAI, R. 2008. Critical role of bone marrow angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 90-6.
- FUKUHARA, M., GEARY, R. L., DIZ, D. I., GALLAGHER, P. E., WILSON, J. A., GLAZIER, S. S., DEAN, R. H. & FERRARIO, C. M. 2000. Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension*, 35, 353-9.
- FUKUI, K., YANG, Q., CAO, Y., TAKAHASHI, N., HATAKEYAMA, H., WANG, H., WADA, J., ZHANG, Y., MARSELLI, L., NAMMO, T., YONEDA, K., ONISHI, M., HIGASHIYAMA, S., MATSUZAWA, Y., GONZALEZ, F. J., WEIR, G. C., KASAI, H., SHIMOMURA, I., MIYAGAWA, J., WOLLHEIM, C. B. & YAMAGATA, K. 2005. The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab*, 2, 373-84.
- FUKUYAMA, K., ICHIKI, T., TAKEDA, K., TOKUNOU, T., IINO, N., MASUDA, S., ISHIBASHI, M., EGASHIRA, K., SHIMOKAWA, H., HIRANO, K., KANAIDE, H. & TAKESHITA, A. 2003. Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone. *Hypertension*, 41, 598-603.
- GALIS, Z. S. & KHATRI, J. J. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90, 251-62.
- GALIS, Z. S., SUKHOVA, G. K., LARK, M. W. & LIBBY, P. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94, 2493-503.
- GALLAGHER, P. E., LI, P., LENHART, J. R., CHAPPELL, M. C. & BROSNIHAN, K. B. 1999. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 33, 323-8.
- GENG, Y. J. & LIBBY, P. 2002. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1370-80.
- GIRERD, X., HANON, O., MOURAD, J. J., BOUTOUYRIE, P., LAURENT, S. & JEUNEMAITRE, X. 1998. Lack of association between renin-angiotensin system, gene polymorphisms, and wall thickness of the radial and carotid arteries. *Hypertension*, 32, 579-83.
- GITTENBERGER-DE GROOT, A. C., DERUITER, M. C., BERGWERFF, M. & POELMANN, R. E. 1999. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1589-94.
- GLASS, C. K. & WITZTUM, J. L. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104, 503-16.
- GOSWAMI, P. C., ALBEE, L. D., SPITZ, D. R. & RIDNOUR, L. A. 1997. A polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantitation of proto-oncogene and GAPD mRNAs in different cell growth rates. *Cell Prolif*, 30, 271-82.
- GOUBERGRITS, L., AFFELD, K., FERNANDEZ-BRITTO, J. & FALCON, L. 2002. Geometry of the human common carotid artery. A vessel cast study of 86 specimens. *Pathol Res Pract*, 198, 543-51.
- GRAY-WEALE, A. C., GRAHAM, J. C., BURNETT, J. R., BYRNE, K. & LUSBY, R. J. 1988. Carotid artery atheroma: comparison of preoperative B-mode ultrasound

- appearance with carotid endarterectomy specimen pathology. *J Cardiovasc Surg*, 29, 676-81.
- GREEN, M. R. 1986. Pre-mRNA splicing. *Annu Rev Genet*, 20, 671-708.
- GRIENDLING, K. K. & USHIO-FUKAI, M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept*, 91, 21-7.
- GRIENDLING, K. K., LASSEGUE, B. & ALEXANDER, R. W. 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 281-306.
- GRIENDLING, K. K., MURPHY, T. J. & ALEXANDER, R. W. 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87, 1816-28.
- GROESCHEL, M. The renin-angiotensin system and immune function, citation, The renin-angiotensin system and immune function, Master thesis. 2009.
- GRONHOLDT, M. L. 1999. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2-13. GRONHOLDT, M. L. 1999. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2-13.
- GRONHOLDT, M. L., NORDESTGAARD, B. G., BENTZON, J., WIEBE, B. M., ZHOU, J., FALK, E. & SILLESEN, H. 2002. Macrophages are associated with lipid-rich carotid artery plaques, echolucency on B-mode imaging, and elevated plasma lipid levels. *J Vasc Surg*, 35, 137-45.
- GRONHOLDT, M. L., NORDESTGAARD, B. G., SCHROEDER, T. V., VORSTRUP, S. & SILLESEN, H. 2001. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. *Circulation*, 104, 68-73.
- GROSS, C. M., GERBAULET, S., QUENSEL, C., KRAMER, J., MITTELMEIER, H. O., LUFT, F. C. & DIETZ, R. 2002. Angiotensin II type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*, 97, 327-33.
- GROTE, K., DREXLER, H. & SCHIEFFER, B. *Renin-angiotensin system and atherosclerosis*, Nephrol Dial Transplant. 2004 Apr;19(4):770-3.
- GUNTHER, S., GIMBRONE, M. A., JR. & ALEXANDER, R. W. 1980. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature*, 287, 230-2.
- GUO, D. F. & INAGAMI, T. 1994. Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*, 23, 1032-5.
- GUO, D. F., FURUTA, H., MIZUKOSHI, M. & INAGAMI, T. 1994. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 200, 313-9.
- GUO, Y. J., LI, W. H., WU, R., XIE, Q. & CUI, L. Q. 2008. ACE2 overexpression inhibits angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in macrophages. *Arch Med Res*, 39, 149-54.
- GUPTA, S. K., BANG, C. & THUM, T. 2010. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 3, 484-8.
- GUTHRIE, G. P., JR. 1995. Angiotensin receptors: physiology and pharmacology. *Clin Cardiol*, 18, 29-34.
- GUY, J. L., LAMBERT, D. W., TURNER, A. J. & PORTER, K. E. 2008. Functional angiotensin-converting enzyme 2 is expressed in human cardiac myofibroblasts. *Exp Physiol*, 93, 579-88.

- HANSSON, G. K. & LIBBY, P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6, 508-19.
- HANSSON, G. K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352, 1685-95.
- HANSSON, G. K. 2009. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 328-331.
- HARMER, D., GILBERT, M., BORMAN, R. & CLARK, K. L. 2002. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*, 532, 107-10.
- HARRISON-BERNARD, L. M., EL-DAHR, S. S., O'LEARY, D. F. & NAVAR, L. G. 1999. Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 33, 340-6.
- HELLEN, C. U. & SARNOW, P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*, 15, 1593-612.
- HENRION, D., AMANT, C., BENESSIANO, J., PHILIP, I., PLANTEFEVE, G., CHATEL, D., HWAS, U., DESMONT, J. M., DURAND, G., AMOUYEL, P. & LEVY, B. I. 1998. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with an increased vascular reactivity in the human mammary artery in vitro. *J Vasc Res*, 35, 356-62.
- HENRIQUES, T. A., HUANG, J., D'SOUZA, S. S., DAUGHERTY, A. & CASSIS, L. A. 2004. Orchidectomy, but not ovariectomy, regulates angiotensin II-induced vascular diseases in apolipoprotein E-deficient mice. *Endocrinology*, 145, 3866-72.
- HENSKENS, L. H., KROON, A. A., VAN BOXTEL, M. P., HOFMAN, P. A. & DE LEEUW, P. W. 2005. Associations of the angiotensin II type 1 receptor A1166C and the endothelial NO synthase G894T gene polymorphisms with silent subcortical white matter lesions in essential hypertension. *Stroke*, 36, 1869-73.
- HEO, S. H., CHO, C. H., KIM, H. O., JO, Y. H., YOON, K. S., LEE, J. H., PARK, J. C., PARK, K. C., AHN, T. B., CHUNG, K. C., YOON, S. S. & CHANG, D. I. 2011. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol*, 7, 69-76.
- HERDER, M., JOHNSEN, S. H., ARNTZEN, K. A. & MATHIESEN, E. B. 2012. Risk factors for progression of carotid intima-media thickness and total plaque area: a 13-year follow-up study: the Tromso Study. *Stroke*, 43, 1818-23.
- HERRMANN, S. M., NICAUD, V., SCHMIDT-PETERSEN, K., PFEIFER, J., ERDMANN, J., MCDONAGH, T., DARGIE, H. J., PAUL, M. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 2002. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and cardiovascular phenotypes: the GLAECO and GLAOLD studies. *Eur J Heart Fail*, 4, 707-12.
- HINDORFF, L. A., HECKBERT, S. R., TRACY, R., TANG, Z., PSATY, B. M., EDWARDS, K. L., SISCOVICK, D. S., KRONMAL, R. A. & NAZAR-STEWART, V. 2002. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens*, 15, 1050-6.
- HOCH, N. E., GUZIK, T. J., CHEN, W., DEANS, T., MAALOUF, S. A., GRATZE, P., WEYAND, C. & HARRISON, D. G. 2009. Regulation of T-cell function by

- endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, 10.
- HONG, S. H., PARK, H. M., AHN, J. Y., KIM, O. J., HWANG, T. S., OH, D. & KIM, N. K. 2008. ACE I/D polymorphism in Korean patients with ischemic stroke and silent brain infarction. *Acta Neurol Scand*, 117, 244-9.
- HORIUCHI, M., HAYASHIDA, W., AKISHITA, M., YAMADA, S., LEHTONEN, J. Y., TAMURA, K., DAVIET, L., CHEN, Y. E., HAMAI, M., CUI, T. X., IWAI, M. & MINOKOSHI, Y. 2000. Interferon-gamma induces AT(2) receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor-1. *Circ Res*, 86, 233-40.
- HOSHIDA, S., KATO, J., NISHINO, M., EGAMI, Y., TAKEDA, T., KAWABATA, M., TANOUCI, J., YAMADA, Y. & KAMADA, T. 2001. Increased angiotensin-converting enzyme activity in coronary artery specimens from patients with acute coronary syndrome. *Circulation*, 103, 630-3.
- HU, C., DANDAPAT, A., CHEN, J., LIU, Y., HERMONAT, P. L., CAREY, R. M. & MEHTA, J. L. 2008. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) reduces atherogenesis and modulates LOX-1, endothelial nitric oxide synthase and heme-oxygenase-1 expression. *Atherosclerosis*, 199, 288-94.
- HUANG, R. S., HU, G. Q., LIN, B., LIN, Z. Y. & SUN, C. C. 2010. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *J Investig Med*, 58, 961-7.
- HUBER, M., VOLLER, H., JAKOB, S., REIBIS, R., DO, V., BOLBRINKER, J., ZERGIBEL, I., SCHMIEDER, R. E., TRESZL, A., WEGSCHEIDER, K. & KREUTZ, R. 2010. Role of the angiotensin II type 2 receptor gene (+1675G/A) polymorphism on left ventricular hypertrophy and geometry in treated hypertensive patients. *J Hypertens*, 28, 1221-9.
- HUBERT, C., HOUOT, A. M., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. 1991. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*, 266, 15377-83.
- HULYAM, K., AYSEGUL, B., VEYSI, G. H., DEMET, O., IRFAN, D., ERTUGRUL, C., DIDEM, C. T., BANU, B. & MIRIS, D. 2013. Frequency of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in Turkish acute stroke patients. *J Cell Mol Med*, 17, 475-81.
- HUNLEY, T. E., JULIAN, B. A., PHILLIPS, J. A., 3RD, SUMMAR, M. L., YOSHIDA, H., HORN, R. G., BROWN, N. J., FOGO, A., ICHIKAWA, I. & KON, V. 1996. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int*, 49, 571-7.
- ICHIKI, T. & INAGAMI, T. 1995. Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circ Res*, 76, 693-700.
- ICHIKI, T., KAMBAYASHI, Y. & INAGAMI, T. 1995. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res*, 77, 1070-6.
- ICHIKI, T., TAKEDA, K., TOKUNOU, T., IINO, N., EGASHIRA, K., SHIMOKAWA, H., HIRANO, K., KANAIDE, H. & TAKESHITA, A. 2001. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-

- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1896-90
- ICHIKI, T., USUI, M., KATO, M., FUNAKOSHI, Y., ITO, K., EGASHIRA, K. & TAKESHITA, A. 1998. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*, 31, 342-8.
- IEMOLO, F., MARTINIUK, A., STEINMAN, D. A. & SPENCE, J. D. 2004. Sex differences in carotid plaque and stenosis. *Stroke*, 35, 477-81.
- IHARA, M., URATA, H., KINOSHITA, A., SUZUMIYA, J., SASAGURI, M., KIKUCHI, M., IDEISHI, M. & ARAKAWA, K. 1999. Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta. *Hypertension*, 33, 1399-405.
- IKEDA, Y., TAKEUCHI, K., KATO, T., TANIYAMA, Y., SATO, K., TAKAHASHI, N., SUGAWARA, A. & ITO, S. 1999. Transcriptional suppression of rat angiotensin AT1a receptor gene expression by interferon-gamma in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 494-8
- IMAI, Y., KUBA, K., OHTO-NAKANISHI, T. & PENNINGER, J. M. 2010. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J*, 74, 405-10.
- INAGAMI, T. 1999. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol*, 10, S2-7.
- ITOYAMA, S., KEICHO, N., HIJIKATA, M., QUY, T., PHI, N. C., LONG, H. T., HA, L. D., BAN, V. V., MATSUSHITA, I., YANAI, H., KIRIKAE, F., KIRIKAE, T., KURATSUJI, T. & SASAZUKI, T. 2005. Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. *Am J Med Genet A*, 136, 52-7.
- IWAI, M., CHEN, R., LI, Z., SHIUCHI, T., SUZUKI, J., IDE, A., TSUDA, M., OKUMURA, M., MIN, L. J., MOGI, M. & HORIUCHI, M. 2005. Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 112, 1636-43.
- IWATA, M., SILVA ENCISO, J. E. & GREENBERG, B. H. 2009. Selective and specific regulation of ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, 16.
- JACOBY, D. S. & RADER, D. J. 2003. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease: from genes to treatment. *Arch Intern Med*, 163, 1155-64.
- JAYADEV, S., SMITH, R. D., JAGADEESH, G., BAUKAL, A. J., HUNYADY, L. & CATT, K. J. 1999. N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells. *Endocrinology*, 140, 2010-7.
- JEUNEMAITRE, X., LIFTON, R. P., HUNT, S. C., WILLIAMS, R. R. & LALOUEL, J. M. 1992. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet*, 1, 72-5.
- JIA, H. P., LOOK, D. C., TAN, P., SHI, L., HICKEY, M., GAKHAR, L., CHAPPELL, M. C., WOHLFORD-LENANE, C. & MCCRAY, P. B., JR. 2009. Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, 1.

- JIANG, Z., ZHAO, W., YU, F. & XU, G. 2001. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Chin Med J*, 114, 1249-51.
- JIN, J. J., NAKURA, J., WU, Z., YAMAMOTO, M., ABE, M., CHEN, Y., TABARA, Y., YAMAMOTO, Y., IGASE, M., BO, X., KOHARA, K. & MIKI, T. 2003. Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension. *Hypertens Res*, 26, 547-52.
- JING, T., WANG, H., SRIVENUGOPAL, K. S., HE, G., LIU, J., MIAO, L. & HE, Y. 2009. Conditional expression of type 2 angiotensin II receptor in rat vascular smooth muscle cells reveals the interplay of the angiotensin system in matrix metalloproteinase 2 expression and vascular remodeling. *Int J Mol Med*, 24, 103-10.
- JOHANSSON, M. E., FAGERBERG, B. & BERGSTROM, G. 2008. Angiotensin type 2 receptor is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 9, 17-21.
- JOHANSSON, M. E., WICKMAN, A., FITZGERALD, S. M., GAN, L. M. & BERGSTROM, G. 2005. Angiotensin II, type 2 receptor is not involved in the angiotensin II-mediated pro-atherogenic process in ApoE^{-/-} mice. *J Hypertens*, 23, 1541-9.
- JONES, A., DHAMRAIT, S. S., PAYNE, J. R., HAWE, E., LI, P., TOOR, I. S., LUONG, L., WOOTTON, P. T., MILLER, G. J., HUMPHRIES, S. E. & MONTGOMERY, H. E. 2003. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension*, 42, 500-6.
- JUREWICZ, M., MCDERMOTT, D. H., SECHLER, J. M., TINCKAM, K., TAKAKURA, A., CARPENTER, C. B., MILFORD, E. & ABDI, R. 2007. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 18, 1093-102.
- KAINULAINEN, K., PEROLA, M., TERWILLIGER, J., KAPRIO, J., KOSKENVUO, M., SYVANEN, A. C., VARTIAINEN, E., PELTONEN, L. & KONTULA, K. 1999. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension*, 33, 844-9.
- KAMBAYASHI, Y., BARDHAN, S. & INAGAMI, T. 1993. Peptide growth factors markedly decrease the ligand binding of angiotensin II type 2 receptor in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 478-82.
- KANNEL, W. B. & WOLF, P. A. 2006. Peripheral and cerebral atherothrombosis and cardiovascular events in different vascular territories: insights from the Framingham Study. *Curr Atheroscler Rep*, 8, 317-23.
- KANNEL, W. B. 1994. Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. *J Cardiovasc Risk*, 1, 333-9.
- KARAGIANNIS, A., BALASKA, K., TZIOMALOS, K., TOKALAKI-NIKOLAIDOU, L., PAPAYEORYIOU, A. & ZAMBOULIS, C. 2004. Lack of an association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischaemic stroke. *Eur Neurol*, 51, 148-52.
- KASCHINA, E., SCHOLZ, H., STECKELINGS, U. M., SOMMERFELD, M., KEMNITZ, U. R., ARTUC, M., SCHMIDT, S. & UNGER, T. 2009. Transition

- from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components. *Atherosclerosis*, 205, 396-403.
- KATSUYA, T. & MORISHITA, R. 2012. Gene polymorphism of angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Curr Pharm Des*, 21, 21.
- KATSUYA, T., HORIUCHI, M., MINAMI, S., KOIKE, G., SANTORO, N. F., HSUEH, A. J. & DZAU, V. J. 1997. Genomic organization and polymorphism of human angiotensin II type 2 receptor: no evidence for its gene mutation in two families of human premature ovarian failure syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 127, 221-8.
- KEIDAR, S., HEINRICH, R., KAPLAN, M., HAYEK, T. & AVIRAM, M. 2001. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1464-9.
- KELLY, D. J., COX, A. J., GOW, R. M., ZHANG, Y., KEMP, B. E. & GILBERT, R. E. 2004. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension*, 44, 195-202.
- KIM, M. P., ZHOU, M. & WAHL, L. M. 2005. Angiotensin II increases human monocyte matrix metalloproteinase-1 through the AT2 receptor and prostaglandin E2: implications for atherosclerotic plaque rupture. *J Leukoc Biol*, 78, 195-201.
- KISS, T. 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, 109, 145-8.
- KOBASHI, G., HATA, A., OHTA, K., YAMADA, H., KATO, E. H., MINAKAMI, H., FUJIMOTO, S. & KONDO, K. 2004. A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet*, 49, 182-6.
- KOH, K. K., HAN, S. H., OH, P. C., SHIN, E. K. & QUON, M. J. 2010. Combination therapy for treatment or prevention of atherosclerosis: focus on the lipid-RAAS interaction. *Atherosclerosis*, 209, 307-13.
- KOKA, V., HUANG, X. R., CHUNG, A. C., WANG, W., TRUONG, L. D. & LAN, H. Y. 2008. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am J Pathol*, 172, 1174-83.
- KOLAKOVIĆ A., ŽIVKOVIC M., KONČAR I., JOVANOVIĆ I., ĐURIĆ T., STANKOVIĆ A. 2013. The angiotensin II type 2 receptor -1332 A/G gene polymorphism (rs1403543) is associated with stroke in males patients with carotid atherosclerosis. 22. European Stroke Conference 28-31 May 2013, London, United Kingdom, *Cerebrovasc Dis* 2013; (suppl 3) 1-854): p.536
- KOLAKOVIĆ A., ŽIVKOVIC M., RADAČ DJ., KONČAR I., DJURIC T., DAVIDOVIĆ L., ALAVANTIĆ D. Association of Angiotensin II Type 1 receptor +1166 A/C gene polymorphism with human carotid plaque vulnerability. The 79th EAS Congress, 26th-29th June 2011, Gothenburg, Sweden, *Atherosclerosis Supplements* (Vol.12 No.1- June 2011): p.111.
- KOLAKOVIC, A., ZIVKOVIC, M., RADAČ, D., DJURIC, T., KONCAR, I., DAVIDOVIC, L., DINCIC, D., ALAVANTIC, D. & STANKOVIC, A. 2012. The association of ACE I/D gene polymorphism with severe carotid atherosclerosis in patients undergoing carotid endarterectomy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 13, 141-7.

- KOŁODGIE, F. D., GOLD, H. K., BURKE, A. P., FOWLER, D. R., KRUTH, H. S., WEBER, D. K., FARB, A., GUERRERO, L. J., HAYASE, M., KUTYS, R., NARULA, J., FINN, A. V. & VIRMANI, R. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*, 349, 2316-25.
- KOSTULAS, K., HUANG, W. X., CRISBY, M., JIN, Y. P., HE, B., LANNFELT, L., EGGERTSEN, G., KOSTULAS, V. & HILLERT, J. 1999. An angiotensin-converting enzyme gene polymorphism suggests a genetic distinction between ischaemic stroke and carotid stenosis. *Eur J Clin Invest*, 29, 478-83.
- KUBA, K., IMAI, Y., OHTO-NAKANISHI, T. & PENNINGER, J. M. 2010. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther*, 128, 119-28.
- KUHN, D. E., MARTIN, M. M., FELDMAN, D. S., TERRY, A. V., JR., NUOVO, G. J. & ELTON, T. S. 2008a. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*, 44, 47-54.
- KUHN, D. E., NUOVO, G. J., MARTIN, M. M., MALANA, G. E., PLEISTER, A. P., JIANG, J., SCHMITTGEN, T. D., TERRY, A. V., JR., GARDINER, K., HEAD, E., FELDMAN, D. S. & ELTON, T. S. 2008b. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochem Biophys Res Commun*, 370, 473-7.
- KUHN, D. E., NUOVO, G. J., TERRY, A. V., JR., MARTIN, M. M., MALANA, G. E., SANSOM, S. E., PLEISTER, A. P., BECK, W. D., HEAD, E., FELDMAN, D. S. & ELTON, T. S. 2010. Chromosome 21-derived microRNAs provide an etiological basis for aberrant protein expression in human Down syndrome brains. *J Biol Chem*, 285, 1529-43.
- KUNKEL, L. M., SMITH, K. D., BOYER, S. H., BORGAONKAR, D. S., WACHTEL, S. S., MILLER, O. J., BREG, W. R., JONES, H. W., JR. & RARY, J. M. 1977. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 1245-9.
- KUZNETSOVA, T., STAESSEN, J. A., THIJS, L., KUNATH, C., OLSZANECKA, A., RYABIKOV, A., TIKHONOFF, V., STOLARZ, K., BIANCHI, G., CASIGLIA, E., FAGARD, R., BRAND-HERRMANN, S. M., KAWECKA-JASZCZ, K., MALYUTINA, S., NIKITIN, Y. & BRAND, E. 2004. Left ventricular mass in relation to genetic variation in angiotensin II receptors, renin system genes, and sodium excretion. *Circulation*, 110, 2644-50.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12, 735-9.
- LAJEMI, M., LABAT, C., GAUTIER, S., LACOLLEY, P., SAFAR, M., ASMAR, R., CAMBIEN, F. & BENETOS, A. 2001. Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. *J Hypertens*, 19, 407-13.
- LAMBERT, D. W., CLARKE, N. E., HOOPER, N. M. & TURNER, A. J. 2008. Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain. *FEBS Lett*, 582, 385-90.
- LAMBERT, D. W., YARSKI, M., WARNER, F. J., THORNHILL, P., PARKIN, E. T., SMITH, A. I., HOOPER, N. M. & TURNER, A. J. 2005. Tumor necrosis factor-

- alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*, 280, 30113-9.
- LAMMIE, G. A., WARDLAW, J., ALLAN, P., RUCKLEY, C. V., PEEK, R. & SIGNORINI, D. F. 2000. What pathological components indicate carotid atheroma activity and can these be identified reliably using ultrasound? *Eur J Ultrasound*, 11, 77-86.
- LANGFORD, K. G., SHAI, S. Y., HOWARD, T. E., KOVAC, M. J., OVERBEEK, P. A. & BERNSTEIN, K. E. 1991. Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*, 266, 15559-62.
- LAPTEVA, N., NIEDA, M., ANDO, Y., IDE, K., HATTA-OHASHI, Y., DYMSHITS, G., ISHIKAWA, Y., JUJI, T. & TOKUNAGA, K. 2001. Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 1059-65.
- LASSEGUE, B., ALEXANDER, R. W., NICKENIG, G., CLARK, M., MURPHY, T. J. & GRIENGLING, K. K. 1995. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol*, 48, 601-9.
- LAXTON, R. C., HU, Y., DUCHENE, J., ZHANG, F., ZHANG, Z., LEUNG, K. Y., XIAO, Q., SCOTLAND, R. S., HODGKINSON, C. P., SMITH, K., WILLEIT, J., LOPEZ-OTIN, C., SIMPSON, I. A., KIECHL, S., AHLUWALIA, A., XU, Q. & YE, S. 2009. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*, 105, 921-9.
- LAZARD, D., BRIEND-SUTREN, M. M., VILLAGEOIS, P., MATTEI, M. G., STROSBERG, A. D. & NAHMIAS, C. 1994. Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT2 receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels*, 2, 271-80.
- LEHTONEN, J., PAUKKU, K., DAVIET, L. & KONTULA, K. 2007. Abstract 1037: Angiotensin II Type 1 Receptor 1166 Polymorphism A -> C Increases mRNA Stability and Steady-State Levels. *Circulation*, 114, II_190.
- LI, D. Y., ZHANG, Y. C., PHILIPS, M. I., SAWAMURA, T. & MEHTA, J. L. 1999. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*, 84, 1043-9.
- LI, D., SALDEEN, T., ROMEO, F. & MEHTA, J. L. 2000. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*, 102, 1970-6.
- LI, J. M., MOGI, M., TSUKUDA, K., TOMOCHIKA, H., IWANAMI, J., MIN, L. J., NAHMIAS, C., IWAI, M. & HORIUCHI, M. 2007. Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol*, 21, 499-511.
- LI, Z., IWAI, M., WU, L., LIU, H. W., CHEN, R., JINNO, T., SUZUKI, J., TSUDA, M., GAO, X. Y., OKUMURA, M., CUI, T. X. & HORIUCHI, M. 2004.

- Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective AT1 receptor blocker, valsartan, on atherosclerosis. *Hypertension*, 44, 758-63.
- LIBBY, P. & RIDKER, P. M. 2006. Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 48, A33-A46.
- LIBBY, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-74.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M. & HANSSON, G. K. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473, 317-25.
- LIM, H. S., CHO, J. Y., OH, D. S., CHUNG, J. Y., HONG, K. S., BAE, K. S., YU, K. S., LEE, K. H., JANG, I. J. & SHIN, S. G. 2007. Angiotensin II type 1 receptor 1166A/C polymorphism in association with blood pressure response to exogenous angiotensin II. *Eur J Clin Pharmacol*, 63, 17-26.
- LIN, Q., KELLER, R. S., WEAVER, B. & ZISMAN, L. S. 2004. Interaction of ACE2 and integrin beta1 in failing human heart. *Biochim Biophys Acta*, 4, 175-8.
- LORENZO, C., WILLIAMS, K., HUNT, K. J. & HAFFNER, S. M. 2007. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care*, 30, 8-13.
- LOUIS, S., SAWARD, L. & ZAHRADKA, P. 2011. Both AT(1) and AT(2) receptors mediate proliferation and migration of porcine vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, 27.
- LOVREN, F., PAN, Y., QUAN, A., TEOH, H., WANG, G., SHUKLA, P. C., LEVITT, K. S., OUDIT, G. Y., AL-OMRAN, M., STEWART, D. J., SLUTSKY, A. S., PETERSON, M. D., BACKX, P. H., PENNINGER, J. M. & VERMA, S. 2008. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, 25.
- LUCHTEFELD, M., GROTE, K., GROTHUSEN, C., BLEY, S., BANDLOW, N., SELLE, T., STRUBER, M., HAVERICH, A., BAVENDIEK, U., DREXLER, H. & SCHIEFFER, B. 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 183-8.
- LUDEWIG, B., ZINKERNAGEL, R. M. & HENGARTNER, H. 2002. Arterial inflammation and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 12, 154-9
- LYNCH, A. I., ARNETT, D. K., DAVIS, B. R., BOERWINKLE, E., FORD, C. E., ECKFELDT, J. H. & LEIENDECKER-FOSTER, C. 2007. Sex-specific effects of AGT-6 and ACE I/D on pulse pressure after 6 months on antihypertensive treatment: the GenHAT study. *Ann Hum Genet*, 71, 735-45.
- MAKEEVA, O. A., PUZYREV, K. V., PAVLIUKOVA, E. N., KOSHEL'SKAIA, O. A., GOLUBENKO, M. V., EFIMOVA, E. V., KUCHER, A. N., TSIMBALIUK, I. V., KARPOV, R. S. & PUZYREV, V. P. 2004. [ACE and AGTR1 genes polymorphisms in left ventricular hypertrophy pathogenesis in humans]. *Mol Biol*, 38, 990-6.
- MALAKAUSKAS, S. M., KOURANY, W. M., ZHANG, X. Y., LU, D., STEVENS, R. D., KOVES, T. R., HOHMEIER, H. E., MUOIO, D. M., NEWGARD, C. B. & LE, T. H. 2009. Increased insulin sensitivity in mice lacking collectrin, a downstream target of HNF-1alpha. *Mol Endocrinol*, 23, 881-92.
- MALAKAUSKAS, S. M., QUAN, H., FIELDS, T. A., MCCALL, S. J., YU, M. J., KOURANY, W. M., FREY, C. W. & LE, T. H. 2007. Aminoaciduria and

- altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, 19.
- MARCHESI, C., PARADIS, P. & SCHIFFRIN, E. L. 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 367-74.
- MARSHALL, S. 2006. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE*, 1.
- MARTIN, M. M. & ELTON, T. S. 1995. The sequence and genomic organization of the human type 2 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 554-62.
- MARTIN, M. M., BUCKENBERGER, J. A., JIANG, J., MALANA, G. E., KNOELL, D. L., FELDMAN, D. S. & ELTON, T. S. 2007. TGF-beta1 stimulates human AT1 receptor expression in lung fibroblasts by cross talk between the Smad, p38 MAPK, JNK, and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293, 29.
- MARTIN, M. M., GARCIA, J. A., MCFARLAND, J. D., DUFFY, A. A., GREGSON, J. P. & ELTON, T. S. 2003. Translation of the human angiotensin II type 1 receptor mRNA is mediated by a highly efficient internal ribosome entry site. *Mol Cell Endocrinol*, 212, 51-61.
- MARTIN, M. M., LEE, E. J., BUCKENBERGER, J. A., SCHMITTGEN, T. D. & ELTON, T. S. 2006. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem*, 281, 18277-84..
- MARTIN, M. M., VICTOR, X., ZHAO, X., MCDOUGALL, J. K. & ELTON, T. S. 2001a. Identification and characterization of functional angiotensin II type 1 receptors on immortalized human fetal aortic vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol*, 183, 81-91.
- MARTIN, M. M., WILLARDSON, B. M., BURTON, G. F., WHITE, C. R., MCLAUGHLIN, J. N., BRAY, S. M., OGILVIE, J. W., JR. & ELTON, T. S. 2001b. Human angiotensin II type 1 receptor isoforms encoded by messenger RNA splice variants are functionally distinct. *Mol Endocrinol*, 15, 281-93.
- MATHIESEN, E. B., BONAA, K. H. & JOAKIMSEN, O. 2001. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the tromso study. *Circulation*, 103, 2171-5.
- MATSUMOTO, T., SAGAWA, N., MUKOYAMA, M., TANAKA, I., ITOH, H., GOTO, M., HORIUCHI, M., DZAU, V. J., MORI, T. & NAKAO, K. 1996. Type 2 angiotensin II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 4366-72.
- MATTEI, M.-G., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., ROECKEL, N., CORVOL, P., SOUBRIER, F. Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 1041, 1989.
- MAURIELLO, A., SANGIORGI, G., FRATONI, S., PALMIERI, G., BONANNO, E., ANEMONA, L., SCHWARTZ, R. S. & SPAGNOLI, L. G. 2005. Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a histopathologic study of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 45, 1585-93.

