



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**ISPITIVANJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE I POSTOJANJA  
REZISTENCIJE NA ANTITROMBOCITNU TERAPIJU KOD  
BOLESNIKA SA TIPOM 2 DIJABETES MELITUSA**

*- Doktorska disertacija -*

Mentor: Prof. dr Gorana Mitić

Kandidat: dr Romana Mijović

*Novi Sad, 2016. godine*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU – MEDICINSKI FAKULTET****KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Romana Mijović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Gorana Mitić
Naslov rada: NR	Ispitivanje endotelne disfunkcije i postojanja rezistencije na antitrombocitnu terapiju kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016. godina
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Hajduk Veljka 3, Novi Sad, Serbia
Fizički opis rada: FO	8 poglavlja, 208 stranica, 8 slika, 19 grafikona, 50 tabela, 347 referenci, 3 priloga
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina:	Patološka fiziologija

ND	
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	diabetes mellitus tip 2; vaskularni endotel; e-selektin; p-selektin; agregacija trombocita; koronarna arterijska bolest; trombociti
UDK	616.379-008.64-06:615.273.065
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>UVOD: Procesi koji obuhvataju endotelnu disfunkciju, oksidativni stres, hroničnu inflamaciju, hiperaktivnost i aktivaciju trombocita te narušavanje ravnoteže procesa koagulacije i fibrinolize od najranijih faza razvoja dijabetes melitusa tip 2 (T2DM) promovišu aterogenezu i nastanak aterotromboznih komplikacija. Kompleksan terapijski pristup u T2DM ima za cilj ne samo uspostavljanje glikoregulacije, korekciju brojnih metaboličkih poremećaja i modifikaciju pridruženih faktora rizika za nastanak ateroskleroze već i primenu antitrombocitne terapije u cilju primarne ili sekundarne prevencije aterotromboznih komplikacija. Uprkos primenjenoj antiagregacionoj terapiji, deo bolesnika doživi rekurentne aterotrombozne atake. Bolesnici sa T2DM se izdvajaju kao grupa sa posebnim rizikom za recidivantne aterotromboze što može biti uslovljeno rezistencijom na primenjenu antitrombocitnu terapiju. Praćenje efekata antitrombocitne terapije i blagovremeno identifikovanje rezistentnih bolesnika ima za cilj optimizaciju primenjene antitrombocitne terapije što može biti od izuzetnog kliničkog značaja u smislu sprečavanja progresije aterotromboznog procesa.</p> <p>CILJ: Proceniti i uporediti nivoe biomarkera, pokazatelja endotelne aktivacije, aktivacije i agregabilnosti trombocita u bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na njihove vrednosti u zdravoj populaciji. Uporediti efikasnost primenjene antitrombocitne terapije tienopiridinima u bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i bolešću arterijskih krvnih sudova u odnosu na efikasnost ove terapije u nedijabetičnoj populaciji bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova.</p> <p>MATERIJAL I METODE: U ispitivanje je uključeno 100 ispitanika oba pola, starosti od 33 do 70 godina života, kod kojih je prethodno utvrđeno postojanje neke od kliničkih manifestacija bolesti arterijskih krvnih sudova (IBS, CVB, PAB) koji kao antitrombocitnu terapiju uzimaju tienopiridinski preparat, klopidogrel. Od toga, 50 uključenih ispitanika imalo je dijagnozu dijabetes melitusa tipa 2, a 50 su bili bolesnici bez dijabetesa. Kontrolnu grupu je činilo 30 klinički i biohemijski zdravih ispitanika, nepušača koji su prema polnoj i dobnoj strukturi odgovarali ispitivanim grupama bolesnika. Svim ispitanicima su urađena antropometrijska merenja, laboratorijska analiza uzoraka krvi na automatizovanim analizatorima sa određivanjem parametara metabolizma glukoze, lipida, parametara inflamacije, KKS, parametara koagulacije i trombocitnih pokazatelja. Određivanje serumske koncentracije sE-selektina i sP-selektina je vršeno ELISA tehnikom (R&amp;D Systems, Inc. Minneapolis, USA). Plazmatska koncentracija vWFAg-a određivana je imunoturbidimetrijskom metodom na koagulacionom analizatoru Siemens Healthcare Diagnostics, Nemačka. Agregabilnost trombocita je određivana impedantnom agregometrijom (Multiple Electrode Aggregometry - MEA) na Multiplate analizatoru, Dynabyte, Minhen, Nemačka. Bazalna agregabilnost trombocita procenjivana je TRAP testom, rezidualna agregabilnost trombocita pod terapijom klopidogrela ADP testom, rezidualna agregabilnost trombocita pod terapijom aspirina, ASPI testom. Individualni odgovor na primenjenu</p>

antiagregacionu terapiju je procenjivan i na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita (%SAT) nakon primenjene antiagregacione terapije što je izračunato sledećim formulama: procena antiagregacionog efekta klopidozrela:  $\%SAT_{adp} = 100 \times (1 - ADP/TRAP)$  i procena antiagregacionog efekta aspirina:  $\%SAT_{aspi} = 100 \times (1 - ASPI/TRAP)$ .

