



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENSKI POLIMORFIZMI ADHEZIJSKIH MOLEKUL IN VNETNIH
GENOV TER PROGRESIJA ATEROSKLEROZE KAROTIDNIH
ARTERIJ PRI SLADKORNI BOLEZNI TIP 2**

Marec, 2017

Dražen Popović



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENSKI POLIMORFIZMI ADHEZIJSKIH MOLEKUL IN VNETNIH
GENOV TER PROGRESIJA ATEROSKLEROZE KAROTIDNIH
ARTERIJ PRI SLADKORNI BOLEZNI TIP 2**

Marec, 2017

Dražen Popović

Mentor: redni prof. dr. Danijel Petrovič

KAZALO VSEBINE

POVZETEK

ABSTRACT

KAZALO TABEL

KAZALO SLIK

SEZNAM KRAJŠAV

1 UVOD	14
1.1 ATEROSKLEROZA IN VNETJE	15
1.2 SLADKORNA BOLEZEN	17
1.3 ADHEZIJSKE MOLEKULE	17
1.3.1 ICAM 1	18
1.3.2 PECAM 1	19
1.4 VNETNI CITOKINI	20
1.4.1 Interlevkin 10	21
1.4.2 Interlevkin 12	22
1.4.3 Interlevkin 18	23
1.5 DEBELINA INTIME IN MEDIJE KAROTIDNE ARTERIJE	24
2 NAMEN IN HIPOTEZA RAZISKAVE	25
3 PREISKOVANCI IN METODE RAZISKAVE	27
3.1 PREISKOVANCI	27
3.2 ULTRAZVOČNA PREISKAVA VRATNIH ARTERIJ	27
3.3 BIOKEMIJSKE PREISKAVE	28
3.4 MOLEKULARNOGENETSKA ANALIZA	28
3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	28
4 REZULTATI	30
4.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	30
4.2 PRIMERJAVA ULTRAZVOČNIH OZNAČEVALCEV ATEROSKLEROZE V VRATNIH ARTERIJAH MED PREISKOVANCI OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO IN KONTROLNEM PREGLEDU	32
4.3 GENSKA ANALIZA PREISKOVANCEV	32
4.3.1 Polimorfizem gena za ICAM 1 K469E (rs 5498)	32
4.3.2 Polimorfizem gena za ICAM 1 G241A (rs 1799969)	35
4.3.3 Polimorfizem gena za PECAM 1 +373C/G (rs 668)	37
4.3.4 Polimorfizem G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10	39
4.3.5 Polimorfizem C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 p40	41
4.3.6 Polimorfizem C607A (rs1946518) gena za interlevkin 18	44
4.3.7 Polimorfizem g137c (rs187238) gena za interlevkin 18	46
5 RAZPRAVA	50
5.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI SLADKORNIH BOLNIKOV	50
5.2 GENSKI POLIMORFIZMI IN ATEROSKLEROZA KAROTID	51
5.2.1 Povezava polimorfizma k469e (rs 5498) gena za ICAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid	51
5.2.2 Povezanost polimorfizma g241a (rs 1799969) gena za ICAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid	53

5.2.3 Povezanost polimorfizma +373C/G (rs668) gena za PECAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid	54
5.2.4 Povezanost polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10 in označevalcev ateroskleroze karotid.....	55
5.2.5 Povezanost polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 p40 in označevalcev ateroskleroze karotid.....	57
5.2.6 Povezanost polimorfizma C607A (rs1946518) gena za interlevkin 18 in označevalcev ateroskleroze karotid.....	58
5.2.7 Povezanost polimorfizma G137C (rs187238) gena za interlevkin 18 in označevalcev ateroskleroze karotid.....	59
5.3 POMANJKLJIVOSTI RAZISKAVE	60
6 ZAKLJUČKI.....	62
7 LITERATURA IN VIRI	63
8 PRILOGE	81
8.1 ČLANKA KOT DEL DOKTORSKE DISERTACIJE	81
8.2 ŽIVLJENJEPIS	96
8.3 ZAHVALA.....	97
8.4 IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA	98

POVZETEK

Ateroskleroza je kronično vnetno dogajanje, za katero je značilno nalaganje leh, sestavljenih iz penastih celic, celic imunskega sistema, celic vaskularnega endotelija, gladkih mišičnih celic, trombocitov, zunajceličnega matriksa in z maščobami bogatega jedra z nekrotičnim materialom in s fibroznim okolnim tkivom. Zapleti ateroskleroze so glavni vzrok obolevnosti in smrti v razvitem svetu. Sladkorna bolezen je pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze. Ključno patološko dogajanje pri aterosklerozi je poškodba endotelija arterijske stene oziroma vnetni odgovor, ki ga poškodba sproži. Poškodba spodbudi endotelijske celice k izločanju vazoaktivnih in adhezijskih molekul, citokinov in rastnih dejavnikov. Ugotovljena je zvišana raven adhezijskih molekul pri bolnikih z napredovalo aterosklerozo in s sladkorno boleznijo. Pomembna v razvoju ateroskleroznih sprememb bi lahko bila vloga genskih označevalcev, vpletenih v vnetni odgovor.

Postavili smo hipotezo, da genski označevalci, ki uravnavajo vnetni odgovor, vplivajo na nastanek ateroskleroznih sprememb in napredovanje ateroskleroze karotidnih arterij pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 (SB tipa 2). Z asociacijsko raziskavo smo ugotavljali povezavo med polimorfizmom K469E (rs 5498) gena za ICAM 1, polimorfizmom G241A (rs 1799969) gena za ICAM 1, polimorfizmom C373G (Leu125Val, rs 668) gena za PECAM 1, polimorfizmom -1082 G/A (rs18000896) gena za interlevkin 10 (IL 10), polimorfizmom -1159 A/C (rs3212227) gena za interlevkin 12 (IL 12), polimorfizmom -607 C/A (rs1946518) gena za IL 18 in polimorfizmom -137 G/C (rs187238) gena za IL 18 ter ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze, napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze in stabilnostjo leh v vratnih arterijah.

V raziskavo smo vključili 795 preiskovancev; 595 je bilo bolnikov s SB tipa 2 in 200 preiskovancev v kontrolni skupini brez SB tipa 2. Preiskovanci so bili slovenskega rodu in niso bili v sorodu. Odvzeli smo jim kri za biokemijske in molekularnogenetske preiskave ter izvedli doplersko preiskavo karotidnih arterij. Preiskovanci so izpolnili vprašalnik z anamnestičnimi podatki.

Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze je pokazala statistično pomembno višje vrednosti v debelini intime in medije (DIM) karotidnih arterij ($p = 0,03$), v seštevku debeline leh ($p = < 0,001$) in v številu segmentov z lehami ($p = 0,01$) v skupini bolnikov s SB tipa 2. Prav tako so bile statistično pomembno višje vrednosti pri kontrolnem pregledu v letnem prirastku DIM karotidnih arterij ($p = 0,02$), Δ števila segmentov z lehami ($p = 0,03$) in Δ seštevka debeline leh ($p = 0,02$) v skupini bolnikov s SB tipa 2.

Ugotovili smo povezavo med genotipom EE K469E (rs5498) polimorfizma za ICAM 1 in višjo vrednostjo seštevka debeline leh ($p = 0,04$), prisotnostjo nestabilnih leh ($p = 0,01$) in večjim letnim prirastkom DIM karotidnih arterij ($p = 0,04$) pri bolnikih s SB tipa 2.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne povezave med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipi polimorfizma G241A (rs1799969) gena za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2.

Statistično pomembna razlika je bila ugotovljena med genotipom GG polimorfizma C373G (rs668) gena za PECAM 1 in prisotnostjo leh v karotidni arteriji ($p = 0,03$). Genotipi

polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 na druge ultrazvočne označevalce ateroskleroze niso vplivali enako kot na napredovanje ateroskleroznih sprememb.

Za genotipa GA in AA polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za IL 10 so bile značilne statistično pomembno stabilnejše lehe glede na genotip GG ($p = 0,03$). Genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 na druge ultrazvočne označevalce ateroskleroze karotidne arterije niso vplivali enako kot na napredovanje ateroskleroze.

V raziskavi nismo ugotovili povezave med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipi polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za IL 12 pri bolnikih s SB tipa 2. Prav tako nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma C607A (rs1946518) in G137C (rs187238) gena za IL 18 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze karotidne arterije.

Na podlagi molekularnogenetskih raziskav lahko trdimo, da je polimorfizem K469E (rs5498) gena za ICAM 1 povezan z ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in napredovanjem ateroskleroze in bi lahko predstavljal genski označevalec ateroskleroze pri sladkornih bolnikih v slovenski populaciji. Genotip GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 je povezan s prisotnostjo leh v karotidni arteriji. Za genotipa GA in AA so bile značilne statistično pomembno stabilnejše lehe glede na genotip GG polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za IL 10.

Ključne besede: sladkorna bolezen, progresija ateroskleroze, ultrazvočni označevalci ateroskleroze, polimorfizem, ICAM 1, PECAM 1, interlevkin 10, interlevkin 12, interlevkin 18

ABSTRACT

GENE POLYMORPHISMS OF ADHESION MOLECULES AND PROINFLAMMATORY GENES AND PROGRESSION OF ATHEROSCLEROSIS OF CAROTID ARTERIES IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process that is characterized by the formation of atherosclerotic plaque consisting of foam cells, immune cells, vascular endothelium cells, smooth muscle cells, platelets, the extracellular matrix with a lipid-rich core with necrosis and fibrosis of surrounding tissues. Complications resulting from atherosclerosis are the leading cause of morbidity and mortality in the developed world. Diabetes mellitus is one of the major risk factors for the development of atherosclerosis. The key pathological events in atherosclerosis are endothelial dysfunction and the inflammatory response to endothelial injury.

Endothelial dysfunctions induce the secretion of vasoactive and adhesion molecules, cytokines and growth factors. Elevated levels of adhesion molecules in patients with advanced atherosclerosis and diabetes mellitus were established. Genetic markers, which are involved in the inflammatory response, could have an important role in the development of atherosclerosis.

Our hypothesis was that genetic markers influence the inflammatory response through the stimulation of atherosclerotic changes and the progression of atherosclerosis in the carotid arteries of patients with diabetes mellitus type 2. With an associative study we investigated the association between polymorphism K469E (rs 5498) gene for ICAM-1, polymorphism G241A (rs1799969) gene for ICAM-1, polymorphism C373G (Leu125Val, RS 668) gene for PECAM-1, polymorphism -1082 G / A (rs18000896) gene for interleukin-10 (IL-10), polymorphism -1159 A / C (rs3212227) gene for interleukin-12 (IL-12), polymorphism -607 C / A (rs1946518) gene for IL-18 and polymorphism -137 G / C (rs187238) gene for IL-18 and ultrasonographic markers of atherosclerosis, ultrasound markers of the progression of atherosclerosis and plaque stability in the carotid arteries.

In this cross-sectional study, 795 subjects were enrolled, 595 patients with diabetes type 2 and 200 subjects in the control group without diabetes type 2. The subjects were of Slovenian origin and were not related. Blood samples were taken for biochemical and genetic tests and a Colour Doppler examination of the carotid arteries was made. The subjects completed a questionnaire including data on medical history.

Our study showed statistically significant higher levels intima media thickness (IMT) of the carotid artery ($p = 0.03$), the sum of plaque thickness ($p = < 0.001$) and number of plaques segment ($p = 0.01$) in the group of patients with diabetes type 2. The study also demonstrated significantly higher values in the increment of IMT carotid artery ($p = 0.02$), Δ number of

segments with plaques ($p = 0.03$) and Δ sum of plaque thickness ($p = 0.02$) in patients with diabetes type 2.

We have established an association between genotype EE K469E (rs5498) polymorphism of ICAM-1 and the higher value of the sum plaque thickness ($p = 0.04$), the presence of unstable plaques ($p = 0.01$) and the maximum annual increment of carotid artery IMT ($p = 0.04$) in patients with diabetes type 2.

The results of our study have not shown a statistically significant correlation between ultrasonographic markers of atherosclerosis and genotypes of G241A polymorphism (rs1799969) gene for ICAM-1 in patients with diabetes type 2.

A statistically significant difference was found in the genotype GG C373G (rs668) polymorphism gene for PECAM-1 in the presence of plaques at the carotid artery ($p = 0.03$). The genotypes of polymorphism of rs668 gene for PECAM-1 have not had the same influence on other ultrasound markers of atherosclerosis than they have had on the progression of atherosclerotic changes.

Subjects with genotype GA and AA had the statistically significant more stable plaques with respect to the plaque genotype GG G1082A (rs1800896) polymorphism gene for IL-10 ($p = 0.03$). The genotypes of polymorphism of rs1800896 gene for IL 10 have not had the same influence on other ultrasound markers of the carotid artery than they have had on the progression of atherosclerotic changes.

Our study has not found a link between the ultrasound markers of atherosclerosis and genotypes C1159A (rs3212227) polymorphism gene for IL-12 in patients with diabetes type 2. A correlation between genotypes C607A polymorphism (rs1946518) and G137C (rs187238) gene for IL-18 and ultrasonographic markers of atherosclerosis in the carotid artery was also not found.

According to the result of our molecular genetic study we conclude that the K469E (rs5498) polymorphism gene for ICAM-1 is associated with the ultrasonic markers of atherosclerosis and the progression of atherosclerosis and could represent a genetic marker of atherosclerosis in diabetic patients in the Slovenian population. Genotype GG rs668 polymorphism gene for PECAM-1 is associated with the presence of plaque in the carotid artery. Genotypes GA and AA are associated with more stable plaques with respect to the plaques genotype GG G1082A (rs1800896) polymorphism gene for IL-10.

Key words: diabetes mellitus, atherosclerosis progression, ultrasound markers of atherosclerosis, polymorphism, ICAM-1, PECAM-1, interleukin-10, interleukin-12, interleukin-18

UDK: 616.13-004.6-002.17:577.27+616.379-008.64:575.22.088.7(043.3

KAZALO TABEL

Tabela 1: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev ob vključitvi v raziskavo	30
Tabela 2: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev ob kontrolnem pregledu.....	31
Tabela 3: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 in zdravimi preiskovanci v kontrolni skupini ob vključitvi v raziskavo	32
Tabela 4: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij	32
Tabela 5: Razporeditev genotipov polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini	33
Tabela 6: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma K469E (rs5498) gena za ICAM 1 ob vključitvi v raziskavo.....	33
Tabela 7: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1	34
Tabela 8: Povezanost genotipov polimorfizma K469E (rs5498) gena za ICAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo.....	34
Tabela 9: Povezanost genotipov polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2.....	35
Tabela 10: Razporeditev genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini	35
Tabela 11: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 ob vključitvi v raziskavo.....	36
Tabela 12: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1.....	36
Tabela 13: Povezanost genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo.....	36
Tabela 14: Povezanost genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2.....	37
Tabela 15: Razporeditev genotipov polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini	37
Tabela 16: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 ob vključitvi v raziskavo.....	38
Tabela 17: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1	38
Tabela 18: Povezanost genotipov polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo.....	38
Tabela 19: Povezanost genotipov polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2.....	39

Tabela 20: Razporeditev genotipov polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za IL 10 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini	39
Tabela 21: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 ob vključitvi v raziskavo	40
Tabela 22: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs1800896 gena za IL 10.....	40
Tabela 23: Povezanost genotipov polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo	41
Tabela 24: Povezanost genotipov polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2	41
Tabela 25: Razporeditev genotipov polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za IL 12 p40 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini	42
Tabela 26: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 ob vključitvi v raziskavo.....	42
Tabela 27: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40.....	43
Tabela 28: Povezanost genotipov polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo	43
Tabela 29: Povezanost genotipov polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2.....	44
Tabela 30: Razporeditev genotipov polimorfizma C607A (rs1946518) gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in v kontrolni skupini.....	44
Tabela 31: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 ob vključitvi v raziskavo	45
Tabela 32: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18.....	45
Tabela 33: Povezanost genotipov polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo	46
Tabela 34: Povezanost genotipov polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2	46
Tabela 35: Razporeditev genotipov polimorfizma G137C (rs187238) gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in v kontrolni skupini.....	47
Tabela 36: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs187238 gena za IL 18 ob vključitvi v raziskavo	47
Tabela 37: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs187238 gena za IL 18.....	48
Tabela 38: Povezanost genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo	48
Tabela 39: Povezanost genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Vloga dejavnikov tveganja in genske predispozicije v endotelijski disfunkciji in procesih, ki vodijo v razvoj ateroskleroze in srčno-žilnih dogodkov (po Widlanski in sod., 2003).....	15
Slika 2: Prikaz prihoda levkocitov na mesto vnetnega odziva in prehod skozi endotelij ter delovanje mediatorjev vnetja na posamezne faze prehoda levkocitov skozi endotelij (po Fotis in sod., 2012).....	18
Slika 3: Delovanje citokinov na razvoj ateroskleroze (po Ait-Oufella in sod., 2011)	21

SEZNAM KRAJŠAV

apoE – apolipoprotein E

bFGF – bazični fibroblastni rastni dejavnik

CRP – C-reaktivni protein

DIM – debelina intime in medije

DNA – deoksiribonukleinska kislina

EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina

eNOS – endotelijska sintaza dušikovega oksida

GWAS – genomske široke asociacijske študije

HbA1c – glikirani hemoglobin

HDL – lipoprotein visoke gostote

ICAM 1 – medcelična adhezijska molekula 1

ICV – cerebrovaskularni inzult

IFN – interferoni

IFN γ – interferon gama

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

ITM – indeks telesne mase

kb – kilobaza

kDa – kilodalton

LFA 1 – limfocitni funkcijski antigen 1

LDL – lipoproteini nizke gostote

Mac 1 – antigen za makrofag 1

MI – miokardni infarkt

NF κ B – jedrni faktor kappa B

oxLDL – oksidirani lipoproteini nizke gostote

PAI 1 – plazminogeni aktivator inhibitorja 1

PAOB – periferno arterijsko okluzivno obolenje

PECAM 1 – trombocitna endotelijska adhezijska molekula 1

SB – sladkorna bolezen

SI – serumski

SNP – enojni nukleotidni polimorfizem

SŽO – srčno-žilno obolenje

TIMMP 1 – tkivni inhibitor metaloproteinaze 1

TNF – dejavnik tumorske nekroze

TNF α – dejavnik tumorske nekroze α

VCAM 1 – žilna celična adhezijska molekula 1

1 UVOD

Ateroskleroza je multifaktorska bolezen, ki se začne v otroštvu in nas spremlja do konca življenja. Klinične manifestacije ateroskleroze so srčni infarkt, možganska kap, periferno žilno obolenje in nenadna srčna smrt.

Rezultat načina življenja v tako imenovanem industrializiranem ali razvitem svetu je porast srčno-žilnih obolenj (SŽO) in sladkorne bolezni (SB). SB je pomemben dejavnik tveganja za razvoj SŽO (1). SŽO predstavljajo zelo širok pojem, ki zajema veliko število obolenj. Niso vsa SŽO neposredna posledica ateroskleroze, ampak so številna povezana s procesi ateroskleroze. Dejavnike tveganja za razvoj ateroskleroze lahko razdelimo na okoljske in genske. Delež okoljskih dejavnikov tveganja v skupni obremenitvi za razvoj ateroskleroze je približno 50-odstoten, delež genskih dejavnikov tveganja pa od 20- do 60- odstoten (2,3). V realnosti noben okoljski dejavnik tveganja ni neodvisen od vpliva genskih dejavnikov tveganja. Stephens in Humphries sta na primer ugotavljala vpliv kajenja na razvoj ateroskleroze glede na genske dejavnike (4). Dober primer je tudi LDL-holesterol, ki je odvisen od načina prehranjevanja, vendar pa na njegovo raven vplivajo tudi genski dejavniki (5). Klasični dejavniki tveganja so kajenje, sladkorna bolezen, zvišan krvni pritisk, debelost, zvišana vrednost LDL-holesterola, zmanjšana telesna dejavnost, moški spol in inzulinska rezistenca. Tako imenovani novi dejavniki tveganja pa so homocistein, fibrinogen, CRP, vnetni označevalci in drugi (slika 1).



1: Vloga dejavnikov tveganja in genske predispozicije v endotelijski disfunkciji in procesih, ki vodijo v razvoj ateroskleroze in srčno-žilnih dogodkov (6).

Številni procesi, povezani s SB, kot so endotelijska disfunkcija, hiperkoagulabilnost, vnetna reakcija in spremembe trombocitov, vplivajo na hitrejši razvoj ateroskleroznih sprememb in posledični hitrejši razvoj SŽO. V študiji *United Kingdom Prospective Diabete Study* (UKPDS) je bila ugotovljena linearna povezava med ravno HbA1c in SŽO (7). V Sloveniji je tako kot v drugih evropskih državah 40 odstotkov primerov smrti posledica SŽO (8). Pri bolnikih s SB in SŽO se pojavlja približno 15 let prej kot v preostali populaciji, prav tako je srčni infarkt štirikrat pogostejši in povezan z večjo umrljivostjo (9). Vse manifestacije SŽO, kot so koronarna bolezen, možganski inzult in periferna žilna bolezen, so pogostejše pri bolnikih s SB kot pri preostali populaciji (10). Framinghamska študija, v katero je bilo vključenih več kot 5000 bolnikov, ki so bili spremljani 18 let, je pokazala, da je bilo pri sladkornih bolnikih več srčno-žilnih dogodkov (11).

Ateroskleroza in z njo povezana SŽO so multifaktorsko gensko pogojeni, pri razvoju pa je pomembna vloga vnetja (12). Prav tako je s pojavom SB povezana višja raven vnetnih označevalcev, kot so fibrinogen, C-reaktivni protein (CRP), interlevkin 6 (IL 6), plazminogeni aktivator inhibitorja 1 (PAI 1) in levkociti (13,14,15). Vnetni odgovor na različne dejavnike tveganja ni enak, intenziteta vnetnega odgovora pa je gensko pogojena. Vloga genskih označevalcev, vpletenih v vnetni odgovor, bi lahko bila pomembna pri hitrejšem razvoju ateroskleroznih sprememb pri bolnikih s SB. Iz tega dejstva izhaja, da je vloga vnetja pri razvoju obeh boleznih pomembna. Glede na omenjeno lahko sklepamo, da so pri nastanku obeh boleznih značilni skupni patofiziološki procesi ter tudi isti dedni in okoljski dejavniki tveganja.

Klinik pri zdravljenju komplikacij SŽO spremlja pri bolniku le klasične dejavnike tveganja in poskuša vplivati nanje, dedni dejavniki tveganja pa niso znani. Številne študije so ugotovljale povezavo med različnimi SNP in aterosklerozo. Rezultati študij so si pogosto nasprotujoči, kajti številne spremembe v genomu medsebojno korelirajo in vplivajo na različna obolenja. S številom zajetih preiskovancev bi se napaka pri interpretaciji lahko zmanjšala, zato se v ta namen priporočajo sistematske metaanalize (16).

Kljub napredku v razumevanju razvoja ateroskleroze in aterotromboznih dogodkov v žilni steni ne moremo z gotovostjo napovedati srčno-žilnih zapletov pri posameznem bolniku. Razumevanje in prepoznavanje vpliva genskih dejavnikov, ki vplivajo na razvoj SŽO in SB, bi omogočili natančno oceno tveganja za zaplete SŽO.

1.1 ATEROSKLEROZA IN VNETJE

Ateroskleroza je kronično vnetno dogajanje z značilnim formiranjem lehe, ki je sestavljena iz penastih celic, celic imunskega sistema, vaskularnih endotelijskih celic, gladkih mišičnih celic, trombocitov, zunajceličnega matriksa ter z maščobami bogatega jedra z nekrotičnim materialom in s fibroznim okolnim tkivom (12).

Vnetje je homeostatski mehanizem, vključen v proces zaščite celice pred poškodbo. Namen vnetnega odgovora je odpraviti vzrok in posledice poškodbe ter omogočiti, da normalno zdravo tkivo nadomesti poškodovano.

Med žilno steno in krvjo so endotelijske celice, ki ne predstavljajo samo membrane med krvjo in žilno steno, ampak omogočajo prenos signalov med celicami. Endotelijske celice izločajo številne bioaktivne snovi, uravnavajo vnetni odgovor, hemostazo, prepustnost žilne stene, tonus žilne stene in angiogenezo (17). V funkciji endotelijskih celic je pomembna vloga dušikovega oksida, ki preprečuje številne mehanizme, povezane z aterogenezo. Klasični dejavniki tveganja povzročajo nagnjenje k endotelijski disfunkciji (18). Ta je povezana z zmanjšanjem izločanja vazodilatacijskih snovi, predvsem dušikovega oksida, in s povečanjem izločanja snovi, ki povzročajo vazokonstrikcijo (19). Pri endotelijski disfunkciji se poveča izločanje adhezijskih molekul, reaktivnih kisikovih delcev, kemokinov in citokinov.

Ključno patološko dogajanje pri aterosklerozi je poškodba endotelija arterijske stene oziroma vnetni odgovor, ki ga poškodba sproži. Možni povzročitelji poškodbe endotelija so sladkorna bolezen, hiperholesterolemija, arterijska hipertenzija, prosti radikali, povezani s kajenjem, genski dejavniki, okužbe oziroma prepletanje omenjenih in drugih dejavnikov tveganja (12).

Poškodba spodbudi endotelijske celice k izločanju vazoaktivnih in adhezijskih molekul, citokinov in rastnih dejavnikov. Monociti in limfociti se pritrjujejo na endotelijsko steno in vstopajo v intimo. Skozi poškodovan endotelij vstopajo delci LDL in se kopičijo v intimi, kjer so podvrženi procesu oksidacije. Oksidirani lipidi spodbudijo izražanje adhezijskih molekul in aktivacijo makrofagov, ki fagocitirajo spremenjene delce LDL in se preoblikujejo v penaste celice. Oksidirani LDL je toksičen za endotelijske celice, pospešuje proliferacijo gladkih mišičnih celic ter spodbuja izražanje tkivnega faktorja in PAI 1 (20). Makrofagi in limfociti T izločajo vnetne citokine, predvsem interleukin (IL) 1 in dejavnik tumorske nekroze α (TNF α) ter vrsto rastnih dejavnikov, kot je na primer bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic fibroblast growth factor – bFGF), ki pospešujejo migracijo in razmnoževanje gladkih mišičnih celic. Posledici sta zadebelitev in preoblikovanje arterijske stene tako, da ostane svetlina žile vsaj na začetku nespremenjena (21).

Aktivirane vnetne celice izločajo hidrolitične encime, vnetne citokine, kemokine in rastne dejavnike, ki povzročijo nadaljnjo poškodbo z nastankom žariščne nekroze. Gladke mišične celice tvorijo in izločajo molekule zunajceličnega matriksa – kolagen, elastin in proteoglikane, ki sestavljajo fibrozno tkivo. Sredico iz maščobne in nekrotične vsebine prekrije in zaščiti vezivni pokrov. Nastane napredovala oziroma zapletena lezija, ki običajno zožuje svetlino žile in zmanjšuje pretok krvi skozi (12).

Do zapleta v smislu miokardnega infarkta (MI) ali cerebrovaskularnega inzulta (CVI) prihaja zaradi razpoke aterosklerozne lehe in nastanka trombusa oziroma embolusa. Pri destabilizaciji aterosklerozne lehe ima pomembno vlogo vnetje (22). Na mestu razpoke aterosklerozne lehe je prisotno vnetje z aktiviranimi monociti, makrofagi in limfociti T (23). Omenjene celice vplivajo na stabilnost aterosklerozne lehe. Makrofagi izločajo proteolitične encime, ki razgrajujejo kolagen (24). T-limfociti izločajo interferon γ , ki zavira nastajanje novih gladkih mišičnih celic in kolagena (25). Makrofagi izločajo tkivni dejavnik, ki sproža koagulacijo in nastanek tromba (24). Zaradi omenjenih procesov prihaja do tanjšanja pokrova aterosklerozne lehe in njene destabilizacije. Značilnosti nestabilne aterosklerozne lehe sta velika maščobna sredica in tanek vezivni pokrov.

1.2 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen (SB) je kronična presnovna bolezen, za katero je značilna povečana vrednost glukoze v krvi (hiperglikemija). SB je posledica pomanjkljivega izločanja inzulina, njegovega neučinkovitega delovanja ali obojega, posledica omenjenega je motena presnova ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin (26). SB delimo na dva osnovna tipa, to sta tip 1 in tip 2. Za SB tipa 1 je značilno hudo ali popolno pomanjkanje inzulina zaradi imunsko povzročene propadanja celic beta v trebušni slinavki. Pri sladkorni bolezni tipa 2 je hiperglikemija posledica prepletanja dedne nagnjenosti, nezdrave prehrane, telesne nedejavnosti in povečane telesne teže s centralno razporeditvijo maščevja (27). Število obolelih s SB po svetu je leta 2013 doseglo 371 milijonov, po predvidevanjih pa se bo do leta 2030 povečalo na 550 milijonov (28). Podatki so utemeljeni s porastom števila debelih ljudi in sodobnim načinom življenja. Med sladkornimi bolniki je 80 odstotkov debelih (29). Poleg vedenjskih dejavnikov tveganja je za nastanek SB pomembna tudi vloga dednosti. V družinah s SB je tveganje, da bo potomec zbolel za SB, 40 odstotkov večje kot pri populaciji brez SB (30).

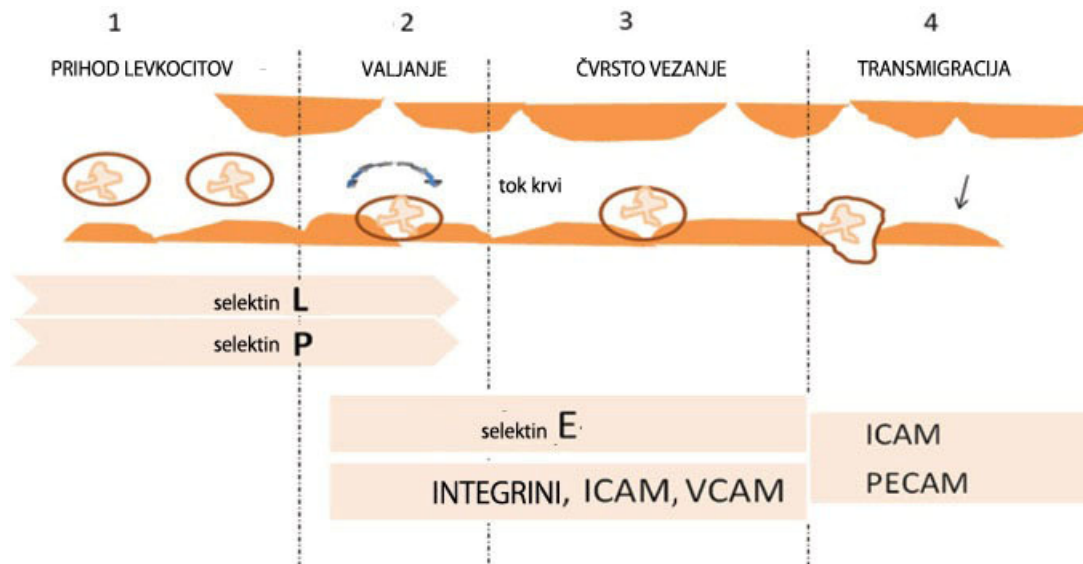
Srčno-žilne bolezni so glavni vzrok smrti pri bolnikih s SB; 75 odstotkov sladkornih bolnikov umre zaradi ishemične srčne bolezni (1). SB tipa 2 pospeši bolezenski potek ishemične srčne bolezni, kar se kaže v prizadetosti večjega števila koronarnih arterij, v obsežnejših ateroskleroznih spremembah in v približno 15 let zgodnejšem pojavu srčno-žilnih zapletov (31). Ateroskleroza se lahko pojavi tudi pred pojavom SB tipa 2, na podlagi česar lahko sklepamo, da so za obe bolezni značilni isti okoljski in dedni dejavniki tveganja (32). Ko primerjamo dejavnika tveganja skupni holesterol in zvišan krvni pritisk med bolniki s SB tipa 2 in zdravo populacijo, ugotovimo, da so bolniki s SB tipa 2 od tri- do štirikrat bolj izpostavljeni večjemu tveganju za nastanek SŽO kot zdrava populacija (33). Prav tako tudi delovanje na dejavnike tveganja za nastanek SŽO ne vpliva tako pozitivno pri bolnikih s SB tipa 2 kot pri zdravi populaciji (34).