- MEHTA, P. K. & GRIENGLING, K. K. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, 26.
- MISHRA, P. J., HUMENIUK, R., LONGO-SORBELLO, G. S., BANERJEE, D. & BERTINO, J. R. 2007. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 13513-8.
- MIZUIRI, S., HEMMI, H., KUMANOMIDOU, H., IWAMOTO, M., MIYAGI, M., SAKAI, K., AIKAWA, A., OHARA, T., YAMADA, K., SHIMATAKE, H. & HASEGAWA, A. 2001. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int*, 60, 1124-30.
- MOGI, M. & HORIUCHI, M. 2013. Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. *Geriatr Gerontol Int*, 13, 13-8.
- MOGI, M., IWAI, M. & HORIUCHI, M. 2007. Emerging concepts of regulation of angiotensin II receptors: new players and targets for traditional receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2532-9.
- MONTAUBAN VAN SWIJNDREGT, A. D., ELBERS, H. R., MOLL, F. L., DE LETTER, J. & ACKERSTAFF, R. G. 1998. Ultrasonographic characterization of carotid plaques. *Ultrasound Med Biol*, 24, 489-93.
- MORAWIETZ, H., RUECKSCHLOSS, U., NIEMANN, B., DUERRSCHMIDT, N., GALLE, J., HAKIM, K., ZERKOWSKI, H. R., SAWAMURA, T. & HOLTZ, J. 1999. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 100, 899-902.
- MORENO, P. R., MURCIA, A. M., PALACIOS, I. F., LEON, M. N., BERNARDI, V. H., FUSTER, V. & FALLON, J. T. 2000. Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation*, 102, 2180-4.
- MORENO, P. R., PURUSHOTHAMAN, K. R., SIROL, M., LEVY, A. P. & FUSTER, V. 2006. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*, 113, 2245-52.
- MORIOKA, M., HAMADA, J., HASHIGUCHI, A., HASEGAWA, Y., TODAKA, T., YANO, S., KAI, Y., MIURA, M., FUJIOKA, S. & USHIO, Y. 2004. Contribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II to ischemic stroke: their role in the formation of stable and unstable carotid atherosclerotic plaques. *Surg Neurol*, 62, 292-301.
- MUELLER, C. F., WASSMANN, K., BERGER, A., HOLZ, S., WASSMANN, S. & NICKENIG, G. 2008. Differential phosphorylation of calreticulin affects AT1 receptor mRNA stability in VSMC. *Biochem Biophys Res Commun*, 370, 669-74.
- MULLER, C., REDDERT, A., WASSMANN, S., STREHLOW, K., BOHM, M. & NICKENIG, G. 2000. Insulin-like growth factor induces up-regulation of AT(1)-receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1, 273-7.
- MULLER, J. E., ABELA, G. S., NESTO, R. W. & TOFLER, G. H. 1994. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol*, 23, 809-13.

- NAGHAVI, M., LIBBY, P., FALK, E., CASSCELLS, S. W., LITOVSKY, S., RUMBERGER, J., BADIMON, J. J., STEFANADIS, C., MORENO, P., PASTERKAMP, G., FAYAD, Z., STONE, P. H., WAXMAN, S., RAGGI, P., MADJID, M., ZARRABI, A., BURKE, A., YUAN, C., FITZGERALD, P. J., SISCOVICK, D. S., DE KORTE, C. L., AIKAWA, M., JUHANI AIRAKSINEN, K. E., ASSMANN, G., BECKER, C. R., CHESEBRO, J. H., FARB, A., GALIS, Z. S., JACKSON, C., JANG, I. K., KOENIG, W., LODDER, R. A., MARCH, K., DEMIROVIC, J., NAVAB, M., PRIORI, S. G., REKHTER, M. D., BAHR, R., GRUNDY, S. M., MEHRAN, R., COLOMBO, A., BOERWINKLE, E., BALLANTYNE, C., INSULL, W., JR., SCHWARTZ, R. S., VOGEL, R., SERRUYS, P. W., HANSSON, G. K., FAXON, D. P., KAUL, S., DREXLER, H., GREENLAND, P., MULLER, J. E., VIRMANI, R., RIDKER, P. M., ZIPES, D. P., SHAH, P. K. & WILLERSON, J. T. 2003a. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108, 1664-72.
- NAGHAVI, M., LIBBY, P., FALK, E., CASSCELLS, S. W., LITOVSKY, S., RUMBERGER, J., BADIMON, J. J., STEFANADIS, C., MORENO, P., PASTERKAMP, G., FAYAD, Z., STONE, P. H., WAXMAN, S., RAGGI, P., MADJID, M., ZARRABI, A., BURKE, A., YUAN, C., FITZGERALD, P. J., SISCOVICK, D. S., DE KORTE, C. L., AIKAWA, M., AIRAKSINEN, K. E., ASSMANN, G., BECKER, C. R., CHESEBRO, J. H., FARB, A., GALIS, Z. S., JACKSON, C., JANG, I. K., KOENIG, W., LODDER, R. A., MARCH, K., DEMIROVIC, J., NAVAB, M., PRIORI, S. G., REKHTER, M. D., BAHR, R., GRUNDY, S. M., MEHRAN, R., COLOMBO, A., BOERWINKLE, E., BALLANTYNE, C., INSULL, W., JR., SCHWARTZ, R. S., VOGEL, R., SERRUYS, P. W., HANSSON, G. K., FAXON, D. P., KAUL, S., DREXLER, H., GREENLAND, P., MULLER, J. E., VIRMANI, R., RIDKER, P. M., ZIPES, D. P., SHAH, P. K. & WILLERSON, J. T. 2003b. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*, 108, 1772-8
- NAHMOD, K. A., VERMEULEN, M. E., RAIDEN, S., SALAMONE, G., GAMBERALE, R., FERNANDEZ-CALOTTI, P., ALVAREZ, A., NAHMOD, V., GIORDANO, M. & GEFFNER, J. R. 2003. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *Faseb J*, 17, 491-3.
- NAKAI, K., OYANAGI, M., HITOMI, J., OGASAWARA, K., INOUE, T., KOBAYASHI, M., SUWABE, A., HABANO, W., BABA, T., YOSHIDA, H. & OGAWA, A. 2009. Screening the single nucleotide polymorphisms in patients with internal carotid artery stenosis by oligonucleotide-based custom DNA array. *Bioinform Biol Insights*, 1, 63-9.
- NAKAJIMA, H., AMANO, W., FUJITA, A., FUKUHARA, A., AZUMA, Y. T., HATA, F., INUI, T. & TAKEUCHI, T. 2007. The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *J Biol Chem*, 282, 26562-74.
- NATESH, R., SCHWAGER, S. L., STURROCK, E. D. & ACHARYA, K. R. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421, 551-4.

- NEWBY, A. C. 2000. An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett*, 113, 519-29.
- NGUYEN DINH CAT, A. & TOUYZ, R. M. 2011. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*, 32, 2141-50.
- NICKENIG, G. & BOHM, M. 1998. Interaction between insulin and AT1 receptor. Relevance for hypertension and arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*, 2, 135-9.
- NICKENIG, G. & MURPHY, T. J. 1994. Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol Pharmacol*, 46, 653-9
- NICKENIG, G., BAUMER, A. T., GROHE, C., KAHLERT, S., STREHLOW, K., ROSENKRANZ, S., STABLEIN, A., BECKERS, F., SMITS, J. F., DAEMEN, M. J., VETTER, H. & BOHM, M. 1998a. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, 97, 2197-201.
- NICKENIG, G., MICHAELSEN, F., MULLER, C., BERGER, A., VOGEL, T., SACHINIDIS, A., VETTER, H. & BOHM, M. 2002. Destabilization of AT(1) receptor mRNA by calreticulin. *Circ Res*, 90, 53-8.
- NICKENIG, G., MICHAELSEN, F., MULLER, C., VOGEL, T., STREHLOW, K. & BOHM, M. 2001. Post-transcriptional regulation of the AT1 receptor mRNA. Identification of the mRNA binding motif and functional characterization. *Faseb J*, 15, 1490-2.
- NICKENIG, G., SACHINIDIS, A., MICHAELSEN, F., BOHM, M., SEEWALD, S. & VETTER, H. 1997. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 95, 473-8.
- NICKENIG, G., STREHLOW, K., ROELING, J., ZOLK, O., KNORR, A. & BOHM, M. 1998b. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension*, 31, 1272-7.
- NICKENIG, G., STREHLOW, K., WASSMANN, S., BAUMER, A. T., ALBORY, K., SAUER, H. & BOHM, M. 2000. Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 102, 1828-33.
- NIEMIEC, P., ZAK, I. & WITA, K. 2008. The D allele of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is associated with the severity of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*, 46, 446-52.
- NISHIMURA, H., YERKES, E., HOHENFELLNER, K., MIYAZAKI, Y., MA, J., HUNLEY, T. E., YOSHIDA, H., ICHIKI, T., THREADGILL, D., PHILLIPS, J. A., 3RD, HOGAN, B. M., FOGO, A., BROCK, J. W., 3RD, INAGAMI, T. & ICHIKAWA, I. 1999. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell*, 3, 1-10.
- NIU, W. & QI, Y. 2010. Association of the angiotensin II type I receptor gene +1166 A>C polymorphism with hypertension risk: evidence from a meta-analysis of 16474 subjects. *Hypertens Res*, 33, 1137-43.
- NOUET, S. & NAHMIAS, C. 2000. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 1-6.
- OHISHI, M., UEDA, M., RAKUGI, H., NARUKO, T., KOJIMA, A., OKAMURA, A., HIGAKI, J. & OGIHARA, T. 1997. Enhanced expression of angiotensin-

- converting enzyme is associated with progression of coronary atherosclerosis in humans. *J Hypertens*, 15, 1295-302.
- OHISHI, M., UEDA, M., RAKUGI, H., NARUKO, T., KOJIMA, A., OKAMURA, A., HIGAKI, J. & OGIHARA, T. 1999. Relative localization of angiotensin-converting enzyme, chymase and angiotensin II in human coronary atherosclerotic lesions. *J Hypertens*, 17, 547-53.
- OHYAMA, K., YAMANO, Y., SANO, T., NAKAGOMI, Y., HAMAKUBO, T., MORISHIMA, I. & INAGAMI, T. 1995. Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regul Pept*, 57, 141-7.
- ONO, K., MANNAMI, T., BABA, S., YASUI, N., OGIHARA, T. & IWAI, N. 2003. Lack of association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens Res*, 26, 131-4.
- ORLOWSKA-BARANOWSKA, E., PLACHA, G., BARANOWSKI, R., MICHALEK, P., GORA, J., GACIONG, Z. & STEPINSKA, J. 2007. Can angiotensin II +1675 G/A type 2 receptor gene polymorphism be a marker of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis? *J Heart Valve Dis*, 16, 495-503.
- OSTEROP, A. P., KOFFLARD, M. J., SANDKUIJL, L. A., TEN CATE, F. J., KRAMS, R., SCHALEKAMP, M. A. & DANSER, A. H. 1998. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*, 32, 825-30.
- OTT, C., TITZE, S. I., SCHWARZ, T. K., KREUTZ, R., HILGERS, K. F., SCHMIDT, B. M., SCHLAICH, M. P. & SCHMIEDER, R. E. 2007. High sodium intake modulates left ventricular mass in patients with G expression of +1675 G/A angiotensin II receptor type 2 gene. *J Hypertens*, 25, 1627-32.
- PALATINI, P., CELOTTO, G., DORIGATTI, F., MOS, L., SANTONASTASO, M., BRATTI, P., PAPPARELLA, I., PESSINA, A. C. & SEMPLICINI, A. 2009. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and metabolic syndrome. *Am J Hypertens*, 22, 208-14.
- PAPPA, T. & ALEVIZAKI, M. 2012. Endogenous sex steroids and cardio- and cerebro-vascular disease in the postmenopausal period. *Eur J Endocrinol*, 167, 145-56.
- PARK, T. S. & ZAMBIDIS, E. T. A role for the renin-angiotensin system in hematopoiesis. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):745-7.
- PARKIN, E. T., TURNER, A. J. & HOOPER, N. M. 2004. Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. *Protein Pept Lett*, 11, 423-32.
- PAUKKU, K., KALKKINEN, N., SILVENNOINEN, O., KONTULA, K. K. & LEHTONEN, J. Y. 2008. p100 increases AT1R expression through interaction with AT1R 3'-UTR. *Nucleic Acids Res*, 36, 4474-87.
- PAUL, M., POYAN MEHR, A. & KREUTZ, R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86, 747-803.
- PEETERS, W., HELLINGS, W. E., DE KLEIJN, D. P., DE VRIES, J. P., MOLL, F. L., VINK, A. & PASTERKAMP, G. 2009. Carotid atherosclerotic plaques stabilize after stroke: insights into the natural process of atherosclerotic plaque stabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 128-33.
- PENDE, A., CONTINI, L., SALLO, R., PASSALACQUA, M., TANVEER, R., PORT, J. D. & LOTTI, G. 2008. Characterization of RNA-binding proteins possibly