**REZULTATI:** Nivo sE-selektina je bio signifikantno viši u bolesnika sa T2DM u odnosu na bolesnike bez dijabetesa ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $31,8 \pm 10,5$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) i kontrolnu grupu zdravih ispitanika ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $27,2 \pm 11,2$  ng/ml;  $p < 0,001$ ). Plazmatski nivo vWF Ag, bio je statistički značajno viši u bolesnika sa T2DM u odnosu na grupu ispitanika bez dijabetesa ( $172 \pm 75,2$  vs.  $146 \pm 40,6$ %;  $p = 0,045$ ), kao i u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ( $172 \pm 75,2$  vs.  $130 \pm 33,8$ %;  $p = 0,007$ ). Nivo sP-selektina bio je statistički značajno viši kod bolesnika s T2DM u odnosu na ispitanike u grupi dijabetesa ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $84,0 \pm 21,8$  ng/ml;  $p = 0,042$ ) i kontrolnoj grupi ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $76,7 \pm 16,2$  ng/ml;  $p = 0,004$ ). Uočeno je da je %rP statistički bio značajno viši u grupi dijabetičara u odnosu na grupu ispitanika bez dijabetesa ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,30 \pm 1,30$ %;  $p < 0,001$ ) i kontrolnu grupu zdravih ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,29 \pm 1,23$ %;  $p < 0,001$ ). Bolesnici sa T2DM imali su statistički značajno više vrednosti ADP testa ( $70,3 \pm 22,0$  vs.  $56,9 \pm 19,7$ U;  $p = 0,002$ ) u odnosu na bolesnike bez dijabetesa, a uočen je i značajno niži stepen procenta sniženja bazalne agregabilnosti, %SAT<sub>adp</sub>, u dijabetičara u odnosu na ispitanike bez dijabetesa ( $31,6 \pm 12,4$  vs.  $48,6 \pm 12,6$  %;  $p < 0,001$ ). U grupi ispitanika sa T2DM vrednost TRAP testa statistički značajno pozitivno koreliše sa brojem neutrofila ( $r = 0,349$ ;  $p = 0,013$ ) i NLR-om ( $r = 0,472$ ;  $p = 0,001$ ), a multivarijantnom linearnom regresionom analizom dokazana je nezavisna povezanost TRAP testa i fibrinogena ( $B = 9,61$ ;  $p = 0,009$ ). Takođe, u istoj ispitivanoj grupi postoji pozitivna povezanost ADP testa sa HOMA-IR ( $r = 0,319$ ;  $p = 0,024$ ), NLR-om ( $r = 0,515$ ;  $p < 0,001$ ), hsCRP-om ( $r = 0,356$ ;  $p = 0,011$ ), kao i sa %rP ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,049$ ). Multivarijantnom linearnom regresionom analizom dokazana je nezavisna povezanost ADP testa i ITM ( $B = 1,43$ ;  $p = 0,043$ ). %SAT<sub>adp</sub> u bolesnika sa T2DM negativno je korelisao sa ITM ( $r = -0,381$ ;  $p = 0,006$ ), OS ( $r = -0,387$ ;  $p = 0,006$ ), HOMA-IR ( $r = -0,349$ ;  $p = 0,013$ ), hsCRP-om ( $r = -0,288$ ;  $p = 0,043$ ), %rP ( $r = -0,302$ ;  $p = 0,049$ ), sE-selektinom ( $r = -0,369$ ;  $p = 0,008$ ) i sP-selektinom ( $r = -0,374$ ;  $p = 0,007$ ). U grupi dijabetičara, postoji pozitivna povezanost %rP sa ITM ( $r = 0,365$ ;  $p = 0,016$ ), OS ( $r = 0,435$ ;  $p = 0,004$ ), HOMA-IR ( $r = 0,409$ ;  $p = 0,006$ ), hsCRP ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,014$ ), sP-selektinom ( $r = 0,341$ ;  $p = 0,025$ ) i vWF Ag-om ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,022$ ). Takođe, sE-selektin pozitivno koreliše sa ITM ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,006$ ), OS ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,007$ ), HOMA-IR ( $r = 0,339$ ;  $p = 0,016$ ), hsCRP-om ( $r = 0,351$ ;  $p = 0,013$ ), a sP-selektin sa ITM ( $r = 0,312$ ;  $p = 0,027$ ), OS ( $r = 0,395$ ;  $p = 0,005$ ), HOMA-IR ( $r = 0,286$ ;  $p = 0,044$ ), hsCRP-om ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,008$ ) i nivoom sE – selektina ( $r = 0,560$ ;  $p < 0,001$ ). Evaluirajući odgovor na terapiju klopidozrelom u podgrupama bolesnika sa dijabetesom, napravljenim prema kvartilnoj distribuciji nivoa ADP-a, tj. stepenu rezidualne agregabilnosti trombocita u toku terapije klopidozrelom, uočeno je da ukupna bazalna agregabilnost trombocita procenjena TRAP testom statistički značajno raste od prvog do četvrtog kvartila ( $76,50 \pm 19,91$  vs.  $94,54 \pm 16,67$  vs.  $112,00 \pm 10,22$  vs.  $128,92 \pm 15,69$ U;  $p < 0,001$ ), dok se %SAT<sub>adp</sub> od prvog do četvrtog kvartila značajno smanjivao ( $40,44 \pm 13,33$  vs.  $31,20 \pm 11,82$  vs.  $33,16 \pm 7,03$  vs.  $21,53 \pm 10,16$ %).

**ZAKLJUČAK:** Koncentracije cirkulišućih biomarkera endotelne aktivacije, sE – selektina i vWF Ag-a, solubilnog biomarkera trombocitne aktivacije, sP – selektina, kao i procenat retikulisanih trombocita, %rP, markera trombocitnog prometa, značajno su povišene kod bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na njihove koncentracije kod zdravih ispitanika i bolesnika bez dijabetesa. Bolesnici sa T2DM imali su znatno viši stepen rezistencije na antitrombocitnu terapiju klopidozrelom u odnosu na bolesnike bez dijabetesa, procenjene stepenom rezidualne agregabilnosti trombocita, ADP test, kao i procentom sniženja ukupne bazalne agregabilnosti trombocita, %SAT<sub>adp</sub>, metodom impedantne agregometrije, a što je uslovalo i trend učestalijeg ponavljanja

	ishemijskih ataka u odnosu na bolesnike bez dijabetesa. Međusobna povezanost ispitivanih biomarkera endotelne i trombocitne aktivacije (sE – selektina, vWF Ag-a, sP – selektina), kao i markera prometa trombocita (%rP) sa metaboličko-inflamatornim parametrima i sa indikatorima odgovora na antiagregacionu terapiju, može ukazivati na to da nepovoljan metabolički milje dijabetičara može biti jedan od doprinosnih faktora lošem odgovoru na antitrombocitnu terapiju klopidogrelom.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	07.06.2012.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsjednik:  član:  član:  član:  član:

## University of Novi Sad - Faculty of Medicine

### Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Romana Mijović
Mentor: MN	Gorana Mitić MD, PhD
Title: TI	Endothelial dysfunction and antiplatelet therapy resistance assessment in patients with type 2 diabetes mellitus
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	8 chapters, 208 pages, 8 pictures, 19 graphs, 50 tables, 347 references, 3 annexes
Scientific field SF	Medicine