Mehanizmi vpliva SB na hitrejši razvoj ateroskleroze niso povsem razjasnjeni. Ugotovljeno je, da infuzija glukoze zdravim preiskovancem povzroča dvig ravni označevalca oksidativnega stresa nitrotirozina in endotelijsko disfunkcijo (35). Hiperglikemija pospeši oksidativni odziv v žilni steni (36). Hiperglikemija zavre tvorbo dušikovega oksida iz endotelijske sintaze dušikovega oksida (eNOS) in poveča njegovo razgradnjo na podlagi nastajanja reaktivne kisikove vrste (37). Poleg tega povzroči porast ravni vnetnih citokinov (IL 6, IL 18 in TNF α) v serumu, ki jih povezujejo z destabilizacijo ateroskleroznih lehi in s prihodnjimi srčno-žilnimi dogodki (38). Vnetni odziv povezuje obe bolezni, SB in ateroskleroza, številni dejavniki tveganja za SŽO in SB tipa 2 pa povzročajo aktivacijo vnetnega odgovora (22). Hiperglikemija v nadaljevanju vnetnega odziva spodbuja proces ateroskleroze z vazokonstrikcijo in nastankom krvnih strdkov (10).

1.3 ADHEZIJSKE MOLEKULE

Prva študija, ki je potrdila vlogo celic imunskega sistema v razvoju ateroskleroze, je dokazala kopičenje T-celic in makrofagov v humani aterosklerozni lehi (39). Ker so T- in B-celice prisotne tako v normalni kot v aterosklerozni steni krvne žile, se je predpostavljalo, da limfociti za migracijo potrebujejo adhezijske molekule. Omenjene celične adhezijske molekule nastajajo na endotelijskih celicah, hematopoetskih celicah in celicah imunskega sistema (40). V to skupino spadajo medcelične adhezijske molekule (angl. intercellular adhesion molecules – ICAM 1, ICAM 2), žilne celične adhezijske molekule (angl. vascular

cell adhesion molecule-1 – VCAM-1), trombocitne endotelijske adhezijske molekule (angl. platelet endothelial cell adhesion molecule-1 – PECAM-1). Potovanje limfocitov in levkocitov na mesto vnetnega dogodka je natančno reguliran proces. Korakov na poti levkocitov v žilno steno je več (slika 1): (1) od selektina odvisno gibanje levkocitov, (2) začetek adhezije na podlagi kemokinov in njihovih receptorjev, (3) od integrina odvisna adhezija in krepitev adhezije z integrinom ter (4) prehod skozi endotelij (41).



Slika 2: Prikaz prihoda levkocitov na mesto vnetnega odziva in prehod skozi endotelij ter delovanje mediatorjev vnetja na posamezne faze prehoda levkocitov skozi endotelij (po Fotis in sod., 2012)(42)

Raven adhezijskih molekul je zvišana v serumu pri ljudeh z razvito aterosklerozo (43,44,45). Prav tako je zvišana raven adhezijskih molekul pri pacientih s SB (46). Na podlagi tega sklepamo, da pri razvoju obeh bolezni potekajo isti patofiziološki procesi.

1.3.1 ICAM 1

ICAM 1 je transmembranski glikoproteinski receptor, sestavljen iz 505 aminokislin. Njegova molekularna teža je med 80 in 114 kDa, odvisno od stopnje glikozilacije (47). ICAM 1 je iz superdružine imunoglobulinov. Deluje kot ligand β 2-integrina na levkocitih. Sestavljen je iz petih ekstracelularnih domen, transmembranske domene in kratke citoplazemske domene (48). Integrini sodelujejo v stikih celica-celica, celica-ekstracelularni matriks in celica-patogen. Integrina, ki sodelujeta v regulaciji prenosa levkocitov na mesto vnetnega odgovora, sta β 2 in α 4. Podskupina β 2 je LFA 1, ki sodeluje v izgradnji ICAM 1 in ICAM 2. ICAM 1 sodeluje v prenosu levkocitov na mesto vnetja. Glavna funkcija ICAM 1 je zagotoviti trdno adhezijo levkocitov na endotelij, kar je ključno za transendotelijsko migracijo levkocitov. Zaradi tega je ICAM 1 vključen v različne vnetne procese. ICAM 1 tvorijo endotelijske celice in levkociti, izločanje pa spodbujajo stimulatorji vnetja, kot so TNF α , IL 1 in interferon γ (IFN γ) (49,50).

Cirkulirajoča ICAM 1 je sestavljena iz samo petih ekstracelularnih Ig-domen; označujemo jo kot sl ICAM 1. Sl ICAM 1 manjkata transmembranski del in citoplazemski rep. Sl ICAM 1 je ugotovljena v serumu (51), urinu (52), bronhoalveolarni tekočini (53) in cerebrospinalni tekočini (54). Normalna koncentracija v serumu človeka je od 100 do 450 ng/ml (40). Zvišana

raven sl ICAM 1 je dokazana pri SŽO, tumorjih, avtoimunskih in drugih boleznih z vnetnim odzivom (44,55,56). Zvišana raven sl ICAM 1 je ugotovljena pri bolnikih s SB tipa 2 (57). Vloga ICAM 1 v razvoju ateroskleroze je bila dokazana na miših z apoE –/– in deficitom ICAM 1, pri katerih je prišlo do zmanjšanja ateroskleroznih sprememb (58).

Vse študije niso potrdile povezave med SŽO in zvišano ravno sl ICAM 1. Med primerjavo vpliva povišane ravni sl ICAM 1 in prihodnjega sekundarnega kardiovaskularnega dogodka pri bolnikih s koronarnim obolenjem ni bila ugotovljena povezava (59).

Ateroskleroza je žariščno vnetno obolenje arterijske stene in zajema določene dele arterij, kot so mesta bifurkacij in mesta deformacij (upogibanje in torzija). Za ta področja je značilen nepravilen oscilatorni tok krvi, kar povzroča povečano izraženost provnetnih adhezijskih molekul ICAM 1 in VACAM 1 (60). LDL in oxLDL povečata izraženost ICAM 1 in pospešujeta adhezijo monocitov na poškodovani (aktivirani) endotelij (61).

Gen za ICAM 1 leži na kromosomu 19p13. Sestavljen je iz 15.775 baznih parov, ima sedem eksonov in šest intronov, ki so v relativno veliki netranslacijski regiji (62). Translacijska startna regija je locirana na eksonu 1 (prav tam). Ima dva pogosta polimorfizma, ki vplivata na izraženost ICAM 1. Locirana sta na četrtem in šestem eksonu. Pri prvi modifikaciji na eksonu 4 je aminokislina glicin zamenjana z argininom na kodonu 241, na tretji Ig-domeni (G241A, rs 1799969) (63). Ta domena je pomembna pri izgradnji levkocitnega integrina MAC 1 (64). Na šestem eksonu na kodonu 469 je glutaminska kislina zamenjana z lizinom (K469E, rs 5498). K469E je na Ig-domeni 5. Omenjena sprememba vpliva na reakcijo ICAM 1 in njegovega receptorja (65).

Prisotnost polimorfizma K469E je povezana z ravno sl ICAM 1 v serumu (66). Povečana prisotnost alela E polimorfizma K469E gena za ICAM 1 je bila ugotovljena pri bolnikih s SŽO v primerjavi z zdravo populacijo (67). Ugotovljena je bila povezanost med polimorfizmom ICAM 1 in ishemičnim možganskim infarktom v primerjavi z genotipom KK K469E polimorfizma gena za ICAM 1 v preostali populaciji, še posebej pri ženskem spolu (68). Prisotnost alela E469 pri transplantaciji srca ščiti pred vaskulopatijo, povzročeno s transplantacijo. Nosilci alela K pa infarkt doživijo pogosteje (69). Vse raziskave niso potrdile povezave med polimorfizmi gena za ICAM 1 in pojavom SŽO. Povezava genotipov EE in KK polimorfizma K469E gena za ICAM 1 in srčnega infarkta pri bolnikih s SB tipa 2 v slovenski populaciji ni bila ugotovljena (70).

1.3.2 PECAM 1

PECAM 1, znan tudi kot CD 31, so 130 kDa veliki imunoglobulini. To so transmembranski glikoproteini iz šestih ekstracelularnih domen, podobnih imunoglobulinom, s transmembranskim delom in citoplazemskim repom. PECAM 1 se kodira na podlagi gena 75 kb, ki je na dolgi roki kromosoma 17 (47).

Izraženost PECAM 1 je na endotelijskih celicah, na površini hematopoetskih celic in na površini nevtrofilcev, monocitov, limfocitov, tkivnih bazofilcev in trombocitov (71). V povezavi z drugimi adhezijskimi molekulami so za PECAM 1 značilne pomembne signalne lastnosti. Zelo hitro se odziva na spremembe laminarnega toka, ki je stimulus za

fosforilizacijo znotrajcelične domene PECAM 1 in posledično aktivacijo PECAM 1 v izpostavljeni regiji žilne stene (72). PECAM 1 je mehanosenzitivna molekula in sodeluje pri odgovoru na povečanje strižnih sil v žilni steni (73). PECAM 1 je multifunkcionalna molekula, vključena v angiogenezo (74), regulacijo integrina (75), aktivacijo T- in B-celic (76), transmembransko migracijo monocitov in ekstravazacijo levkocitov med vnetnim dogajanjem (77). Pomembna je njena vloga pri formiranju lehe in nastanku trombusa (78).

Pomembnost vloge PECAM 1 v vnetnem odgovoru je bila ugotovljena pri miših brez PECAM 1, kjer je prišlo do zmanjšanja aktivacije vnetnih genov (ICAM 1) v odgovoru na nelaminarni tok krvi (73).

Opisanih je enajst polimorfizmov gena za PECAM 1, od teh pa trije vplivajo na zamenjavo aminokislin v molekuli PECAM 1. Najbolj raziskana je mutacija na eksonu 3, poziciji +373, ki zajema zamenjavo citozina z gvaninom, kar povzroča zamenjavo aminokislina levcin z valinom na poziciji 125 (rs 668) (79). Aktivacija PECAM 1 se odvija med hemofilnim vezanjem na ekstracelularno imunoglobulinu podobno domeno. Opisani polimorfizem je povezan z zmožnostjo navedenega vezanja, kar je povezano z dovzetnostjo za razvoj ateroskleroze (80).

Študije so pokazale povezavo med polimorfizmi PECAM 1 in kardiovaskularnimi obolenji pri različnih etničnih skupinah, npr. Nemcih (81), Japoncih (82), Indijcih (83) in Slovencih (84). Omenjene raziskave so dokazale povezanost polimorfizma C373G (Leu125Val) s kardiovaskularnimi obolenji. Povezanost omenjenega polimorfizma z ishemičnim možganskim infarktom so za kitajsko populacijo ugotovili Wei in sodelavci (85).

1.4 VNETNI CITOKINI

Citokini so polipeptidne molekule nižje molekularne teže z vlogo komunikacije med celicami imunskega odgovora. Njihovo delovanje je na mestu ali v bližini izražanja. Do izražanja prihaja po aktivaciji celice in posledičnem izražanju genov. Citokini običajno delujejo na več različnih tipov celic, tako da lahko sprožajo različne biološke procese, prav tako lahko več različnih citokinov sodeluje v istih bioloških procesih (86). Citokini so velika in različna skupina molekul; razlikujemo interlevkine, identificiranih je 37, dejavnik tumorske nekroze (TNF), interferone (INF), stimulirajući dejavnik za kolonije (CSF), transformirajoči rastni dejavnik (TGF) in kemokine (87). Vključeni so v številne fiziološke procese, posebna pa je njihova vloga v regulaciji vnetnega in imunološkega odgovora. Za vse celice, vključene v razvoj ateroskleroze, je značilna možnost produkcije ali odgovora na citokine. V aterosklerozni lehi je obilje citokinov. Ti v prvi fazi ateroskleroze spreminjajo endotelijsko funkcijo (slika 3). Endotelijske celice izgubljajo zaščitno funkcijo in nastajajo pogoji za prehod levkocitov skozi endotelij (88). Citokini tudi sprožajo izražanje kemokinov in adhezijskih molekul, ki omogočajo migracijo limfocitov in monocitov ter lepljenje na žilno steno (89). V intimi in mediji so levkociti aktivirani z lokalno izraženimi citokini, ki pospešujejo transformacijo makrofagov v penaste celice (90). V napredovalem stadiju ateroskleroze pro-vnetni citokini destabilizirajo aterosklerozno leho, ki spodbuja apoptozo celic in degradacijo matriksa. Posledica odmiranja makrofagov je rast jedra aterosklerozne lehe. Odmiranje gladkih mišičnih celic vodi v tanjšanje fibroznega pokrova, kar omogoča razpoko lehe (91,92). Na koncu citokini delujejo tako, da inhibirajo protitrombotične lastnosti endotelijskih celic (93).



Slika 3: Delovanje citokinov na razvoj ateroskleroze (po Ait-Oufella in sod., 2011)(87).

V nadaljevanju so natančneje opisani interlevkini 10, 12 in 18, katerih polimorfizmi so povezani z razvojem ateroskleroze.

1.4.1 Interlevkin 10

IL 10 je eden od ključnih citokinov, ki sodelujejo v žariščnem in sistemskem odgovoru na vnetje, in je med aterogenezo v zaščitni vlogi (94). Sestavljen je iz 178 aminokislin, je neglikozilirani α -vijačni polipeptid, izločajo pa ga predvsem monociti, makrofagi in limfociti T (95). Njegova vloga je v zmanjšanju produkcije monocitnih proinflammatoryh citokinov (96). IL 10 je eden izmed ključnih regulatorjev vnetnega odgovora in med aterogenezo deluje zaščitno (94). Prisoten je v ateroskleroznih lehah, kjer je predvsem v makrofagih (97). IL 10 deluje tudi na stabilizacijo aterosklerozne lehe z zaviranjem izražnosti tkivnega dejavnika in ciklooksigenaze 2 ter z zaviranjem aktivacije NF κ B. Ugotovitve študij in vitro so pokazale, da zavira nastajanje metaloproteinaz in spodbuja nastanek tkivnega inhibitorja metaloproteinaz 1 (TIMP 1) (98).

Med številnimi mehanizmi zaviranja nastanka vnetnih citokinov, po katerih naj bi IL 10 vplival na vnetni odziv v steni krvne žile, je najbolj raziskano delovanje na inhibicijo NF κ B v monocitih in limfocitih T. Do zavore NF κ B prihaja na podlagi dveh mehanizmov, in sicer supresije aktivnosti kinaze zaviralca kappa B (IKK) in inhibicije vezave NF κ B na DNA (99).

V raziskavi na miših brez IL 10 (IL 10^{-/-}), ki so bile na aterogeni dieti, je bilo ugotovljeno večje kopičenje lipidov v ateroskleroznih lehah. Lehe so bile bolj nestabilne, z večjo infiltracijo celic, s povečano izražnostjo INF γ in z zmanjšano količino kolagena v primerjavi z mišmi divjega tipa (100).

Pri bolnikih z nestabilno angino pectoris je bila v primerjavi z bolniki s stabilno angino pectoris ugotovljena znižana raven IL 10 v serumu (101). Pri sladkornih bolnikih z restenozo po perkutani koronarni angioplastiki so bile v primerjavi s sladkornimi bolniki brez restenoze ugotovljene znižane vrednosti IL 10 (102).

Ugotovljena je bila tudi povezanost med SB in ravnjo IL 10. Pri preiskovancih z nizko sposobnostjo tvorbe IL 10 je bila v primerjavi s preiskovanci z višjo sposobnostjo tvorbe IL 10 verjetnost nastanka SB 2,7-krat večja (103).

Gen za IL 10 je na kromosomu 1q31-32, velik je 4,2 kb, vsebuje pet eksonov in štiri introne (104).

Tvorbo IL 10 gensko uravnava polimorfizmi na področju promotorja (105). Na področju promotorja gena za IL 10 je zamenjava nukleotida gvanina z adeninom na mestu -1082 pomembna pri regulaciji tvorbe IL 10. Pri posameznikih, homozigotnih za alel G polimorfizma G1082A, so bile značilne višja raven IL 10 v serumu, večja izraženost mRNA za IL 10 in večja tvorba IL 10 po spodbujanju monocitov in vitro (106). Ugotovljena je bila tudi povezava med polimorfizmi gena za IL 10 in različnimi obolenji, kot so revmatoidni artritis (107), sistemski lupus eritematosus (108), astma (109) in rakasta obolenja (110). Ugotovljena je bila povezava med polimorfizmom G1082A gena za IL 10 s povečano tvorbo IL 10 in z učinkovitejšo regulacijo vnetja ter dolžino življenja v italijanski populaciji (111). Vse raziskave pa niso pokazale pozitivnih učinkov polimorfizma G1082A pri genu za IL 10. Povezava ni bila ugotovljena med srčnim infarktom ter polimorfizmi G1082A, 819CT in -592 C/A gena za IL 10 (112).

1.4.2 Interlevkin 12

IL 12 je citokin, ki pospešuje vnetni odziv, inducira produkcijo interferona gama in pospešuje diferenciacijo celic Th 1 (113). Sestavljen je iz dveh podenot, lahke verige s 35 kDa (p35) in težke verige s 40 kDa (p40), ki sta kovalentno povezani z disulfidno vezjo. Podenoti kodirata ločena gena, podenoto p35 IL12A gen na tretjem kromosomu (3p12-q13.2) in podenoto p40 IL12B gen na petem kromosomu (5q31.1-q33.2) (114).

Ker je vloga IL 12 pri spodbujanju Th 1 celičnega odziva osrednja, se domneva, da je tudi eden izmed ključnih posrednikov aterogenega vnetnega procesa (115). IL 12 spodbuja izločanje pro-vnetnega dejavnika IFN γ s sinergističnim delovanjem z IL 18, kar dodatno vpliva na napredovanje ateroskleroznih sprememb (116).

Vloga IL 12 pri razvoju ateroskleroze je bila ugotovljena pri miših. Injiciranje IL 12 je pospešilo razvoj ateroskleroznih sprememb (117). Prav tako na mišjem modelu je s funkcionalno blokado IL 12 uspelo zmanjšati površino ateroskleroznih leh in stabilizirati aterosklerozne spremembe (118).

Pri bolnikih s srčno-žilnimi obolenji je povečana raven IL 12 v serumu (119). Prav tako je bila ugotovljena povezava med povečano ravnjo IL 12 in nestabilno angino pectoris (120).

Polimorfizmi gena za IL 12A in IL 12B lahko povzročajo dovzetnost za imunsko pogojene bolezni, kot so astma (121), multipla skleroza (122), psoriaza (123) in Takajasujev artritis (124).

Višje vrednosti IL 12 so bile ugotovljene pri bolnikih s SB tipa 1 v primerjavi z zdravo populacijo, višje vrednosti pa so bile povezane tudi z večjim indeksom telesne mase (125).

Raziskave gena za IL 12 niso pokazale polimorfizmov v kodirajočem zaporedju, kar kaže na visoko ohranjenost gena pri ljudeh. Odkriti so bili številni polimorfizmi na nekodirajočih področjih gena za IL 12 p40, med katerimi je raziskan polimorfizem C1159A v regiji 3' UTR. Dokazano je, da so nosilci -1159 genotipa AA izpostavljeni manjšemu tveganju za možgansko kap (126).

1.4.3 Interlevkin 18

IL 18 je znan kor interferon gama ($\text{IFN } \gamma$) spodbujajoči dejavnik. Pripada superdružini interlevkina 1 in je pomemben regulator imunskega odziva (127). Citokin, ki spodbuja vnetni odziv, sodeluje pri kroničnih vnetjih ter avtoimunskih in rakastih obolenjih. IL 18 spodbuja tvorbo številnih drugih posrednikov, vpletenih v aterogenezo, kot so vnetni citokini IL 1, IL 6 in $\text{TNF } \alpha$, kemokini IL 8, kemotaktičen protein za monocite 1 (MCP 1) in zaviralni protein za monocite 1 α (MIP 1 α), ICAM 1, spodbujevalni dejavnik rasti kolonij granulocitov in makrofagov (GM-CSF), inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS) in inducibilna ciklooksigenaza 2 (Cox 2) (128,129). Tvorijo ga v največji meri monociti in makrofagi, lahko pa še keranociti, hondrociti, sinovialni fibroblasti in osteoblasti (130, 131).

IL 18 spodbuja tudi aktivacijo IL 12, ki sodeluje v diferenciaciji T-limfocitov (132). IL 18 in IL 12 sinergistično delujeta v spodbujanju nastanka $\text{IFN } \gamma$, celic ubijalk in podskupin makrofagov (116,133).

Mallat s sodelavci je v ateroskleroznih lezah ugotovil visoko raven IL 18, ki je bila značilno povezana s prisotnostjo kliničnih in patoloških znakov nestabilnosti aterosklerozne lehe (91). Vzrok za te ugotovitve bi lahko bila vloga IL 18 pri spodbujanju izražanja encimov kolagenaz, ki so ključne pri razgradnji kolagena, kar povzroča nestabilnost aterosklerozne lehe (134). Dokazano je, da je pri bolnikih s SB višja raven IL 18 (135), prav tako je dokazano, da imajo sladkorni bolniki z višjo ravno IL 18 debelejšo intimo in medijo ter več ateroskleroznih leh v karotidnih arterijah kot sladkorni bolniki z normalno ravno IL 18 (136).

Gen za IL 18 je na 11. kromosomu q22.2-q22.3, sestavljen pa je iz šestih eksonov in petih intronov (137). Številni polimorfizmi gena za IL 18 so bili odkriti na področju promotorja. Ugotovljena je povezava polimorfizmov IL 18 in SŽO (138) z revmatoidnim artritisom (139), Alzheimerjevo boleznijo (140) in SB tipa I (141).

Zamenjava gvanina s citozinom na mestu -137 spremeni vezavno mesto za jedrni faktor H4TF 1 (angl. histone 4 transcription factor-1), zamenjava citozina z adeninom na mestu -607 pa spremeni vezavno mesto za protein odzivnega elementa za ciklični adenozinmonofosfat. Opisane spremembe lahko spremenijo gensko aktivnost IL 18 (142). Ugotovljena je povezava med nosilci -607A in znižano serumsko vrednostjo IL 18 v primerjavi z nosilci -607C (143). Prav tako je ugotovljeno, da monociti nosilcev alela 137C producirajo nižjo raven IL 18 kot monociti nosilcev alela -137G (144). Vpliv polimorfizmov IL 18 na ishemično možgansko kap so ugotovili Zhang in sodelavci v kitajski populaciji. Ugotovili so, da je pri bolnikih s haplotipom -607C/-137G povečano tveganje za ishemično možgansko kap (145).

1.5 DEBELINA INTIME IN MEDIJE KAROTIDNE ARTERIJE

Porast debeline intime in medije karotidne arterije (DIM) je zgodnji subklinični znak ateroskleroze in daje dobro napovedno vrednost za srčne dogodke (146). Priznan je kot nadomestni označevalec generalizirane ateroskleroze (147). Glede na velike študije, kot so *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), *The Cardiovascular Health Study* (CHS) in *The Rotterdam Study*, je potrjena povezava med DIM in tveganjem srčno-žilnega dogodka (147,148,149).

Že zgodnje spremembe na žilni steni je mogoče ugotoviti z ultrazvočno preiskavo. Ta preiskava z visoko resolucijo je najboljša metoda za odkrivanje zgodnjih stadijev ateroskleroze predvsem zaradi preprostosti, široke dostopnosti, dobre resolucije med tkivi v primerjavi z drugimi radiološkimi tehnikami in zaradi neinvazivnosti. Ultrazvočna slika na longitudinalnem rezu prikaže strukturo med dvema linijama na zgornjem in spodnjem delu preiskovane žile. Ena linija predstavlja mejo med svetlino žile in intimo, druga pa mejo med intimo in adventicijo (150).

Meritve DIM se razen v klinični praksi uporabljajo tudi v številnih raziskavah. Obstajajo omejitve v primerjavi rezultatov raziskav zaradi različnih načinov izvajanja meritev DIM (mišljena sta predvsem mesto in tehnika meritve). Zaradi tega je treba pred izvajanjem raziskave pripraviti natančen protokol izvajanja meritev. Zadebelitev DIM je lahko posledica kompenzatornih mehanizmov s hipertrofijo medije kot posledico hiperplazije gladkih mišičnih celic in fibrocelularne hipertrofije. Teh sprememb ni mogoče razlikovati od sprememb, ki so posledica ateroskleroze. V zdravi populaciji je DIM med 0,25 in 1,5 mm (151), s tem da > 1 mm pomeni zvišano vrednost (152).

Metaanaliza študij o vplivu zniževanja LDL-holesterola na debelino DIM je pokazala, da se z zniževanjem LDL-holesterola za deset odstotkov debelina DIM zmanjša za 0,75 odstotka na leto (153). Pri pacientih z dokazanim SŽO je ugotovljena večja debelina DIM v primerjavi z zdravo populacijo (154).

Leha je fokalna struktura, ki se boči v svetlino krvne žile za najmanj 0,5 mm ali za 50 odstotkov od okolnega DIM. Meritve DIM se izvajajo na mestu brez lehe, na bolj oddaljenem robu. Priporoča se izvajanje na treh mestih, in sicer v skupni karotidni arteriji, v predelu bifurkacije in v notranji karotidni arteriji. V skupni karotidni arteriji se meritve izvajajo 5 mm pred bifurkacijo. Meritve v notranji karotidni arteriji se izvajajo na ravnem delu, in ne v predelu, kjer arterija dela ovinek. Meritev v predelu bifurkacije je zaradi ukrivljenosti žilne stene otežena. Natančna priporočila glede izvajanja meritev so v mannheinskem konsenzu (*Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus*) (150).

2 NAMEN IN HIPOTEZA RAZISKAVE

Namen asociacijske raziskave je bil preveriti naslednje trditve:

1. Polimorfizem K469E (rs 5498) gena za ICAM 1 je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
2. Polimorfizem G241A (rs 1799969) gena za ICAM 1 je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
3. Polimorfizem C373G (Leu125Val, rs 668) gena za PECAM 1 je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
4. Polimorfizem G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10 (IL 10) je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
5. Polimorfizem C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 (IL 12) je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
6. Polimorfizem C607A (rs1946518) gena za interlevkin 18 (IL 18) je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
7. Polimorfizem G137C (rs187238) gena za interlevkin 18 (IL 18) je povezan z DIM, debelino leh in s seštevkom leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.
8. Polimorfizem K469E (rs5498) gena za ICAM 1 je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.
9. Polimorfizem G241A (rs1799969) gena za ICAM 1 je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.
10. Polimorfizem C373G (Leu125Val, rs668) gena za PECAM 1 je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.
11. Polimorfizem G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10 (IL 10) je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.
12. Polimorfizem C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 (IL 12) je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.
13. Polimorfizem C607A (rs1946518) gena za IL 18 je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.

14. Polimorfizem G137C (rs187238) gena za IL 18 je povezan z napredovanjem ateroskleroznega procesa pri bolnikih s SB tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.

Hipotezi sta naslednji:

- Polimorfizmi testiranih genov adhezijskih molekul in vnetnih genov so povezani z DIM, debelino leh in s seštevkom leh (angl. plaque score) v vratnih arterijah ter z bolj nestabilnimi lehami pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2.
- Genska raznolikost testiranih genov adhezijskih molekul in vnetnih genov vpliva na napredovanje ateroskleroznega procesa v triletnem obdobju opazovanja pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, ki ga bomo kvantificirali z DIM, debelino leh in s seštevkom leh.

3 PREISKOVANCI IN METODE RAZISKAVE

Vsi bolniki, ki so sodelovali v raziskavi, so bili seznanjeni s potekom in z namenom raziskave. Strinjanje z odvzemom krvi za genske in biokemijske preiskave ter s sodelovanjem v raziskavi so potrdili s podpisom. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije na redni seji 17. 8. 2010 (številka odločbe 98/08/10).

3.1 PREISKOVANCI

V prospektivno asociacijsko presečno študijo je bilo vključenih 795 preiskovancev. 595 je bilo bolnikov s SB tipa 2 in 200 preiskovancev v kontrolni skupini brez SB tipa 2. Bolniki s SB tipa 2 so bili vodeni v diabetičnih ambulantah v Splošni bolnišnici Murska Sobota, Splošni bolnišnici Slovenj Gradec, v Zdravstvenem domu Gornja Radgona, v Zdravstvenem domu Ljutomer in v Zdravstvenem domu Lendava. Preiskovanci so bili slovenskega rodu in niso bili v sorodu.

Ob vključitvi v raziskavo so vsi preiskovanci podali anamnestične podatke o predhodnih boleznih, kajenju in trajanju SB tipa 2. Odvzeti so bili vzorci krvi za molekularnogenetske in biokemijske preiskave. Odvzeta je bila venska kri iz kubitalne vene v 10-mililitrske epruvete Na-EDTA. Določani so bili glikemija na tešče, HbA1c (%), skupni holesterol, HDL, LDL, trigliceridi in visokoselektivni CRP. Preiskovanci so bili ob odvzemu krvi tešči. Od kliničnih podatkov so bili zbrani podatki o spolu in starosti, obsegu pasu in telesni teži, izračunan je bil indeks telesne mase ter izmerjena sistolični in diastolični krvni pritisk. Vsi omenjeni podatki so bili vpisani v enotni vprašalnik. Istočasno so bile ultrazvočno pregledane vratne arterije.

Vabilu na kontrolni ultrazvočni pregled vratnih arterij se je odzvalo 426 preiskovancev iz skupine bolnikov s SB tipa 2 in 132 preiskovancev iz kontrolne skupine. Med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij je minilo v povprečju $3,8 \pm 0,5$ leta. Bolniki s srčnim infarktom in z ishemično možgansko kapjo so bili iz raziskave izključeni.