- involved in modulating human AT 1 receptor mRNA stability. *Cell Biochem Funct*, 26, 493-501.
- PENDE, A., GIACCHE, M., CASTIGLIOLA, L., CONTINI, L., PASSERONE, G., PATRONE, M., PORT, J. D. & LOTTI, G. 1999. Characterization of the binding of the RNA-binding protein AUF1 to the human AT(1) receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 609-14.
- PERA, J., SLOWIK, A., DZIEDZIC, T., WLOCH, D. & SZCZUDLIK, A. 2006. ACE I/D polymorphism in different etiologies of ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*, 114, 320-2.
- PEREZ-DIAZ, I., GUZMAN, C., OLIVARES-REYES, J. A., RAMIREZ, T., GUTIERREZ-REYES, G., HIRIART, M. & ROBLES-DIAZ, G. 2011. Evidence of an intracellular angiotensin-generating system and non-AT1, non-AT2 binding site in a human pancreatic cell line. *Pancreas*, 40, 701-7.
- PEREZ-LOPEZ, F. R., LARRAD-MUR, L., KALLEN, A., CHEDRAUI, P. & TAYLOR, H. S. 2010. Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences. *Reprod Sci*, 17, 511-31.
- PETERLIN, B., MILANEZ, T., KOBAL, J., PETERLIN-POTISK, K., PETROVIC, D., GRAD, A. & POGACNIK, T. 2000. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene and stroke in Slovenian population. *Pflugers Arch*, 439, R38-9.
- PETNEHAZY, T., STOKES, K. Y., WOOD, K. C., RUSSELL, J. & GRANGER, D. N. 2006. Role of blood cell-associated AT1 receptors in the microvascular responses to hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 313-8.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30.
- PHILLIPS, M. I. & KAGIYAMA, S. 2002. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs*, 3, 569-77.
- PLAT, A. W., STOFFERS, H. E., DE LEEUW, P. W., VAN SCHAYCK, C. P., SOOMERS, F. L., KESTER, A. D., ARETZ, K. & KROON, A. A. 2009. Sex-specific effect of the alpha-adducin (G460W) and AGTR1 (A1166C) polymorphism on carotid intima-media thickness. *J Hypertens*, 27, 2165-73.
- PUEYO, M. E., GONZALEZ, W., NICOLETTI, A., SAVOIE, F., ARNAL, J. F. & MICHEL, J. B. 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 645-51.
- PURUSHOTHAMAN, K. R., KRISHNAN, P., PURUSHOTHAMAN, M., WILEY, J., ALVIAR, C. L., RUIZ, F. J., ZUBATOV, Y., KINI, A. S., SHARMA, S. K., FUSTER, V. & MORENO, P. R. 2013. Expression of angiotensin-converting enzyme 2 and its end product angiotensin 1-7 is increased in diabetic atheroma: implications for inflammation and neovascularization. *Cardiovasc Pathol*, 22, 42-8.
- RABELO, L. A., ALENINA, N. & BADER, M. 2011. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res*, 34, 154-60.
- RAITOHARJU, E., LYYTIKAINEN, L. P., LEVULA, M., OKSALA, N., MENNANDER, A., TARKKA, M., KLOPP, N., ILLIG, T., KAHONEN, M., KARHUNEN, P. J., LAAKSONEN, R. & LEHTIMAKI, T. 2011. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis*, 219, 211-7.

- RAIZADA, V., SKIPPER, B., LUO, W. & GRIFFITH, J. 2007. Intracardiac and intrarenal renin-angiotensin systems: mechanisms of cardiovascular and renal effects. *J Investig Med*, 55, 341-59.
- RAMKHELAWON, B., VILAR, J., RIVAS, D., MEES, B., DE CROM, R., TEDGUI, A. & LEHOUX, S. 2009. Shear stress regulates angiotensin type 1 receptor expression in endothelial cells. *Circ Res*, 105, 869-75.
- RE, R. N. 2004. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am*, 88, 19-38.
- REINECKE, K., LUCIUS, R., REINECKE, A., RICKERT, U., HERDEGEN, T. & UNGER, T. 2003. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *Faseb J*, 17, 2094-6.
- RENTZSCH, B., TODIRAS, M., ILIESCU, R., POPOVA, E., CAMPOS, L. A., OLIVEIRA, M. L., BALATU, O. C., SANTOS, R. A. & BADER, M. 2008. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension*, 52, 967-73.
- REYES-ENGEL, A., MORCILLO, L., ARANDA, F. J., RUIZ, M., GAITAN, M. J., MAYOR-OLEA, A., ARANDA, P. & FERRARIO, C. M. 2006. Influence of gender and genetic variability on plasma angiotensin peptides. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 7, 92-7.
- RIBICHINI, F., PUGNO, F., FERRERO, V., BUSSOLATI, G., FEOLA, M., RUSSO, P., DI MARIO, C., COLOMBO, A. & VASSANELLI, C. 2006. Cellular immunostaining of angiotensin-converting enzyme in human coronary atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*, 47, 1143-9.
- RICE, G. I., THOMAS, D. A., GRANT, P. J., TURNER, A. J. & HOOPER, N. M. 2004. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*, 383, 45-51.
- RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86, 1343-6.
- ROMPE, F., ARTUC, M., HALLBERG, A., ALTERMAN, M., STRODER, K., THONE-REINEKE, C., REICHENBACH, A., SCHACHERL, J., DAHLOF, B., BADER, M., ALENINA, N., SCHWANINGER, M., ZUBERBIER, T., FUNKE-KAISER, H., SCHMIDT, C., SCHUNCK, W. H., UNGER, T. & STECKELINGS, U. M. 2010. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*, 55, 924-31.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- ROTHWELL, P. M., GIBSON, R. & WARLOW, C. P. 2000. Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with symptomatic carotid stenosis. On behalf of the European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke*, 31, 615-21.
- ROTHWELL, P. M., GIBSON, R. J., SLATTERY, J., SELLAR, R. J. & WARLOW, C. P. 1994. Equivalence of measurements of carotid stenosis. A comparison of three methods on 1001 angiograms. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke*, 25, 2435-9.

- RUBATTU, S., DI ANGELANTONIO, E., STANZIONE, R., ZANDA, B., EVANGELISTA, A., PIRISI, A., DE PAOLIS, P., COTA, L., BRUNETTI, E. & VOLPE, M. 2004. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and the risk of ischemic stroke: a role of the A1166C/AT1 gene variant. *J Hypertens*, 22, 2129-34.
- RUNDEK, T., ARIF, H., BODEN-ALBALA, B., ELKIND, M. S., PAIK, M. C. & SACCO, R. L. 2008. Carotid plaque, a subclinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study. *Neurology*, 70, 1200-7.
- SAAM, T., CAI, J., MA, L., CAI, Y. Q., FERGUSON, M. S., POLISSAR, N. L., HATSUKAMI, T. S. & YUAN, C. 2006. Comparison of symptomatic and asymptomatic atherosclerotic carotid plaque features with in vivo MR imaging. *Radiology*, 240, 464-72.
- SALES, V. L., SUKHOVA, G. K., LOPEZ-ILASACA, M. A., LIBBY, P., DZAU, V. J. & PRATT, R. E. 2005. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation*, 112, 3328-36.
- SANSOM, S. E., NUOVO, G. J., MARTIN, M. M., KOTHA, S. R., PARINANDI, N. L. & ELTON, T. S. 2010. miR-802 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in intestinal epithelial C2BBel1 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, 17.
- SANTOS, R. A., FERREIRA, A. J. & SIMOES, E. S. A. C. 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, 93, 519-27.
- SASAMURA, H., NAKAZATO, Y., HAYASHIDA, T., KITAMURA, Y., HAYASHI, M. & SARUTA, T. 1997. Regulation of vascular type 1 angiotensin receptors by cytokines. *Hypertension*, 30, 35-41.
- SATA, M. & FUKUDA, D. 2010. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Med Invest*, 57, 12-25.
- SAUNDERS, M. A., LIANG, H. & LI, W. H. 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3300-5.
- SAVIC, Z. N., DAVIDOVIC, L., SAGIC, D., BRAJOVIC, M. D., POPOVIC, S. S. & MIJAILOVIC, M. 2010. [Correlation between morphologic carotid plaque findings based on color-Doppler and CT multidetector angiography with intraoperative findings in carotid artery stenosis]. *Vojnosanit Pregl*, 67, 449-52.
- SAVOIA, C., BURGER, D., NISHIGAKI, N., MONTEZANO, A. & TOUYZ, R. M. 2011. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med*, 30.
- SAVOIA, C., TOUYZ, R. M., VOLPE, M. & SCHIFFRIN, E. L. 2007. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension*, 49, 341-6.
- SAYED-TABATABAEI, F. A., HOUWING-DUISTERMAAT, J. J., VAN DUIJN, C. M. & WITTEMAN, J. C. 2003. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke*, 34, 1634-9.
- SAYESKI, P. P. & BERNSTEIN, K. E. 2001. Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT(1)-receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2, 4-10.

- SCHAPER, W. & ITO, W. D. 1996. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*, 79, 911-9.
- SCHIEFFER, B., SCHIEFFER, E., HILFIKER-KLEINER, D., HILFIKER, A., KOVANEN, P. T., KAARTINEN, M., NUSSBERGER, J., HARRINGER, W. & DREXLER, H. 2000. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*, 101, 1372-8.
- SCHMIEDER, R. E., ERDMANN, J., DELLES, C., JACOBI, J., FLECK, E., HILGERS, K. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 2001. Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans. *J Am Coll Cardiol*, 37, 175-82.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHOENHAGEN, P., ZIADA, K. M., KAPADIA, S. R., CROWE, T. D., NISSEN, S. E. & TUZCU, E. M. 2000. Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes : an intravascular ultrasound study. *Circulation*, 101, 598-603.
- SCHWARTZ, S. M., VIRMANI, R. & ROSENFELD, M. E. 2000. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2, 422-9.
- SERVANT, G., DUDLEY, D. T., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. 1994. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol Pharmacol*, 45, 1112-8.
- SETHUPATHY, P., BOREL, C., GAGNEBIN, M., GRANT, G. R., DEUTSCH, S., ELTON, T. S., HATZIGEORGIOU, A. G. & ANTONARAKIS, S. E. 2007. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet*, 81, 405-13.
- SETHUPATHY, P., CORDA, B. & HATZIGEORGIOU, A. G. 2006a. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *Rna*, 12, 192-7.
- SETHUPATHY, P., MEGRAW, M. & HATZIGEORGIOU, A. G. 2006b. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods*, 3, 881-6.
- SHAH, P. K. 2003. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol*, 41, 15S-22S.
- SHARMA, P. 1998. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64, 227-30.
- SIRAGY, H. M. & CAREY, R. M. 2010. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 31, 541-50.
- SLUIMER, J. C., GASC, J. M., HAMMING, I., VAN GOOR, H., MICHAUD, A., VAN DEN AKKER, L. H., JUTTEN, B., CLEUTJENS, J., BIJNENS, A. P., CORVOL, P., DAEMEN, M. J. & HEENEMAN, S. 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions. *J Pathol*, 215, 273-9.
- SMILDE, T. D., ZUURMAN, M. W., HILLEGE, H. L., VAN VELDHUISEN, D. J., VAN GILST, W. H., VAN DER STEEGE, G., VOORS, A. A., KORS, J. A.,