Scientific discipline SD	Pathophysiology
Subject, Key words SKW	Diabetes Mellitus, Type 2; Endothelium, Vascular; E-Selectin; P-Selectin; Platelet Aggregation; Coronary Artery Disease; Blood Platelets
UC	616.379-008.64-06:615.273.065
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p><b>INTRODUCTION:</b> Processes involving endothelial dysfunction, oxidative stress, chronic inflammation, platelet activation and the imbalance between coagulation and fibrinolysis promote atherogenesis and atherothrombotic complications at early stage of diabetes mellitus type 2 (T2DM). The complex therapeutic approach in T2DM aims not only to reestablish glycemic control and to correct a number of metabolic disorders, but also to achieve primary or secondary prevention of atherothrombotic complications. Despite the applied antiplatelet therapy, some patients experience recurrent atherothrombotic attacks. Patients with T2DM are the group at particular risk for recurrent atherothrombosis, which can be caused by antiplatelet therapy resistance. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy and identification of resistant patients aims to optimize the applied antiplatelet therapy, which can be of great clinical significance in terms of preventing progression of atherothrombotic processes.</p> <p><b>AIM:</b> Evaluate and compare the levels of biomarkers, indicators of endothelial activation, platelet activation and aggregability in patients with arterial vascular disease in type 2 diabetes mellitus compared to their values in a healthy population. Compare the effectiveness of applied antiplatelet therapy with thienopyridines in patients with type 2 diabetes mellitus and arterial vascular disease compared to the efficacy of this therapy in nondiabetic population of patients with arterial vascular disease.</p> <p><b>MATERIAL AND METHODS:</b> The study included 100 patients, 33 to 70 years of age, with previously established existence of some of the clinical manifestations of arterial vascular disease (CAD, CVD, PAD), taking thienopyridine antiplatelet therapy with clopidogrel. 50 patients was previously diagnosed with diabetes mellitus type 2 and 50 were nondiabetic patients. Control group included 30 age and sex matched healthy participants, non-smokers. All subjects underwent anthropometric measurements and laboratory analysis of blood samples on automated analyzers with determining the parameters of glucose metabolism, lipids, inflammation parameters, complete blood count, coagulation and platelet parameters. Serum concentrations of sE-selectin and sP-selectin were determined by ELISA (R&amp;D Systems, Inc., Minneapolis, USA). vWFAg was determined by immunoturbidimetry on coagulometer Siemens Healthcare Diagnostics, Germany. Platelet aggregability was determined by impedance aggregometry (Multiple Electrode Aggregometry - MEA) on Multiplate analyzer, Dynabyte, Munich, Germany. Basal platelet aggregability was estimated by TRAP test, residual platelet aggregability during clopidogrel treatment was estimated by ADP test and during aspirin</p>

treatment by ASPI test. Individual response to antiplatelet therapy was estimated by the percentage of decrease in basal platelet aggregability (%DPA) obtained after antiplatelet therapy, calculated by presented formulas:  $\%DPA_{adp} = 100 \times (1 - ADP/TRAP)$  and  $\%DPA_{aspi} = 100 \times (1 - ASPI/TRAP)$ .

**RESULTS:** Concentration of sE-selectin was significantly higher in patients with T2DM in order to non-diabetic patients ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $31,8 \pm 10,5$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) and healthy control group ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $27,2 \pm 11,2$  ng/ml;  $p < 0,001$ ). vWF Ag was significantly higher in diabetic patients than in non-diabetics ( $172 \pm 75,2$  vs.  $146 \pm 40,6\%$ ;  $p = 0,045$ ) and healthy controls ( $172 \pm 75,2$  vs.  $130 \pm 33,8\%$ ;  $p = 0,007$ ). sP-selectin was also significantly higher in patients with T2DM than in non-diabetics ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $84,0 \pm 21,8$  ng/ml;  $p = 0,042$ ) and healthy controls ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $76,7 \pm 16,2$  ng/ml;  $p = 0,004$ ). %rP was significantly higher in group of patients with T2DM than in non-diabetic patients ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,30 \pm 1,30\%$ ;  $p < 0,001$ ) and healthy control group ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,29 \pm 1,23\%$ ;  $p < 0,001$ ). T2DM patients had statistically higher values of ADP test ( $70,3 \pm 22,0$  vs.  $56,9 \pm 19,7$  U;  $p = 0,002$ ) compared to patients without diabetes, and significantly lower %DPA<sub>adp</sub> ( $31,6 \pm 12,4$  vs.  $48,6 \pm 12,6\%$ ;  $p < 0,001$ ). In T2DM group of patients, level of TRAP test correlated positively with number of white blood cells ( $r = 0,349$ ;  $p = 0,013$ ) and NLR ( $r = 0,472$ ;  $p = 0,001$ ), and multivariant linear regression analysis showed significant independent association of TRAP test with fibrinogen ( $B = 9,61$ ;  $p = 0,009$ ). Statistically significant positive correlation of ADP test with HOMA-IR ( $r = 0,319$ ;  $p = 0,024$ ), NLR ( $r = 0,515$ ;  $p < 0,001$ ), hsCRP ( $r = 0,356$ ;  $p = 0,011$ ) and %rP ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,049$ ) was observed in patients with T2DM. Multivariant linear regression analysis showed significant independent association of ADP test with BMI ( $B = 1,43$ ;  $p = 0,043$ ). %DPA<sub>adp</sub> negatively correlated with BMI ( $r = -0,381$ ;  $p = 0,006$ ), WC ( $r = -0,387$ ;  $p = 0,006$ ), HOMA-IR ( $r = -0,349$ ;  $p = 0,013$ ), hsCRP ( $r = -0,288$ ;  $p = 0,043$ ), %rP ( $r = -0,302$ ;  $p = 0,049$ ), sE-selectin ( $r = -0,369$ ;  $p = 0,008$ ) and sP-selectin ( $r = -0,374$ ;  $p = 0,007$ ) in diabetic patients. Significant positive correlation of %rP with BMI ( $r = 0,365$ ;  $p = 0,016$ ), WC ( $r = 0,435$ ;  $p = 0,004$ ), HOMA-IR ( $r = 0,409$ ;  $p = 0,006$ ), hsCRP ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,014$ ), sP-selectin ( $r = 0,341$ ;  $p = 0,025$ ) and vWF Ag ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,022$ ) was found in diabetics. Also, sE-selectin positively correlated with BMI ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,006$ ), WC ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,007$ ), HOMA-IR ( $r = 0,339$ ;  $p = 0,016$ ), hsCRP ( $r = 0,351$ ;  $p = 0,013$ ), and sP-selectin correlated positively with BMI ( $r = 0,312$ ;  $p = 0,027$ ), WC ( $r = 0,395$ ;  $p = 0,005$ ), HOMA-IR ( $r = 0,286$ ;  $p = 0,044$ ), hsCRP ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,008$ ) and sE – selectin ( $r = 0,560$ ;  $p < 0,001$ ). Evaluating the response to clopidogrel therapy in subgroups of diabetic patients according to the quartile distribution of ADP test (clopidogrel on-treatment platelet reactivity), it is found that total basal aggregability estimated by TRAP test significantly increased from the first to the fourth quartile ( $76,50 \pm 19,91$  vs.  $94,54 \pm 16,67$  vs.  $112,00 \pm 10,22$  vs.  $128,92 \pm 15,69$  U;  $p < 0,001$ ) while %DPA<sub>adp</sub> decreased ( $40,44 \pm 13,33$  vs.  $31,20 \pm 11,82$  vs.  $33,16 \pm 7,03$  vs.  $21,53 \pm 10,16\%$ ).