3.2 ULTRAZVOČNA PREISKAVA VRATNIH ARTERIJ

Ultrazvočne preiskave so bile izvedene z aparatom Toshiba Aplio SSA-700 (Toshiba Medical System Corp., Tokio, Japonska); uporabljena je bila linearna multifrekventna sonda 7,5–10 MHz. Vse preiskave, ki so bile izvedene v ležečem položaju preiskovanca, sta opravila izkušena izvajalca. Karotidna arterija je bila pregledana od supraklavikularne jame do roba spodnje čeljusti. V pregled so bili vključeni skupna karotidna arterija, karotidna bifurkacija, začetni del notranje karotidne arterije in zunanja karotidna arterija na obeh straneh. Meritve so bile izvedene na treh mestih, in sicer v skupni karotidni arteriji, notranji karotidni arteriji in zunanji karotidni arteriji. Ugotavljani so bili DIM, seštevek leh (število segmentov z lehami), seštevek debeline leh in prisotnost nestabilnih leh.

DIM je definiran kot področje med notranjim robom intime in robom med medijo in adventicijo. DIM je bil merjen na mestu brez leh, na 10 mm dolgem segmentu, na bolj oddaljenem robu ultrazvočne slike. Meritve DIM so bile izvajane po priporočilih mannhemskega konsenza (150).

Leha je bila definirana kot struktura, ki se širi v lumen žile za več kot 0,5 mm ali za več kot 50 odstotkov okolnega DIM ali debeline DIM $> 1,5$ mm (mannheimski konsenz) (155).

Razširjenost ateroskleroze vratnih arterij je bila ocenjena s seštevkom leh. Ultrazvočno je bila ugotovljena prisotnost leh v skupni vratni, notranji vratni in zunanji vratni arteriji. Prisotnost leh v eni od arterij je bila ovrednotena z eno točko. Preiskava je bila izvajana na levi in desni strani tako, da je bil najvišji možni seštevek leh 6, če leh ni bilo, pa je bil seštevek 0. Seštevek debeline leh je bil izračunan kot seštevek največje debeline leh na merjenih mestih. Glede na stabilnost so bile lehe razdeljene v pet tipov (155):

- Tip I (homogeno hipoehogena leha). Značilnosti tega tipa so razjede na površini, krvavitve v lehi ali visoka vsebnost maščob. Lehe so hipoehogene do anehogene vsebine. Tovrstne lehe so nestabilne.
- Tip II (pretežno hipoehogene lehe). Lehe tega tipa vsebujejo več kot 50 odstotkov neehogenih predelov.
- Tip III (pretežno hiperehogene lehe). Lehe tega tipa vsebujejo manj kot 50 odstotkov nestabilnih hipoehogenih elementov.
- Tip IV (homogeno hiperehogene lehe). Lehe lahko vsebujejo drobne kalcinacije, ki so sestavljene predvsem iz fibroznega tkiva.
- Tip V (pretežno kalcinirane lehe). Lehe povzročajo akustično senco, ki onemogoča oceno arterijske stene ali svetline. Lehe tega tipa so nizkega tveganja za razvoj ishemičnega dogodka.

3.3 BIOKEMIJSKE PREISKAVE

Ob vključitvi v raziskavo in ob kontrolnem pregledu smo preiskovancem odvzeli po 15 ml krvi iz kubitalne vene. V krvi smo določali celotni holesterol, LDL- in HDL-holesterol, trigliceride, visokoreaktivni CRP, raven glukoze na tešče in HbA1c (v odstotkih). Biokemijske preiskave so bile izvedene po standardnem biokemijskem postopku, v atestiranem bolnišničnem laboratoriju.

3.4 MOLEKULARNOGENETSKA ANALIZA

Genomski DNA smo izolirali iz 100 μ L polne krvi z uporabo seta FlexiGene DNA, upoštevajoč protokol proizvajalca (Qiagene GmbH, Hilden, Nemčija). Polimorfizme K469E (rs 5498) gena za ICAM 1, G241A (rs 1799969), gena za ICAM 1, C373G (rs 668), gena za PECAM 1, G1082A (rs1800896), gena za IL 10, C1159A (rs3212227), gena za IL 12p40, C607A (rs1946518), gena za IL 18 in G137C (rs187238) ter gena za IL 18 smo določili na podlagi PCR v realnem času z uporabo seta StepOne (48-well) real-Time PCR System, upoštevajoč navodila proizvajalca (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Uporabljali smo komercialno dostopni set za genotipizacijo TagMan SNP Genotyping assay, upoštevajoč navodila proizvajalca (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA).

3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Z uporabo Kolmogorov-Smirnovega testa smo na začetku preverili, ali porazdelitve vrednosti spremenljivk sledijo normalni porazdelitvi. Normalno porazdeljene kontinuirane spremenljivke smo prikazali v obliki povprečje \pm standardni odklon. Spremenljivke, ki niso sledile normalni porazdelitvi, smo prikazali kot vrednosti mediane (medkvartilnega intervala). Studentov test t ali analizo variance (ANOVA) smo uporabili za primerjavo numeričnih vrednosti kontinuiranih spremenljivk, če so bile spremenljivke normalno porazdeljene. Mann-Whitneyjev test U ali Kruskal-Wallisov test H smo uporabili, če so bile spremenljivke

asimetrično porazdeljene. Test χ^2 smo uporabili za primerjavo frekvenc kategoričnih spremenljivk, statistično vrednotenje razlik v frekvencah različnih alelov in genotipov med raziskavo in pri ugotavljanju Hardy-Weinbergovega ravnovesja.

Na podlagi Pearsonove korelacijske analize smo ugotavljali povezanost med neodvisnimi spremenljivkami. V primeru visoke stopnje povezanosti med spremenljivkama smo za vključitev v multivariantne statistične modele izbrali samo eno spremenljivko iz vsakega para. Spremembo vrednosti ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij smo izračunali tako, da smo od vrednosti, izmerjene ob kontrolnem ultrazvočnem pregledu vratnih arterij, odšteli vrednost, izmerjeno ob prvem ultrazvočnem pregledu.

Pri preizkušanju domnev smo kot statistično pomembno upoštevali vrednost p , manjšo od $p < 0,05$. Bonferronijevo korekcijo smo uporabili za odpravo tveganja glede na število izvedenih primerjav. Vse statistične analize smo izvedli z računalniškim programom za statistično analizo SPSS za Windows, v različici 20 (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, ZDA).

4 REZULTATI

Doktorska disertacija je sestavljena iz sedmih asociacijskih raziskav vpliva polimorfizmov adhezijskih molekul (rs 5498 gena za ICAM 1, rs 1799969 gena za ICAM 1, Leu125Val gena za PECAM 1) in interlevkinov (G1082A gena za IL 10, C1159 A gena za IL 12, C607A gena za IL 18, G137C gena za IL 18) na debelino DIM, debelino leh, seštevek leh in prisotnost nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 in vpliva na napredovanje ateroskleroznega procesa, ki je izraženo z napredovanjem v DIM, debelini leh, seštevkam leh in prisotnosti nestabilnih leh v obdobju med prvim in kontrolnim pregledom ($3,8 \pm 0,5$ leta).

4.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

V tabeli 1 so prikazane klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev ob vključitvi v raziskavo.

Tabela 1: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev ob vključitvi v raziskavo

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Starost (leta)	61,38 ± 9,65	60,07 ± 9,18	0,07
Moški spol (%)	338 (56,8)	92 (46)	0,008
Trajanje SB (leta)	11,25 ± 7,88	-	-
Kadilci (%)	53 (8,91)	34 (17)	0,002
Obseg pasu (cm)	108,65 ± 12,88	93,31 ± 13,18	< 0,001
ITM (kg/m ²)	30,96 ± 4,74	27,90 ± 4,42	0,16
Sistolični krvni tlak (mm Hg)	146,98 ± 19,98	143,3 ± 16,6	0,86
Diastolični krvni tlak (mm Hg)	85,75 ± 11,62	84,7 ± 11,6	0,19
Glikemija na tešče (mmol/L)	8,04 ± 2,57	5,27 ± 0,87	< 0,001
HbA1c (%)	7,89 ± 3,56	4,79 ± 0,29	< 0,001
Celotni holesterol (mmol/L)	4,70 ± 1,19	5,36 ± 1,08	< 0,001
Holesterol HDL (mmol/L)	1,19 ± 0,35	1,43 ± 0,37	< 0,001
Holesterol LDL (mmol/L)	2,63 ± 0,94	3,24 ± 0,98	< 0,001
Trigliceridi (mmol/L)	1,9 (1,2–2,7)	1,3 (0,9–1,9)	< 0,001
Visokoobčutljivi CRP (mg/L)	2,2 (1–4,3)	1,3 (0,8–2,7)	< 0,001

Iz tabele 1 je razvidno, da med bolniki s SB tipa 2 in kontrolno skupino ob vključitvi v raziskavo ni bilo statistično pomembnih razlik v starosti, spolu, indeksu telesne mase ter sistoličnem in diastoličnem krvnem pritisku. Statistično pomembna razlika je bila ugotovljena pri obsegu pasu, saj je bil ta pri bolnikih s SB tipa 2 statistično pomembno večji ($p < 0,001$) kot pri preiskovancih v kontrolni skupini. Kadilcev je bilo statistično pomembno ($p = 0,002$) več v kontrolni skupini kot v skupini bolnikov s SB tipa 2 (tabela 1). Biokemijske preiskave krvi so pokazale statistično pomembno višje ravni glikemije na tešče, HbA1c, trigliceridov in CRP v skupini bolnikov s SB tipa 2 v primerjavi s kontrolno skupino.

Skupni holesterol, LDL in HDL so bili statistično pomembno višji v kontrolni skupini kot v skupini bolnikov s SB tipa 2 (tabela 1). Ta rezultat je mogoče razložiti s predpostavko, da v primerjavi s kontrolno skupino zdrave bolnikov s SB tipa 2 nadzorujeta osebni zdravnik in diabetolog.

Klinične in biokemijske značilnosti smo preverjali ob kontrolnem pregledu v povprečju $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda. V tabeli 2 so prikazani rezultati omenjenih kontrolnih pregledov.

Tabela 2: Klinične in biokemijske značilnosti preiskovancev ob kontrolnem pregledu

	Bolniki s SB n = 426	Kontrolna skupina zdravih n = 137	p
Starost (leta)	64,28 ± 7,79	65,83 ± 7,58	0,56
Moški spol (%)	231 (54,2)	59 (43,1)	0,02
Kadilci (%)	35 (8,2)	6 (4,4)	0,18
Obseg pasu (cm)	109,73 ± 11,73	95,24 ± 12,38	< 0,001
ITM (kg/m ²)	32,20 ± 5,07	30,18 ± 4,69	0,16
Sistolični krvni tlak (mm Hg)	149,4 ± 24,4	147,72 ± 23,26	0,84
Diastolični krvni tlak (mm Hg)	85,9 ± 11,2	84,83 ± 11,16	0,94
Glikemija na tešče (mmol/L)	8,06 ± 2,24	5,88 ± 2,78	< 0,001
HbA1c (%)	7,85 ± 1,12	5,37 ± 1,20	< 0,001
Celotni holesterol (mmol/L)	4,36 ± 1,08	4,79 ± 1,12	0,02
Holesterol HDL (mmol/L)	1,26 ± 0,39	1,39 ± 0,41	0,10
Holesterol LDL (mmol/L)	2,29 ± 0,94	2,72 ± 1,02	0,18
Trigliceridi (mmol/L)	1,84 (1,20–2,10)	1,40 (1,05–1,95)	< 0,001
Visokoobčutljivi CRP (mg/L)	2,35 (1–4,5)	1,4 (1–2,1)	< 0,001

Na kontrolni pregled je prišlo 426 preiskovancev iz skupine bolnikov s SB tipa 2 in 137 preiskovancev iz kontrolne skupine. Iz tabele 2 je razvidno, da ni statistično pomembnih razlik med skupinama v starosti, spolu, indeksu telesne mase ter sistoličnem in diastoličnem pritisku. Statistično pomembna razlika je bila le pri obsegu pasu, pri bolnikih s SB tipa 2 pa je bil v primerjavi s preiskovanci v kontrolni skupini statistično pomembno večji obseg pasu ($p < 0,001$); rezultat je bil podoben rezultatu ob vključitvi v raziskavo. Razlika v deležu kadilcev ni bila statistično pomembna, kar je predstavljalo razliko glede na rezultate ob vključitvi v raziskavo, ko je bilo statistično pomembno več kadilcev v kontrolni skupini. Rezultat si razlagamo z možnostjo, da so posamezniki zaradi vključitve v raziskavo nehali kaditi.

Biokemijske preiskave niso pokazale statistično pomembnih razlik med skupinama preiskovancev v ravneh celotnega holesterola ter holesterola HDL in LDL v primerjavi z rezultati ob vključitvi v raziskavo, ko je bila ta razlika statistično pomembna. Rezultat je mogoče razložiti s predpostavko, da so preiskovanci iz kontrolne skupine začeli natančneje upoštevati priporočila osebnega zdravnika in izvajati terapijo za zniževanje holesterola. Statistično pomembna razlika je bila v ravneh glikemije na tešče, HbA1c, trigliceridov in CRP, glede katerih so bile pri bolnikih s SB tipa 2 v primerjavi s kontrolno skupino statistično pomembno višje ravni.

4.2 PRIMERJAVA ULTRAZVOČNIH OZNAČEVALCEV ATEROSKLEROZE V VRATNIH ARTERIJAH MED PREISKOVANCI OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO IN KONTROLNEM PREGLEDU

Ob vključitvi v raziskavo smo pri vseh preiskovancih opravili ultrazvočni pregled vratnih arterij. Izmerili smo DIM, zapisali število segmentov z lehami in sešteli debelino leh. Rezultati ultrazvočnih preiskav so navedeni v tabeli 3.

Tabela 3: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 in zdravimi preiskovanci v kontrolni skupini ob vključitvi v raziskavo

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Debelina intime in medije (μm)	1013 \pm 208	979 \pm 141	0,03
Število segmentov z lehami	2,52 \pm 1,63	1,92 \pm 1,64	< 0,001
Seštevek debeline leh (mm)	7,89 \pm 3,51	5,65 \pm 3,52	0,01

Statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino je bila ugotovljena glede vrednosti DIM ($p = 0,03$), seštevka debeline leh ($p = < 0,001$) in števila segmentov z lehami ($p = 0,01$). Ob kontrolnem pregledu, ki je bil opravljen v povprečju $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda, je bil ponovljen ultrazvočni pregled vratnih arterij in ponovno so bili preverjeni DIM, število leh in seštevek debeline leh. Iz razlike med DIM ob vključitvi v raziskavo in kontrolnem pregledu je bil izračunan letni prirastek DIM. Iz razlike v številu segmentov z lehami ob vključitvi v študijo in ob kontrolnem pregledu je bila izračunana Δ števila segmentov z lehami, ki predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Iz razlike seštevka debeline leh ob vključitvi v študijo in ob kontrolnem pregledu je bila izračunana Δ seštevka debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Rezultati so navedeni v tabeli 4.

Tabela 4: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij

	Bolniki s SB n = 426	Kontrolna skupina zdravih n = 137	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	20,33 (11,74–29,86)	12,83 (8,82–20,66)	0,02
Δ števila segmentov z lehami	2 (1–3)	1,5 (0,7–2,2)	0,03
Δ seštevka debeline leh (mm)	5,40 (2,40–7,05)	3,64 (2,88–5,48)	0,02

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino je bila ugotovljena v letnem prirastku DIM ($p = 0,02$), Δ števila segmentov z lehami ($p = 0,03$) in Δ seštevka debeline leh ($p = 0,02$) (tabela 4).

4.3 GENSKA ANALIZA PREISKOVANCEV

4.3.1 Polimorfizem gena za ICAM 1 K469E (rs 5498)

Razporeditev genotipov polimorfizma K469E (rs5498) je prikazana v tabeli 5.

Tabela 5: Razporeditev genotipov polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip KK	172 (28,9)	59 (29,5)	0,87
Genotip KE	306 (51,4)	105 (52,5)	
Genotip EE	117 (19,7)	36 (18)	
Allel K	650 (54,6)	223 (55,8)	0,69
Allel E	540 (45,4)	177 (44,2)	

Statistično pomembna razlika v razporeditvi genotipov polimorfizma rs5498 za ICAM 1 med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino ni bila ugotovljena.

Razporeditev genotipov v populaciji bolnikov s SB tipa 2 in v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,83$; $p = 0,36$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 0,82$; $p = 0,36$).

Ultrazvočni označevalci ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 so bili primerjani glede na genotipe polimorfizma rs5498 gena za ICAM 1. Rezultati so navedeni v tabeli 6.

Tabela 6: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma K469E (rs5498) gena za ICAM 1 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip KK	Genotip KE	Genotip EE	P
Debelina intime in medije (μm)		996 \pm 206	1015 \pm 212	1024 \pm 212	0,65
Število segmentov z lehami		2,26 \pm 1,54	2,54 \pm 1,62	2,74 \pm 1,75	0,15
Seštevka debeline leh (mm)		7,07 \pm 3,64	7,94 \pm 4,32	8,95 \pm 4,73	0,04
Prisotnost leh	+	144 (83,7)	257 (84)	98 (83,8)	0,99
	-	28 (16,3)	49 (16)	19 (16,2)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	83 (57,6)	161 (62,6)	44 (44,9)	0,01
	-	61 (42,4)	96 (37,4)	54 (55,1)	

Povezava med posameznimi genotipi polimorfizma rs5498 in DIM ni bila ugotovljena, prav tako tudi ne povezava med posameznimi genotipi rs5498 ter številom segmentov z lehami in prisotnostjo leh. Povezava je bila ugotovljena med seštevkom debeline leh ($p = 0,04$) in prisotnostjo nestabilnih leh ($p = 0,01$) glede na genotip rs5498 gena za ICAM 1 (tabela 6). Genotip EE rs5498 je povezan z višjo vrednostjo seštevka debeline leh in s prisotnostjo nestabilnih leh.

Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med vključitvijo v raziskavo in kontrolnim pregledom glede na genotipe polimorfizma rs 5498 gena za ICAM 1 so navedene v tabeli 7.

Tabela 7: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1

	Genotip KK	Genotip KE	Genotip EE	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	12,76 (5,26–23,96)	20,34 (12,50–28,04)	26,09 (20,69–32,42)	0,04
Δ števila segmentov z lehami	1 (0,5–3)	2 (1–2,5)	3 (2–3)	0,65
Δ seštevka debeline leh (mm)	4,3 (1,4–7,8)	5,4 (1,55–10,15)	6,3 (2,3–8,1)	0,62

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Ugotovljena je bila statistično pomembna razlika pri letnem prirastu DIM, genotip EE rs 5498 pa je povezan z večjim letnim prirastkom DIM. Statistično pomembne razlike ni bilo v številu segmentov z lehami in seštevku debeline leh med posameznimi genotipi polimorfizma rs5498 (tabela 7).

Tabela 8 prikazuje povezanost pojavnosti nestabilnih leh pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo glede na klasične dejavnike tveganja za aterosklerozo in genotipe polimorfizma K469E za ICAM 1. Ugotovljena je bila statistično pomembna povezava med genotipom EE polimorfizma K469E in pojavom nestabilnih leh v karotidni arteriji. Pri genotipu KE polimorfizma K469E gena za ICAM 1 tako kot pri klasičnih dejavnikih tveganja za aterosklerozo ni bila ugotovljena statistično pomembna povezava s pojavnostjo nestabilnih leh.

Tabela 8: Povezanost genotipov polimorfizma K469E (rs5498) gena za ICAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	2,43	0,25	1,56	0,38
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,12	0,44	0,17	0,37
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,45	0,32	1,22	0,71
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,15	0,03	0,48	0,76
Hba1c (%)	0,72	0,10	1,14	0,49
Genotip KE	0,97	0,49	0,74	0,17
Genotip EE	0,85	0,51	1,69	0,03

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini. Referenčna skupina so homozigoti za alel K.

V tabeli 9 so prikazani rezultati povezanosti med napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 s klasičnimi dejavniki tveganja za aterosklerozo ter z genotipoma KE in EE polimorfizma K469E gena za ICAM 1. Ugotovljena je bila statistično pomembna povezava med letnim prirastkom DIM in genotipom EE polimorfizma K469E gena za ICAM 1. Seštevka segmentov z lehami in seštevka debeline leh pri omenjenem genotipu nista pokazala statistično pomembne povezave. Statistično pomembna povezava ni bila ugotovljena med genotipom KE polimorfizma K469E gena za ICAM 1 in kazalniki napredovanja ateroskleroze karotidne arterije, enako kot pri klasičnih dejavnikih tveganja za aterosklerozo.

Tabela 9: Povezanost genotipov polimorfizma K469 (rs5498) gena za ICAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija	1,45	0,35	1,26	0,64	1,46	0,92
Sistolični krvni tlak	0,12	0,44	0,08	0,32	0,45	0,48
Serumski holesterol LDL	0,32	0,40	0,07	0,69	0,53	0,41
Serumski holesterol HDL	-0,04	0,18	-0,51	0,34	-0,39	0,90
Hba1c (%)	0,89	0,70	0,13	0,43	0,68	0,28
Genotip KE	1,37	0,49	0,74	0,17	1,14	0,37
Genotip EE	3,69	0,03	0,25	0,51	1,31	0,62

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel K.

4.3.2 Polimorfizem gena za ICAM 1 G241A (rs 1799969)

Razporeditev genotipov polimorfizma G242A (rs 1799969) gena za ICAM 1 v skupini bolnikov s SB tipa 2 in v kontrolni skupini je prikazana v tabeli 10.

Tabela 10: Razporeditev genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip GG	466 (78,3)	153 (76,5)	0,81
Genotip GA	120 (20,2)	43 (21,5)	
Genotip AA	9 (1,5)	4 (2)	
Alel G	1052 (88,4)	349 (87,3)	0,54
Alel A	138 (11,6)	51 (12,7)	

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs 1799969 gena za ICAM 1 ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino. Razporeditev genotipov v populaciji bolnikov s SB tipa 2 in v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,16$; $p = 0,69$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 0,23$; $p = 0,63$). Zaradi majhnega števila homozigotov za alel A v obeh skupinah preiskovancev smo jih pri statistični analizi združili s heterozigoti. Ultrazvočni označevalci ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 so bili primerjani glede na genotipe polimorfizma rs1799969 gena za ICAM 1. Ultrazvočni označevalci ateroskleroze so bili zapisani na podlagi ultrazvočne preiskave ob vključitvi v študijo. Rezultati so zapisani v tabeli 11.

Tabela 11: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 ob vključitvi v raziskavo

	Genotip GG	Genotipa GA + AA	p
Debelina intime in medije (μm)	1009 \pm 209	1026 \pm 204	0,51
Število segmentov z lehami	2,49 \pm 1,61	2,58 \pm 1,76	0,67
Seštevek debeline leh (mm)	7,62 \pm 4,41	8,79 \pm 4,81	0,08
Prisotnost leh	+	396 (85)	0,17
	-	70 (15)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	235 (59,3)	0,18
	-	161 (40,7)	

Razlika med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze glede na genotip polimorfizma rs1799969 gena za ICAM 1 ni bila ugotovljena (tabela 11).

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze smo preverjali ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevek debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Rezultati so prikazani v tabeli 12.

Tabela 12: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1

	Genotip GG	Genotipa GA + AA	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	20,69 (12,21–28,65)	24,28 (10,71–32,18)	0,66
Δ števila segmentov z lehami	2 (0,5–3)	2 (1–3)	0,92
Δ seštevek debeline leh (mm)	4,30 (2,3–7,88)	5,85 (2,90–8,53)	0,31

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi rs1799969 gena za ICAM 1 in spremembami ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze med prvim in kontrolnim pregledom.

Povezanost med genotipi rs1799969 gena za ICAM 1 s prisotnostjo leh oziroma nestabilnih leh je prikazana v tabeli 13.

Tabela 13: Povezanost genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,66	0,21	1,24	0,53
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,162	0,36	0,15	0,25
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,32	0,40	1,46	0,61
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,18	0,03	0,44	0,33
HbA1c (%)	0,95	0,04	0,83	0,47
Genotipa GA + AA	1,32	0,49	1,18	0,22

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Povezava med genotipoma GA + AA in prisotnostjo leh oziroma nestabilnih leh ni bila ugotovljena. Ugotovljena pa je bila povezava med ravno serumskega HDL in HbA1c ter prisotnostjo leh.

Povezanost genotipov GA + AA polimorfizma rs1799969 gena za ICAM 1 z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze je prikazana v tabeli 14.

Tabela 14: Povezanost genotipov polimorfizma R241G (rs1799969) gena za ICAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija	1,54	0,55	0,32	0,95	1,06	0,18
Sistolični krvni tlak	0,14	0,42	0,07	0,49	0,43	0,18
Serumski holesterol LDL	0,56	0,87	0,08	0,65	0,19	0,87
Serumski holesterol HDL	-0,55	0,44	-0,54	0,31	-0,64	0,25
Hba1c (%)	0,23	0,38	0,02	0,85	0,46	0,16
Genotipa GA + AA	1,33	0,56	0,38	0,36	1,07	0,49

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne povezave med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipoma GA + AA polimorfizma rs1799969 gena za ICAM 1 (tabela 14).

4.3.3 Polimorfizem gena za PECAM 1 +373C/G (rs 668)

Razporeditev genotipov polimorfizma +373C/G (rs 668) gena za PECAM 1 je prikazana v tabeli 15.

Tabela 15: Razporeditev genotipov polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip CC	174 (29,2)	53 (26,5)	0,71
Genotip CG	303 (50,9)	108 (54)	
Genotip GG	118 (19,9)	39 (19,5)	
Alel C	651 (54,7)	214 (53,5)	0,67
Alel G	539 (45,3)	186 (46,5)	

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs 668 gena za PECAM 1 ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino. Razporeditev genotipov v populaciji bolnikov s SB tipa 2 je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,45$; p = 0,50; kontrolna skupina: $\chi^2 = 1,46$; p = 0,23).

Primerjali smo tudi ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij, ugotovljene ob vključitvi v raziskavo, med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs668 gena za PECAM 1. Rezultati so prikazani v tabeli 16.

Tabela 16: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip CC	Genotip CG	Genotip GG	P
Debelina intime in medije (μm)		1041 \pm 198	990 \pm 187	988 \pm 211	0,19
Število segmentov z lehami		2,56 \pm 1,65	2,39 \pm 1,72	2,51 \pm 1,54	0,36
Seštevek debeline leh (mm)		8,14 \pm 4,77	7,99 \pm 5,23	7,66 \pm 4,02	0,16
Prisotnost leh	+	149 (85,6)	256 (84,5)	94 (79,7)	0,36
	-	25 (14,4)	47 (15,5)	24 (20,3)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	86 (57,7)	144 (56,3)	58 (61,7)	0,66
	-	63 (42,3)	112 (43,7)	36 (38,3)	

Kot je razvidno iz tabele 16, ob vključitvi v raziskavo ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med genotipi polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze vratnih arterij.

Kontrola ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah je bila opravljena ob kontrolnem pregledu 3,8 \pm 0,5 leta od prvega pregleda. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevek debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Rezultati so prikazani v tabeli 17.

Tabela 17: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1

	Genotip CC	Genotip CG	Genotip GG	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	20,34 (11,64–28,04)	20,69 (7,14–32,28)	14,28 (10,71–35,97)	0,71
Δ števila segmentov z lehami	2 (0,5–2,5)	2 (1–3)	2 (2–3)	0,74
Δ seštevek debeline leh (mm)	7,30 (3,85–8,70)	5,45 (2,30–9,20)	4,40 (1,40–8,42)	0,38

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 in napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v opazovalnem obdobju.

Povezanost med genotipoma CG in GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 in prisotnostjo leh oziroma nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 18.

Tabela 18: Povezanost genotipov polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,88	0,35	1,38	0,52
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,24	0,68	0,26	0,32
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,41	0,41	1,34	0,25
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,11	0,02	0,31	0,34
Hba1c (%)	0,89	0,03	1,23	0,43
Genotip CG	1,03	0,49	0,72	0,17
Genotip GG	1,18	0,03	0,68	0,51

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati so pokazali statistično pomembno razliko v prisotnosti leh v genotipu GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1; referenčna vrednost je bil genotip CC. Razlika ni bila ugotovljena v prisotnosti nestabilnih leh. Prisotnost leh je bila višja tudi pri bolnikih z višjim serumskim HDL in višjim HbA1c.

Povezanost genotipov CG in GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 z napredovanjem označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 19.

Tabela 19: Povezanost genotipov polimorfizma 373C/G (rs668) gena za PECAM 1 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija	1,38	0,73	0,18	0,73	1,09	0,53
Sistolični krvni tlak	0,07	0,71	0,01	0,88	0,08	0,81
Serumski holesterol LDL	0,43	0,90	0,34	0,64	0,62	0,82
Serumski holesterol HDL	-0,14	0,64	-0,67	0,18	-1,33	0,48
HbA1c (%)	0,96	0,40	0,68	0,34	0,98	0,24
Genotip CG	0,94	0,75	0,29	0,43	0,45	0,51
Genotip GG	0,43	0,47	0,56	0,26	0,30	0,32

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati so pokazali, da genotipa CG in GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 nista povezana z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2.

4.3.4 Polimorfizem G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10

Razporeditev genotipov polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za IL 10 je prikazana v tabeli 20.

Tabela 20: Razporeditev genotipov polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za IL 10 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip GG	183 (30,7)	57 (28,5)	0,84
Genotip GA	314 (52,8)	109 (54,5)	
Genotip AA	98 (16,5)	34 (17)	
Alel G	680 (57,2)	223 (55,8)	0,62
Alel A	510 (42,8)	177 (44,2)	

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino. Razporeditev genotipov pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 3,57$; $p = 0,06$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 2,19$; $p = 0,14$).

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij, ugotovljene ob vključitvi v raziskavo, med bolniki s SB tipa 2 smo primerjali glede na genotipe polimorfizma rs1800896 gena za IL 10. Rezultati so prikazani v tabeli 21.

Tabela 21: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip GG	Genotip GA	Genotip AA	P
Debelina intime in medije (μm)		1032 \pm 214	1012 \pm 202	1001 \pm 220	0,67
Število segmentov z lehami		2,64 \pm 1,68	2,55 \pm 1,41	2,29 \pm 1,65	0,42
Seštevka debeline leh (mm)		8,12 \pm 4,49	7,77 \pm 4,92	7,19 \pm 3,82	0,18
Prisotnost leh	+	148 (80,9)	265 (84,4)	85 (86,7)	0,39
	-	35 (19,1)	49 (15,6)	13 (13,3)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	72 (48,6)	165 (62,3)	49 (57,6)	0,03
	-	76 (51,4)	100 (37,7)	36 (42,4)	

Statistično pomembna razlika med genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 in DIM ni bila ugotovljena v številu segmentov z lehami, v seštevku debeline leh in prisotnosti leh. Ugotovljena pa je bila statistično pomembna razlika v prisotnosti nestabilnih leh. Pri genotipih GA in AA so bile lehe statistično pomembno stabilnejše kot pa pri genotipu GG ($p = 0,03$).