- DE JONG, P. E. & NAVIS, G. 2007. Renal function dependent association of AGTR1 polymorphism (A1166C) and electrocardiographic left-ventricular hypertrophy. *Am J Hypertens*, 20, 1097-103.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SOHN, H. Y., RAFF, U., HOFFMANN, A., GLOE, T., HEERMEIER, K., GALLE, J. & POHL, U. 2000. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol*, 131, 667-72.
- SPAGNOLI, L. G., MAURIELLO, A., SANGIORGI, G., FRATONI, S., BONANNO, E., SCHWARTZ, R. S., PIEPGRAS, D. G., PISTOLESE, R., IPPOLITI, A. & HOLMES, D. R., JR. 2004. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *Jama*, 292, 1845-52.
- SPRUTH, E., ZURBRUGG, H. R., WARNECKE, C., ERDMANN, J., PREGLA, R., PFAUTSCH, P., HETZER, R., FLECK, E. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 1999. Expression of ACE mRNA in the human atrial myocardium is not dependent on left ventricular function, ACE inhibitor therapy, or the ACE I/D genotype. *J Mol Med*, 77, 804-10.
- STANKOVIC, A. & ALAVANTIC, D. 2002. Rapid detection of the hypertension-associated A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1). *Genet Test*, 6, 133-4.
- STANKOVIĆ, A., ILIĆ N., ŽUNIĆ Z., GLIŠIĆ S., ALAVANTIĆ D. 1999. Association of the insertion/deletion polymorphism at the angiotensin I-converting enzyme locus with arterial blood pressure: population-based study. *Jugoslav Med Biochem* 18:141-147.
- STANKOVIC, A., ZIVKOVIC, M. & ALAVANTIC, D. 2002. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in a Serbian population: a gender-specific association with hypertension. *Scand J Clin Lab Invest*, 62, 469-75.
- STANKOVIC, A., ZIVKOVIC, M., GLISIC, S. & ALAVANTIC, D. 2003. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and essential hypertension in Serbian population. *Clin Chim Acta*, 327, 181-5.
- STANKOVIC, A., ZIVKOVIC, M., KOSTIC, M., ATANACKOVIC, J., KRSTIC, Z. & ALAVANTIC, D. 2010. Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT. *Clin Biochem*, 43, 71-5.
- STANKOVIC, A., ZIVKOVIC, M., KOSTIC, M., ATANACKOVIC, J., KRSTIC, Z. & ALAVANTIC, D. 2010. Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT. *Clin Biochem*, 43, 71-5.
- STECKELINGS, U. M., WIDDOP, R. E., PAULIS, L. & UNGER, T. 2010. The angiotensin AT2 receptor in left ventricular hypertrophy. *J Hypertens*, 28, S50-5.
- STEEDS, R. P., TOOLE, L. O., CHANNER, K. S. & MORICE, A. H. 1999. Human vascular reactivity and polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and the angiotensin type 1 receptor genes. *J Vasc Res*, 36, 445-55.
- STICCHI, E., ROMAGNUOLO, I., SOFI, F., PRATESI, G., PULLI, R., PRATESI, C., ABBATE, R. & FATINI, C. 2011. Association between polymorphisms of the renin angiotensin system and carotid stenosis. *J Vasc Surg*, 54, 467-73.

- STOCKER, R. & KEANEY, J. F., JR. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84, 1381-478.
- SU, B., MARTIN, M. M. & ELTON, T. S. 1996. Human AT1 receptor gene regulation. *Adv Exp Med Biol*, 396, 11-21.
- SU, B., MARTIN, M. M., BEASON, K. B., MILLER, P. J. & ELTON, T. S. 1994. The genomic organization and functional analysis of the promoter for the human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 204, 1039-46.
- SUEHIRO, T., MORITA, T., INOUE, M., KUMON, Y., IKEDA, Y. & HASHIMOTO, K. 2004. Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet*, 115, 91-6.
- SUGIMURA, K., TIAN, X. L., HOFFMANN, S., GANTEN, D. & BADER, M. 1998. Alternative splicing of the mRNA coding for the human endothelial angiotensin-converting enzyme: a new mechanism for solubilization. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 466-72.
- SUZUKI, Y., RUIZ-ORTEGA, M., LORENZO, O., RUPEREZ, M., ESTEBAN, V. & EGIDO, J. 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 881-900.
- SZOLNOKI, Z., HAVASI, V., TALIAN, G., BENE, J., KOMLOSI, K., SOMOGYVARI, F., KONDACS, A., SZABO, M., FODOR, L., BODOR, A. & MELEGH, B. 2006a. Angiotensin II type-1 receptor A1166C polymorphism is associated with increased risk of ischemic stroke in hypertensive smokers. *J Mol Neurosci*, 28, 285-90.
- SZOLNOKI, Z., MAASZ, A., MAGYARI, L., HORVATOVICH, K., FARAGO, B., SOMOGYVARI, F., KONDACS, A., SZABO, M., FODOR, L., BODOR, A., HADARITS, F. & MELEGH, B. 2006b. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med*, 8, 353-60.
- SZOLNOKI, Z., SOMOGYVARI, F., KONDACS, A., SZABO, M. & FODOR, L. 2001. Evaluation of the roles of the Leiden V mutation and ACE I/D polymorphism in subtypes of ischaemic stroke. *J Neurol*, 248, 756-61.
- TABARA, Y., KOHARA, K., NAKURA, J. & MIKI, T. 2001. Risk factor-gene interaction in carotid atherosclerosis: effect of gene polymorphisms of renin-angiotensin system. *J Hum Genet*, 46, 278-84.
- TABAS, I. 2009. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2333-9.
- TABAS, I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*, 10, 36-46.
- TABAS, I., WILLIAMS, K. J. & BOREN, J. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116, 1832-44.
- TAKAYA, N., YUAN, C., CHU, B., SAAM, T., POLISSAR, N. L., JARVIK, G. P., ISAAC, C., MCDONOUGH, J., NATIELLO, C., SMALL, R., FERGUSON, M. S. & HATSUKAMI, T. S. 2005. Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation*, 111, 2768-75.

- TAKEDA, K., ICHIKI, T., FUNAKOSHI, Y., ITO, K. & TAKESHITA, A. 2000. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by all-trans retinoic acid in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 35, 297-302.
- TAM, W. 2001. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*, 274, 157-67.
- TANG, B., MA, S., YANG, Y., YANG, D., CHEN, J., SU, X., TAN, Y., SUN, M. & LI, D. 2011. Overexpression of angiotensin II type 2 receptor suppresses neointimal hyperplasia in a rat carotid arterial balloon injury model. *Mol Med Report*, 4, 249-54.
- TENDERA, M., ABOYANS, V., BARTELINK, M. L., BAUMGARTNER, I., CLEMENT, D., COLLET, J. P., CREMONESI, A., DE CARLO, M., ERBEL, R., FOWKES, F. G., HERAS, M., KOWNATOR, S., MINAR, E., OSTERGREN, J., POLDERMANS, D., RIAMBAU, V., ROFFI, M., ROTHER, J., SIEVERT, H., VAN SAMBEEK, M. & ZELLER, T. 2011. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 32, 2851-906.
- TESANOVIC, S., VINH, A., GASPARI, T. A., CASLEY, D. & WIDDOP, R. E. 2010. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 1606-13.
- TESTUT, P., SOUBRIER, F., CORVOL, P. & HUBERT, C. 1993. Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem J*, 293, 843-8.
- THAM, D. M., MARTIN-MCNULTY, B., WANG, Y. X., WILSON, D. W., VERGONA, R., SULLIVAN, M. E., DOLE, W. & RUTLEDGE, J. C. 2002. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics*, 11, 21-30.
- THATCHER, S., YIANNIKOURIS, F., GUPTA, M. & CASSIS, L. 2009. The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease. *Mol Cell Endocrinol*, 302, 111-7.
- THIM, T., HAGENSEN, M. K., BENTZON, J. F. & FALK, E. 2008. From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J Intern Med*, 263, 506-16.
- THOMAS, M. C., PICKERING, R. J., TSOROTES, D., KOITKA, A., SHEEHY, K., BERNARDI, S., TOFFOLI, B., NGUYEN-HUU, T. P., HEAD, G. A., FU, Y., CHIN-DUSTING, J., COOPER, M. E. & TIKELLIS, C. 2010. Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res*, 107, 888-97.
- THORP, E. & TABAS, I. 2009. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol*, 86, 1089-95.
- TIPNIS, S. R., HOOPER, N. M., HYDE, R., KARRAN, E., CHRISTIE, G. & TURNER, A. J. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 275, 33238-43.
- TIRET, L., BLANC, H., RUIDAVETS, J. B., ARVEILER, D., LUC, G., JEUNEMAITRE, X., TICHET, J., MALLET, C., POIRIER, O., PLOUIN, P. F. & CAMBIEN, F. 1998. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in

- relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens*, 16, 37-44.
- TIRET, L., KEE, F., POIRIER, O., NICAUD, V., LECERF, L., EVANS, A., CAMBOU, J. P., ARVEILER, D., LUC, G., AMOUYEL, P. & ET AL. 1993. Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet*, 341, 991-2.
- TOUSOULIS, D., KOUMALLOS, N., ANTONIADES, C., ANTONOPOULOS, A. S., BAKOGIANNIS, C., MILLIOU, A., MARINOU, K., KALLIKAZAROU, E., STEFANADI, E., MENTZIKOF, D. & STEFANADIS, C. 2010. Genetic polymorphism on type 2 receptor of angiotensin II, modifies cardiovascular risk and systemic inflammation in hypertensive males. *Am J Hypertens*, 23, 237-42.
- TOUYZ, R. M. 2005. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14, 125-31.
- TUNCER, N., TUGLULAR, S., KILIC, G., SAZCI, A., US, O. & KARA, I. 2006. Evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of ischaemic stroke. *J Clin Neurosci*, 13, 224-7.
- TURNER, A. J. & HOOPER, N. M. 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 23, 177-83.
- ULLIAN, M. E., RAYMOND, J. R., WILLINGHAM, M. C. & PAUL, R. V. 1997. Regulation of vascular angiotensin II receptors by EGF. *Am J Physiol*, 273, C1241-9.
- UNGER, T., CHUNG, O., CSIKOS, T., CULMAN, J., GALLINAT, S., GOHLKE, P., HOHLE, S., MEFFERT, S., STOLL, M., STROTH, U. & ZHU, Y. Z. 1996. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*, 14, S95-103.
- VAN DER WAL, A. C., BECKER, A. E., VAN DER LOOS, C. M. & DAS, P. K. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, 89, 36-44.
- VAN GEEL, P. P., PINTO, Y. M., VOORS, A. A., BUIKEMA, H., OOSTERGA, M., CRIJNS, H. J. & VAN GILST, W. H. 2000. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension*, 35, 717-21.
- VAUGHAN, D. E., LAZOS, S. A. & TONG, K. 1995. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest*, 95, 995-1001.
- VERREY, F., SINGER, D., RAMADAN, T., VUILLE-DIT-BILLE, R. N., MARIOTTA, L. & CAMARGO, S. M. 2009. Kidney amino acid transport. *Pflugers Arch*, 458, 53-60.
- VICKERS, C., HALES, P., KAUSHIK, V., DICK, L., GAVIN, J., TANG, J., GODBOUT, K., PARSONS, T., BARONAS, E., HSIEH, F., ACTON, S., PATANE, M., NICHOLS, A. & TUMMINO, P. 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 277, 14838-43.
- VIRMANI, R., BURKE, A. P., FARB, A. & KOLODZIE, F. D. 2006. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*, 47, C13-8.