**CONCLUSION:** Concentration of circulating biomarkers of endothelial activation, sE-selectin and vWF Ag, soluble marker of platelet activation, sP – selectin, as well as percentage of reticulated platelets, %rP, marker of platelet turnover, were significantly higher in patients with arterial vascular disease in T2DM compared to healthy controls and non-diabetics. Patients with T2DM had significantly higher degree of resistance to antiplatelet therapy with clopidogrel compared to non-



	<p>diabetics, estimated by ADP test, as well as with %DPAadp, what caused more frequent recurrent ischemic attacks compared to non-diabetic patients. Correlation of biomarkers of endothelial and platelet activation (sE – selectin, vWF Ag, sP – selectin) and markers of platelet turnover (%rP) with metabolic profile indicators and poor antiplatelet therapy response suggest that altered metabolic profile can be one of contributing factors of poor antiplatelet response in diabetic patients.</p>
Accepted on Senate on: AS	07.06.2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president:</p> <p>member:</p> <p>member:</p> <p>member:</p> <p>member:</p>

*Mom oca ...*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, Prof. dr Gorani Mitić za neizmernu pomoć, podršku i razumevanje koje mi je pružila u toku izrade doktorske disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem mojoj dragoj prijateljici i kolegici dr Nadi Kovačević koja mi je pružila nesebičnu pomoć tokom ovog istraživanja.*

*Hvala i svim zaposlenima u Centru za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine koji su mi pomogli prilikom izrade ovog rada. Posebnu zahvalnost dugujem svim zaposlenima u Odeljenju za trombozu, hemostazu i hematološku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine, bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo izvedeno.*

*U matematičkoj i statističkoj obradi podataka i grafičkom dizajnu prikaza rezultata veliku pomoć mi je pružio Zoran Potić i na tome sam mu veoma zahvalna.*

*Na kraju, želela bih da se zahvalim mojoj majci, suprugu i kćerki, koji su uvek moja najveća podrška i inspiracija za sve što radim.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	5
<b>1.1. DIJABETES MELITUS TIP 2</b>	7
1.1.1. Etiopatogeneza, definicija i dijagnostika dijabetes melitusa tip 2	7
1.1.2. Insulinska rezistencija – etiopatogeneza, definicija i kliničke implikacije	8
1.1.2.1. Insulinska rezistencija i dislipidemija	9
1.1.2.2. Insulinska rezistencija i inflamacija	9
1.1.2.3. Insulinska rezistencija i hipertenzija	10
1.1.3. Metabolički sindrom	11
<b>1.2. PATOFIZIOLOGIJA MAKROVASKULARNE BOLESTI U DIJABETES MELITUSU TIP 2</b>	13
1.2.1. Disfunkcija vaskularnog endotela	13
1.2.1.1. Fiziologija vaskularnog endotela	14
1.2.1.2. Patofiziologija endotelne disfunkcije	16
1.2.1.3. Endotelna disfunkcija i tip 2 dijabetes melitusa	19
1.2.1.3.1. Hiperglikemija i endotelna disfunkcija	19
1.2.1.3.2. Insulinska rezistencija i endotelna disfunkcija	22
1.2.1.3.3. Inflamacija i endotelna disfunkcija	22
1.2.1.3.4. Dislipidemija i endotelna disfunkcija	22
1.2.2. Patofiziologija dijabetične ateroskleroze	23
1.2.3. Circulus vitiosus: Koagulacija – Inflamacija – Tromboza	27
1.2.4. Kliničke manifestacije makrovaskularne bolesti u dijabetes melitusus tipa 2	28
<b>1.3. BIOMARKERI VASKULARNOG ENDOTELA</b>	31
1.3.1. E – selektin	32

1.3.2. P – selektin	33
1.3.3. von Willebrand faktor – vWF	34
1.3.4. Adhezivne molekule – imunoglobulinska superfamilija	35
1.3.5. Pro-/antikoagulantni markeri endotelne aktivacije	35
1.3.6. Asimetrični dimetilarginin – ADMA	36
1.3.7. Biomarkeri endotelne povrede i reparacije	36
1.3.8. Endokan	37
1.3.9. C- reaktivni protein	37
<b>1.4. TROMBOCITI</b>	<b>39</b>
1.4.1. Morfologija i fiziologija trombocita	39
1.4.2. Trombocitni receptori	40
1.4.3. Adhezija, aktivacija i agregacija trombocita	44
1.4.4. Proinflamatorna i proaterosklerotska uloga trombocita	46
1.4.5. Dijabetični trombociti	48
1.4.6. Marker aktivacije trombocita	49
<b>1.5. ANTIAGREGACIONA TERAPIJA</b>	<b>51</b>
1.5.1. Tienopiridini (blokatori P2Y <sub>12</sub> receptora)	52
1.5.1.1. Tiklopidin	52
1.5.1.2. Klopido­grel – farmakokinetika, farmakodinamika i farmakogenomika	52
1.5.1.3. Prasugrel	55
1.5.2. Direktni inhibitori P2Y <sub>12</sub> receptora	55
1.5.3. Aspirin	56
1.5.4. Metode za praćenje antiagregacione terapije klopido­grelom i aspirinom	57
1.5.4.1. LTA	58
1.5.4.2. VerifyNow	58