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij smo kontrolirali 3,8 \pm 0,5 leta od prve preiskave. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevka debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Rezultati so prikazani v tabeli 22.

Tabela 22: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs1800896 gena za IL 10

	Genotip GG	Genotip GA	Genotip AA	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	20,33 (10,54–28,65)	17,14 (12,25–23,35)	12,34 (6,55–16,28)	0,06
Δ števila segmentov z lehami	2 (0,75–3)	2,5 (0,5–3)	2 (1–2,25)	0,62
Δ seštevka debeline leh (mm)	5,42 (3,65–8,43)	6,45 (5,05–8,58)	4,35 (2,80–7,22)	0,44

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 in napredovanjem DIM, v seštevku segmentov z lehami in seštevku debeline leh v obdobju med vključitvijo v raziskavo in kontrolnim pregledom (3,8 \pm 0,5 let).

Prisotnost leh oziroma nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 glede na genotipa GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 je prikazana v tabeli 23.

Tabela 23: Povezanost genotipov polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,64 (0,95–2,31)	0,06	1,12 (0,64–1,76)	0,98
Sistolični krvni tlak (mmHg)	1,09 (0,97–1,34)	0,33	1,18 (0,97–1,32)	0,32
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,21 (0,76–1,91)	0,41	1,09 (0,76–1,58)	0,64
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,16 (0,04–0,63)	0,009	0,29 (0,08–1,13)	0,07
Trigliceridi (mmol/L)	1,35 (0,56–1,67)	0,03	1,16 (0,65–1,47)	0,34
Hba1c (%)	1,19 (0,62–1,76)	0,24	1,16 (0,85–1,43)	0,42
Genotip GA	1,17 (0,44–2,76)	0,84	1,65 (0,74–3,70)	0,02
Genotip AA	1,67 (0,88–3,11)	0,07	1,23 (0,65–3,29)	0,52

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike v prisotnosti leh v genotipih GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10. Razlika je bila ugotovljena glede prisotnosti nestabilnih leh pri genotipu GA, pri genotipu AA pa razlike ni bilo. Referenčna vrednost je bil genotip GG. Prisotnost leh je bila večja pri bolnikih z višjim serumskim HDL in višjimi vrednostmi trigliceridov.

Povezanost genotipov GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 z napredovanjem označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 24.

Tabela 24: Povezanost genotipov polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	0,082	0,62	0,069	0,61	1,060	0,49
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,013	0,50	0,025	0,86	0,036	0,73
Serumski holesterol LDL	0,069	0,64	0,062	0,61	0,622	0,62
Serumski holesterol HDL	–	0,15	–	0,02	–0,338	0,54
Trigliceridi (mmol/L)	0,256	0,094	0,107	0,40	0,514	0,56
Hba1c (%)	1,156	0,26	1,35	0,24	0,749	0,71
Genotip GA	–	0,65	0,204	0,14	1,562	0,93
Genotip AA	–	0,29	0,033	0,41	0,181	0,51

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Rezultati so pokazali, da genotipa GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 nista povezana z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 med pregledom ob vključitvi v študijo in kontrolnim pregledom ($3,8 \pm 0,5$ leta). Ugotovljeno je bilo povečanje števila segmentov z lehami pri bolnikih z višjimi vrednostmi HDL-holesterola.

4.3.5 Polimorfizem C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 p40

Razporeditev genotipov polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za IL 12 p40 je prikazana v tabeli 25.

Tabela 25: Razporeditev genotipov polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za IL 12 p40 pri bolnikih s SB tipa 2 in zdravih preiskovancih v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip CC	373 (62,7)	93 (46,5)	0,0002
Genotip CA	197 (33,1)	92 (46)	
Genotip AA	25 (4,2)	15 (7,5)	
Allel C	943 (79,2)	278 (69,5)	< 0,0001
Allel A	247 (20,8)	122 (30,5)	

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 je ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino. Razporeditev genotipov med bolniki s SB tipa 2 in v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,02$; $p = 0,87$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 1,44$; $p = 0,23$).

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij, ugotovljene ob vključitvi v raziskavo, pri bolnikih s SB tipa 2 smo primerjali glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40. Rezultati so prikazani v tabeli 26.

Tabela 26: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip CC	Genotip CA	Genotip AA	P
Debelina intime in medije (μm)		991 \pm 206	1103 \pm 202	1116 \pm 97	0,58
Število segmentov z lehami		2,48 \pm 1,83	2,95 \pm 1,53	3,17 \pm 1,34	0,56
Seštevka debeline leh (mm)		7,32 \pm 4,55	8,29 \pm 4,12	8,67 \pm 3,30	0,94
Prisotnost leh	+	304 (81,5)	172 (87,3)	22 (88)	0,17
	-	69 (18,5)	25 (12,7)	3 (12)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	165 (54,3)	104 (60,5)	17 (77,3)	0,07
	-	139 (45,7)	68 (39,5)	5 (22,7)	

Statistično pomembna razlika med genotipi polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 in DIM ni bila ugotovljena v številu segmentov z lehami, seštevku debeline leh, prisotnosti leh in prisotnosti nestabilnih leh ob vključitvi v raziskavo.

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij smo kontrolirali 3,8 \pm 0,5 leta od prve preiskave. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevka debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Pridobljene rezultate meritev smo primerjali glede na genotip polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40. Rezultati so prikazani v tabeli 27.

Tabela 27: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40

	Genotip CC	Genotip CA	Genotip AA	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	18,28 (10,71–26,65)	20,51 (10,34–28,22)	24,14 (10,52–29,86)	0,76
Δ števila segmentov z lehami	1,5 (1–2,75)	2 (1–3)	2 (0,75–3)	0,27
Δ seštevka debeline leh (mm)	4,32 (2,63–7,08)	5,83 (3,10–7,26)	6,45 (3,58–8,48)	0,59

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 v napredovanju DIM, seštevku segmentov z lehami in seštevku debeline leh v obdobju med vključitvijo v raziskavo in kontrolnim pregledom ($3,8 \pm 0,5$ leta).

Prisotnost leh oziroma nestabilnih leh v vratnih arterijah ob vključitvi v raziskavo pri bolnikih s SB tipa 2 glede na genotipa CA in AA polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 je prikazana v tabeli 28.

Tabela 28: Povezanost genotipov polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95% CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,46 (0,96–2,27)	0,46	1,74 (0,64–2,91)	0,43
Sistolični krvni tlak (mmHg)	1,03 (0,97–1,17)	0,34	1,04 (0,98–1,43)	0,31
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,18 (0,62–1,67)	0,22	1,22 (0,73–1,89)	0,04
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,45 (0,05–0,78)	0,52	0,26 (0,06–1,17)	0,07
Trigliceridi (mmol/L)	1,37 (0,53–1,96)	0,03	1,08 (0,73–1,39)	0,96
Hba1c (%)	1,48 (0,72–2,06)	0,29	1,28 (0,88–1,85)	0,19
Genotip CA	1,79 (0,85–2,49)	0,12	1,48 (0,69–2,27)	0,93
Genotip AA	1,86 (0,72–2,27)	0,29	1,92 (0,76–3,24)	0,29

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike v prisotnosti leh v genotipih CA in AA polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40. Referenčna vrednost je bil genotip CC. Prisotnost leh je bila višja pri bolnikih z višjimi serumskimi trigliceridi ($p = 0,03$). Ugotovljena je bila povezava med ravnjo LDL-holesterola in stabilnostjo lehe ($p = 0,04$).

Povezanost genotipov CA in AA polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 z napredovanjem označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta) pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 29.

Tabela 29: Povezanost genotipov polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	B	p	β	p	B	p
Arterijska hipertenzija	0,112	0,53	0,095	0,56	0,133	0,13
Sistolični krvni tlak	0,148	0,39	0,067	0,68	0,059	0,09
Serumski holesterol LDL	0,184	0,58	0,127	0,85	0,397	0,18
Serumski holesterol HDL	-0,127	0,44	-	0,09	-0,139	0,09
Trigliceridi (mmol/L)	0,224	0,16	0,105	0,49	0,203	0,08
Hba1c (%)	0,198	0,17	0,166	0,22	0,279	0,16
Genotip CA	0,079	0,58	0,048	0,56	0,579	0,17
Genotip AA	0,133	0,89	0,063	0,38	0,624	0,29

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati pri bolnikih s SB tipa 2 so pokazali, da genotipa CA in AA polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 nista povezana z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta).

4.3.6 Polimorfizem C607A (rs1946518) gena za interlevkin 18

Razporeditev genotipov polimorfizma C607A (rs1946518) gena za IL 18 je prikazana v tabeli 30.

Tabela 30: Razporeditev genotipov polimorfizma C607A (rs1946518) gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip CC	231 (38,8)	68 (34)	0,44
Genotip CA	272 (45,7)	101 (50,5)	
Genotip AA	92 (15,5)	31 (15,5)	
Alel C	734 (61,7)	237 (59,3)	0,39
Alel A	456 (38,3)	163 (40,7)	

V razporeditvi genotipov polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino. Razporeditev genotipov med bolniki s SB tipa 2 in kontrolno skupino je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,65$; $p = 0,42$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 0,42$; $p = 0,52$).

Ob vključitvi v raziskavo smo ugotavljali ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij. Primerjali smo jih glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18. Rezultati so prikazani v tabeli 31.

Tabela 31: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip CC	Genotip CA	Genotip AA	P
Debelina intime in medije (μm)		1027 \pm 187	1014 \pm 211	985 \pm 245	0,42
Število segmentov z lehami		2,66 \pm 1,67	2,52 \pm 1,64	2,26 \pm 1,49	0,29
Seštevka debeline leh (mm)		8,50 \pm 4,38	7,69 \pm 4,66	7,21 \pm 4,15	0,17
Prisotnost leh	+	197 (85,3)	225 (82,7)	76 (82,1)	0,71
	–	34 (14,7)	47 (17,3)	16 (17,9)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	115 (58,4)	129 (57,3)	42 (55,3)	0,89
	–	82 (41,6)	96 (42,7)	34 (44,7)	

Statistično pomembna razlika med genotipi polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 in DIM v številu segmentov z lehami, seštevku debeline leh, prisotnosti leh in prisotnosti nestabilnih leh ob vključitvi v raziskavo ni bila ugotovljena.

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij smo kontrolirali 3,8 \pm 0,5 leta od prve preiskave. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevka debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Pridobljene rezultate meritev smo primerjali glede na genotip polimorfizma rs1946518 gena za IL 18. Rezultati so prikazani v tabeli 32.

Tabela 32: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18

	Genotip CC	Genotip CA	Genotip AA	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	27,17 (17,63–29,67)	21,36 (13,25–28,36)	14,28 (10,71–22,43)	0,47
Δ števila segmentov z lehami	2 (2–3)	1 (1–2,25)	1,5 (1–3)	0,08
Δ seštevka debeline leh (mm)	5,60 (3,50–8)	5,25 (2,37–7,91)	3,85 (2,18–6,42)	0,14

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 in napredovanjem DIM, seštevkom segmentov z lehami in seštevkom debeline leh v obdobju med vključitvijo v raziskavo in kontrolnim pregledom (3,8 \pm 0,5 leta).

Prisotnost leh oziroma nestabilnih leh v vratnih arterijah ob vključitvi v raziskavo pri bolnikih s SB tipa 2 glede na genotipa CA in AA polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 je prikazana v tabeli 33.

Tabela 33: Povezanost genotipov polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,48 (1,14–1,77)	0,08	1,17 (0,83–1,55)	0,78
Sistolični krvni tlak (mmHg)	1,06 (0,98–1,13)	0,41	1,03 (0,97–1,16)	0,24
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	1,12 (0,71–1,76)	0,64	1,09 (0,73–1,61)	0,68
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	0,13 (0,03–0,51)	0,003	0,19 (0,05–0,79)	0,02
Trigliceridi (mmol/L)	1,32 (0,58–1,94)	0,04	1,23 (0,59–1,78)	0,18
HbA1c (%)	1,19 (0,62–2,83)	0,24	1,16 (0,88–1,50)	0,30
Genotip CA	1,05 (0,56–1,78)	0,44	1,08 (0,66–1,67)	0,36
Genotip AA	1,02 (0,46–1,69)	0,31	0,94 (0,43–1,30)	0,12

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike v prisotnosti leh in nestabilnih leh pri genotipih CA in AA polimorfizma rs1946518 gena za IL 18. Referenčna vrednost je bil genotip CC. Prisotnost leh je bila povezana z ravno HDL-holesterola ($p = 0,003$) in trigliceridov ($p = 0,04$). Ugotovljena je bila povezava med ravno HDL-holesterola in prisotnostjo nestabilnih leh ($p = 0,02$).

Povezanost genotipov CA in AA polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 z napredovanjem označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta) pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 34.

Tabela 34: Povezanost genotipov polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	0,094	0,56	0,091	0,53	0,265	0,51
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,151	0,37	0,045	0,76	0,067	0,34
Serumski holesterol LDL (mmol/L)	0,150	0,92	0,132	0,81	0,134	0,77
Serumski holesterol HDL (mmol/L)	-0,226	0,14	-0,229	0,09	-0,162	0,35
Trigliceridi (mmol/L)	0,242	0,124	0,153	0,26	0,176	0,34
HbA1c (%)	0,163	0,23	0,166	0,17	0,339	0,69
Genotip CA	-0,177	0,24	-0,300	0,13	-0,139	0,82
Genotip AA	-0,113	0,45	-0,032	0,81	-0,322	0,18

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini ter izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel C.

Rezultati pri bolnikih s SB tipa 2 so pokazali, da genotipa CA in AA polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 nista povezana z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta).

4.3.7 Polimorfizem G137C (rs187238) gena za interlevkin 18

Razporeditev genotipov polimorfizma G137C (rs187238) gena za IL 18 je prikazana v tabeli 35.

Tabela 35: Razporeditev genotipov polimorfizma G137C (rs187238) gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in v kontrolni skupini

	Bolniki s SB n = 595	Kontrolna skupina zdravih n = 200	p
Genotip GG	336 (56,5)	103 (51,5)	0,35
Genotip GC	217 (36,5)	78 (39)	
Genotip CC	42 (7)	19 (9,5)	
Allel G	889 (74,7)	284 (71)	0,15
Allel C	301 (25,3)	116 (29)	

Med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino ni bila ugotovljena statistično pomembna razlika v razporeditvi genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18. Razporeditev genotipov v skupini bolnikov s SB tipa 2 in v kontrolni skupini je bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (SB tipa 2: $\chi^2 = 0,73$; $p = 0,39$; kontrolna skupina: $\chi^2 = 0,56$; $p = 0,45$).

Ob vključitvi v raziskavo smo ugotavljali ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij. Primerjali smo jih glede na genotipe polimorfizma rs187238 gena za IL 18. Rezultati so prikazani v tabeli 36.

Tabela 36: Primerjava ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij med bolniki s SB tipa 2 glede na genotipe polimorfizma rs187238 gena za IL 18 ob vključitvi v raziskavo

		Genotip GG	Genotip GC	Genotip CC	P
Debelina intime in medije (μm)		1029 \pm 203	993 \pm 208	976 \pm 182	0,19
Število segmentov z lehami		2,64 \pm 1,67	2,35 \pm 1,58	2,30 \pm 1,56	0,20
Seštevka debeline leh (mm)		8,23 \pm 4,50	7,73 \pm 4,73	7,37 \pm 4,46	0,27
Prisotnost leh	+	286 (85,1)	178 (82)	34 (81)	0,56
	-	50 (14,9)	39 (18)	8 (19)	
Prisotnost nestabilnih leh	+	172 (60,1)	96 (53,9)	18 (52,9)	0,36
	-	114 (39,9)	82 (46,1)	16 (47,1)	

Statistično pomembna razlika med genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 in DIM, številom segmentov z lehami, seštevkom debeline leh, prisotnostjo leh in prisotnostjo nestabilnih leh ob vključitvi v raziskavo ni bila ugotovljena.

Ultrazvočne označevalce ateroskleroze vratnih arterij smo kontrolirali 3,8 \pm 0,5 leta od prve preiskave. Izračunali smo letni prirastek DIM, Δ števila segmentov z lehami, kar predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti, in Δ seštevka debeline leh, kar prav tako predstavlja odstotek izhodiščne vrednosti. Pridobljene rezultate meritev smo primerjali glede na genotip polimorfizma rs187238 gena za IL 18. Rezultati so prikazani v tabeli 37.

Tabela 37: Spremembe ultrazvočnih kazalnikov ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2 v obdobju med prvim in kontrolnim ultrazvočnim pregledom vratnih arterij glede na genotipe polimorfizma rs187238 gena za IL 18

	Genotip GG	Genotip GC	Genotip CC	p
Letni prirastek DIM ($\mu\text{m}/\text{leto}$)	24,65 (14,56–30,25)	21,94 (15,34–29,14)	18,17 (10,75–26,52)	0,84
Δ števila segmentov z lehami	2 (1–3)	1,5 (1–2,75)	1 (1–3)	0,35
Δ seštevka debeline leh (mm)	6,12 (2,98–9,38)	5,28 (2,21–8,67)	4,54 (2,36–7,72)	0,11

Δ – sprememba vrednosti spremenljivke v obdobju opazovanja, izražena kot odstotek izhodiščne vrednosti

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike med genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 in napredovanjem DIM, seštevkom segmentov z lehami in seštevkom debeline leh v obdobju med vključitvijo v raziskavo in kontrolnim pregledom ($3,8 \pm 0,5$ leta).

Prisotnost leh oziroma nestabilnih leh v vratnih arterijah ob vključitvi v raziskavo pri bolnikih s SB tipa 2 glede na genotipa GC in CC polimorfizma rs187238 gena za IL 18 je prikazana v tabeli 38.

Tabela 38: Povezanost genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18 s prisotnostjo leh/nestabilnih leh v vratnih arterijah pri bolnikih s SB tipa 2 ob vključitvi v raziskavo

	Prisotnost leh		Prisotnost nestabilnih leh	
	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	1,68 (1,06–2,28)	0,04	1,05 (0,63–2,77)	0,93
Sistolični krvni tlak (mmHg)	1,13 (0,97–1,27)	0,25	1,12 (0,97–1,28)	0,23
Serumski holesterol LDL	1,29 (0,78–2,14)	0,33	1,07 (0,73–1,56)	0,74
Serumski holesterol HDL	0,17 (0,05–0,65)	0,009	0,27 (0,07–1,05)	0,06
Trigliceridi (mmol/L)	1,24 (0,62–1,65)	0,10	1,15 (0,65–1,67)	0,36
HbA1c (%)	1,25 (0,59–1,95)	0,15	1,14 (0,89–1,52)	0,42
Genotip GC	0,96 (0,47–1,36)	0,79	0,98 (0,46–2,07)	0,95
Genotip CC	0,51 (0,12–1,22)	0,38	0,73 (0,06–2,45)	0,28

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje in zdravljenje s statini.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike v prisotnosti leh in nestabilnih leh pri genotipih GC in CC polimorfizma rs187238 gena za IL 18. Referenčna vrednost je bil genotip GG. Prisotnost leh je bila povezana z zvišanim krvnim pritiskom in ravno HDL-holesterola ($p = 0,009$).

Povezanost genotipov GC in CC polimorfizma rs187238 gena za IL 18 z napredovanjem označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta) pri bolnikih s SB tipa 2 je prikazana v tabeli 39.

Tabela 39: Povezanost genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18 z napredovanjem ateroskleroze vratnih arterij pri bolnikih s SB tipa 2

	Δ DIM/leto		Δ števila segmentov		Δ seštevka debeline leh	
	β	p	β	p	β	p
Arterijska hipertenzija (0 = ne; 1 = da)	0,104	0,59	0,056	0,71	0,404	0,50
Sistolični krvni tlak (mmHg)	0,149	0,3	0,017	0,91	0,076	0,19
Serumski holesterol LDL	0,073	0,6	0,021	0,87	0,046	0,86
Serumski holesterol HDL	-0,215	0,1	-0,189	0,17	-0,339	0,20
Trigliceridi (mmol/L)	0,273	0,0	0,157	0,26	0,231	0,19
Hba1c (%)	0,171	0,2	0,142	0,25	0,292	0,48
Genotip GC	-0,181	0,9	-0,272	0,25	-0,727	0,39
Genotip CC	-0,142	0,3	-0,314	0,91	-0,674	0,25

Vsi modeli so prilagojeni glede na starost, spol, kajenje, zdravljenje s statini in izhodiščno vrednost odvisne spremenljivke v modelu.

Referenčna skupina so homozigoti za alel G.

Rezultati pri bolnikih s SB tipa 2 so pokazali, da genotipa GC in CC polimorfizma rs187238 gena za IL 18 nista povezana z napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah med dvema pregledoma ($3,8 \pm 0,5$ leta)

5 RAZPRAVA

5.1 KLINIČNE IN BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI SLADKORNIH BOLNIKOV

Preiskovanci v skupini bolnikov s SB tipa 2 so bili v povprečju stari $61,38 \pm 9,65$ leta, povprečna starost preiskovancev v kontrolni skupini pa je bila $60,07 \pm 9,18$, kar ni predstavljalo statistično pomembne razlike ($p = 0,07$). Staranje je pomemben dejavnik tveganja za SŽO. Poveča se debelina arterijske stene, stena je bolj toga in pojavi se endotelijska disfunkcija. Klinično se pojavi zvišan krvni pritisk ter nastanejo pogoji za hitrejši razvoj ateroskleroze in zapletov, kot sta srčni infarkt in možganska kap (156).

Razlika med skupino bolnikov s SB tipa 2 in kontrolno skupino je bila v spolu. Moških je bilo statistično pomembno več v skupini bolnikov s SB tipa 2 ($p = 0,008$). Moški spol pomeni dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze. Turner in sodelavci so ugotovili, da sta starost nad 60 let in moški spol pomembna dejavnika tveganja za srčni infarkt (7).

Trajanje SB tipa 2 je bilo med preiskovanci v povprečju $11,25 \pm 7,88$ leta. Trajanje SB je neodvisni dejavnik tveganja za SŽO (157).

Preiskovanci ob vključitvi v študijo niso imeli urejenih svojih dejavnikov tveganja. Kadilcev je bilo 17 odstotkov v kontrolni skupini in 8,9 odstotka med bolniki s SB tipa 2 ($p = 0,002$). Na kontrolnem pregledu razlika med skupinama ni bila statistično pomembna ($p = 0,18$). Številne epidemiološke študije so potrdile povezavo med kajenjem in srčnim infarktom pri moškem in ženskem spolu (158). Kajenje je tudi neodvisni dejavnik tveganja za srčno-žilno umrljivost pri bolnikih s SB tipa 2 (159).

Obseg pasu je bil statistično pomembno višji v skupini bolnikov s SB tipa 2 kot v kontrolni skupini, pri ITM pa ni bilo statistično pomembne razlike. Debelost poveča tveganje nastanka SŽO, povezana je z nastankom inzulinske intolerance in s SB tipa 2 (160).

Vrednosti krvnega pritiska so bile zvišane, pri bolnikih s SB tipa 2 je ta znašal 146,9 mmHg, v kontrolni skupini pa 143,3 mmHg. Razlika med skupinama ni bila statistično pomembna ($p = 0,89$). Med bolniki s SB tipa 2 je dvakrat več hipertonikov kot v zdravi populaciji (161). Z zvišanjem krvnega pritiska za 10 mmHg se tveganje za SŽO poveča za 15 odstotkov (7). Glede na ugotovitve raziskave, ki smo jo izvedli, domnevamo, da so bolniki s SB tipa 2 glede krvnega pritiska bolj pod nadzorom kot kontrolna skupina.

Vrednosti HbA1c so bile statistično pomembno višje ($p < 0,001$) v skupini bolnikov s SB tipa 2. Slaba urejenost HbA1c je dejavnik tveganja za srčno-žilne dogodke, porast vrednosti HbA1c pa poveča tveganje za srčno-žilno umrljivost za 11 odstotkov (7).

Ob vključitvi v raziskavo so bile vrednosti celotnega holesterola, HDL in LDL statistično pomembno višje v kontrolni skupini ($p < 0,001$), vrednosti trigliceridov pa višje v skupini bolnikov s SB tipa 2 ($p < 0,001$). Nižje vrednosti celotnega holesterola in HDL je mogoče pripisati boljšemu nadzoru bolezni in vodenju bolnikov s SB tipa 2. Ob kontrolnem pregledu ($3,8 \pm 0,5$ leta) je bila prisotna statistično pomembna razlika le v celotnem holesterolu ($p = 0,02$), višja pa je bila v kontrolni skupini. Trigliceridi so bili višji pri bolnikih s SB tipa 2 ($p < 0,001$). Zelena raven LDL-holesterola je pri SB tipa 2 z znanim SŽO nekoliko nižja kot v preostali populaciji. Priporočene so vrednosti pod 2 mmol/l (26). Delci LDL pri bolnikih s SB tipa 2 so manjši in gostejši, zato lažje vstopajo v žilno steno in so bolj aterogeni (162).

Vrednosti visokoreaktivnega CRP so bile statistično pomembno višje pri bolnikih s SB tipa 2 kot v kontrolni skupini ($p < 0,001$). Zvišane vrednosti CRP pri bolnikih s SB tipa 2 napovedujejo večje tveganje za srčno-žilne dogodke in umrljivost (163). Lee in sodelavci so ugotovili zvišane vrednosti CRP pri bolnikih s prisotno večžilno srčno boleznijo v primerjavi z bolniki s SB tipa 2 brez srčno-žilne bolezni (164).

V raziskavi smo ugotovili statistično pomembno zvišane vse vrednosti ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah v skupini bolnikov s SB tipa 2. Prav tako je bil porast vrednosti ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze ob kontrolnem pregledu po $3,8 \pm 0,5$ leta statistično pomemben pri bolnikih s SB tipa 2.

Višje vrednosti DIM so dejavnik tveganja za srčni infarkt in ishemično možgansko kap (149). V študiji ARIC, v katero je bilo vključenih 15.792 preiskovancev, starih od 45 do 64 let, je bila ugotovljena povezava med spremembami DIM glede na urejenost SB tipa 2, kajenje, HDL-holesterol in krvni pritisk. Spremljanje preiskovancev je trajalo enajst let (147). Višje vrednosti DIM pri sladkornih bolnikih v indijski populaciji so ugotovili Mohan in sodelavci (165). V raziskavi smo prišli do istih rezultatov, kajti DIM, seštevek debeline leh in seštevek segmentov z lehami so statistično pomembno višji pri preiskovancih s SB tipa 2 kot v kontrolni skupini. Prav tako je bilo ugotovljeno hitrejše napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze ob kontrolnem pregledu pri preiskovancih s SB tipa 2 v primerjavi s kontrolno skupino. Rezultati raziskave, ki smo jo izvedli, se ujemajo z rezultati že omenjenih študij.

5.2 GENSKI POLIMORFIZMI IN ATEROSKLEROZA KAROTID

5.2.1 Povezava polimorfizma K469E (rs 5498) gena za ICAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid

V študiji smo ugotavljali povezavo med polimorfizmom K469E gena za ICAM 1 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze karotidne arterije. Ugotovili smo povezanost med genotipom EE in letnim prirastkom DIM karotidne arterije kot kazalnikom napredovanja ateroskleroze. Prav tako smo ugotovili povezanost med genotipom EE in prisotnostjo nestabilnih leh v karotidni arteriji. Povezava ni bila ugotovljena med Δ števila segmentov z lehami in Δ seštevek debeline leh karotidne arterije.

Študija, ki smo jo izvedli, je prva, s katero je bila ugotovljena povezava med napredovanjem ateroskleroze v karotidni arteriji in polimorfizmom K469E gena za ICAM 1.

Razporeditev genotipov polimorfizma K469E gena za ICAM 1 je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Do istih rezultatov so prišli Yokoyama in sodelavci v japonski populaciji, ki so primerjali sladkorne bolnike in kontrolno skupino (166).

ICAM 1 proizvajajo endotelijske celice med vnetnim odzivom. ICAM 1 sodeluje v reakciji lepljenja monocitov, makrofagov, T-limfocitov in trombocitov med seboj in na žilno steno, kar pomeni ključno vlogo v razvoju ateroskleroze (167). ICAM 1 sodeluje v interakciji na podlagi integrinskega receptorja na levkocitih, kar omogoča vezavo z endotelijskimi celicami

in s transendotelijsko migracijo levkocitov v predel intime in omogoča akumulacijo levkocitov v žilni steni (62).

Številne raziskave podpirajo hipotezo, da raven sl ICAM 1 vpliva na razvoj ateroskleroze. V epidemioloških raziskavah v navidezno zdravi populaciji je bilo ugotovljeno, da zvišana raven sl ICAM 1 poveča tveganje za razvoj srčno-žilnih obolenj, PAOB, ateroskleroze karotidne arterije in ICV (44,56,168,169).

Raven sl ICAM 1 je povezana s koronarno aterosklerozo, izraženo kot seštevek kalcija. Tang in sodelavci v zaključku raziskave navajajo, da je sl ICAM 1 biološki označevalec za koronarno aterosklerozo (170).

Polimorfizem K469E gena za ICAM 1 je povezan s povečano izraženostjo ICAM 1, ki vodi v povečano adhezijo levkocitov na endotelij žilne stene. Raziskave bioloških označevalcev podpirajo trditev, da polimorfizem ICAM 1 K469E vodi do zamenjave aminokislin in spremembe zgradbe liganda ali stabilnosti multimerične ICAM 1 na celični površini. Alel E gena za ICAM 1 spremeni funkcijo in strukturo ICAM 1 regije D5, kar povzroča spremembo dimerizacije in adhezijske funkcije. Kombinacija opisanih sprememb olajša adherenco levkocitov in prehod skozi žilni endotelij, kar vodi v aterosklerozo (171). Klasični dejavnik tveganja za aterosklerozo v kombinaciji s polimorfizmom ICAM 1 poveča tveganje za razvoj srčno-žilnih obolenj (172).

Gaetani in sodelavci v italijanski populaciji ter Shaker in sodelavci v egipčanski populaciji so ugotovili, da je genotip EE polimorfizma K469E za ICAM 1 značilno pogostejši pri bolnikih s PAOB kot v kontrolni skupini (173,174). Metaanaliza, ki je zajemala osemnajst študij in vključevala 3546 preiskovancev in 3852 kontrol ugotavlja povezanost polimorfizma K469E in srčno-žilnega obolenja (175)

Pola in sodelavci so ugotovili, da je genotip EE dvakrat pogostejši pri pacientih, ki so preboleli ICV, kot pa v kontrolni skupini (176). Metaanaliza dvanajstih študij, v katero je bilo vključeno 1593 preiskovancev in 1555 kontrol ni pokazala povezave med polimorfizmom K469E in možganskim kapi (177). McGlinchey in sodelavci v irski populaciji in Chou in sodelavci v tajvanski populaciji niso ugotovili povezave med polimorfizmom K469E gena za ICAM 1 in ishemičnim srčnim obolenjem (178, 179). Milutinović in Petrović sta ugotovila, da genotipa EE in KK polimorfizma K469E za ICAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 nista povezana s srčnim infarktom (70).