- VIRMANI, R., KOLODZIE, F. D., BURKE, A. P., FARB, A. & SCHWARTZ, S. M. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1262-75.
- VIRMANI, R., KOLODZIE, F. D., BURKE, A. P., FINN, A. V., GOLD, H. K., TULENKO, T. N., WRENN, S. P. & NARULA, J. 2005. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2054-61.
- VOLPE, M., MUSUMECI, B., DE PAOLIS, P., SAVOIA, C. & MORGANTI, A. 2003. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens*, 21, 1429-43.
- VON BIRGELEN, C., KLINKHART, W., MINTZ, G. S., PAPANICOLAOU, A., HERRMANN, J., BAUMGART, D., HAUDE, M., WIENEKE, H., GE, J. & ERBEL, R. 2001. Plaque distribution and vascular remodeling of ruptured and nonruptured coronary plaques in the same vessel: an intravascular ultrasound study in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 37, 1864-70.
- W VAN LAMMEREN G., MOLL, L. F., BORST, G.J., DE KLEJIN DP, DE VRIES JP,P.M., PASTERKAMP, G. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr Cardiol Rev*, 7, 22-7.
- WALSH, K., SMITH, R. C. & KIM, H. S. 2000. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*, 87, 184-8.
- WANG, C. H., LI, S. H., WEISEL, R. D., FEDAK, P. W., DUMONT, A. S., SZMITKO, P., LI, R. K., MICKLE, D. A. & VERMA, S. 2003. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*, 107, 1783-90.
- WANG, C., JAYADEV, S. & ESCOBEDO, J. A. 1995. Identification of a domain in the angiotensin II type 1 receptor determining Gq coupling by the use of receptor chimeras. *J Biol Chem*, 270, 16677-82.
- WANG, D. H. & DU, Y. 1998. Regulation of vascular type 1 angiotensin II receptor in hypertension and sodium loading: role of angiotensin II. *J Hypertens*, 16, 467-75.
- WANG, J. G. & STAESSEN, J. A. 2000. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol*, 410, 289-302.
- WANG, W. Y., ZEE, R. Y. & MORRIS, B. J. 1997. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet*, 51, 31-4.
- WANG, X., NICKENIG, G. & MURPHY, T. J. 1997. The vascular smooth muscle type I angiotensin II receptor mRNA is destabilized by cyclic AMP-elevating agents. *Mol Pharmacol*, 52, 781-7.
- WARDLAW, J. M. & LEWIS, S. 2005. Carotid stenosis measurement on colour Doppler ultrasound: agreement of ECST, NASCET and CCA methods applied to ultrasound with intra-arterial angiographic stenosis measurement. *Eur J Radiol*, 56, 205-11.
- WARNECKE, C., MUGRAUER, P., SURDER, D., ERDMANN, J., SCHUBERT, C. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 2005. Intronic ANG II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, 18..

- WARNECKE, C., SURDER, D., CURTH, R., FLECK, E. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 1999a. Analysis and functional characterization of alternatively spliced angiotensin II type 1 and 2 receptor transcripts in the human heart. *J Mol Med*, 77, 718-27.
- WARNECKE, C., WILLICH, T., HOLZMEISTER, J., BOTTARI, S. P., FLECK, E. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 1999b. Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements. *Biochem J*, 340, 17-24.
- WARNER, F. J., LEW, R. A., SMITH, A. I., LAMBERT, D. W., HOOPER, N. M. & TURNER, A. J. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem*, 280, 39353-62.
- WARNHOLTZ, A., NICKENIG, G., SCHULZ, E., MACHARZINA, R., BRASEN, J. H., SKATCHKOV, M., HEITZER, T., STASCH, J. P., GRIENDLING, K. K., HARRISON, D. G., BOHM, M., MEINERTZ, T. & MUNZEL, T. 1999. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 99, 2027-33.
- WASSMANN, S., CZECH, T., VAN EICKELS, M., FLEMING, I., BOHM, M. & NICKENIG, G. 2004a. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation*, 110, 3062-7.
- WASSMANN, S., STUMPF, M., STREHLOW, K., SCHMID, A., SCHIEFFER, B., BOHM, M. & NICKENIG, G. 2004b. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res*, 94, 534-41.
- WATANABE, Y., ISHIGAMI, T., KAWANO, Y., UMAHARA, T., NAKAMORI, A., MIZUSHIMA, S., HIBI, K., KOBAYASHI, I., TAMURA, K., OCHIAI, H., UMEMURA, S. & ISHII, M. 1997. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and carotid plaques in Japanese. *Hypertension*, 30, 569-73.
- WHARTON, J., MORGAN, K., RUTHERFORD, R. A., CATRAVAS, J. D., CHESTER, A., WHITEHEAD, B. F., DE LEVAL, M. R., YACOUB, M. H. & POLAK, J. M. 1998. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 323-36.
- WIDDER, B., PAULAT, K., HACKSPACHER, J., HAMANN, H., HUTSCHENREITER, S., KREUTZER, C., OTT, F. & VOLLMAR, J. 1990. Morphological characterization of carotid artery stenoses by ultrasound duplex scanning. *Ultrasound Med Biol*, 16, 349-54.
- WILLIAMS, K. J. 2001. Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 12, 477-87.
- WILLIAMS, T. A., VILLARD, E., PRIGENT, Y., DADOUNE, J. P. & SOUBRIER, F. 1995. A genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. *Mol Cell Endocrinol*, 107, 215-9.
- WU, L., IWAI, M., NAKAGAMI, H., LI, Z., CHEN, R., SUZUKI, J., AKISHITA, M., DE GASPARO, M. & HORIUCHI, M. 2001. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor

- blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation*, 104, 2716-21.
- WU, L., IWAI, M., NAKAGAMI, H., LI, Z., CHEN, R., SUZUKI, J., AKISHITA, M., DE GASPARO, M. & HORIUCHI, M. 2001. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation*, 104, 2716-21.
- XU, M., SHAM, P., YE, Z., LINDPAINTNER, K. & HE, L. 2010. A1166C genetic variation of the angiotensin II type I receptor gene and susceptibility to coronary heart disease: collaborative of 53 studies with 20,435 cases and 23,674 controls. *Atherosclerosis*, 213, 191-9.
- YAMAMOTO, Y., WATARI, Y., BRYDUN, A., YOSHIZUMI, M., AKISHITA, M., HORIUCHI, M., CHAYAMA, K., OSHIMA, T. & OZONO, R. 2008. Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling after wire injury in mice. *Hypertens Res*, 31, 1241-9.
- YASUHARA, A., WADA, J., MALAKAUSKAS, S. M., ZHANG, Y., EGUCHI, J., NAKATSUKA, A., MURAKAMI, K., KANZAKI, M., TESHIGAWARA, S., YAMAGATA, K., LE, T. H. & MAKINO, H. 2008. Collectrin is involved in the development of salt-sensitive hypertension by facilitating the membrane trafficking of apical membrane proteins via interaction with soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex. *Circulation*, 118, 2146-55.
- YOSHIDA, H., KON, V. & ICHIKAWA, I. *Polymorphisms of the renin-angiotensin system genes in progressive renal diseases*, *Kidney Int.* 1996 Sep;50(3):732-44.
- ZEE, R. Y., RIDKER, P. M., STAMPFER, M. J., HENNEKENS, C. H. & LINDPAINTNER, K. 1999. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation*, 99, 340-3.
- ZHAN, Y., BROWN, C., MAYNARD, E., ANSHELEVICH, A., NI, W., HO, I. C. & OETTGEN, P. 2005. Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest*, 115, 2508-16.
- ZHANG, C., ZHAO, Y. X., ZHANG, Y. H., ZHU, L., DENG, B. P., ZHOU, Z. L., LI, S. Y., LU, X. T., SONG, L. L., LEI, X. M., TANG, W. B., WANG, N., PAN, C. M., SONG, H. D., LIU, C. X., DONG, B., ZHANG, Y. & CAO, Y. 2010. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15886-91.
- ZHANG, H., SUN, M., SUN, T., ZHANG, C., MENG, X., ZHANG, Y. & YANG, J. 2011. Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis. *Cerebrovasc Dis*, 32, 431-8.
- ZHANG, H., WADA, J., HIDA, K., TSUCHIYAMA, Y., HIRAGUSHI, K., SHIKATA, K., WANG, H., LIN, S., KANWAR, Y. S. & MAKINO, H. 2001. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem*, 276, 17132-9.
- ZHANG, X., WANG, D., XU, L., MA, Y. & ZHANG, S. 2001. [Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and type 2 diabetics with stroke in China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 18, 462-6.