1.5.4.3. VASP	58
1.5.4.4. Multiplate analizator	59
1.5.4.5. PFA-100	59
1.5.5. Indikacije za uvođenje antiagregacione terapije klopidogrelom i aspirinom	60
<b>2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	62
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	63
3.1. Vrsta studije	63
3.2. Ispitanici	63
3.2.1. Konstrukcija i način izbora uzorka	63
3.2.2. Protok ispitivanja	65
3.3. Metode ispitivanja	66
3.3.1. Antropometrijski parametri	66
3.3.2. Laboratorijske analize	67
3.3.3. Određivanje sE –selektina	71
3.3.4. Određivanje sP-selektina	72
3.3.5. Određivanje agregabilnosti trombocita	73
3.4. Osnovne metode statističke obrade podataka	75
<b>4. REZULTATI</b>	77
4.1. Analiza podataka u odnosu na ispitivane grupe	77
4.1.1. Demografske karakteristike ispitivanih grupa i kontrolne grupe	77
4.1.2. Kliničke karakteristike ispitanika u odnosu na ispitivane grupe	78
4.1.3. Antropometrijske karakteristike ispitanika u ispitivanim i kontrolnoj grupi	81
4.1.4. Parametri metabolizma glukoze u ispitivanim i kontrolnoj grupi	82
4.1.5. Parametri inflamacije u ispitivanim i kontrolnoj grupi	83
4.1.6. Parametri metabolizma lipida u ispitivanim i kontrolnoj grupi	85

4.1.7. Parametri metabolizma homocisteina u ispitivanim i kontrolnoj grupi	87
4.1.8. Biomarkeri endotelne aktivacije i aktivacije trombocita u ispitivanim i kontrolnoj grupi	87
4.1.9. Parametri koagulacije u ispitivanim i kontrolnoj grupi	88
4.1.10. Analiza trombocitnih pokazatelja i odgovora na antiagregacionu terapiju	90
4.1.10.1. Trombocitni pokazatelji u ispitivanim i kontrolnoj grupi	90
4.1.10.2. Parametri agregabilnosti trombocita i odgovora na antiagregacionu terapiju u ispitivanim i kontrolnoj grupi	91
4.1.11. Biohemijski parametri u ispitivanim i kontrolnoj grupi	92
4.1.12. Eritrocitni pokazatelji u ispitivanim i kontrolnoj grupi	94
4.2. Korelaciona analiza ispitivanih parametara u grupi bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2	95
4.3. Korelaciona analiza ispitivanih parametara u grupi bolesnika bez dijabetesa	108
4.4. Regresiona analiza u grupi bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2	113
4.5. Analiza ispitivanih podgrupa u odnosu na stepen rezidualne aktivnosti trombocita	114
4.5.1. Analiza agregabilnosti trombocita i odgovora na antitrombocitnu terapiju u podgrupama prema kvartilnoj distribuciji ADP testa kod bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa	114
4.5.2. Analiza agregabilnosti trombocita i odgovora na antitrombocitnu terapiju u podgrupama prema kvartilnoj distribuciji ADP testa kod bolesnika bez dijabetesa	122
<b>5. DISKUSIJA</b>	130
<b>6. ZAKLJUČACI</b>	163
<b>7. LITERATURA</b>	165
<b>8. PRILOZI</b>	199

## 1. UVOD

Dijabetes melitus (DM), kao jedno od najčešćih masovnih nezaraznih oboljenja predstavlja globalni svetski zdravstveni problem 21. veka. Rezultat njegove rastuće prevalencije je oko 360 miliona ljudi na svetu obolelih od ove bolesti u 2011. godini. Gotovo 95% od ovog broja čine bolesnici sa tipom 2 dijabetes melitusa (T2DM) (1). Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije, u Republici Srbiji (bez Kosova i Metohije) od dijabetesa boluje približno 600.000 ljudi ili 8,2% populacije. Od ovog broja, 95% čine bolesnici sa T2DM. U Srbiji, dijabetes je peti vodeći uzrok smrtnosti i peti uzrok opterećenja bolešću (2).

Epidemijski porast T2DM praćen je epidemijskim porastom kardiovaskularnih oboljenja jer je sam T2DM ekvivalent rizika za nastanak ishemijske bolesti srca (IBS), ishemijske cerebrovaskularne bolesti (CVB) i periferne arterijske bolesti (PAB) (3). Dugotrajna hiperglikemija, specifični metabolički milje (insulinska rezistencija, hiperinsulinizam, aterogena dislipidemija i visceralna gojaznost), hronična inflamacija, endotelna disfunkcija, poremećena koagulabilnost krvi i hiperaktivnost trombocita, udruženo doprinose nastanku stečenog trombofilnog stanja i različitih aterotromboznih komplikacija (4,5). Kliničke studije su pokazale da je u preko 70% bolesnika sa T2DM letalni ishod uzrokovan upravo različitim kardiovaskularnim akcidentima (3).

U Vojvodini, stopa incidence T2DM raste sa godinama starosti, dostiže maksimum u rasponu životne dobi od 60 - 64 godine, a otkriva se relativno kasno, kada su već prisutne brojne kardiovaskularne komplikacije. Stopa incidence angine pektoris (AP) u novootkrivenih bolesnika sa T2DM, u 2010. godini, za Južno-bački okrug iznosila je 14,5%, stopa incidence akutnog infarkta miokarda (AIM) 4,8%, a moždanog udara po tipu ishemijske 3,8% (2).