Iz navedenih študij ni mogoče podati jasnega zaključka o vlogi polimorfizma K469E v razvoju ateroskleroze. Razlike v rezultatih študij so lahko posledica dejstva, da so bile v študije vključene različne populacije, vzorci so bili razmeroma majhni, preiskovanci pa pod vplivom različnega okolja.

Rezultati študije, ki smo jo izvedli, podpirajo trditev, da je genotip EE povezan z razvojem ateroskleroze v karotidni arteriji. Ugotovili smo statistično pomembno višji seštevek leh pri preiskovancih z genotipom EE (tabela 6) kot pri drugih genotipih polimorfizma K469E gena za ICAM 1. Prav tako je kontrolni pregled, ki je bil opravljen $3,8 \pm 0,5$ leta po prvem ultrazvočnem pregledu, pokazal statistično pomemben letni prirastek DIM pri preiskovancih z genotipom EE (tabela 7).

De Graba in sodelavci so v simptomatskih lehah v primerjavi z asimptomatskimi ugotovili povečano izraženost ICAM 1 (180). Na podlagi tega dejstva bi lahko sklepali o vlogi adhezijskih molekul pri prehodu stabilne lehe v nestabilno. V primerjavi z omenjeno raziskavo pa so Nuotio in sodelavci ugotovili, da izraženost ICAM 1, VACAM 1 ter selektinov E in P ni povečana v simptomatski karotidni lehi. V raziskavi, ki smo jo izvedli, smo ugotovili povezanost med genotipom EE polimorfizma K469E za ICAM1 in nestabilno leho karotidne arterije (181).

Rezultati raziskave so lahko omejeni zaradi razmeroma majhnega števila preiskovancev, zato je tudi moč študije manjša. Preiskovanci so iz iste geografske regije in iste etnične skupine. V raziskavi nismo izključili vpliva drugih genskih polimorfizmov, ki bi potencialno vplivali na izraženost in vlogo ICAM 1. V študiji nismo merili ravni sl ICAM 1.

5.2.2 Povezanost polimorfizma G241A (rs 1799969) gena za ICAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid

V raziskavi smo ugotavljali povezavo med polimorfizmom G241A (rs 1799969) gena za ICAM 1 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze karotidne arterije. Povezave med genotipi polimorfizma rs 1799969 in označevalci ateroskleroze ob vključitvi v študijo nismo ugotovili. Prav tako povezave nismo ugotovili med polimorfizmom rs 1799969 ob kontrolnem pregledu ($3,8 \pm 0,5$ leta) v napredovanju ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze vratnih arterij. Povezanost med genotipi polimorfizma rs 1799969 in prisotnostjo nestabilnih leh v karotidni arteriji ni bila ugotovljena.

Povezavo med sl ICAM 1 in polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM 1 so ugotovili Abel in sodelavci (182). Pri omenjenem polimorfizmu prihaja do zamenjave glicina z argininom na kodirajočem eksonu 4, na mestu, pomembnem za formiranje vezavnega mesta za MAC 1. Predpostavlja se, da ta mutacija spreminja interakcijo med receptorjem in ligandom.

Ugotovljena je povezava med ravnjo sl ICAM 1 in polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM1 (64). Prav tako je ugotovljena povezava med sl ICAM 1 in tveganjem za srčni infarkt, ishemično možgansko kap in periferno žilno obolenje (56,168,169).

Bielinski in sodelavci so ugotovili povezavo med polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP) gena za ICAM 1 in ravnjo sl ICAM 1, niso pa ugotovili povezave med ravnjo sl ICAM 1 in ravnjo kalcija koronarnih arterij kot označevalca ateroskleroze (66). Abel in sodelavci povezave med ravnjo kalcija v koronarnih arterijah in polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM 1 niso ugotovili (182).

Malo homozigotov za alel A so ugotovili Ren in sodelavci v kitajski populaciji, kar predstavlja težavo za analizo omenjenega polimorfizma (183). V študiji, ki smo jo izvedli, smo za analizo zaradi majhnega števila homozigotov za alel A pridružili še heterozigote.

Povezava med polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM 1 in aterosklerozo koronarnih arterij v študiji GRACE-IMMUNE ni bila ugotovljena. V študiji je sodelovalo 1545 preiskovancev, preučevali so vpliv 51 SNP polimorfizmov genov, ki sodelujejo v vnetnem odgovoru na aterosklerozo koronarnih arterij (184).

Ugotovljena je bila povezava med polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM 1 in vnetnimi obolenji, kot so ulcerozni kolitis (185), Chronova bolezen (186), revmatoidni artritis (187).

Nejentsev in sodelavci so ugotovili, da je genotip A povezan z manjšim tveganjem za razvoj SB tipa 1 v primerjavi z genotipom G polimorfizma rs 1799969 gena za ICAM 1 (3695 družin, relativno tveganje 0,91, $p = 0,03$; 446 družin, relativno tveganje 0,60, $p = 0,006$) (188). To je edina raziskava, v kateri je bila ugotovljena povezava med genotipi polimorfizma rs 1799969 gena za ICAM 1 in SB tipa 1.

Številne raziskave so ugotovljale povezanost sl ICAM 1 in ateroskleroznega procesa. Razmeroma malo raziskav je preiskovalo vpliv polimorfizma rs 1799969 gena za ICAM 1 na aterosklerozni proces in SŽO. V raziskavi, ki smo jo izvedli, nismo ugotovili povezave omenjenega polimorfizma z ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze, napredovanjem ateroskleroze in s prisotnostjo nestabilnih leh v karotidni arteriji. Rezultati se ujemajo z rezultati Abela in sodelavcev ter Bielinskega in sodelavcev, ki niso ugotovili povezave med rs 1799969 in ravnjo kalcija v koronarnih arterijah (182,66).

5.2.3 Povezanost polimorfizma +373C/G (rs668) gena za PECAM 1 in označevalcev ateroskleroze karotid

V raziskavi smo ugotavljali povezanost med genotipi polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 pri bolnikih s SB tipa 2 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji ter stabilnostjo lehe v karotidni arteriji, upoštevajoč dejavnike tveganja. Prav tako smo spremljali napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda. V raziskavi smo ugotovili povezanost genotipa GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 in pojava lehe v karotidni arteriji, upoštevajoč dejavnike tveganja. Povezava ni bila ugotovljena med napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze in genotipom GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1.

Zmanjšanje območja z ateroskleroznimi spremembami pri miših z deficitom PECAM 1 so ugotovili Stevans in sodelavci. Postavili so hipotezo, da spremembe strižnih sil, ki so vidne v aterogenih regijah, kot so bifurkacije arterij, povzročajo spremembe endotelijskih celic, ki postanejo občutljive za PECAM 1, prisotnost PECAM 1 pa spodbuja nastanek in večanje aterosklerozne lezije. Odsotnost PECAM 1 upočasni razvoj aterosklerozne lezije, ne more pa preprečiti njenega začetka (189).

Povezavo med povišano ravnjo sl PECAM 1 ter pojavom srčnega infarkta in srčnega popuščanja so ugotovili Serebruany in sodelavci (190). Do istih ugotovitev pri indijski populaciji so prišli Shalia in sodelavci (191) ter Fang in sodelavci (83).

V kitajski populaciji je bila ugotovljena povezava med polimorfizmom rs668 gena za PECAM 1 in posledično zvišanega sl PECAM 1 z ishemično možgansko kapjo (85). Povezavo med polimorfizmom rs668 gen za PECAM 1 in srčno-žilnimi obolenji so ugotovili Listi in sodelavci v severnoitalijanski populaciji (192).

Reschner in sodelavci so ugotovili, da je pri bolnikih s SB tipa 2 v slovenski populaciji genotip CC polimorfizma rs 668 statistično pomembno višji pri bolnikih s srčnim infarktom kot v kontrolni skupini (84).

V vseh študijah pa ni bila ugotavljana povezanost med polimorfizmom rs668 gena za PECAM 1 in pojavom SŽO. Gardemann in sodelavci v nemški populaciji niso ugotovili povezave med polimorfizmom rs668 gena za PECAM 1 in SŽO. Prav tako so ugotovili, da

omenjeni polimorfizem ni neodvisni dejavnik tveganja za SŽO (193). Povezava med polimorfizmom rs668 gena za PECAM 1 in obolenjem koronarnih arterij v čilski populaciji ni bila ugotovljena (194).

V metaanalizi petnajstih študij, v katero je bilo vključenih 7636 preiskovancev, ni bila ugotovljena povezava med polimorfizmom rs668 gena za PECAM 1 in SŽO (195).

V raziskavi, ki smo jo izvedli, smo ugotovili večje število leh v karotidni arteriji pri genotipu GG polimorfizma rs 668 gena za PECAM 1. To ugotovitev podpira hipoteza Stevensa in sodelavcev, da zvišana raven sl PECAM 1 na mestih večjih strižnih sil povzroča hitrejše napredovanje ateroskleroze (189). V raziskavi nismo ugotovili povezave med napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze in genotipom GG polimorfizma rs 668 gena za PECAM 1 med prvim in kontrolnim pregledom. Pričakovali smo napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze pri genotipu GG rs 668 gena za PECAM 1. Rezultat smo razlagali z dolžino intervala med preiskavama. Razmik med preiskavama ($3,8 \pm 0,5$ leta) je bil nekoliko prekratek, da bi prišlo do pričakovanega napredovanja ateroskleroznih sprememb.

Po multivariantni logistični regresijski analizi smo ugotovili statistično večje število segmentov z lehami pri genotipu GG rs 668. Razlike pri drugih ultrazvočnih označevalcih ateroskleroze glede na genotipe polimorfizma rs668 nismo ugotovili. Na podlagi omenjenega lahko sklepamo, da obstaja možnost povezave med polimorfizmom rs 668 gena za PECAM 1 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze vratnih arterij. Treba bi bilo izvesti nove študije s še večjim številom preiskovancev, ki bi to povezavo potrdile.

5.2.4 Povezanost polimorfizma G1082A (rs1800896) gena za interlevkin 10 in označevalcev ateroskleroze karotid

Ugotavljali smo povezanost med genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 pri bolnikih s SB tipa 2 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji ter stabilnostjo lehe v karotidni arteriji. Prav tako smo spremljali napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda glede na genotip polimorfizma rs1800896 gena za IL 10.

Povezava med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipi rs1800896 gena za IL 10 pri bolnikih s SB tipa 2 ni bila ugotovljena. Ugotovili smo povezanost genotipov GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 s prisotnostjo stabilnejših leh v karotidni arteriji v primerjavi z genotipom GG. Ob upoštevanju dejavnikov tveganja je bila ugotovljena povezava med genotipom GA in prisotnostjo nestabilnih leh, povezava pa ni bila ugotovljena pri genotipu AA, kar je nepričakovani rezultat. Povezava med napredovanjem ateroskleroznih sprememb ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda in genotipi rs1800896 gena za IL 10 ni bila ugotovljena.

IL 10 med aterogenezo deluje zaščitno in je eden izmed ključnih regulatorjev vnetnega odgovora. Sodeluje pri zaviranju izražanja vnetnih citokinov, kot so IL 6, IL 12, IFN γ in MCP 1 (94). Dokazana je njegova vloga v stabilizaciji lehe na podlagi zaviranja nastajanja

metaloproteinaz in spodbujanja nastanka tkivnega inhibitorja metaloproteinaz 1 (TIMP 1) (98).

V skandinavski multicentrični študiji FRISC II, v katero je bilo vključeno 3179 bolnikov z akutnim srčnim infarktom, je bila zvišana raven IL 10 v serumu povezana z večjim tveganjem umrljivosti zaradi infarkta in ponovnega srčnega infarkta (196). Do nasprotnih rezultatov so prišli raziskovalci v študiji CAPTURE, kajti zvišana raven serumskega IL 10 je bila povezana z ugodnejšo prognozo glede umrljivosti in ponovnega srčnega infarkta pri bolnikih z zvišano vrednostjo CRP v serumu. Na podlagi teh ugotovitev so Heeschen in sodelavci sklepali, da je pomembno ravnovesje med vnetnimi in protivnetnimi citokini za izid pri akutnem koronarnem sindromu (197). Malarstig in sodelavci pa so ugotovili višje vrednosti serumskega IL 10 pri bolnikih z akutno koronarno boleznijo v primerjavi z zdravimi preiskovanci (196). Pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom je bilo več klasičnih dejavnikov tveganja. Razlika med skupinama ob upoštevanju klasičnih dejavnikov tveganja in označevalcev sistemskega vnetja ni bila statistično pomembna.

Raven serumskega IL 10 variira in je povezana s sistemskim vnetnim odgovorom. Povišana je pri višjem CRP in višji vrednosti IL 6 (prav tam). Glede na nasprotujoče si rezultate lahko ugotovimo, da vloga ravni serumskega IL 10 ni povsem razjasnjena, prav tako tudi ne vpliv na potek srčno-žilnih obolenj. Na raven serumskega IL 10 zelo vplivajo genski polimorfizmi na področju promotorja (198). Zamenjava gvanina z adeninom na področju promotorja gena za IL 10 na mestu -1082 vpliva na tvorbo IL 10. Rezultati genskih raziskav so protislovn.

V posameznih raziskavah je bila ugotovljena povečana tvorba IL 10 pri genotipu GG rs1800896 (106,199). V drugih raziskavah je bilo ugotovljeno, da je alel G rs1800896 povezan z zmanjšano tvorbo IL 10 (200,201). V raziskavi in vitro so Turner in sodelavci ugotovili, da je prisotnost genotipa GG povezana z manjšo izraženostjo IL 10 (202). Lio in sodelavci pa so poročali, da je genotip AA povezan z nižjo ravno IL 10 (105). V italijanski populaciji stoletnikov je bilo ugotovljeno, da je genotip GG rs1800896 gena za IL 10 povezan z višjo ravno serumskega IL 10 in s podaljšanjem življenjske dobe (198). Kljub različnim rezultatom pa je mogoče domnevati, da je pri bolezenskih stanjih s povečanim vnetnim odgovorom genotip GG rs1800896 povezan z večjo tvorbo IL 10 in ugodnejšim izidom bolezni.

V raziskavi, v katero so bili vključeni dializni bolniki, je bila ugotovljena povezava med genotipom AA rs1800896 in pojavom kardiovaskularnih obolenj v primerjavi z genotipom GG (203). Povezavo med polimorfizmom rs1800896 in pojavom srčno-žilnega obolenja v kitajski populaciji so ugotovili Liang in sodelavci (204). Koch in sodelavci niso ugotovili razlike med genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 in pojavom koronarnega sindroma (112). Metaanaliza 21 raziskav v katero je bilo vključeno 8263 preiskovancev in 5765 kontrol ni pokazala povezave med polimorfizmom rs1800896 in srčno-žilnim obolenjem (205).

V raziskavi, ki smo jo izvedli, tako kot Koch in sodelavci nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in napredovanjem ateroskleroze. Ugotovljena je bil povezava med genotipoma GA in AA in stabilnostjo lehe v karotidni arteriji.

Nestabilne lehe vsebujejo večje količine vnetnih celic, maščobno sredico in tanek fibrozni pokrov brez zunajceličnega matriksa (206). IL 10 nastaja v napredovali fazi ateroskleroze ter

je povezan z nižjo ravno sintaze dušikovega oksida in nižjo ravno apoptoze, kar je povezano s stabilnostjo lehe (97). IL 10 zavira sproščanje vnetnih citokinov, tkivnega dejavnika, matriks metaloproteinaz iz mononuklearnih celic, kar potencialno vodi v stabilizacijo lehe (207). Glede na omenjene ugotovitve rezultati raziskave, ki smo jo izvedli, kažejo na povezanost genotipov GA in AA rs1800896 gena za IL 10 s stabilnostjo plakov v karotidni arteriji.

Glede na nasprotujoče si rezultate raziskav o vplivu ravni serumskega IL 10 na razvoj ateroskleroze in vpliva polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 na raven serumskega IL 10 bi bilo treba izvesti nove in obsežnejše raziskave ter z namenom ugotovitve vloge IL 10 v procesu ateroskleroze upoštevati klasične dejavnike tveganja in druge vnetne citokine. Glede na navedene nasprotujoče si rezultate raziskav je mogoče domnevati, da je raven serumskega IL 10 odvisna od drugih provnetnih mediatorjev in genskih polimorfizmov. Rezultati spremljanja izolirane ravni IL 10 v serumu so nasprotujoči si. Genotipa GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 sta torej možna neodvisna genska dejavnika za stabilnost leh v karotidni arteriji.

5.2.5 Povezanost polimorfizma C1159A (rs3212227) gena za interlevkin 12 p40 in označevalcev ateroskleroze karotid

V raziskavi smo ugotavljali povezanost med genotipi polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 pri bolnikih s SB tipa 2 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji ter stabilnostjo lehe v karotidni arteriji. Prav tako smo spremljali napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda glede na genotipe polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40.

Povezava med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipi polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 pri bolnikih s SB tipa 2 ni bila ugotovljena. Prav tako nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 s prisotnostjo stabilnih oziroma nestabilnih leh v karotidni arteriji. Napredovanje ateroskleroznih sprememb ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda smo primerjali glede na genotip polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40. Glede na genotip ni bilo statistično pomembne razlike v napredovanju ateroskleroznih sprememb v karotidni arteriji.

Vloga IL 12 pri sprožanju in vzdrževanju Th 1 celičnega imunskega odgovora je pomembna. Inducira produkcijo interferona gama (IFN γ) in pospešuje diferenciacijo celic Th 1 (113). Glede na vlogo IL 12 v diferenciaciji Th 1 se domneva, da je eden od pomembnih posrednikov v vnetnem aterogenem procesu (115). S sinergističnim delovanjem z IL 18 spodbuja izločanje IFN γ , ta pa po mehanizmu pozitivne povratne zanke spodbuja izločanje IL 12 (208). Po drugi strani spodbuja tvorbo IL 10, kar je zaščitni mehanizem pri kroničnih vnetnih stanjih (209). Na mišjem modelu so Hauer in sodelavci povzročili blokado delovanja IL 12, rezultat pa sta bila zmanjšanje aterosklerozne lehe in stabilizacija lehe (118). Ugotovljena je bila povečana raven IL 12 v serumu bolnikov s koronarno boleznijo in z nestabilno angino pectoris (120). Wegner in sodelavci so pri sladkornih bolnikih v primerjavi z bolniki s koronarno boleznijo ugotovili višjo raven serumskega IL 12 (125). Mangino in sodelavci pa niso ugotovili povezave med polimorfizmom -1188 A/C gena za IL 12, koronarno boleznijo in srčnim infarkt (210).

V raziskavi, ki smo jo izvedli, nismo ugotovili povezave med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji in genotipi rs3212227 gena za IL 12 p40, rezultati, do katerih smo prišli, pa se ujemajo z rezultati Mangina in sodelavcev (210). V raziskavo so bili vključeni bolniki s SB tipa 2, Wegner in sodelavci pa so ugotovili, da je za bolnike s SB značilna višja raven serumskega IL 12 kot pri bolnikih s koronarno boleznijo (125). Obstaja možnost, da je na rezultat vplivala izbira preiskovancev, tj. bolnikov s SB tipa 2.

5.2.6 Povezanost polimorfizma C607A (rs1946518) gena za interlevkin 18 in označevalcev ateroskleroze karotid

V raziskavi smo ugotavljali povezavo med polimorfizmom rs1946518 gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze karotidne arterije in stabilnostjo lehe v karotidni arteriji. Spremljali smo napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda glede na genotipe polimorfizma rs1946518 gena za IL 18. V raziskavi nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji. Genotipi polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 niso povezani s stabilnostjo oziroma z nestabilnostjo lehe v karotidni arteriji.

IL 18 spada v skupino citokinov, ki spodbujajo vnetni odgovor. Sodeluje pri spodbujanju izražanja IFN γ , proinflammatoryh citokinov in adhezijskih molekul, vključen je v aktivacijo T-celic in celic ubijalk (127,211,212). S spodbujanjem izločanja IFN γ vpliva na moč vnetnega odgovora in tanjšanje fibroznega pokrova lehe, kar povzroči razpoko lehe (213). Na stabilnost lehe IL 18 vpliva na podlagi povečanega izražanja metaloproteinaz in makrofagov (214). Povečano izražanje IL 18 predvsem na podlagi makrofagov je bilo ugotovljeno v nestabilnih lehah (91). Raziskovalci so tudi ugotovili povečano koncentracijo IL 18 pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom in vpliv na stopnjo okvare miokarda (215). V evropski populaciji zdravih moških srednjih let je zvišana raven po ugotovitvah Blankenberga in sodelavcev v študiji PRIME neodvisni dejavnik tveganja za akutni srčni dogodek (216). Vpliv zvišane ravni IL 18 v serumu na DIM karotidne arterije so ugotovili Yamagami in sodelavci (217). Do nasprotnih rezultatov so prišli Chapman in sodelavci v raziskavi CUDAS na 1111 preiskovancih, kajti niso ugotovili vpliva ravni IL 18 v serumu na DIM karotidne arterije (218). Povezava med ravnjo IL 18 ter srčnim in možganskim infarktom pri preiskovancih moškega in ženskega spola, starih od 60 do 79 let, v raziskavi Jefferisa in sodelavcev ni bila ugotovljena (219). Zvišana raven IL 18 pri bolnikih po preboleli možganski kapi z večjim nevrološkim deficitom so ugotovili Yuen in sodelavci (220). V zaključku raziskave navajajo, da zvišana raven serumskega IL 18 lahko napove slab klinični izid po možganski kapi (prav tam).

Zvišana raven serumskega IL 18 je neodvisni dejavnik tveganja za nastanek SB pri moških in ženskah srednjega življenjskega obdobja (135). Do podobnih rezultatov so prišli Thorand in sodelavci, ki so ugotovili, da zvišana raven IL 18 za do 70 odstotkov zviša tveganje za nastanek SB v primerjavi s preiskovanci z nižjo ravnjo IL 18 (221). Zvišane vrednosti IL 18 pri bolnikih s SB v primerjavi z nediabetiki so ugotovili Aso in sodelavci (136). Isti avtorji so povezali zvišano raven IL 18 s hiperhomocisteinemijo v plazmi, kar je vplivalo na DIM karotidne arterije (prav tam).

Vpliv polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 na raven IL 18 v serumu so raziskovali Khripko in sodelavci (222). Ugotovili so, da je alel -607C povezan z zvišano produkcijo IL 18. Zhang in sodelavci so v kitajski populaciji ugotovili zvišano raven IL 18 v serumu in povečano tveganje za možgansko kap pri haplotipu -607/C polimorfizma rs1946518 in haplotipu -137/G polimorfizma rs187238 gena za IL 18 (145). V metaanalizi, ki je zajemala pet raziskav s 1391 preiskovanci in 1194 kontrol avtorji so ugotovili, da alel A polimorfizma C607A ima zaščitno funkcijo pri pojavu ishemične možganske kapi (223).

V raziskavi, ki smo jo izvedli, nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji, prav tako tudi ne povezave z napredovanjem ateroskleroznih sprememb v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu ($3,8 \pm 0,5$ leta). Rezultati te raziskave se ujemajo z rezultati Chapmana in sodelavcev (218) ter Jefferisa in sodelavcev (219), ki niso ugotovili povezave med ravno serumskega IL 18 in DIM karotidne arterije ter srčnim oziroma možganskim infarktom. Po drugi strani pa so rezultati, do katerih smo prišli, v nasprotju z ugotovitvami Zhanga in sodelavcev, ki so ugotovili vpliv haplotipa -607C polimorfizma rs1946518 gena za IL 18 na raven IL 18 v serumu in posledično povečano tveganje za možganski infarkt (145).

Do razlike v rezultatih raziskav prihaja zaradi razlik v preučevanih fenotipih, vpliva različnih dejavnikov okolja in različnih genskih dejavnikov. Vse navedene raziskave so bile izvedene na razmeroma majhnem številu preiskovancev, večina vanje vključenih pa je bila pripadnikov iste etnične skupine. V posameznih študijah nista bila upoštevana starost in spol preiskovancev. Na rezultate lahko vplivajo drugi polimorfizmi, ki vplivajo na aterogenezo, in ti so lahko v vezanem neravnovesju s preučevanim polimorfizmom, to neravnovesje pa se v različnih populacijah lahko tudi razlikuje. V raziskavo smo vključili bolnike s SB tipa 2, kar je lahko vplivalo na rezultat, kajti pri teh bolnikih je povišana raven serumskega IL 18.

5.2.7 Povezanost polimorfizma G137C (rs187238) gena za interlevkin 18 in označevalcev ateroskleroze karotid

V raziskavi smo ugotavljali povezanost med genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2 in ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji ter stabilnostjo lehe v karotidni arteriji ob upoštevanju dejavnikov tveganja. Prav tako smo spremljali napredovanje ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v karotidni arteriji ob kontrolnem pregledu $3,8 \pm 0,5$ leta od prvega pregleda. Povezanost genotipov polimorfizma rs187238 gena za IL 18 in ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze karotidne arterije ni bila ugotovljena. Prav tako ni bila ugotovljena povezava med napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze in genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 pri bolnikih s SB tipa 2.

Vloga IL 18 v procesu aterogeneze je opisana v prejšnjem razdelku. Polimorfizem rs187238 gena za IL 18 je eden od treh najbolj raziskanih polimorfizmov. Vpliv rs187238 gena za IL 18 na raven serumskega IL 18 so raziskovali Arimitsu in sodelavci ter ugotovili značilno večjo zmožnost tvorbe IL 18 v monocitih genotipa GG v primerjavi z drugimi genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 (144). Do istih rezultatov so prišli Giedraitis in sodelavci (2001), ki so ugotovili višjo raven mRNA za IL 18 pri preiskovancih z genotipom

GG v primerjavi z drugimi genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 (142). Vpliv polimorfizma rs187238 gena za IL 18 na raven serumskega IL 18 v raziskavi Opstada in sodelavcev ni bil ugotovljen (224). V raziskavo je bil vključen 1001 preiskovanec kavkaške rase s koronarno boleznijo (prav tam). Do podobnih rezultatov so prišli Liang in sodelavci, ki niso ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 in ravnjo serumskega IL 18 pri 393 preiskovancih indijske, kitajske in malajske narodnosti (225).

Hernesniemi in sodelavci so v raziskavi Helsinki Sudden Death Study, v katero je bilo vključenih 700 nenadno umrlih moških, ugotovili, da je pri nosilcih alela C polimorfizma rs187238 gena za IL 18 manjše tveganje za nenadno srčno smrt v primerjavi s homozigoti GG (226). Naknadno so v raziskavi ugotovili povezavo med genotipom GG, arterijsko hipertenzijo, površino ateroskleroznih leh ter pojavnostjo nestabilnih leh (227). GG genotip in visoko občutljivi CRP predstavljata riziko za razvoj srčno-žilnega obolenja prvi generaciji zdravih sorodnikov bolnikov obolelih od srčno-žilnega obolenja (228). Pei in sodelavci niso ugotovili povezave med akutnim srčnim infarktoma in genotipi polimorfizma rs187238 gena za IL 18 v kitajskih populaciji (229). Iz teh raziskav izhajajo nasprotujoči si rezultati glede vpliva polimorfizma rs187238 gena za IL 18 na raven serumskega IL 18 ter na proces aterogeneze in stabilnosti lehe. Nasprotujoči si rezultati so lahko posledica vpliva drugih polimorfizmov gena za IL 18, ki vplivajo na izražanje IL 18 (+183 A/G in -607 C/A); omenjeni polimorfizmi so v vezavnem neravnovesju (225). Razlike so lahko posledica spremljanja različnih fenotipov, pripadnosti preiskovancev različnim etničnim skupinam, raziskave pa so bile izvedene na razmeroma majhnih vzorcih, torej je moč študije majhna, in ni mogoče izključiti vpliva drugih mediatorjev aterogeneze.

V raziskavi, ki smo jo izvedli, nismo ugotovili povezave med polimorfizmom rs187238 gena za IL 18 in označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji ter napredovanjem ateroskleroznega procesa. Rezultate, do katerih smo prišli, je mogoče primerjati z rezultati raziskav, ki so jih izvedli Pei in sodelavci (229).

5.3 POMANJKLJIVOSTI RAZISKAVE

Pomanjkljivosti raziskave izhajajo iz njene zasnove. V asociacijskih raziskavah ugotavljamo vpliv posameznega genskega označevalca na določen fenotip, interakcije med posameznimi geni, ki vplivajo na fenotip, pa ne moremo izločiti. Prav tako ne moremo izločiti vpliva okolja na fenotip in genske označevalce.

Na rezultate raziskave vpliva število preiskovancev, v raziskavo pa smo jih vključili 795. Kathiresan in sodelavci za izognitev lažno pozitivnim rezultatom priporočajo vključitev od 1000 do 10.000 preiskovancev (230). Zaradi majhnega števila preiskovancev pri poskusu ponovitve raziskave lahko pride do nasprotujočih si rezultatov (230). Obstajata dva tipa asociacijskih raziskav. Pri prvem tipu asociacijskih raziskav, ki temelji na predhodni hipotezi, izberejo raziskovalci polimorfizme in gene, ki jih testiramo kot možne genetske označevalce določenega fenotipa (npr. koronarne bolezni, ateroskleroze karotid itd.) na osnovi poznavanja patogenetskega procesa, ki vodi v nastanek določenega fenotipa (231). Pri drugem tipu asociacijskih raziskav, presečna raziskava genoma - GWAS (angl. Genome wide association studies) pa testiramo večje število polimorfizmov in genov, dobljeni rezultati pa so neodvisni od predhodne hipoteze, ampak samo od tega, kako statistično pomembno vrednost želimo

imeti (torej vrednost p) ter od občutljivosti signala (232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240). Raziskave GWAS imajo določene prednosti pred klasičnimi asociacijskimi raziskavami, ki temeljijo na predhodni hipotezi, kajti v raziskavah GWAS je zajeto večje število polimorfizmov/genov, navadno večje število preiskovancev, prav tako pa ni pristranosti raziskovalcev (angl. bias) (231, 232, 233, 241, 242, 243). Navadno so raziskave GWAS narejene v okviru konzorcijev, ki so povezani z velikimi finančnimi vložki za raziskave, ki so navadno narejene v državah z velikimi vlaganji v raziskovalno delo (ZDA, Kanada, Avstralija, Japonska, Kitajska, Velika Britanija, Nemčija, Francija, Nizozemska itd.) (234, 235, 236, 237, 238, 239, 240). Zaradi teh razlogov v raziskave GWAS navadno niso vključeni preiskovanci iz regij v Evropi in drugih držav z manjšimi vložki v raziskovalno delo. V raziskavah GWAS so večinoma išče povezava - asociacija med polimorfizmi in izrazitimi fenotipi kot npr. koronarna bolezen, srčni infarkt, sladkorna bolezen, vnetna črevesna bolezen, različne vrste karcinomov itd (241, 244). Pri raziskovanju ateroskleroze oziroma označevalcev ateroskleroze so se doslej v večjih raziskavah (GWAS ali meta-analize klasičnih asociacijskih raziskav) večinoma testirale povezave med polimorfizmi in debelino intime medije, manj pa z ostalimi subkliničnimi označevalci ateroskleroze karotid kot so seštevki plakov in ostali (241, 243, 245). V zadnjem obdobju je bilo objavljenih kar nekaj raziskav o povezavi med polimorfizmi in subkliničnimi označevalci ateroskleroze karotid in koronark in njenega napredovanja (meta-analiz ali večjih asociacijskih raziskav), ki so testirale polimorfizme (rs-je), za katere so v raziskavah GWAS ugotovili, da so bili povezani s koronarno boleznijo (243, 245, 246, 247).