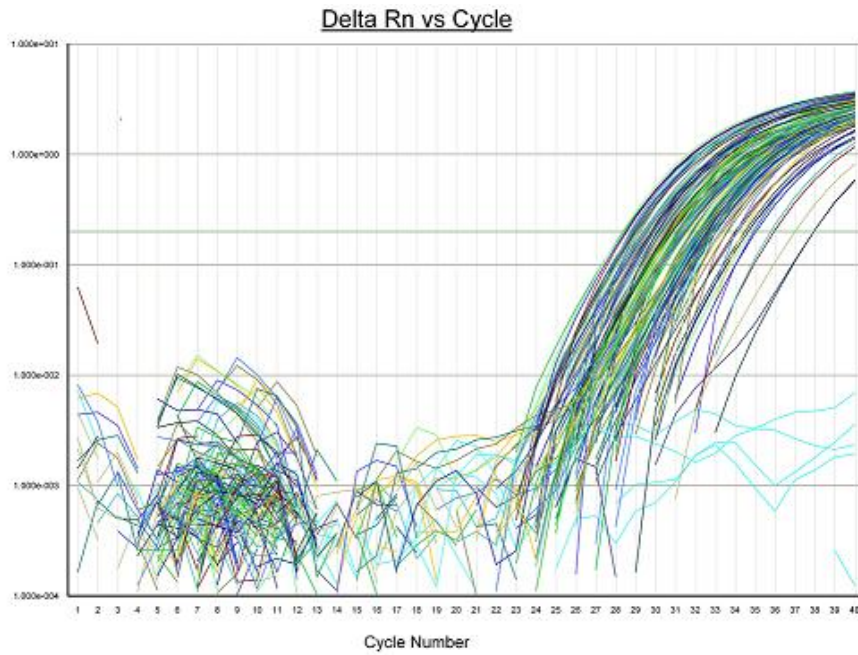
- ZHANG, Y. & WADA, J. 2007. Collectrin, a homologue of ACE2, its transcriptional control and functional perspectives. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 1-5.
- ZHANG, Y., WADA, J., YASUHARA, A., ISEDA, I., EGUCHI, J., FUKUI, K., YANG, Q., YAMAGATA, K., HIESBERGER, T., IGARASHI, P., ZHANG, H., WANG, H., AKAGI, S., KANWAR, Y. S. & MAKINO, H. 2007. The role for HNF-1beta-targeted collectrin in maintenance of primary cilia and cell polarity in collecting duct cells. *PLoS One*, 2.
- ZHANG, Z., XU, G., LIU, D., FAN, X., ZHU, W. & LIU, X. 2012. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS One*, 7, 1.
- ZHAO, X., MARTIN, M. M. & ELTON, T. S. 2000. Basal level transcriptional regulation of the human angiotensin II type 1 receptor gene. *Biochim Biophys Acta*, 15, 1-2.
- ZHAO, X., MARTIN, M. M. & ELTON, T. S. 2001. The transcription factors Sp1 and Sp3 are required for human angiotensin II type 1 receptor gene expression in H295-R cells. *Biochim Biophys Acta*, 30, 195-206.
- ZHENG, L., XU, C. C., CHEN, W. D., SHEN, W. L., RUAN, C. C., ZHU, L. M., ZHU, D. L. & GAO, P. J. 2010. MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 400, 483-8.
- ZHU, N., ZHANG, D., CHEN, S., LIU, X., LIN, L., HUANG, X., GUO, Z., LIU, J., WANG, Y., YUAN, W. & QIN, Y. 2011. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*, 215, 286-93.
- ZHU, S. & MENG, Q. H. 2006. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with carotid atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*, 44, 282-4.
- ZHUO, J. L. & LI, X. C. 2011. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*, 32, 1551-65.
- ZIVKOVIC, M., DJURIC, T., STANCIC, O., ALAVANTIC, D. & STANKOVIC, A. 2007. X-linked angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism -1332A/G in male patients with essential hypertension. *Clin Chim Acta*, 386, 110-3.
- ZIVKOVIC, M., STANKOVIC, A. & ALAVANTIC, D. 2005. AT1 receptor A1166C and AT2 receptor -1332A/G gene polymorphisms: efficient genotyping by single-tube PCR. *J Clin Lab Anal*, 19, 84-6.
- ZULLI, A., BURRELL, L. M., BUXTON, B. F. & HARE, D. L. 2008. ACE2 and AT4R are present in diseased human blood vessels. *Eur J Histochem*, 52, 39-44.
- ZULLI, A., BURRELL, L. M., WIDDOP, R. E., BLACK, M. J., BUXTON, B. F. & HARE, D. L. 2006. Immunolocalization of ACE2 and AT2 receptors in rabbit atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem*, 54, 147-50.

Web stranice :

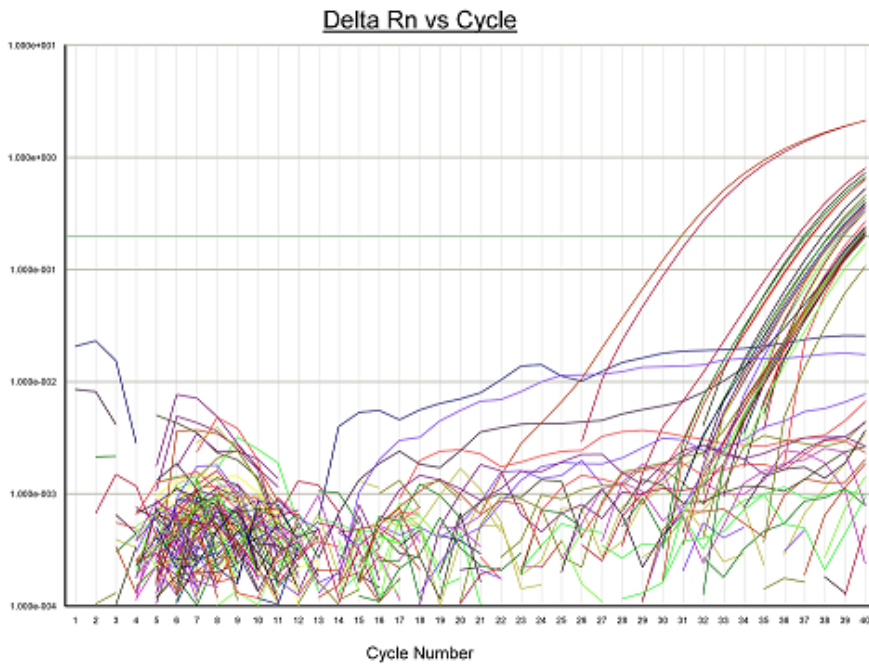
- <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>
<http://www.graphpad.com>
http://www.nieronline.org/uploads/5/53/Lely_Fig2.jpg
<http://www.statsoft.com>
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/

PRILOZI

a)

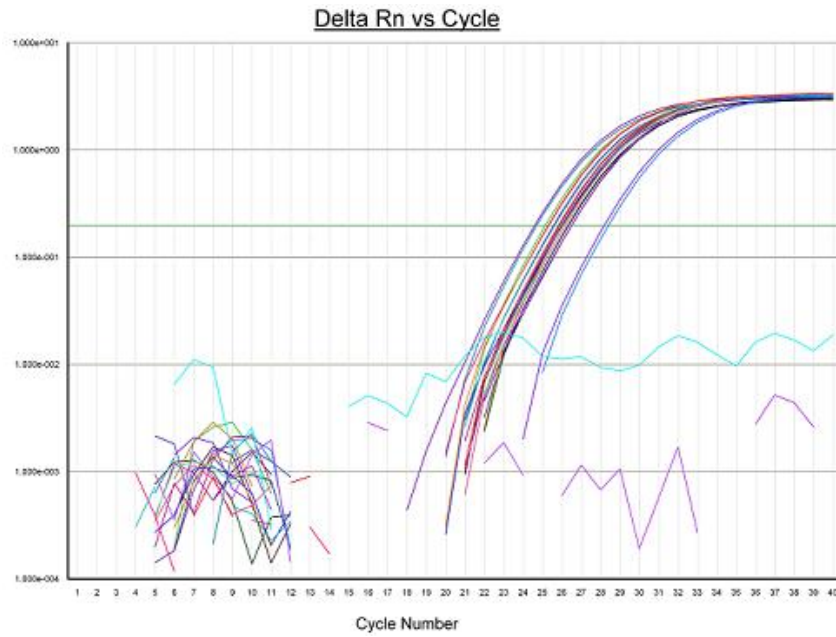


b)

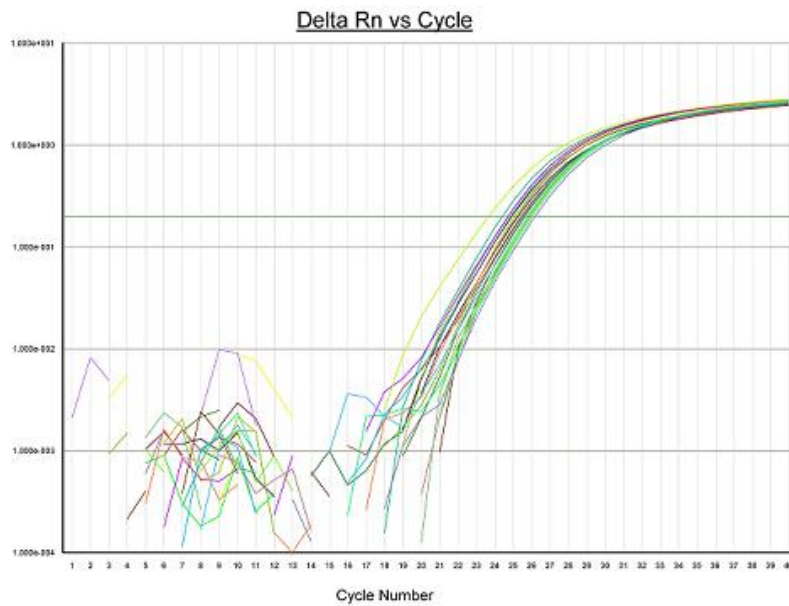


Prilog A. Profili amplifikacije iRNK (cDNK) ciljnih gena za **a) ACE** **b) ACE2** u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Na graficima je logaritamski prikaz amplifikacije u vidu zavisnosti delta RN od broja ciklusa PCR. Zelena horizontalna linija predstavlja automatski podešen "treshold". Presek ove linije sa eksponencijalnom fazom krive amplifikacije ciljne sekvence u analiziranom uzorku definiše Ct vrednost (*Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System SDS Software*).

c)



d)



Prilog B. Profili amplifikacije malih nekodirajućih RNK **c)** miR-155 **d)** RNU44 u tkivu karotidnog aterosklerotskog plaka. Na graficima je logaritamski prikaz amplifikacije u vidu zavisnosti deltaRN od brojne ciklusa PCR. Zelena horizontalna linija predstavlja automatski podešen "treshold". Presek ove linije sa eksponencijalnom fazom krive amplifikacije ciljne sekvence u analiziranom uzorku definiše Ct vrednost (*Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System SDS Software*).

Stručna biografija

Ana Kolaković je rođena 01.06.1982. godine u Čačku. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa biologija, je upisala školske 2001/2002 godine. Diplomirala je 20.07.2007. godine sa prosečnom ocenom 8.97 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Školske 2007/2008 je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota.

Od februara 2008. do juna 2010. godine je bila stipendista doktorant Ministarstva za Nauku i Tehnološki razvoj Republike Srbije. Od 01.06. 2010. godine je zaposlena u Laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu Genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 17.11.2010. godine.

Do sada je bila angažovana na nekoliko naučnih projekata: od 2008. do 2010. godine na projektu pod nazivom „Genetska epidemiologija i farmakogenomika vaskularnih oboljenja“ i od 2008. do 2009. godine na projektu „Primena parametara genetske i radijacione epidemiologije u procesu rizika hroničnih nezaraznih oboljenja u populaciji opštine Obrenovac“. Trenutno je angažovana na projektima: „Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti“ (br. OI175085) i „Integralna studija identifikacije regionalnih genetskih faktora rizika životne sredine za masovne nezarazne bolesti humane populacije- INGEMA_S (br. III41028), Ministarstva za Prosvetu i Nauku, Republike Srbije.

Ana Kolaković je do sada bila autor i koautor 4 naučne publikacije iz uže naučne oblasti u istaknutim međunarodnom časopisima, 1 rada sa skupova od međunarodnog značaja štampan u celini i 11 saopštenja sa naučnih skupova od međunarodnog značaja štampanih u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Колаковић

број уписа ИО 070006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Генетичко-епидемиолошка анализа и анализа експресије гена ренин-ангиотензин система (RAS) у каротидној атеросклерози од човека

- 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, 29.11.2013

Ана Колаковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Колаковић

Број уписа ИО 070006

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада

Генетичко-епидемиолошка анализа и анализа експресије гена ренин-ангиотензин
система (RAS) у каротидној атеросклерози код човека

Ментор др Александра Станковић, виши научни сарадник Института за
нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду

др Горан Брајушковић, ванредни професор, Биолошког факултета, Универзитета
у Београду

Потписани Ана Колаковић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.11.2013.

Ана Колаковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Генетичко-епидемиолошка анализа и анализа експресије гена ренин-ангиотензин система (RAS) у каротидној атеросклерози код човека

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.12.2013.

Ана Ђосковић

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

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

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

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

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

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