Proaterogeni i proinflamatorni poremećaji u T2DM narušavaju homeostazu trombocita i vaskularnog endotela. Hiperaktivni trombociti u interaktivnoj komunikaciji sa



disfunkcionalnim vaskularnim endotelom igraju veoma važnu ulogu u nastanku dijabetične makroangiopatije i doprinose nastanku aterotromboznih komplikacija (6,7).

Kompleksan terapijski pristup u T2DM ima za cilj ne samo uspostavljanje glikoregulacije, korekciju brojnih metaboličkih poremećaja i modifikaciju pridruženih faktora rizika za nastanak ateroskleroze već i primenu antitrombocitne terapije u cilju primarne ili sekundarne prevencije aterotromboznih komplikacija. Uprkos primenjenoj antiagregacionoj terapiji, deo bolesnika doživi rekurentne aterotrombozne atake. Bolesnici sa T2DM se izdvajaju kao grupa sa posebnim rizikom za recidivantne aterotromboze što može biti uslovljeno rezistencijom na primenjenu antitrombocitnu terapiju (8). Praćenje efekata antitrombocitne terapije i blagovremeno identifikovanje rezistentnih bolesnika, ima za cilj optimizaciju primenjene antitrombocitne terapije što može biti od izuzetnog kliničkog značaja u smislu sprečavanja progresije aterotromboznog procesa. Ovo istraživanje ima za cilj da ispita učestalost i stepen rezistencije na antitrombocitnu terapiju u bolesnika sa T2DM kao i patofiziološke mehanizme odgovorne za njen nastanak.

## **1.1. DIJABETES MELITUS TIP 2**

### **1.1.1. Etiopatogeneza, definicija i dijagnostika dijabetes melitusa tip 2**

T2DM je heterogena grupa metaboličkih poremećaja (metabolizma ugljenih hidrata, proteina i masti) koju karakteriše stanje hronične hiperglikemije, a koje je nastalo kao posledica različitog stepena poremećaja sekrecije i/ili delovanja insulina (9).

Interakcija između faktora okoline (nepravilna ishrana, gojaznost i sedateran način života) i poligenetskog nasleđa dovodi do poremećene sekrecije insulina i redukovane insulinske osetljivosti, jetrenog, mišićnog i masnog tkiva, što su ujedno i glavne patofiziološke odlike odgovorne za nastanak bolesti (10). Studije o genomskim asocijacijama (eng. genome - wide association studies - GWAS), dovele su do novih saznanja o povezanosti genetske arhitekture T2DM i mehanizma nastanka i razvoja ovog oboljenja (11) kao i preklapanja T2DM genskih lokusa sa genetskim determinantama gojaznosti i dislipidemije što objašnjava fenotipsko preklapanje T2DM, gojaznosti i kardiovaskularnih bolesti (KVB) (12). Sam početak T2DM nemoguće je jasno definisati jer ovo sporoprogredijentno oboljenje prolazi kroz različite faze razvoja, od sindroma insulinske rezistencije, preko narušene homeostaze glukoze, u vidu oštećene glikemije našte (eng. impaired fasting glucose- IFG) i/ili sindroma intolerancije na glukozu (eng. impaired glucose tolerance - IGT) do kliničkog ispoljavanja same bolesti. Sa progresijom insulinske rezistencije i kompenzatornog hiperinsulinizma,  $\beta$  ćelije pankreasa se vremenom iscrpljuju i nemoguće je održati euglikemijsko stanje. U početku se razvija postprandijalna hiperglikemija, glavna odlika sindroma IGT, a daljim smanjenjem insulinske sekrecije i povećanjem hepatične produkcije glukoze razvija se perzistentna hiperglikemija sa kliničkom manifestacijom T2DM. Pojedine faze poremećaja metabolizma glukoze u toku razvoja T2DM možemo dijagnostikovati merenjem koncentracije glukoze u venskom uzorku plazme našte i/ili u toku izvođenja oralnog glukoza tolerans testa sa 75 g glukoze (OGTT) u 120. minutu (13).

Prema Američkoj asocijaciji za dijabetes (American Diabetes Association – ADA), dijagnoza dijabetesa se postavlja na osnovu sledećih dijagnostičkih kriterijuma: HbA1C  $\geq$  6.5%; ili ŠUK našte  $\geq$ 7,0 mmol/l; ili ŠUK u toku OGTT-a u 120. minutu  $\geq$ 11,1 mmol/l; ili ŠUK u bilo kom slučajnom uzorku krvi (bez obzira na obrok)  $\geq$ 11,1 mmol/l uz prisustvo tipičnih dijabetesnih simptoma (poliurija, polidipsija, gubitak u telesnoj težini) (14).

### **1.1.2. Insulinska rezistencija – etiopatogeneza, definicija i kliničke implikacije**

Početa i glavna odlika T2DM jeste insulinska rezistencija, praćena poremećenom insulinskom sekrecijom, a potom prekomernom hepatičnom produkcijom glukoze i dislipidemijom. Insulinska rezistencija se definiše kao smanjena osetljivost insulin zavisnog tkiva, mišićnog, masnog i jetrenog, na aktuelne koncentracije endogeno sintetisanog insulina kojima je izloženo (15). Na nivou skeletnih mišića, manifestuje se smanjenim insulinom posredovanim preuzimanjem glukoze u mišićnim ćelijama, a rezultat je poremećene insulinske signalizacije, kao i niza multiplih postreceptorskih intraćelijskih defekata uključujući poremećen transport glukoze putem GLUT-4 transportera (eng. glucose transporter type 4 – GLUT-4), glukozne fosforilacije, redukovane oksidacije glukoze i sinteze glikogena. Javlja se mnogo pre manifestacije poremećaja glikemijskog statusa (16,17). Osobe izložene gomilanju visceralnih masnih depoa, imaju visok rizik za nastanak insulinske rezistencije (18). U visceralnom masnom tkivu odvija se intenzivan lipolitički proces što doprinosi brzom prometu slobodnih masnih kiselina (SMK) i njihovom pojačanom oslobađanju u cirkulaciju (19). Fluks SMK proporcionalan je količini masnog tkiva. Fiziološki, inhibicija lipolize u masnom tkivu je najdelikatnija odlika insulinskog delovanja dok se u uslovima insulinske rezistencije ona mnogostruko umanjuje (20). Povećanje koncentracije SMK doprinosi inhibiciji antilipolitičkog efekta insulina, uzrokujući dalju lipolizu i pogoršavajući stepen rezistencije na insulin (21). Venska drenaža regije visceralnih masnih depoa odvija se direktno putem portnog krvotoka, a prema ovoj ‘portnoj teoriji’

smatra se da je visceralna gojaznost odgovorna za preplavlivanje jetre SMK, što posledično doprinosi razvoju insulinske rezistencije na ovom nivou (22). U jetri, SMK stimulišu procese glukoneogeneze i sinteze triglicerida, što dodatno doprinosi povećanju glikemije i razvoju specifične dislipidemije (23).