Na rezultate raziskave vpliva tudi izbira preiskovancev. Pri tem je treba upoštevati, da preiskovanci niso v sorodu, ker rezultati glede prisotnosti posameznih polimorfizmov ne bi bili primerljivi s stanjem v populaciji, iz katere izhajajo preiskovanci. Vplivu sorodstva smo se poskušali izogniti tako, da so preiskovanci pred začetkom preiskav izpolnili vprašalnik. Prav tako morajo preiskovanci v obeh skupinah biti približno iste starosti in razporeditve po spolu ter na splošno čim bolj medsebojno podobni, razen fenotipa, po katerem so razvrščeni v skupini.

Na rezultat lahko vpliva napaka pri meritvah. V raziskavi smo izvajali ultrazvočne meritve DIM v karotidnih arterijah. Ultrazvočna preiskava je subjektivna metoda in pri meritvah so možne napake. Espeland in sodelavci so ugotovili razliko med različnimi preiskovanci v višini 11 odstotkov v meritvah DIM karotidnih arterij (248).

Končno moramo omeniti še eno pomanjkljivost. Raziskava se ni ukvarjala s vplivi interakcij z okoljskimi dejavniki ter vpliva epigenetike in metabolomike.

Ob omenjenih možnih pomanjkljivostih naše raziskave kot tudi drugih podobnih raziskav na izbranih populacijah pa moramo omeniti tudi izreden pomen raziskav na manjših narodih, kajti kavkaška populacija iz naše regije oziroma na področju Balkana zaenkrat ni zajeta v nobeni evropski raziskavi GWAS s področja koronarne bolezni oziroma ateroskleroze karotid in debeline intime medije. Zaradi zgoraj omenjenih razlogov predstavlja pomemben vir genetskih podatkov za slovansko populacijo.

6 ZAKLJUČKI

V raziskavi, ki smo jo izvedli, smo potrdili vlogo adhezijskih molekul in vnetnih genov v procesu aterogeneze. Pri preiskovancih s SB tipa 2 smo ugotovili zvišane vrednosti CRP, kar povezuje patogenezo SB in aterosklerozo na podlagi vnetnega odziva. Pri preiskovancih s SB tipa 2 smo ugotovili statistično pomembno zvišane vrednosti vseh opazovanih ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze v vratnih arterijah. Prav tako je bil porast vrednosti ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze ob kontrolnem pregledu po $3,8 \pm 0,5$ leta statistično pomemben pri preiskovancih s SB tipa 2, kar potrjuje domnevo vpliva SB na hitrejši potek ateroskleroznega procesa.

Ugotovili smo povezanost med genotipom EE polimorfizma rs 5498 gena za ICAM 1 in letnim prirastkom DIM karotidne arterije kot kazalnikom napredovanja ateroskleroze in prisotnostjo nestabilnih leh v karotidni arteriji.

Povezave med polimorfizmom rs 1799969 gena za ICAM 1 in ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze karotidne arterije nismo ugotovili.

V raziskavi smo ugotovili povezanost med genotipom GG polimorfizma rs668 gena za PECAM 1 in pojavom lehe v karotidnih arterijah, upoštevajoč dejavnike tveganja. Povezave med napredovanjem ultrazvočnih označevalcev ateroskleroze in genotipom GG polimorfizma rs 668 gena za PECAM 1 med prvim in kontrolnim pregledom nismo ugotovili.

Povezava med ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze in genotipi rs1800896 gena za IL 10 pri bolnikih s SB tipa 2 ni bila ugotovljena. Ugotovili smo povezanost genotipov GA in AA polimorfizma rs1800896 gena za IL 10 s prisotnostjo stabilnejših leh v karotidni arteriji v primerjavi z genotipom GG.

Vpliv polimorfizma rs3212227 gena za IL 12 p40 pri bolnikih s SB tipa 2 na ultrazvočne označevalce ateroskleroze ni bil ugotovljen. Prav tako nismo ugotovili povezave omenjenega polimorfizma s prisotnostjo stabilnih oziroma nestabilnih leh v karotidni arteriji in z napredovanjem ateroskleroznih sprememb.

V raziskavi nismo ugotovili povezave med genotipi polimorfizma rs1946518 in rs187238 gena za IL 18 ter ultrazvočnimi označevalci ateroskleroze v karotidni arteriji, prav tako nismo ugotovili povezave z napredovanjem ateroskleroznih sprememb v karotidni arteriji.

Rezultati raziskave, ki smo jo izvedli, potrjujejo vlogo genskih označevalcev ateroskleroze v razvoju ateroskleroznega procesa in prispevajo k nekoliko boljšemu razumevanju ateroskleroznega procesa. Za opredelitev pomembnosti posameznih polimorfizmov na razvoj ateroskleroze in morebitno uporabo v klinični praksi v smislu ugotavljanja tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj ali uvajanje terapije bi bile smiselne dodatne genske raziskave, v katere bi bilo vključeno večje število preiskovancev.

7 LITERATURA IN VIRI

1. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999; 100: 1134–46. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th edition, Philadelphia. 2007; Elsevier Saunders: 572 str.
2. Kraus WE. Genetic approaches for the investigation of genes associated with coronary heart disease. *Am Heart J*. 2000 Oct; 140 (4): S27–35.
3. Smith SC Jr, Amsterdam E, Balady GJ, Bonow RO, Fletcher GF, Froelicher V, Heath G, Limacher MC, Maddahi J, Pryor D, Redberg RF, Roccella E, Ryan T, Smaha L, Wenger NK. Prevention Conference. In: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: tests for silent and inducible ischemia: Writing Group II. *Circulation*. 2000 Jan 4; 101 (1): E12–16.
4. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *Journal of internal medicine*. 2003 Feb; 253 (2): 120–127.
5. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Orvas JM, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet*. 2008 Feb; 40 (2): 189–197.
6. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita J, The clinical implications of endothelial dysfunction, *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42 (7): 1149–116.
7. Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ*. 1998; 316: 823–828.
8. Fras Z. Celovitost primarnega preprečevanja srčno-žilnih bolezní ter njegovo udeležanje v Sloveniji. *Slov kardiolog*. 2004; 1: 8–23.
9. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 339: 229–34.
10. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology and management. *JAMA*, 2002; 287: 2570–2581.
11. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979; 241: 2035–2038.
12. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115–26.
13. Schmidt MI, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999; 353: 1649–1652.
14. Duncan BB, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes*. 2003; 52: 1799–1805.

15. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286: 327–334.
16. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001; 29: 306–309.
17. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 168–75.
18. Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995; 75: 67B–70B.
19. Lerman A, Burnett JC. Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992; 86 (Suppl III): III-12–III-19.
20. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 195–
21. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1371–5.
22. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 1135–43.
23. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994; 89: 36–44.
24. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*. 2001; 103: 1718–20.
25. Mulvihill NT, Foley JB. Inflammation in acute coronary syndromes. *Heart*. 2002; 87: 201–4.
26. Ryden L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2007; 28: 88–136
27. Mrevlje F. Bolezni presnove. In: Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. *Interna medicina*. Ljubljana: Založba Littera Picta, d. o. o.; 2005: p. 682–716.
28. Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development; *Nature Reviews Endocrinology*. 2014; 10, 293–302. DOI:10.1038/nrendo.2014.29.
29. Freeman H, Cox RD. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet*. 2006; 15: R202–9.
30. Rich S. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes*. 1990; 39: 1315–9.9.
31. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet*. 2006; 368: 29–36.

32. Hunt KJ, Williams K, Rivera D, O'Leary DH, Haffner SM, Stern MP, et al. Elevated carotid artery intima-media thickness levels in individuals who subsequently develop type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1845–50.
33. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993 Feb; 16 (2): 434–44.
34. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Savage PJ. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA.* 2004 Nov 24; 292 (20): 2495–9.
35. Marfella R, Quagliari L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest.* 2001; 108: 635–6.
36. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest.* 2001; 107: 853–860.
37. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414: 813–20.
38. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002; 106: 2067–72.
39. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986; 6: 131–138.
40. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today.* 1993; 14, 506–512. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90267-O.
41. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76: 301–314.
42. Fotis L, Giannakopoulos D, Stamogiannou L, Xatzipsalti M, Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis? *Hormones.* 2012, 11 (2): 140–146.
43. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kübler W, Bode C. Circulating Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Correlates With the Extent of Human Atherosclerosis in Contrast to Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1, E-Selectin, P-Selectin, and Thrombomodulin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 505–512. DOI: 10.1161/01.ATV.17.3.505.
44. Hwang SJ, Ballantyne C, Sharret AC, Smith L, Davis C, Gotto Jr A, Boerwinkle E. Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in Carotid Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease Cases The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 1997; 96: 4219–4225. DOI: 10.1161/01.CIR.96.12.4219.
45. Rohde LE, Lee R, Rivero J, Jamacochian M, Arroyoet L, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager M, Ridker P. Circulating Cell Adhesion Molecules Are Correlated With Ultrasound-Based Assessment of Carotid Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 1765–1770. DOI: 10.1161/01.ATV.18.11.1765.

46. Roep BO, de Vries R, Heidenthal E, Kolb H, Martin S. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Lancet*. 1994; 343: 1590–1593. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)93055-4.
47. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990; 247: 1219–1222.
48. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 1998; 52: 925–933.
49. Pober JS, Gimbrone MA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986; 137 (6): 1893–6.
50. Dustin, ML, Rothlein R, et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*. 1986; 137 (1): 245–54.
51. Rothlein R, Mainolfi EA, et al. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol*. 1991; 147 (11): 3788–93.
52. Teppo AM, von Willebrand E, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation: the origin and role of urinary sICAM-1? *Transplantation*, 2001; 71 (8): 1113–9.
53. Shijubo N, Imai K, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 1994; 95 (1): 156–61.
54. Tsukada N, Matsuda M, et al. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1993; 43 (12): 2679–82.
55. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur. Cytokine Netw*. 2004; 15: 91–98.
56. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998; 351: 88–92. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)09032-6.
57. Becker A, van Hinsbergh VW, et al. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest*. 2002; 32 (1): 1–8
58. Sandberg ET, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17 (8): 1517–20.
59. Blankenberg S, Rupprecht HJ, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104 (12): 1336–42.
60. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics*. 2002; 9: 27–41.
61. Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Pritchard KA Jr. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 585–590.

62. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 1996; 74: 13–33.
63. Vora DK, Rosenbloom CL, Beaudet AL, Cottingham RW. Polymorphisms and Linkage Analysis for ICAM-1 and the Selectin Gene Cluster. *Genomics.* 1994; 21: 473–477. DOI: 10.1006/geno.1994.1303.
64. Ponthieux A, Lambert D, Herbeth B, Drosch S, Pfister M, Visvikis S. Association between Gly241Arg ICAM-1 gene polymorphism and serum sICAM-1 concentration in the Stanislas cohort. *European Journal of Human Genetics.* 2003; 11: 679–686.
65. Borozdenkova S, Smith J, Marshall S, Yacoub M, Rose M. Identification of ICAM-1 polymorphism that is associated with protection from transplant associated vasculopathy after cardiac transplantation. *Human Immunol.* 2001; 62: 247–255.
66. Bielinski SJ, Pankow J, Li N, Hsu FC, Adar SD, Swords N, Donald J, Bowden BA, Wasserman DA. ICAM1 and VCAM1 polymorphisms, coronary artery calcium, and circulating levels of soluble ICAM-1: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2008; 201, 339–344. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.031.
67. Motawi T, Shaker O, Taha N, Raheem MA. Genetic variations in E selectin and ICAM-1: Relation to atherosclerosis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2012; 18, CR381–CR389. DOI: 10.12659/MSM.882908.
68. Li XX, Liu JP, Cheng JQ, Han SH, Geng YJ, Wei S, Gao ST, Huang DN, Nie SF. Intercellular adhesion molecule-1 gene K469E polymorphism and ischemic stroke: a case-control study in a Chinese population. *Molecular Biology Reports.* 2009; Volume 36, Number 6: 1565–1571.
69. Jiang H, Klein RM, Niederacher D, et al. C/T polymorphism of the ICAM-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2002; 84: 171–177.
70. Milutinović A, Petrović D. The K469E polymorphism of the intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene is not associated with myocardial infarction in Caucasians with type 2 diabetes. *Folia Biologica (Praha).* 2006; 52 (3): 79–80.
71. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 1990; 110, 1227–1237. DOI: 10.1083/jcb.110.4.1227.
72. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2005; 118, 4103–4111. DOI: 10.1242/jcs.02541.
73. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005; 437: 426–431
74. Matsumura, T, Wolff, K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J. Immunol. Baltim.* 1997; Md 1950; 158: 3408–3416. ISSN: 0022-1767
75. Piali L, et al. Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 2464–2471. DOI: 10.1002/eji.1830231013.

76. Newton-Nash DK, Newman PJ. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J. Immunol.* Baltim. Md. 1950. 1999; 163: 682–688. ISSN: 0022-1767
77. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003; 24: 327–334.
78. Mahooti S, Graesser D, Patil S, Newman P, Duncan G, Mak T, et al. PECAM-1 (CD31) expression modulates bleeding time in vivo. *Am J Pathol.* 2000; 157: 75–81.
79. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 1996; 334: 286–291. DOI: 10.1056/NEJM199602013340502
80. Sun J, Williams J, Yan HC, Amin KM, Albelda SM, DeLisser HM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J Biol Chem.* 1996; 271: 18561–18570. DOI: 10.1074/jbc.271.31.18561.
81. Wenzel K, Baumann G, Felix SB. The homozygous combination of Leu125Val and Ser563Asn polymorphisms in the PECAM1 (CD31) gene is associated with early severe coronary heart disease, *Hum. Mutat.* 1999; 14: 54
82. Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T. Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947: 259–69; discussion 269–70.
83. Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK, Sethi S, Koh TH, Chatterjee S. Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res.* 2005; 121: 92–9.
84. Reschner H, Milutinović A, Petrović D. The PECAM-1 gene polymorphism – a genetic marker of myocardial infarction *Cent. Eur. J. Biol.* 2009; 4 (4): 515–520.
85. Wei YS, Lan Y, Liu YG, Meng LQ, Xu QQ, Xie HY. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with ischemic stroke, *DNA Cell Biol.* 2009 Mar; 28 (3): 151–8.
86. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 6th edition, Philadelphia. 2007; Elsevier Saunders: 572 str.
87. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May; 31 (5): 969–79. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207415.
88. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 463–493.
89. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 802–815.
90. Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjo A. CXCL16/SR-PSOX is an interferon- γ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 750–75.

91. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 2001a; 104: 1598–603.
92. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* 2006; 12: 1075–1080.
93. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* 2004; 114: 321–327.
94. Girn HRS, Orsi NM, Homer-Vanniasinkam S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vascular Medicine.* 2007; 12: 299–309
95. von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 133–66.
96. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 165–190. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 165–190.
97. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, et al. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999a; 19: 611–616.
98. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2304–10.
99. Schottelius AJG, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS. Interleukin-10 Signaling Blocks Inhibitor of kappa B Kinase Activity and Nuclear Factor kappa B DNA Binding. *J Biol Chem.* 1999; 274: 31.868–74.
100. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999b; 85: e17–24
101. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, et al. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation.* 2001; 104: 746–9.
102. Sato T, Kameyama T, Noto T, Inoue H. Impaired macrophage production of anti-atherosclerotic interleukin-10 induced by coronary intraplaque hemorrhage in patients with acute coronary syndrome and hyperglycemia. *J Diabetes Complications.* 2014 Mar-Apr; 28 (2): 196-202. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2013.10.005. Epub 2013 Oct 18.
103. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, Frolich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RGJ. Low production capacity of interleukin 10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51: 1088–92.
104. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics.* 1997; 46 (2): 120–8.
105. Lio D, Candore G, Crivello A, Scola L, Colonna-Romano G, Cavallone L, et al. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet.* 2004; 41: 790–4.

106. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*. 2003; 75: 711–7.
107. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, et al. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 1841–8.
108. Nath SK, Harley JB, Lee YH. Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet*. 2005; 118: 225–34.
109. Lyon H, Lange C, Lake S, Silverman EK, Randolph AG, Kwiatkowski D, et al. IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. *Genet Epidemiol*. 2004; 26: 155–65.
110. Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14: 1613–8.
111. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafe M, et al. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 21082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha 2308 promoter SNP. *J Med Genet*. 2003; 40: 296–9.
112. Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001; 159: 137–44.
113. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993; 260: 547–9.
114. Huang D, Cancilla MR, Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes Immun*. 2000; 1: 515–20.
115. Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 2421–32.
116. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*. 1998; 187: 2103–8.
117. Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 734–42.
118. Hauer AD, Uyttenhove C, de Vos P, Stroobant V, Renauld JC, van Berkel TJ, et al. Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis. *Circulation*. 2005; 112: 1054–62.
119. Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR, et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine*. 2004; 26: 131–7.

120. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003; 91: 133.
121. Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, in sod. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet.* 2002; 360: 455–9.
122. van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, Bouma G, Killestein J, van Winsen L, et al. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001; 50: 275.
123. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet.* 2007; 80: 273–90.
124. Saruhan-Direskeneli G, Bicakcigil M, Yilmaz V, Kamali S, Aksu K, Fresko I, et al. Interleukin (IL)-12, IL-2, and IL-6 gene polymorphisms in Takayasu's arteritis from Turkey. *Hum Immunol.* 2006; 67: 735–40.
125. Wegner M, Winiarska H, Bobkiewicz-Kozłowska T, Dworacka M. IL-12 serum levels in patients with type 2 diabetes treated with sulphonylureas. *Cytokine.* 2008; 42: 312–6.
126. Timasheva YR, Nasibullin TR, Zakirova AN, Mustafina OE. Association of Interleukin-6, Interleukin-12, and Interleukin-10 Gene Polymorphisms with Essential Hypertension in Tatars from Russia. *Biochemical Genetics.* 2008: Volume 46, Numbers 1-2: 64–74.
127. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 213–24.
128. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2752–61.
129. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14⁺ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1998; 101: 711–21.
130. Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, Grail D, Okamura H, Kurimoto M, Dunn AR, Martin T, Gillespie MT. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Clin Invest.* 1998 Feb 1; 101 (3): 595–603.
131. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1999 Nov; 104 (10): 1393–1401.
132. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70: 281–312.
133. Fantuzzi G, Reed DA, Dinarello CA. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest.* 1999; 104: 761–767.
134. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999; 99: 2503–9.
135. Esposito K, Nappo F, Giugliano D, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, et al. Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1647.

136. Aso Y, Okumura KI, Takebayashi K, Wakabayashi S., Inukai T. Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intima-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26: 2622–7.
137. Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics*. 1998; 51: 161–163.
138. Tired T, Godefroy T, Lubos E, Nicaud V, Tregouet DA, Barbaux S, et al. Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. *Circulation*. 2005; 112: 643–50.
139. Gracie JA, Koyama N, Murdoch J, Field M, McGarry F, Crilly A, et al. Disease association of two distinct interleukin-18 promoter polymorphisms in Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Genes Immun*. 2005; 6: 211–6.
140. Bossu P, Ciaramella A, Moro ML, Bellincampi L, Bernardini S, Federici G, et al. Interleukin 18 gene polymorphisms predict risk and outcome of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78: 807–11.
141. Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 3347–9.
142. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol*. 2001; 112: 146–52.
143. Zhou Y, Yamaguchi E, Hizawa N, Nishimura M. Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005; 22: 105–13.
144. Arimitsu J, Hirano T, Higa S, et al. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342: 1413–6.
145. Zhang N, Yu JT, Yu NN, Lu RC, Ma T, Wang ND, Miao D, Song HJ, Tan L. Interleukin-18 promoter polymorphisms and risk of ischemic stroke Original Research Article *Brain Research Bulletin*. 2010 5 April; Volume 81, Issue 6: 590–594.
146. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke*. 2006 Jan; 37 (1): 87–92.
147. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, 1987–1993. *Am J Epidemiol*. 1997; 146 (6): 483–94.
148. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997; 96 (5): 1432–7.
149. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson Jr SK, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999; 340 (1): 14– 22.

150. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Naqvi T, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 34 (4): 290-6. DOI: 10.1159/000343145. Epub 2012 Nov 1.
151. Veller MG, Fisher CM, Nicolaidis AN. Measurement of the ultrasonic intima-media complex thickness in normal subjects. *J Vasc Surg.* 1993; 17: 719–725.
152. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation.* 1993; 87 (suppl II): II-56–II-65.
153. Amarenco P, Labreuche J, Lavallee P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke.* 2004; 35 (12): 2902–9.
154. Burke GL, Evans GW, Riley WA, Sharrett AR, Howard G, Barnes RW, Rosamond W, Crow RS, Rautaharju PM, Heiss G. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke.* 1995 Mar; 26 (3): 386–391.
155. Montauban van Swijndregt AD, Elbers HR, Moll FL, de Letter J, Ackersta RG. Ultrasonographic characterization of carotid plaques. *Ultrasound Med Biol.* 1998; 24: 489–93.
156. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises, part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 2003; 107: 346–354.
157. Gomes MB, Giannella-Neto D, Faria M, Tambascia M, Fonseca RM, Rea R, et al. Estimating cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes: a national multicenter study in Brazil. *Diabetol Metab Syndr.* 2009; 1: 22.
158. Doll R, Peto R, Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *BMJ.* 1976; 2: pp. 1525–1536.
159. Fagard RH. Smoking Amplifies Cardiovascular Risk in Patients With Hypertension and Diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 32: S429–31.
160. Bonadonna RC, Groop L, Kraemer N, et al. Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism.* 1990; 39: 452–459.
161. Sowers JR, Epstein M, Edwards D, Frohlich ED. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease. *Hypertension.* 2001; 37: 1053-1059 doi: 10.1161/01.HYP.37.4.1053.
162. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Reviews* 1997; 5: 294-315.
163. Bruno G, Fornengo P, Novelli G, Panero F, Perotto M, Segre O, Zucco C, Deambrogio P, Bargero G, Perin PC. C-reactive protein and 5-year survival in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. *Diabetes.* 2009; 58: 926–33.

164. Lee HJ, Her SH, Im YS, Won KY, Yoo SH, Kim DB, et al. Significance of inflammatory markers in diabetic patients with stable coronary artery disease. *Korean J Intern Med.* 2009; 24: 212–9.
165. Mohan V, Ravikumar R, Shanthi Rani S, Deepa R. Intimal medial thickness of the carotid artery in south Indian diabetic and nondiabetic subjects: the Chennai Urban Population study (CUPS). *Diabetologia.* 1998; 433: 494–499.
166. Yokoyama H, Tahara H, Emoto M, Fujiwara S, Araki T, Shinohara K, Maeno T, Shoji T, Koyama H, Shoji T, Nishizawa Y. The K469E polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene is associated with plasma fibrinogen level in type 2 diabetes. *Metabolism.* 2005; 54: 381–386.
167. Ley K, Miller YI, Hedrick, CC. Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 1506–1516.
168. Pradhan, AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1, Soluble Vascular Adhesion Molecule-1, and the Development of Symptomatic Peripheral Arterial Disease in Men. *Circulation.* 2002; 106: 820–825.
169. Tanne D, et al. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Risk of Future Ischemic Stroke A Nested Case-Control Study From the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Cohort. *Stroke.* 2002; 33: 2182–2186.
170. Tang W, et al. Association of sICAM-1 and MCP-1 with coronary artery calcification in families enriched for coronary heart disease or hypertension: the NHLBI Family Heart Study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2007; 7: 30.
171. Casasnovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95: 4134–4139.
172. Sarecka-Hujar B, Zak I, Krauze J. Interactions between rs5498 polymorphism in the ICAM1 gene and traditional risk factors influence susceptibility to coronary artery disease. *Clin. Exp. Med.* 2009; 9: 117–124.
173. Gaetani E, et al. The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 2002; 13: 483–488.
174. Shaker O, et al. Role of ICAM-1 and E-selectin gene polymorphisms in pathogenesis of PAOD in Egyptian patients. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 9–15.
175. Li D, Qu C, Dong P. The ICAM-1 K469E polymorphism is associated with the risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *Coron Artery Dis.* 2014 Dec;25(8):665-70
176. Pola, R. et al. Synergistic Effect of -174 G/C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter and 469 E/K Polymorphism of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene in Italian Patients With History of Ischemic. *Stroke.* 2003; 34: 881–885.
177. Zhang MJ, Zhang M, Yin YW, Li BH, Liu Y, Liao SQ, Gao CY, Li JC, Zhang LL. Association between intercellular adhesion molecule-1 gene K469E polymorphism and the risk of stroke in a Chinese population: a meta-analysis. *Int J Neurosci.* 2015 Mar;125(3):175-85. doi: 10.3109/00207454.2014.919916. Epub 2014 Jun 6
178. McGlinchey PG, et al. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using

- family-based tests of association. *Eur. J. Immunogenetics Off. J. Br. Soc. Histocompat. Immunogenetics*. 2004; 31: 201–206.
179. Chou CH, Ueng KC, Liu YF, Wu CH, Yang SF, Wang PH. Impact of Intercellular Adhesion Molecule-1 Genetic Polymorphisms on Coronary Artery Disease Susceptibility in Taiwanese Subjects. *Int J Med Sci*. 2015 Jun 9;12(6):510-6.
 180. DeGraba, TJ, et al. Increased Endothelial Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Symptomatic Versus Asymptomatic Human Carotid Atherosclerotic Plaque. *Stroke*. 1998; 29: 1405–1410.
 181. Nuotio K, Lindsberg PJ, Carpén O, Soenne L, Lehtonen-Smeds EMP, Saimanen E, Lassila R, Sairane T, Sarna S, Salonen O, Kovanen PT, Kaste M. Adhesion molecule expression in symptomatic and asymptomatic carotid stenosis. *Neurology*. 2003; 60: 1890–1899. DOI: 10.1212/01.WNL.0000065914.33177.9E.
 182. Abel M, Cellier C, Kumar N, Cerf-Bensussan N, Schmitz J, Caillat-Zucman S. Adulthood-onset celiac disease is associated with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphism. *Hum Immunol*. 2006; 67: 612–617.
 183. Ren Z, Ji N, Jia K, Wang L, Gu HF, Ma J. Association of the intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms with type 2 diabetes and diabetic peripheral neuropathy in a Chinese Han population. *Genes and Genomics*. January 2015, Volume 37: 69–75.
 184. Brown BD, Nsengimana J, Barrett JH, Lawrence RA, Steiner L, Cheng S, Bishop TD, Samani N, Ball SG. An evaluation of inflammatory gene polymorphisms in sibships discordant for premature coronary artery disease: the GRACE-IMMUNE study, *BMC Medicine*. 2010 December; 8: 5.
 185. Braun C, Zahn R, Martin K, Albert E, Folwaczny C. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with inflammatory bowel disease, regardless of the p-ANCA status. *Clin Immunol*. 2001; 101: 357–360.
 186. Yang H. Analysis of ICAM-1 gene polymorphism in immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Exp Clin Immunogenet*. 1997; 14: 214–225.
 187. Macchioni P, Boiardi L, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Salvarani C: Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene polymorphisms in Italian patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18: 553–558.
 188. Nejentsev S, Guja C, McCormack R, Cooper J, Howson JM, et al. Association of intercellular adhesion molecule-1 gene with type 1 diabetes. *Lancet*. 2003; 362: 1723–1724.
 189. Stevens HY, Melchior B, Bell KS, Yun S, Yeh JC, Frangos JA. PECAM-1 is a critical mediator of atherosclerosis. *Disease Models & Mechanisms*. 2008; 1: 175–181. DOI:10.1242/dmm.000547.
 190. Serebruany VL, Murugesan SR, Pothula A, Atar D, Lowry DR, O'Connor CM, Gurbel PA. Increased soluble platelet/endothelial cellular adhesion molecule-1 and osteonectin levels in patients with severe congestive heart failure. Independence of disease etiology, and antecedent aspirin therapy. *Eur J Heart Fail*. 1999; 1: 243–249. ISSN: 1388–9842.
 191. Shalia KK, Mashru MR, Soneji SL, Shah VK, Payannavar S, Walvalkar A, Mokal RA, Mithbawkar SM, Kudalkar KV, Abraham A, Thakur PK, Leucine125Valine (Leu125Val) Gene Polymorphism of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) and Myocardial Infarction in Indian Population. *Ind J Clin Biochem*. 2010 July-Sept; 25 (3): 273–279. DOI 10.1007/s12291-010-0063-5.

192. Listì F, Caruso C, Di Carlo D, Falcone C, Boiocchi C, Cuccia M, Candore G. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule-1 polymorphisms and atherosclerosis: results of a study on patients from northern Italy. *Rejuvenation Res.* 2010; 13: 237–41. DOI: 10.1089/rej.2009.0940.
193. Gardemann A, Knapp A, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. No evidence for the CD31 C/G gene polymorphism as an independent risk factor of coronary heart disease. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 629. ISSN 0340-6245.
194. Herrera CL, Jaramillo PC, Lanás F, Salazar LA. Polymorphism C373G of the PECAM-1 Gene in Chilean Subjects with Coronary Disease and Controls. *Int J. Morphol.* 2007. 25 (2): 439–444. DOI: 10.4067/S0717-95022007000200031.
195. Xia T, Liu X, Du CJ, Jin X, Kong XQ, Li G. Association of Leu125Val polymorphisms in the PECAM-1 gene with the risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8 (2): 2219-2225. ISSN: 1940-5901.
196. Malarstig A, Eriksson P, Hamsten A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart.* 2008; 94: 724–9.
197. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm C, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons M, et al. Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 107: 2109–14.
198. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafe M, Cavallone L, Franceschi C, Caruso C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun.* 2002; 3: 30–3.
199. Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphism influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation and host specific colonization during *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2004; 53: 1082–9.
200. Keijsers V, Verweij CL, Westendorp RGJ, Breedveld FC, Huizinga TWJ. IL10 polymorphisms in relation to production and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40 Suppl: S179–S179.
201. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL10 promoter affect IL10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2001; 166: 3915–22.
202. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24: 1–8.
203. Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int Suppl.* 2003; 84: S76–9. K.
204. Liang, S.R. Dong, H. Peng. Association between IL-10-G1082A polymorphisms and the development of coronary artery disease in a Chinese population; *Genet. Mol. Res.*, April 2016, 15 (2)
205. Xuan Y, Wang L, Zhi H, Li X, Wei P. Association Between 3 IL-10 Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease Risk: Systematic Review With Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis, *Medicine*: February 2016 - Volume 95 - Issue 6 - p e2846

206. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995; 91: 2844–2850.
207. Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, Kjekshus J, Froland SS, Aukrust P. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNFalpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002; 32: 803–810.
208. Trinchieri G. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immuno-regulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994; 84: 4008–27.
209. Morita Y, Gupta R, Seidl KM, McDonagh KT, Fox DA. Cytokine production by dendritic cells genetically engineered to express IL-4: induction of Th2 responses and differential regulation of IL-12 and IL-23 synthesis. *J Gene Med.* 2005; 7: 869–77.
210. Mangino M, Braund P, Singh R, Steeds R, Stevens S, Channer KS, et al. Association analysis of IL-12B and IL-23R polymorphisms in myocardial infarction. *J Mol Med.* 2008; 86: 99–103.
211. Dinarello CA. Interleukin 18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol.* 2007; 27: 98–114.
212. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schönbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002; 195: 245–257.
213. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E (-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res.* 2002; 90: E34–E38.
214. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schönbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002; 195: 245–257.
215. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufils P, et al. Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes. *Heart.* 2002; 88: 467–9.
216. Blankenberg S, Rupprecht HJ, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 104 (12): 1336–42.
217. Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, Furukado S, Hougaku H, Nagai Y, et al. Associations of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1458–62.
218. Chapman CM, McQuillan BM, Beilby JP, Thompson PL, Hung J. Interleukin-18 levels are not associated with subclinical carotid atherosclerosis in a community population. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Atherosclerosis.* 2006 Dec; 189 (2): 414–9. Epub 2006 Jan 24.
219. Jefferis BJ, Whincup PJ, Welsh P, Wannamethee SG, Rumley A, Ebrahim S, Lawlor DA, Lowe GDO. Prospective study of IL-18 and risk of MI and stroke in men and women aged 60–79 years: A nested case-control study *Cytokine.* 2013 Feb; 61 (2): 513–520.