#### **1.1.2.1. Insulinska rezistencija i dislipidemija**

Visoki fluks SMK u jetru, u insulin rezistentnih osoba dovodi do pojačane sinteze i skladištenja triglicerida i njihove prekomerne sekrecije u vidu lipoproteina veoma male gustine (eng. very low-density lipoprotein –VLDL) (24). Nastalu dislipidemiju karakteriše povećanje nivoa SMK, triglicerida, VLDL i lipoproteina male gustine (eng. low-density lipoprotein - LDL). Sa povećanjem nivoa triglicerida, koji se smatraju dobrim markerom postojanja insulinske rezistencije, povećava se i udeo mali gustih LDL čestica, LDL čestica bogatih trigliceridima. Udruženo sa ovim procesom, snižava se nivo lipoproteina visoke gustine (eng. high density lipoproteins – HDL). Aterogeni potencijal ove dislipidemije višestruko uvećava kardiovaskularni rizik i doprinosi nastanku i razvoju ateroskleroze (25,26).

#### **1.1.2.2. Insulinska rezistencija i inflamacija**

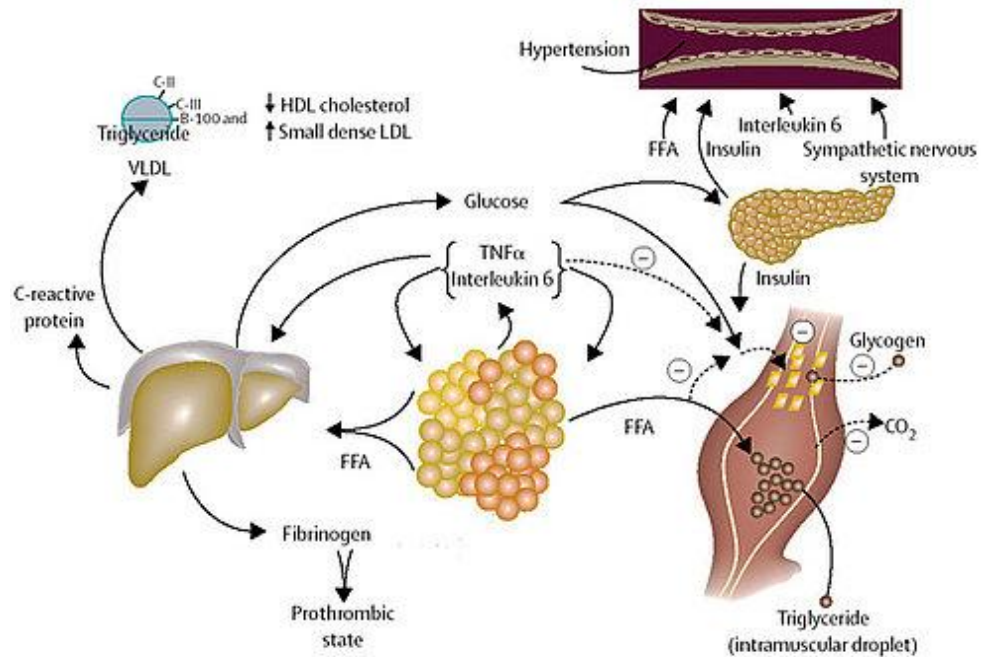
Adipociti i makrofazi poreklom iz monocita koji se nalaze u masnom tkivu, luče proinflamatorne citokine poput IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-10, IL-18, rezistina, visfatina i drugih, za koje se zna da nisu samo markeri inflamatornog procesa već njegovi aktivni učesnici i na različite načine doprinose patogenezi insulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i T2DM (27,28,29,30). Oni se javljaju u najranijim fazama patogeneze T2DM, doprinose progresiji oboljenja povećavajući stepen insulinske rezistencije u jetri, masnom i mišićnom tkivu remeteći na taj način homeostazu glukoze. TNF- $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor alpha) promovise insulinsku rezistenciju inhibišući insulinsku signalizaciju putem insulin receptorskog supstrata (IRS-1), a IL-6 stimuliše hepatičnu produkciju glukoze, sintezu VLDL

u jetri i povećava insulinsku rezistenciju na nivou mišića. IL-6 i TNF-  $\alpha$  stimulišu hepatičnu produkciju C - reaktivnog proteina (CRP), inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1), serumskog amiloida A (SAA) i fibrinogena, a nalaze se u pozitivnoj korelaciji sa povišenim nivoom glikemije, gojaznošću i insulinskom rezistencijom (31). Mnogobrojne studije su ukazale na povezanost pojedinih proinflamatornih molekula sa određenim metaboličkim pokazateljima kao što su hiperglikemija, hiperinsulinemija, insulinska rezistencija, indeks telesne mase (ITM), obim struka (OS) kod bolesnika u različitim fazama progresije T2DM (32,33,34). Adipocitokini pospešuju proces hronične inflamacije, narušavaju vaskularnu homeostazu, remete fiziološke procese hemostaze povećavajući ukupni kardiovaskularni rizik kod ovih bolesnika u najranijim fazama razvoja T2DM (35).

### **1.1.2.3. Insulinska rezistencija i hipertenzija**

Poznato je da hiperinsulinemija može rezultirati povećanom reapsorpcijom natrijuma i povišenom aktivnošću simpatikusa što doprinosi razvoju hipertenzije. Delovanje lokalnog renin-angiotenzin sistema masnog tkiva gojaznih osoba, čija je aktivnost proporcionalna veličini masne mase, doprinosi razvoju hipertenzije u osoba sa insulinskom rezistencijom (36).