220. Yuen CM, Chiu CA, Chang LT, Liou CW, Lu CH, Youssef AA, Yip HK. Level and value of interleukin-18 after acute ischemic stroke, *Circ J*. 2007 Nov; 71 (11): 1691–6.
221. Thorand B, Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C, et al. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984–2002. *Diabetes*. 2005; 54: 2932–8.
222. Khripko OP, Sennikova NS, Lopatnikova JA, Khripko JI, Filipenko ML, Khrapov EA, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with production of IL-18 protein by mononuclear cells from healthy donors. *Mediators Inflamm*. 2008; 2008: 309721.
223. Zhang MJ, Zhou Y, Wang X, Chen X, Pi Y, Guo L, Gao CY, Li JC. Zhang LL: Interleukin-18 gene promoter 607A polymorphism, but not 137C polymorphism, is a protective factor for ischemic stroke in the Chinese population: A meta-analysis. *Meta Gene*. 2016 Jun 29;9:165-72. doi: 10.1016/j.mgene.2016.06.006.
224. Opstad T, Pettersen A, Harald Arnesen H, Seljeflot I, Circulating levels of IL-18 are significantly influenced by the IL-18 +183 A/G polymorphism in coronary artery disease patients with diabetes type 2 and the metabolic syndrome: an Observational Study *Cardiovasc Diabetol*. 2011; 10: 110.
225. Liang XH, Cheung W, Heng CK, Wang DY. Reduced transcriptional activity in individuals with IL-18 gene variants detected from functional but not association study. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338: 736–741.
226. Hernesniemi JA, Karhunen PJ, Rontu R, Ilveskoski E, Kajander O, Goebeler S, et al. Interleukin-18 promoter polymorphism associates with the occurrence of sudden cardiac death among Caucasian males: The Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis*. 2008; 196: 643–9.
227. Hernesniemi JA, Karhunen PJ, Oksala N, Kähönen M, Levula M, Rontu R, et al. Interleukin 18 gene promoter polymorphism: a link between hypertension and pre-hospital sudden cardiac death: the Helsinki Sudden Death Study. *Eur Heart J*. 2009; 30: 2939–46.
228. Rajesh Kumar G, Mrudula Spurthi K, Kishore Kumar G, Mohanalatha Kurapati, Saraswati M, Mohini Aiyengar T, Chiranjeevi P, Srilatha Reddy G, Nivas S, Kaushik P, Sanjib Sahu K, Surekha Rani H. Evaluation of Hs-CRP Levels and Interleukin 18 (-137G/C) Promoter Polymorphism in Risk Prediction of Coronary Artery Disease in First Degree Relatives. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):e0127609. doi: 10.1371/journal.pone.0127609. eCollection 2015
229. Pei F, Han Y, Zhang X, Yan C, Huang M, Huang L, et al. Association of interleukin-18 gene promoter polymorphisms with risk of acute myocardial infarction in northern Chinese Han population. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47: 523–9.
230. Kathiresan S, Newton-Cheh C, Gerszten RE. On the interpretation of genetic association studies. *Eur Heart J*. 2004; 25: 1378–81.
231. Burgess S, Adam Butterworth A, Malarstig A, Simon G Thompson SG. Use of Mendelian randomisation to assess potential benefit of clinical intervention *BMJ* 2012;345:e7325
232. P. Deloukas, S. Kanoni, C. Willenborg, the CARDIoGRAMplusC4D Consortium, *et al* Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease; *Nat Genet*, 45 (2013), pp. 25–33.

233. Xie G, Myint PK, Voora D, Laskowitz DT, Shi P, Ren F, Wang H, Yang Y, Huo Y, Gao W, Wu Y. Genome-wide association study on progression of carotid artery intima media thickness over 10 years in a Chinese cohort. *Atherosclerosis*. 2015 Nov;243(1):30-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.034. Epub 2015 Sep 5.
234. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdóttir S, Jonsdóttir T, Palsson S, Einarsdóttir H, Gunnarsdóttir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdóttir U, Kong A, Stefansson K.; A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007 Jun 8;316(5830):1491-3. Epub 2007 May 3.
235. Erbilgin A, Civelek M, Romanoski CE, Pan C, Hagopian R, Berliner JA, Lusis AJ. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. *J Lipid Res* 2013 Jul; 54(7): 1894–1905. doi: 10.1194/jlr.M037085.
236. Pare G, Ridker PM, Rose L, Barbalic M, Dupuis J, Dehghan A, Bis JC, Benjamin EJ, Shiffman D, Parker AN, Chasman DI. Genome-Wide Association Analysis of Soluble ICAM-1 Concentration Reveals Novel Associations at the *NFKB1K1*, *PNPLA3*, *RELA*, and *SH2B3* Loci. *PLoS Genet*. 2011 Apr; 7(4): e1001374. doi: 10.1371/journal.pgen.1001374.
237. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic Mapping in Human Disease. *Science*. 2008 Nov 7; 322(5903): 881–888. doi: 10.1126/science.1156409.
238. Paré G, Chasman DI, Kellogg M, Zee RYL, Rifai N, Badola S, Miletich JP, Ridker PM. Novel Association of ABO Histo-Blood Group Antigen with Soluble ICAM-1: Results of a Genome-Wide Association Study of 6,578 Women. *PLoS Genet*. 2008 Jul; 4(7): e1000118. Published online 2008 Jul 4. doi: 10.1371/journal.pgen.1000118.
239. Matarín M, Brown MW, Scholz S, Simón-Sánchez J, Fung H-C, Hernandez D, Gibbs RJ, De Vrieze FW, Crews C, Angela Britton A, Langefeld CD, Brott TG, Brown RD Jr, Worrall BB, Frankel M, Silliman S, L Douglas Case DL, Singleton A, Hardy JA, Rich SS, Mesina JF. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke initial analysis and data release. *Lancet Neurol*. 2007 May; 6(5): 414–420. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70081-9.
240. Meschia JF, Singleton A, Nalls MA, Rich SS, Sharma P, Ferrucci L, Matarin M, Hernandez DG, Pearce K, Brott TG, Brown RD Jr, Hardy J, Worrall BB. Genomic risk profiling of ischemic stroke: results of an international genome-wide association meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(9):e23161. doi: 10.1371/journal.pone.0023161. Epub 2011 Sep 21.
241. Ahlqvist E, van Zuydam NR, Groop LC, McCarthy MI. The genetics of diabetic complications. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 31 March 2015; doi:10.1038/nrneph.2015.37.
242. Malley JD, Dasgupta A, Moore JH. The limits of p-values for biological data mining *BioData Mining* 2013, 6:10.
243. Melton PE, Carless MA, Curran JE, Dyer TD, Göring HH, Kent JW, Drigalenko E, Johnson MP, MacCluer JW, Moses EK, Comuzzie AG, Mahaney MC, O'Leary DH, Blangero J, Almasy L. Genetic Architecture of Carotid Artery Intima-Media Thickness

in Mexican Americans. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:211-221; originally published online March 13, 2013;

244. Nikpay M, Goel A, Won H-H, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, Saleheen D, Kyriakou T, Nelson CP, Hopewell JC, Webb TR, Zeng L, Dehghan A et al. A comprehensive 1000 Genomes–based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease *Nat Genet.* 2015 October ; 47(10): 1121–1130. doi:10.1038/ng.3396.
245. Conde L, Bevanb S, Sitzer M, Kloppd N, Illig T, Thierye J, Seissler J, Baumertg J, Raitakarjih O, Kähöneni M, Lyytikäinenj L-P, Laaksonenj R, Viikari J, Lehtimäkij T, Koernigl W, Halperinm E, Markusb HS. Novel associations for coronary artery disease derived from genome wide association studies are not associated with increased carotid intima-media thickness, suggesting they do not act via early atherosclerosis or vessel remodeling. *Atherosclerosis* 219 (2011) 684–689.
246. Bis JC, Kavousi M, Franceschini N, Isaacs A, Abecasis GR, Schminke U, Post W, Smith AV, Cupples A, Markus HS, Schmidt R, Huffman JE, Lehtimäki T, Baumert J et al. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. *Nat Genet.* ; 43(10): 940–947. doi:10.1038/ng.920.
247. Vargas JD, Manichaikul A, Wang X-Q, Rich SS, Rotter J, Post WS, Polak JF, Budoff MJ, Bluemke DA. Detailed analysis of association between common single nucleotide polymorphisms and subclinical atherosclerosis: The Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Data in Brief* 7(2016)229–242
248. Espeland MA, Craven TE, Riley WA, Corson J, Romont A, Furberg CD. Reliability of longitudinal ultrasonographic measurements of carotid intimal-medial thicknesses. Asymptomatic Carotid Artery Progression Study Research Group. *Stroke.* 1996; 27 (3): 480–5.

RESEARCH

Open Access



Polymorphism rs5498 of the ICAM-1 gene affects the progression of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus

Dražen Popović¹, Jovana Nikolajević Starčević², Marija Šantl Letonja¹, Jana Makuc³, Andreja Cokan Vujkovic³, Ruda Zorc Pleskovič², Ludovit Gaspar^{4*}, Peter Kruzliak^{5*} and Danijel Petrovič^{2*}

Abstract

Background: Adhesion molecules are involved in the development of atherosclerosis. An increased level of the ICAM 1 molecule is associated with numerous inflammatory diseases including atherosclerosis of carotid arteries. The rs5498 (K469E) polymorphism of the ICAM-1 gene leads to an increase in the level of serum ICAM. We investigated the association between the rs5498 (K469E) polymorphism of the ICAM-1 gene and the progression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods: The study included 595 patients with T2DM and 200 subjects in the control group without T2DM. The control examination was made 3.8 years after the initial examination. Indicators of atherosclerosis (carotid intima-media thickness (CMT), total plaque sum and sum of the plaques thickness) were detected by ultrasound examination. Genetic analyses of the polymorphism rs5498 of the ICAM-1 gene were made by RT-PCR.

Results: The distribution of genotypes and frequencies of rs5498 polymorphism was not significantly different between the group with type 2 diabetes (T2DM) and the control group. Genotype EE K469E polymorphism is associated with a statistically significant annual plaques growth.

Conclusion: The EE genotype of the rs5498 of the ICAM-1 gene was associated with a more rapid progression of carotid atherosclerosis in patients with T2DM in comparison with other genotypes.

Keywords: ICAM 1, Polymorphism rs5498, Carotid atherosclerosis, Type 2 diabetes mellitus

Background

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease [1]. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disease. In patients with diabetes, cardiovascular complications are reported about 15 years earlier than in the population without T2DM [2]. It has not been clarified how T2DM affects the development of atherosclerosis.

It was reported that an increase of inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-18 and TNF- α) might cause plaque destabilization [3].

The leukocytes adhesion and their transendothelial migration play an important role in the initial phase of atherogenesis [4]. Processes are regulated by the various types of adhesion molecules, such as the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), the vascular cell adhesion molecule 1 (VACAM 1) and the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM 1). Their expression takes place on the surface of endothelial cells, hematopoietic cells, and immunological cells [5]. The plasma level of adhesion molecules is elevated in individuals with atherosclerosis [6–8]. The level of adhesion molecules in the serum is also elevated in patients with T2DM [9].

* Correspondence: ludovitgaspar@gmail.com; peter.kruzliak@savba.sk; Daniel.petrovic@mfn.uni-lj.si

¹2nd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University and University Hospital, Bratislava, Slovakia

²Laboratory of Structural Biology and Proteomics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

³Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Popović et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ICAM 1 is a transmembrane glycoprotein receptor consisting of 505 amino acids, with molecular weight between 80 and 114 kDa depending on the degree of glycosylation [10]. ICAM 1 belongs to the immunoglobulin superfamily. It acts as a ligand β 2-integrin present on leukocytes. It consists of five extracellular domains, a transmembrane domain and a short cytoplasmic domain [11].

Increased concentrations of sICAM-1 were reported in patients with cardiovascular disease, tumors, autoimmune disease and other diseases with an inflammatory reaction [7, 12, 13]. The gene for ICAM-1 is located on the short arm chromosome 19. It consists of 15 775 base pairs, and it has seven exons and six introns comprising a relatively large non-translation region [14]. Translational start region is located in exon 1 [14].

The literature describes two polymorphisms of the gene for ICAM 1, which affect the expression, K469E (rs 5498) and G241A (rs1799969) [15].

The rs5498 polymorphism in exon 6 of the gene for ICAM-1 affects the structure of ICAM 1 and, consequently, the migration of leukocytes in inflammatory milieu [16]. Motawi et al. found an increased incidence of E alleles K469E polymorphism of ICAM 1 in patients with peripheral and cardiovascular disease compared with the control group [17].

Bjelinski et al. have found an association between the K469E polymorphism and sICAM 1, however, there was no correlation between calcium in coronary arteries and circulating levels of sICAM 1 [18]. Milutinović and Petrović reported that the EE and KK genotype polymorphism K469E for ICAM 1 was not associated with myocardial infarction in patients with T2DM [19]. An increased level of sICAM 1 in the healthy population

represents a risk for future heart attacks according to Ridker et al. [13]. Those studies do not give a clear answer on the relationship between the K469E polymorphism of ICAM 1 and the development of cardiovascular diseases.

The purpose of the study was to investigate an association between the rs5498 polymorphism of the ICAM-1 gene and the progression of carotid atherosclerosis in patients with T2DM.

Methods

Subjects

The study included 595 patients with T2DM and 200 subjects without T2DM. Patients with T2DM were selected from diabetic outpatient departments of the General Hospital Murska Sobota and General Hospital Slovenj Gradec.

Control ultrasound examinations of the neck artery were performed on 426 patients with T2DM and on 132 subjects in the control group. The period between the first and the control ultrasound examination was 3.8 ± 0.5 years.

Patients with myocardial infarction (MI) and ischemic stroke were not enrolled in the study. The study was approved by the National Medical Ethics Committee.

Ultrasound examination

High resolution B mode ultrasound analysis was performed using the portable ultrasound system Toshiba Aplio SSA-700 (Toshiba Medical. System Corp., Tokyo, Japan) connected to a multi-frequency linear array transducer. All examinations were performed by a single expert radiologist. Patients were examined in the supine position with the head tilted backwards. CIMT, defined

Table 1 Initially clinical and biochemical characteristics patients with T2DM and control subjects

	Patients with T2DM <i>n</i> = 595	Subjects without T2DM <i>n</i> = 200	<i>p</i>
Age	61.38 \pm 9.65	60.07 \pm 9.18	0.07
Male sex (%)	338 (56.8)	92 (46.0)	0.008
Duration T2DM	11.25 \pm 7.88	-	-
Smoking (%)	53 (8.91)	34 (17.0)	0.002
Waist circumference (cm)	108.65 \pm 12.88	93.31 \pm 13.18	<0.001
BMI (kg/m ²)	30.96 \pm 4.74	27.90 \pm 4.42	0.16
systolic pressure (mm Hg)	146.98 \pm 19.98	143.3 \pm 16.6	0.86
Diastolic pressure (mm Hg)	85.75 \pm 11.62	84.7 \pm 11.6	0.19
Fasting glucose (mmol/L)	8.04 \pm 2.57	5.27 \pm 0.87	<0.001
HbA1c (%)	7.89 \pm 3.56	4.79 \pm 0.29	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.70 \pm 1.19	5.36 \pm 1.08	<0.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.19 \pm 0.35	1.43 \pm 0.37	<0.001
LDL cholesterol (mmol/L)	2.63 \pm 0.94	3.24 \pm 0.98	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.9 (1.2–2.7)	1.3 (0.9–1.9)	<0.001
High sensitivity CRP (mg/L)	2.2 (1.0–4.3)	1.3 (0.8–2.7)	<0.001

Table 2 Changes in echo markers of carotid atherosclerosis in patients with T2DM and control subjects between the first and control echo examination after 3.8 ± 0.5 years

	Patients with T2DM n = 426	Subjects without T2DM n = 137	p
Annual CIMT increment (µm/year)	20.33 (11.74–29.86)	12.83 (8.82–20.66)	0.02
Δ number of plaque segments	2.0 (1.0–3.0)	1.5 (0.7–2.2)	0.03
Δ sum of the plaques thickness (mm)	5.40 (2.40–7.05)	3.64 (2.88–5.48)	0.02

Δ- variable value changes during the observation period, expressed as a percentage of baseline values

as the distance from the leading edge of the lumen-intima interface to the leading edge of the media-adventitia interface, was measured at three sites along the 10 mm long segment of the far wall of the common carotid artery (CCA) free of plaques in agreement with the carotid intima-media thickness consensus [20]. CIMT on the left and on the right were calculated as the mean of three readings, and the mean of the left and right CCA-CIMT measurements was used in the analysis. For the purpose of logistic regression analysis we divided all the patients into two subgroups according to the median CIMT value.

Biochemical analysis

Blood samples for biochemical analyses: fasting glucose, glycated haemoglobin (HbA1c), total cholesterol, triglyceride levels, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol level were collected after a 12 h fasting period. All blood biochemical analyses were determined by standard biochemical methods in the hospital’s accredited lab.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from 100 µL of whole blood using a FlexiGene DNA isolation kit, in accordance with the recommended protocol (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The rs5498 polymorphism of the ICAM-1 gene was determined with real-time PCR using StepOne™ (48-well) Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We used the commercially available genotyping kit TagMan SNP Genotyping assay (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) following the manufacturer’s instructions. Moreover, we used the following primers: -5’-CCATCGGGGAAT-CAGTG-3’; -5’-ACAGAGCACATTACGGTC-3’.

Statistical analysis

Normality of distribution continuous variables was examined by using the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables which were normally distributed, showed in the form of means ± standard deviations. Variables that were not in normal distribution, were presented in the form of median (interquartile range). To compare the numerical values of the continuous variables, we used Student’s *t* test or analysis of variance (ANOVA), if the variables were normally distributed. Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis H test if the variables were asymmetrically distributed. To compare frequencies categorical variables, statistical evaluation of differences in the frequencies of different alleles and genotypes between the two groups as well as in the case of determining the Hardy-Weinberg equilibrium, were used χ² test.

The correlation between independent variables were analyzed using the Pearson correlation analyzes. The results showed a high degree of correlation between the serum levels of total and LDL cholesterol (*r* = 0.86; *p* < 0.001) as well as systolic and diastolic blood pressure (*r* = 0.65, *p* < 0.001). In the cases of a high degree correlation between the two variables only one variable from each pair were included in the multivariate statistical models. Change in the value of ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis was calculated by deducting between value measured at two ultrasound examination.

For searching association between polymorphisms of selected candidate genes and their interactions with statins treatment and indicators of progression carotid artery atherosclerosis were used multivariate linear regression analysis. The criteria for a statistically significant difference is *p* value less then 0.05. To reduce the possibility of error due to the small number of subjects were used Bonferronis correction. All statistical analyzes

Table 3 Distribution of rs5498 genotypes for ICAM-1 in patients with T2DM and control subjects without T2DM

	Patients with T2DM n = 595	Subjects without T2DM n = 200	p
KK genotype	172 (28.9)	59 (29.5)	0.87
EK genotype	306 (51.4)	105 (52.5)	
EE genotype	117 (19.7)	36 (18.0)	
K allele	650 (54.6)	223 (55.8)	0.69
E allele	540 (45.4)	177 (44.2)	

Table 4 Changes in ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis in subjects with T2DM and without T2DM between the first and second ultrasound examination of the carotid arteries according to rs5498 ICAM genotypes

	KK genotype	KE genotype	EE genotype	<i>p</i>
Subjects with T2DM				
Annual CIMT increment (µm/year)	12.76 (5.26–23.96)	20.34 (12.50–28.04)	26.09 (20.69–32.42)	0.04
Δ number of plaque segments	1.0 (0.5–3.0)	2.0 (1.0–2.5)	3.0 (2.0–3.0)	0.65
Δ sum of the plaques thickness (mm)	4.3 (1.4–7.8)	5.4 (1.55–10.15)	6.3 (2.3–8.1)	0.62
Subjects without T2DM				
Annual CIMT increment (µm/year)	10.22 (6.72–17.85)	13.47 (10.24–19.66)	16.46 (10.32–21.82)	0.12
Δ number of plaque segments	1.0 (0.5–3.0)	2.0 (1.0–3.0)	2.0 (1.0–3.0)	0.42
Δ sum of the plaques thickness (mm)	2.8 (1.3–6.2)	3.8 (1.40–6.08)	4.5 (1.8–6.64)	0.58

Δ- variable value changes during the observation period, expressed as a percentage of baseline values

were performed using a computer program SPSS for Windows, version 20 (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Basic clinical characteristics and biochemical laboratory results are shown in Table 1. There were no statistically significant differences in age, body mass index, systolic and diastolic blood pressure between the group with T2DM and the control group. Waist circumference was significantly higher in the T2DM group, as well as the number of smokers (Table 1). A biochemical examination in patients with T2DM showed statistically significant higher levels of fasting glucose, HbA1c, total cholesterol, HDL, LDL, triglyceride and CRP-a compared with the control group (Table 1).

A control ultrasound examination of the carotid artery was made 3.8 ± 0.5 years after the initial examination. The progression of atherosclerotic markers (change in annual CIMT, change in the number of plaque segments, and change in the sum of the plaque thickness) was more intense in subjects with T2DM in comparison with subjects without T2DM (Table 2).

The distribution of rs5498 genotypes in patients with T2DM and the control group are presented in Table 3. There are no statistically significant differences in the distribution of genotypes in patients with T2DM and the control group. The distribution of genotypes in the population of patients with T2DM was in Hardy-

Weinberg equilibrium (SB2: $\chi^2 = 0.83$; $p = 0.36$; healthy controls: $\chi^2 = 0.82$; $p = 0.36$).

Ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis in patients with T2DM were compared between the first and the second examination in comparison to the rs5498 genotypes. There was a statistically significant difference in the annual increment of CIMT with regard to rs5498-ICAM genotypes, i.e. subjects with T2DM with the EE genotype had the biggest enlargement of CIMT per year in comparison with other genotypes (Table 4). We did not demonstrate, however, a statistically significant differences in subclinical markers of carotid atherosclerosis with regard to rs5498-ICAM genotypes in subjects without T2DM (Table 4).

Table 5 demonstrates the effect of rs5498 genotypes on progression of markers of carotid atherosclerosis in patients with T2DM due to statin treatment. We demonstrated the EE genotype of the rs5498 to be associated with higher statistically significant annual increment of CIMT in subjects with T2DM that were not on statin treatment.

Table 6 shows the relation in incidence of unstable plaques in patients with T2DM, adjusted to the classical risk factors for atherosclerosis and genotypes K469E polymorphism for ICAM 1 upon the inclusion in the study. When adjusted to other risk factors, the rs5498 EE genotype had an independent effect on the presence of unstable plaques on the carotid artery.

Table 5 Association of ICAM-1 polymorphism with carotid atherosclerosis progression in patients with T2DM due to statin treatment

	Statin treatment	KK genotype	KE genotype	EE genotype	<i>p</i>
Annual CIMT increment (µm/year)	+	11.77 (6.24–16.19)	18.06 (14.45–23.08)	22.62 (17.81–29.48)	0.13
	-	14.27 (10.22–19.32)	21.28 (15.21–28.27)	28.04 (24.32–32.56)	0.04
Δ sum of the plaques thickness (mm)	+	3.76 (2.8–5.40)	4.69 (3.68–5.12)	5.86 (4.16–7.68)	0.30
	-	4.92 (3.76–6.48)	6.40 (4.66–8.02)	6.93 (4.76–8.31)	0.74
Δ number of plaque segments	+	1.0 (0.5–2.0)	1.5 (1.0–3.0)	2.0 (1.0–3.0)	0.23
	-	1.0 (0.5–2.0)	2.0 (1.0–3.0)	3.0 (0.5–3.0)	0.57

Table 6 Adjusted analysis of rs5498-ICAM gene polymorphism and the presence of plaques/unstable plaques in the carotid arteries in patients with T2DM upon the inclusion in the study

	Presence of the plaques		Presence of the unstable plaques	
	OR (95 % CI)	<i>p</i>	OR (95 % CI)	<i>p</i>
Hypertension (0 = no; 1 = yes)	2.43	0.25	1.56	0.38
Systolic pressure (mmHg)	0.12	0.44	0.17	0.37
Serum LDL (mmol/L)	1.45	0.32	1.22	0.71
Serum HDL (mmol/L)	0.15	0.03	0.48	0.76
Hba1c (%)	0.72	0.10	1.14	0.49
KE	0.97	0.49	0.74	0.17
EE	0.85	0.51	1.69	0.03

All models were adjusted by age, sex, smoking, and treatment with statins. The reference group are homozygotes for allele K

Table 7 shows the results of multiple linear regression, adjusted to classic risk factors for atherosclerosis and rs5498-ICAM genotypes. When adjusted to other risk factors, the rs5498 EE genotype had an independent effect on the annual enlargement of CIMT in subjects with T2DM.

Discussion

An association between the rs5498 polymorphism of the ICAM-1 gene and the progression of carotid atherosclerosis in subjects with T2DM was demonstrated in the present study. We found an association between the EE genotype of rs5498-ICAM-1 and the annual increment of CIMT. Moreover, a regression analysis demonstrated an association between the EE genotype of rs5498-ICAM-1 and the presence of unstable plaques in the carotid arteries. Our study is the first to establish an association between the rs5498-ICAM-1 and the progression of carotid atherosclerosis. ICAM-1, produced by endothelial cells during inflammatory reactions, is involved in the adhesion reaction of monocytes, macrophages, T lymphocytes, and platelets to each other and to the vessel wall, which all favour the atherosclerotic process [21]. Moreover, ICAM-1 is involved in the interaction through intergrin receptors on leukocytes which enabled

the binding to endothelial cells and transendothelial migration of leukocytes in the intima and leukocytes accumulations in vascular wall [14].

Several studies support the hypothesis that the ICAM 1 might influence the development of atherosclerosis. Pola and co-workers demonstrated that the EE genotype of the rs5498 was twice as frequent in patients with CVI than in the control group, indicating the the rs5498 was a genetic risk for ischemic stroke [22]. The association between the rs5498 polymorphism and coronary heart disease was not demonstrated in Caucasians in Ireland and Slovenia [19, 23]. In epidemiological studies in a seemingly healthy population, elevated levels of sICAM-1 were reported to be associated with an increased risk for the development of cardiovascular disease, peripheral vascular disease, carotid artery disease and cerebrovascular stroke [7, 13, 24, 25]. Tang and co-workers reported that the level of serum ICAM-1 was associated with calcium score as a marker of coronary atherosclerosis. Moreover, they concluded that sICAM-1 might be a biomarker for coronary atherosclerosis [26]. Gaetan et al. in the Italian population and Shaker et al. in the Egyptian population reported that the EE genotype of the rs5498 was significantly more

Table 7 Relation between genotypes K469E polymorphism for ICAM 1 gene and the progress of carotid artery atherosclerosis in patients with T2DM

	ΔCIMT/year		Δ Plaques segments		Δ Sum of the plaques thickness	
	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>
Hypertension (0 = no; 1 = yes)	1.45	0.35	1.26	0.64	1.46	0.92
Systolic pressure (mmHg)	0.12	0.44	0.08	0.32	0.45	0.48
Serum LDL (mmol/L)	0.32	0.40	0.07	0.69	0.53	0.41
Serum HDL (mmol/L)	-0.04	0.18	-0.51	0.34	-0.39	0.90
Hba1c (%)	0.89	0.70	0.13	0.43	0.68	0.28
KE	1.37	0.49	0.74	0.17	1.14	0.37
EE	3.69	0.03	0.25	0.51	1.31	0.62

All models were adjusted by age, sex, smoking, and treatment with statins. The reference group are homozygotes for allele K

frequent in patients with peripheral arterial occlusive disease than in the control group [27, 28].

Finally, in the study we demonstrated the EE genotype of the rs5498 to be associated with higher statistically significant annual increment of CIMT in subjects with T2DM that were not on statin treatment.

The rs5498-ICAM-1 polymorphism was reported to be associated with an increased expression of ICAM-1 in our study in which subjects with T2DM with diabetic retinopathy were enrolled [29]. Namely, significantly higher sICAM-1 serum levels were demonstrated in Caucasian subjects with T2DM with the EE genotype compared with those with other (EK + KK) genotypes (918 ± 104 vs. 664 ± 209 microg/L; $P = 0.001$) [29]. We presume that the increased expression of ICAM-1 might lead to an increased leukocytes adhesion to the vessel wall endothelium and the atherosclerotic process [30]. In their study, De Graba et al. found an increased expression of ICAM-1 in symptomatic in comparison to asymptomatic plaques [31]. Contrary to this report, however, Nuotio and co-workers did not report about an increased expression of ICAM 1, VACAM 1, E-selectin and P-selectin in symptomatic carotid plaques [32]. The rs5498 of the ICAM-1 gene results in a change in the amino acid sequence of the immunoglobulin-like domain 5. This domain is of crucial importance for the activity of the ICAM-1 protein [33]. We speculate that the EE genotype might affect the development of atherosclerotic markers via increased sICAM-1 serum activity.

Conclusion

In our study, the EE genotype of the rs5498 of the ICAM-1 gene was associated with a more rapid progression of carotid atherosclerosis in subjects with T2DM in comparison with other genotypes.

Statement of human and animal rights

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

Statement of informed consent

Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

Competing interest

All authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DP, JNS, MSL, JM, DP have participated in study conception and design; DP, JNS, MSL, JM, ACV, RZP have been responsible for acquisition of data, analysis and interpretation of data; DP, JNS, MSL, PK, DP have been involved in drafting the paper; PK, LG revised the final draft of manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

The authors thank Mrs. Brina Bešković, BA, for revising the English.

Author details

¹General Hospital Rakičan, Murska Sobota, Slovenia. ²Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. ³General Hospital Slovenj Gradec, Slovenj Gradec, Slovenia. ⁴2nd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University and University Hospital, Bratislava, Slovakia. ⁵Laboratory of Structural Biology and Proteomics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic.

Received: 1 March 2016 Accepted: 13 April 2016

Published online: 18 April 2016

References

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801–9.
- Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet*. 2006;368:29–36.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002;106:2067–72.
- Cybulska M, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788–91.
- Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993;14:506–12.
- Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kübler W, Bode C. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:505–12.
- Hwang S-J, Ballantyne C, Sharret AC, Smith L, Davis C, Gotto Jr A, Boerwinkle E. Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) Study. *Circulation*. 1997;96:4219–25.
- Rohde LE, Lee R, Rivero J, Jamacochian M, Arroyoet L, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager M, Ridker P. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1765–70.
- Roep BO, de Vries R, Heidenthal E, Kolb H, Martin S. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1994;343:1590–3.
- Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White 2nd GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247:1219–22.
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 1988;52:925–33.
- Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw*. 2004;15:91–8.
- Ridker PM, Hennekens CH, Rimm JB, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88–92.
- Van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 1996;74:13–33.
- Vora DK, Rosenbloom CL, Beaudet AL, Cottingham RW. Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster. *Genomics*. 1994;21:473–7.
- Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron C, Dustin M. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med*. 1995;182:1231–41.
- Motawi T, Shaker O, Taha N, Raheem MA. Genetic variations in E selectin and ICAM-1: Relation to atherosclerosis. *Med Sci Monit*. 2012;18:CR381–9.
- Bielinski SJ, Pankow J, Li N, Hsu FC, Adar SD, Swords N, Donald J, Bowden BA, Wasserman DA. ICAM1 and VCAM1 polymorphisms, coronary artery calcium, and circulating levels of soluble ICAM-1: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2008;201:339–344.

19. Milutinović A, Petrović D. The K469E polymorphism of the intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene is not associated with myocardial infarction in caucasians with type 2 diabetes. *Folia Biologica (Praha)*. 2006;52:79–80.
20. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaute E, Woo KS, Zannad F, Zureik M. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). an update on behalf of the advisory board of the 3rd and 4th watching the risk symposium, 13th and 15th european stroke conferences, manheim, germany, 2004, and brussels, belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis*. 2007;23:75–80.
21. Yokoyama H, Tahara H, Emoto M, Fujiwara F, Araki T, Shinohara K, Hatsuda S, Maeno T, Shoji T, Koyama H, Shoji T, Nishizawa Y. The K469E polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene is associated with plasma fibrinogen level in type 2 diabetes. *Metabolism*. 2005;54:381–6.
22. Pola R, Fex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P. Synergistic effect of –174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:881–5.
23. McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C, McKeown PP. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using family-based tests of association. *Eur J Immunogenet*. 2004;31:201–6.
24. Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in Men. *Circulation*. 2002;106:820–5.
25. Tanne D, Haim M, Boyko V, Goldbourt U, Reshef T, Matetzky S, Adler Y, Mekori YA, Behar S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke. A nested case–control study from the bezafibrate infarction prevention (BIP) study cohort. *Stroke*. 2002;33(Haim M):2182–6.
26. Tang W, Pankow JS, Carr JJ, Tracy PR, Bielinski SJ, North KE, Hopkins PH, Kraja AT, Arnett DK. Association of sICAM-1 and MCP-1 with coronary artery calcification in families enriched for coronary heart disease or hypertension: the NHLBI family heart study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2007;7:30.
27. Gaetani E, Flex A, Pola R, Papaleo P, De Martini D, Pola E, Aloï F, Flore R, Serricchio M, Gasbarrini A, Pola P. The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13:483–8.
28. Shaker O, Zahra A, Sayed A, Refaat A, El-Khaiat Z, Hegazy G, El-Hindawi K, Ay-El Deen M. Role of ICAM-1 and E-selectin gene polymorphisms in pathogenesis of PAOD in Egyptian patients. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6: 9–15.
29. Petrović Globočnik M, Osredkar J, Saraga-Babić M, Petrović D. K469E polymorphism of the intracellular adhesion molecule 1 gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in caucasians with type 2 diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008;36:468–72.
30. Casanovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4134–9.
31. DeGraba TJ, Sirén A-L, Penix L, McCarron RM, Hargraves R, Sood S, Karen D, Pettigrew KD, Hallenbeck JM. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*. 1998;29:1405–10.
32. Nuotio K, Lindsberg PJ, Carpén O, Soine L, Lehtonen-Smeds EMP, Saimanen E, Lassila R, Sairane T, Sarna S, Salonen O, Kovanen PT, Kaste M. Adhesion molecule expression in symptomatic and asymptomatic carotid stenosis. *Neurology*. 2003;60:1890–9.
33. Ma J, Möllsten A, Prázný M, Falhammar H, Brismar K, Dahlquist G, Efendic S, Gu HF. Genetic influences of the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene polymorphisms in development of Type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabet Med*. 2006;23:1093–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



***PECAM-1* GENE POLYMORPHISM (rs668) AND SUBCLINICAL MARKERS OF CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

Popović D¹, Nikolajević Starčević J², Šantl Letonja M¹, Makuc J³, Cokan Vujkovic A³, Reschner H⁴, Bregar D¹, Petrovič D^{2,5}

***Corresponding Author:** Professor Daniel Petrovič, M.D., Ph.D., Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine University Ljubljana, Korytkova 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. Tel: +386-1-543-7367. Fax: +386-1-543-7361. E-mail: daniel.petrovic@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

The platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) plays an important role in many inflammatory processes, including the development of atherosclerosis. Polymorphism rs668 of the *PECAM-1* gene (373C/G) is functional, and it was reported to be associated with increased serum levels of PECAM-1. We investigated the association between the rs668 polymorphism of PECAM-1 and subclinical markers of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Five hundred and ninety-five T2DM subjects and 200 control subjects were enrolled. The carotid intima-media thickness (CIMT) and plaque characteristics (presence and structure) were assessed ultrasonographically. Biochemical analyses were performed using standard biochemical methods. Geno-typing of the *PECAM-1* gene polymorphism (rs668) was performed using KASPar assays. The control examinations were performed 3.8 ± 0.5 years after the initial examination. Higher CIMT was found in patients with T2DM in comparison with subjects without T2DM. Statistically significantly faster progression of the atherosclerotic markers was

shown in subjects with T2DM in comparison with the control group. When adjusted to other risk factors, the rs668 GG genotype was associated with an increased risk of carotid plaques in subjects with T2DM. We concluded that our study demonstrated a minor effect of the rs668 PECAM-1 on markers of carotid atherosclerosis in subjects with T2DM.

Keywords: Association study; carotid atherosclerosis; Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1); rs668 polymorphism; type 2 diabetes mellitus (T2DM).

INTRODUCTION

The leukocyte adhesion and their transendothelial migration play an important role in the initial phase of atherogenesis [1]. Processes are regulated by various types of adhesion molecules, such as platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). The plasma level of adhesion molecules is elevated in individuals with atherosclerosis [2-4].

Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, also called CD31, is a 130 kD member of the immunoglobulin superfamily, consisting of six extracellular immunoglobulin-like domains, one transmembrane domain, and one cytoplasmic domain. Their expression takes place on the surface of circulating platelets, monocytes, neutrophils and selected T cells [5,6]. The PECAM-1 is a signaling molecule that plays diverse roles in vascular biology, including

¹ General Hospital Rakičan, Murska Sobota, Slovenia

² Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University in Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³ General Hospital Slovenj Gradec, Slovenj Gradec, Slovenia

⁴ Zdravstveni Zavod Reschner, Ljubljana, Slovenia

⁵ Cardiology Outpatient Department Medical Center Medicor, Ljubljana, Slovenia

modulation of platelet function [7,8], angiogenesis [9], vasculogenesis [10], integrin regulation [11], T-cell and B-cell activation [12] and mediation of leukocyte migration across the endothelium [13].

The *PECAM-1* gene is located at the end of the long arm of the chromosome 17 (17q23). Previous studies have reported the existence of 11 different single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *PECAM-1* gene. Three of them have been described that encode amino acid substitutions in the PECAM-1 molecule. A mutation in the *PECAM-1* gene in exon 3 at position +373 involves a C>G substitution, causing a leucine to valine substitution at position 125 (rs668) [14].

The interaction or activation of the PECAM-1 take place *via* homophilic binding with its first extracellular Ig-like domains [15,16]. This polymorphism might affect the homophilic binding capability and influence individual susceptibility to the development of atherosclerosis. The association between the rs668 PECAM-1 polymorphism and cardiovascular disease was studied in Caucasians [17-19], Japanese [20] and Chinese [21], but no clear answer on the association between the rs668 polymorphism of PECAM-1 and the development of cardiovascular diseases could be provided.

Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 is important in the detection of mechanoreception (mechanical shear force) and mechanotransduction (conversion into chemical signals) by the endothelium [22,23]. Atherosclerotic lesion development occurs at sites of the vessel where flow and shear stress conditions are disturbed [24]. Pulsatile or oscillatory shear stresses induce pro inflammatory gene expression [25]. Using the mouse model, the effect of PECAM-1 deficiency (double knock-out mice model without the presence of the *PECAM-1* gene) on the development of atherosclerosis. They reported reduced atherosclerotic lesions in double knock-out mice models [21,25]. The purpose of this study was to investigate an association between the rs668 (+373C/G) polymorphism of the *PECAM-1* gene and subclinical markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

PATIENTS AND METHODS

This study included 595 consecutive subjects with T2DM, admitted to the diabetes outpatient clinics of the general hospitals at Murska Sobota and Slovenj Gradec, Slovenia, and from the outpatient

department at the Medical Center Medicor, Ljubljana, Slovenia. The inclusion criteria for the control group was the absence of T2DM, and consisted of employees of the General Hospital Murska Sobota, Slovenia. Another inclusion criteria for the subjects with T2DM and for the subjects in the control group was the age from 40 to 70. The exclusion criteria for subjects with T2DM and for the subjects in the control group was a history of either myocardial infarction (MI) or ischemic stroke. The study protocol was approved by the Slovene Medical Ethics Committee (98/08/10). The patients and control subjects were enrolled and followed in the period from 2008 to 2014.

Patients were classified as having T2DM according to the current report of the American Diabetes Association [26]. After informed consent was obtained from the patients, a detailed interview was conducted concerning smoking habits, the duration and treatment of diabetes, arterial hypertension, and hyperlipidemia. Patients were asked whether they were smokers at the time of recruitment (current smoker). Subjects with T2DM with systolic blood pressure ≥ 140.0 mm Hg or diastolic blood pressure ≥ 85.0 mm Hg and/or subjects who were taking anti hypertensive drugs were considered to be hypertensive.

All ultrasound examinations were performed by two experienced doctors blinded to the participants' diabetes status. The carotid intima-media thickness (CIMT), defined as the distance from the leading edge of the lumen-intima interface to the leading edge of the media-adventitia interface, was measured as previously described [27]. Plaques were defined as a focal intima-media thickening, and divided into five types according to their echogenic/ echolucent characteristics, as previously described [27]. The interobserver reliability for carotid plaque characterization was found to be substantial ($\kappa = 0.64, p < 0.001$).

After the patients with T2DM and subjects without T2DM (control group) were enrolled, they were prospectively followed-up for a few years. From the group with T2DM, 426 responded and participated in the control ultrasound examination of the neck artery, whereas, 132 re-ponded from the group of subjects without T2DM; 3.8 ± 0.5 years passed between the first and the control ultrasound examination.

Biochemical Analyses. Fasting blood samples for biochemical analysis were collected twice patients: upon enrollment and upon follow-up after a few years. Analyses were made at the hospital ac-

credited laboratory. The following parameters were determined: total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), blood sugar and high-sensitive C-reactive protein (hsCRP).

Genotyping. Genomic DNA was extracted from 100 µL of whole blood using a *FlexiGene* DNA isolation kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), in accordance with the recommended protocol. The rs668 polymorphism of the *PECAM-1* gene was determined with the KASPar assay (LGC Genomics Ltd., Hoddesdon, Hertfordshire, UK) system.

Statistical Analyses. Continuous variables that were normally distributed, were reported in the form of mean ± standard deviation (SD). Variables that were not normally distributed, were presented in the form of median (inter-quartile range). The normality of distribution of continuous variables was examined using the Kolmogorov-Smirnov test. We used the Student's *t* test or the analysis of variance (ANOVA) to compare the numerical values of the continuous variables, to identify the distribution of variables. If the variables were asymmetrically distributed, we used the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis H test. The χ^2 test was used to compare the frequency's categorical variables, statistical evaluation of differences in the frequencies of different alleles and

genotypes between the two groups, as well as in the case of determining the Hardy-Weinberg equilibrium.

The Pearson analyses was performed to examine the correlation between the independent variables. The results showed a high degree of correlation between the serum levels of total and LDL cholesterol ($r = 0.86$; $p < 0.001$), as well as systolic and diastolic blood pressure ($r = 0.65$; $p < 0.001$). In the case of a high degree correlation between two variables, only one variable from each pair was included in the multivariate statistical models.

The change in the value of ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis was calculated by deducting the values measured at two ultrasound examinations. The criteria for a statistically significant difference was a *p* value of less than 0.05. To reduce the possibility of error due to the small number of subjects, we used the Bonferroni correction. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) computer program for Windows, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The clinical characteristics of subjects with T2DM and control subjects are shown in Table 1. Patients with T2DM had a greater waist circumference and there

Table 1. Initial clinical and biochemical characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus and the control group.

Parameters	Patients with T2DM (<i>n</i> = 529)	Control Group (<i>n</i> = 200)	<i>p</i> Value
Age (mean ± SD)	61.38 ± 9.65	60.07 ± 9.18	0.07
Sex: M (%); F (%)	M: 338 (56.8); F: 191 (43.2)	M: 92 (46.0); F: 108 (54.0)	0.008
Duration of T2DM	11.5 ± 7.88	–	–
Smokers: M (%); F (%)	M: 30 (8.9); F: 23 (12.0)	M: 19 (20.6); F: 15 (13.9)	0.002
Waist circumference (cm)	108.65 ± 12.88	93.31 ± 13.18	<0.001
BMI (kg/m ²)	30.96 ± 4.74	27.90 ± 4.42	0.16
Systolic pressure (mm Hg)	146.98 ± 19.98	143.30 ± 16.60	0.86
Diastolic pressure (mm Hg)	85.75 ± 11.62	84.70 ± 11.60	0.19
Fasting glucose (mmol/L)	8.04 ± 2.57	5.27 ± 0.87	<0.001
Hb A _{1c} (%)	7.89 ± 3.56	4.79 ± 0.29	<0.001
Total cholesterol (nmol/L)	4.70 ± 1.19	5.36 ± 1.08	<0.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.19 ± 0.35	1.43 ± 0.37	<0.001
LDL cholesterol (mmol/L)	2.63 ± 0.94	3.24 ± 0.98	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.90 (1.20-2.70)	1.30 (0.90-1.90)	<0.001
High sensitivity CRP (mg/L)	2.20 (1.00-4.30)	1.30 (0.80-2.70)	<0.001
CIMT (µm)	1013.00 ± 208.00	979.00 ± 141.00	0.030

T2DM: type 2 diabetes mellitus; BMI: body mass index; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; CRP: C-reactive protein; CIMT: carotid intima-media thickness.

Table 2. Changes in ultrasound markers of atherosclerosis at carotid artery in patients with type 2 diabetes mellitus and the control group between the initial and control ultrasound examinations.

Parameters	Patients with T2DM (n = 426)	Control Group (n = 137)	0.50
Annual CIMT increment (µm/year)	20.33 (11.74-29.86)	12.83 (8.82-20.66)	0.00
Δ number of plaque segments	2.00 (1.00-3.00)	1.50 (0.70-2.20)	0.00
Δ sum of the plaque thickness (mm)	5.40 (2.40-7.05)	3.64 (2.88-5.48)	0.02

CIMT: carotid intima-media thickness; Δ: variable value changes during the observation period, expressed as a percentage of baseline values.

Table 3. Comparison of ultrasound markers of the carotid artery atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus according to the *PECAM* gene polymorphism 373 C/G (rs668) genotypes at the beginning of the study.

Parameters	CC Genotype	CG Genotype	GG Genotype	p value
CIMT (µm)	1041.00 ± 198.00	990.00 ± 187.00	988.00 ± 211.00	0.19
Number of segments with plaques	2.56 ± 1.65	2.39 ± 1.72	2.51 ± 1.54	0.36
Sum of the plaque thickness (mm)	8.14 ± 4.77	7.99 ± 5.23	7.66 ± 4.02	0.16
Presence of plaques: [+] [-]	149.00 (85.60) 25.00 (14.40)	256.00 (84.50) 47.00 (15.50)	94.00 (79.70) 24.00 (20.30)	0.36
Presence of unstable plaques: [+] [-]	86.00 (57.70) 63.00 (42.30)	144.00 (56.30) 112.00 (43.70)	58.00 (61.70) 36.00 (38.30)	0.66

CIMT: carotid intima-media thickness.

Table 4. Changes in ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus between the first and the second ultrasound examination of the carotid arteries according to the *PECAM* gene polymorphism 373 C/G (rs668) genotypes.

Parameters	CC Genotype	CG Genotype	GG Genotype	p Value
Annual CIMT increment (µm/year)	20.34 (11.64-28.04)	20.69 (7.14-32.28)	14.28 (10.71-35.97)	0.71
Δ number of plaque segments	2.00 (0.50-2.50)	2.00 (1.00-3.00)	2.00 (2.00-3.00)	0.74
Δ sum of the plaque thickness (mm)	7.30 (3.85-8.70)	5.45 (2.30-9.20)	4.40 (1.40-8.42)	0.38

CIMT: carotid intima-media thickness; Δ: variable value changes during the observation period, expressed as a percentage of baseline values.

were more smokers compared to the control group. There were no statistically significant differences between patients with T2DM and controls in other clinical characteristics [age, body mass index (BMI), systolic and diastolic pressure]. A biochemical examination of patients with T2DM showed statistically significant higher levels of fasting glucose, Hb A_{1c}, total cholesterol, HDL, LDL, triglyceride and hsCRP compared with the control group (Table 1). Moreover, higher CIMT was found in patients with T2DM in comparison with subjects without T2DM (Table 1).

The ultrasound examination of the carotid artery was performed at the time of enrollment in the study, and 3.8 ± 0.5 years after the initial examination. Changes in the progression of atherosclerotic markers (change in annual CIMT increase, change in the number of plaque segments and change in the sum of the plaque thickness) between subjects with T2DM and

the control group are shown in Table 2. Statistically significantly faster progression of the atherosclerotic markers was shown in subjects with T2DM in comparison with the control group (Table 2).

The distribution of genotypes in the population of patients with T2DM was in Hardy-Weinberg equilibrium (T2DM: $\chi^2 = 0.45$; $p = 0.50$; control group: $\chi^2 = 1.46$; $p = 0.23$). Table 3 outlines differences in the ultrasound markers of carotid artery atherosclerosis (initial ultrasound examination) in patients with T2DM with regard to the rs668 genotypes. The differences were not statistically significant with regard to rs668 genotypes (Table 3). We did not demonstrate statistically significant differences in the markers of subclinical carotid atherosclerosis between different genotypes in subjects with T2DM (Table 4).

Table 5 shows the relation between the rs668 and the incidence of either plaques or unstable plaques

Table 5. Relationship of the *PECAM* gene polymorphism 373 C/G (rs668) genotypes to the presence of plaques/ unstable plaques of the carotid arteries in patients with type 2 diabetes mellitus at the beginning of the study.

Parameters	Presence of Plaques		Presence of Unstable Plaques	
	OR (95% CI)	<i>p</i> Value	OR (95% CI)	<i>p</i> Value
Hypertension (0 = no; 1 = yes)	1.88	0.35	1.38	0.52
Systolic pressure (mm Hg)	0.24	0.68	0.26	0.32
Serum LDL (mmol/L)	1.41	0.41	1.34	0.25
Serum HDL (mmol/L)	0.11	0.02	0.31	0.34
Hb A _{1c} (%)	0.89	0.03	1.23	0.43
CG allele	1.03	0.49	0.72	0.17
GG allele	1.18	0.03	0.68	0.51

OR (95% CI): odds ratio (95% confidence interval); LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; all models were adjusted by age, sex, smoking habits and treatment with statins. The reference group are homozygotes for the C allele (the CC genotype).

in subjects with T2DM. When adjusted to other risk factors, the rs668 GG genotype was associated with an increased risk of carotid plaques in subjects with T2DM (Table 5).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated an association between the rs668 GG genotype and carotid artery plaque incidence in patients with T2DM when adjusted to other risk factors. On the other hand, we did not find any effect of the rs688 genotype on the progression of atherosclerosis in patients with T2DM.

Our study is the first demonstrating an association between the rs668 *PECAM-1* and the presence of carotid plaques in patients with T2DM. In our study, we observed a greater number of plaques in subjects with the GG rs668 genotype. The importance of the *PECAM-1* gene in the pathogenesis of atherosclerosis was demonstrated [21,25]. The decrease in areas with atherosclerotic lesion in *PECAM-1* double knock-out mice was reported [21,25].

An association between the rs668 *PECAM-1* and cardiovascular disorders was reported several times, but not in all studies [29-33]. Similarly, an association between the rs668 *PECAM-1* gene and either the increased levels of soluble *PECAM-1* or ischemic stroke was found in the Chinese population [21]. An association between the rs668 *PECAM-1* gene and increased levels of soluble *PECAM-1* was confirmed in the setting of patients with acute MI [28].

Similarly, Fang *et al.* [29] demonstrated an association between the rs668 *PECAM-1* gene and either

increased levels of soluble *PECAM-1* or the severity of coronary artery disease in the Asian Indian population in Singapore. Reschner *et al.* [17] reported an association between the *PECAM-1* rs668 (the CC genotype) and MI in Caucasians with T2DM. Finally, the effect of several polymorphisms of the *PECAM-1* gene on cardiovascular disease was confirmed by Listi *et al.* [30] in the Northern Italian population. These findings were not confirmed in the general population from Germany, as rs688 was not found to be an independent risk factor for coronary artery disease (CAD) [31].

In a recently published meta-analysis of 15 studies, including 7636 subjects, no association between the rs668 *PECAM-1* and cardiovascular diseases was demonstrated [35]. Moreover, the progression of sub-clinical markers of carotid atherosclerosis was statistically significantly faster in subjects with T2DM in comparison with subjects without T2DM. This finding is in accordance with expectations of other researchers as well [32,33].

Our study has some limitations due to its actual design (cross-sectional design at the enrollment of subjects with T2DM and control subjects) and relatively small sample size (*i.e.*, less than 1000 subjects with T2DM), however the study was appropriately powered to detect the differences in subclinical markers of carotid atherosclerosis upon enrollment as well as during follow-up. The lack of the effect of rs688 on the progression of atherosclerosis might be due to a rather short interval between the first and control examinations (3.8 ± 0.5 years). Moreover, it is impossible to exclude the impact of interactions with other

potentially relevant variables on the development of atherosclerosis. The second limitation of the study is the lack of an intermediate phenotype, *i.e.*, serum PECAM levels. We presume that the effect of rs668 is *via* increased serum PECAM levels.

In conclusion, our study demonstrated a minor effect of the rs668 PECAM-1 on the markers of carotid atherosclerosis in subjects with T2DM, as the GG genotype of the rs668 PECAM-1 was associated with a higher incidence of carotid plaques in subjects with T2DM. With that kind of associations established in genetic studies, we presumed that we might predict the genetic risk of carotid atherosclerosis in subjects with T2DM.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Brina Beskonik, B.A., Jeziček Brina Beškovnik s.p., Portoroz-Portorose, Slovenia, for revising the English.

Declaration of Interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

REFERENCES

1. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991; 251(4995): 788-791.
2. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, *et al.* Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(3): 505-512.
3. Hwang S-J, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, *et al.* Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 1997; 96(12): 4219-4225.
4. Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, *et al.* Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(11): 1765-1770.
5. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 1990; 110(4): 1227-1237.
6. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, *et al.* PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990; 247(4947): 1219-1222.
7. Cicmil M, Thomas JM, Sage T, Barry FA, Leduc M, Bon C, *et al.* Collagen, convulxin, and thrombin stimulate aggregation-independent tyrosine phosphorylation of CD31 in platelets. Evidence for the involvement of Src family kinases. *J Biol Chem*. 2000; 275(35): 27339-27347.
8. Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, *et al.* Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006; 107(2): 535-541.
9. Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol*. 1997; 158(7): 3408-3416.
10. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnüch H, Gotsch U, *et al.* Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 1996; 87(2): 630-641.
11. Piali L, Albelda SM, Baldwin HS, Hammel P, Gisler RH, Imhof BA. Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur J Immunol*. 1993; 23(10): 2464-2471.
12. Newton-Nash DK, Newman PJ. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol*. 1999; 163(2): 682-688.
13. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, *et al.* Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol*. 1999; 162(5): 3022-3030.

14. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, *et al.* Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 1996; 334(5): 286-291.
15. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993; 178(2): 449-460.
16. Sun J, Williams J, Yan HC, Amin KM, Albelda SM, DeLisser HM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J Biol Chem.* 1996; 271(31): 18561-18570.
17. Reschner H, Milutinović A, Petrović D. The PECAM-1 gene polymorphism – A genetic marker of myocardial infarction. *Cent Eur J Biol.* 2009; 4(4): 515-520.
18. Wenzel K, Baumann G, Felix SB. The homozygous combination of Leu125Val and Ser563Asn polymorphisms in the PECAM1 (CD31) gene is associated with early severe coronary heart disease. *Hum Mutat.* 1999; 14(6): 545.
19. Gardemann A, Knapp A, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. No evidence for the CD31 C/G gene polymorphism as an independent risk factor of coronary heart disease. *Thromb Haemost.* 2000; 83(4): 629.
20. Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T. Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563 Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 947: 259-269; discussion 269-270.
21. Wei H, Fang L, Chowdhury SH, Gong N, Xiong Z, Song J, *et al.* Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe coronary artery stenosis in Chinese Singaporean. *Clin Biochem.* 2004; 37(12): 1091-1097.
22. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 18): 4103-4111.
23. Bagi Z, Frangos JA, Yeh JC, White CR, Kaley G, Koller A. PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(8): 1590-1595.
24. DeBaakey ME, Lawrie GM, Glaeser DH. Patterns of atherosclerosis and their surgical significance. *Ann Surg.* 1985; 201(2): 115-131.
25. Bao X, Lu C, Frangos JA. Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(4): 996-1003.
26. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2012; 35(Suppl 1): S64-S71 (<http://dx.doi.org/10.2337/dc12-s064>).
27. Serebruany VL, Murugesan SR, Pothula A, Atar D, Lowry DR, O'Connor CM, *et al.* Increased soluble platelet/endothelial cellular adhesion molecule-1 and osteonectin levels in patients with severe congestive heart failure. Independence of disease etiology, and antecedent aspirin therapy. *Eur J Heart Fail.* 1999; 1(3): 243-249.
28. Shalia KK, Mashru MR, Soneji SL, Shah VK, Payannavar S, Walvankar A, *et al.* Leucine-125Valine (Leu 125Val) gene polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and myocardial infarction in Indian Population. *Ind J Clin Biochem.* 2010; 25(3): 273-279.
29. Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK, *et al.* Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res.* 2005; 121(2): 92-99.
30. Listi F, Caruso C, Di Carlo D, Falcone C, Boiocchi C, Cuccia M, *et al.* Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule-1 polymorphisms and atherosclerosis: results of a study on patients from northern Italy. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(2-3): 237-241.
31. Xia T, Liu X, Jiang CD, Jin X, Kong XQ, Li G. Association of Leu125Val polymorphisms in the PECAM-1 gene with the risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(2): 2219-2225.

32. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(12): 2293-2300.
33. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, *et al.* Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1999; 100(10): 1134-1146.

8.2 ŽIVLJENJEPIS

Rojen sem 11. 8. 1960 v Prelogu v Republiki Hrvaški. Diplomiral sem 15. 2. 1985 na Medicinski fakulteti Univerze v Zagrebu. Po končanem študiju sem se zaposlil kot specializant iz splošne kirurgije na Kirurškem oddelku Splošne bolnišnice Murska Sobota, kjer sem zaposlen tudi danes. Specializacijo iz splošne kirurgije sem končal 9. 10. 1991 v UKC Ljubljana. Podiplomski študij iz splošne kirurgije sem vpisal na Medicinski fakulteti Univerze v Zagrebu v šolskem letu 1992/1993. Zaključni izpit sem opravil 28. 9. 1993.

S področja žilne kirurgije sem se izobraževal v:

- kliničnem oddelku za kirurgijo srca in ožilja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (1992);
- oddelku za žilno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra v Mariboru (1993);
- Stadtisches Klinikum St. Georg v Leipzigu (2002);
- Texas Heart Institute v Hustonu (2004) in
- Semmelweis University of Medicine Department of Cardiovascular Surgery v Budimpešti (2003).

Sem član strokovnega sveta Združenja za žilne bolezni Slovenskega zdravniškega društva in podpredsednik Društva žilnih kirurgov Slovenije. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije mi je dne 25. 9. 2012 podelilo naziv primarij. Permanentno sem se izobraževal in udeleževal številnih strokovnih srečanj doma in v tujini. Aktivno sem sodeloval na kongresih v Sloveniji in tujini. Objavljal sem prispevke v domačih in tujih revijah. Med delom na kirurškem oddelku Splošne bolnišnice Murska Sobota sem bil mentor številnim specializantom in pripravnikom.

8.3 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju red. prof. dr. Danijelu Petroviču, dr. med. za strokovno usmerjanje, spodbudo in potrpežljivost pri izvedbi doktorske naloge.

Doktorsko delo presega znanje iz zmožnosti posameznika, zato se zahvaljujem vsem, ki so sodelovali pri posameznih fazah raziskave. Sodelovalo je veliko posameznikov in ker jih ne morem vseh naštetih, se iskreno zahvaljujem ustanovam in oddelkom: Diabetološki ambulanti SB Murska Sobota, Radiološkemu oddelku SB Murska Sobota, Kirurškemu oddelku SB Murska Sobota in Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za histologijo in embriologijo UKC Ljubljana.

Posebna zahvala soprogi Jasni ter hčerkam Ivi, Janji in Klari, ki so me spodbujale in potrpežljivo prenašale tekom doktorskega študija.

8.4 IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

PRILOGA 4

UNIVERZA V MARIBORU

MEDICINSKA FAKULTETA

IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

Podpisani-a **Dražen Popović**, vpisna številka **30802109**

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom **GENSKI POLIMORFIZMI ADHEZIJSKIH MOLEKUL IN VNETNIH GENOV TER PROGRESIJA ATEROSKLEROZE KAROTIDNIH ARTERIJ PRI SLADKORNI BOLEZNI TIP 2**

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskem programu druge fakultete ali univerze,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorskega kandidata:

Dražen Popović