Slika 1. Patofiziološki mehanizmi insulinske rezistencije – preuzeto iz Eckel RH et al. (37)



### 1.1.3. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MS) je entitet koji u sebi integriše insulinsku rezistenciju, visceralni tip gojaznosti, dislipidemiju (povišeni trigliceridi, VLDL i LDL, snižen HDL uz prisustvo malih gustih LDL čestica), hiperglikemiju, hipertenziju, endotelnu disfunkciju, proinflamatorno i protrombotičko stanje (38). Smatra se da MS petostruko povećava rizik za nastanak T2DM, a dvostruko za nastanak aterosklerotskih KVB (39). Iako su veze između insulinske rezistencije i različitih komponenata MS kompleksne i često dvosmerne, i teško je razlučiti specifičan doprinos same insulinske rezistencije patofiziologiji MS, ona se i dalje smatra njegovom okosnicom. Pošto insulin ostvaruje značajne efekte na metabolizam glukoze, lipida, kontrolu krvnog pritiska i vaskularnu homeostazu, važno je imati u vidu da je svaki od ovih sistema pod multifaktorijalnim uticajem i često je potreban poremećaj na više nivoa da bi se poremetila homeostaza ovih sistema (40). Više od 75% bolesnika sa već manifestnim T2DM kao i osoba sa smanjenom glukoznom tolerancijom imaju znake metaboličkog sindroma (41). Više promenljivih (gojaznost, hiperglikemija, hipertenzija,

dislipidemija, fizička neaktivnost, pušenje) i nepromenljivih (godine života, rasa, pol i porodična anamneza) faktora rizika udruženo čine kardiometabolički rizik, zapravo rizik za nastanak T2DM i KVB (42,43). Važnost pravovremenog identifikovanja osoba sa visokim kardiometaboličkim rizikom, uslovila je definisanje kriterijuma (na osnovu pojedinačnog doprinosa različitih faktora rizika u nastanku aterosklerotskog kardiovaskularnog i metaboličkog komorbiditeta) za postavljanje dijagnoze MS (44). Prema Međunarodnoj federaciji za dijabetes (International Diabetes Federation – IDF), kriterijumi za definisanje metaboličkog sindroma su sledeći: OS  $\geq 94$  cm (M) i  $\geq 80$  cm (Ž), trigliceridi  $\geq 1,7$  mmol/l, HDL  $< 1,03$  mmol/l (M) i  $< 1,29$  mmol/l (Ž), TA  $\geq 130/85$  mmHg, ŠUK  $\geq 5,6$  mmol/l. Dijagnoza se postavlja na osnovu obima struka i još dva pozitivna od ostala četiri kriterijuma (44, 45, 46).

Tokom predijabetesnog stanja, paralelno sa razvojem hronične hiperglikemije, razvija se aterogena dislipidemija, metabolička inflamacija, endotelna disfunkcija, hipertenzija, prokoagulantno i protrombotičko stanje, što dovodi do ubrzanog razvoja hroničnih makrovaskularnih komplikacija. Framingamska studija (Framingham Heart Study - FHS) pokazala je da već osobe sa predijabetesom imaju visok rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja, a neretko se dijagnoza T2DM postavlja pri prvom aterotromboznom akcidentu (47). Podaci INTERHEART studije, pokazuju da se visceralna gojaznost, dislipidemija, hipertenzija i dijabetes nalaze među devet najznačajnijih faktora rizika koji zajedno čine 90% populacionog rizika za nastanak infarkta miokarda (48).

## **1.2. PATOFIZIOLOGIJA MAKROVASKULARNE BOLESTI U DIJABETES MELITUSU TIP 2**

Hronične vaskularne komplikacije T2DM utiču na mnoge organe i organske sisteme i odgovorne su za većinu nastalog komorbiditeta i mortaliteta ovih bolesnika. S obzirom da dug period asimptomatske hiperglikemije, kao i niz metaboličkih poremećaja, predstoje kliničkoj manifestaciji T2DM, mnogi bolesnici imaju vaskularnu komplikaciju u vreme postavljanja dijagnoze dijabetesa. Rizik za nastanak hronične vaskularne komplikacije se povećava u funkciji trajanja hiperglikemije (49,50). Hiperglikemija, visceralni tip gojaznosti, insulinska rezistencija, dislipidemija, hipertenzija, smanjena fizička aktivnost i pušenje su najčešće faktori rizika odgovorni za nastanak makrovaskularne bolesti u T2DM (51,52). Patogeneza dijabetičnih komplikacija je kompleksna i uključuje endotelnu disfunkciju, niz hemostaznih poremećaja (hiperaktivnost trombocita, poremećaj koagulacije i fibrinolize) i inflamaciju, uslovljene kardiometaboličkim faktorima rizika, koje za posledicu imaju narušavanje vaskularne homeostaze i ubrzano odvijanje procesa ateroskleroze (53).

### **1.2.1. Disfunkcija vaskularnog endotela**

S obzirom da se endotel odavno ne smatra inertnim omotačem unutrašnjosti zida krvnog suda, već kompleksnim organom koji ispoljava intenzivnu autokrinu, parakrinu i endokrinu funkciju, a koji je prva linija odbrane u borbi protiv ateroskleroze, jasno je da alteracija funkcije endotela prethodi razvoju morfoloških aterosklerotskih promena (54). Biološka veza između "oštećenja" endotela i procesa ateroskleroze, predmet je istraživanja još od pedesetih godina 19. veka, kada je Rudolph Virchow pretpostavio da je aterosklerotska lezija produkt inflamatorne promene intime zida arterijskog krvnog suda koja je inicirana mehaničkom iritacijom (55). 1977. godine, Ross i Glosmet su postavili hipotezu "odgovora endotela na povredu", inicijalnog događaja u evoluciji ateroskleroze i istakli ključnu ulogu trombocita u razvoju ove lezije (56). 1998. godine, otkriće azot monoksida (eng. nitric oxide -



NO), ``signalne molekule kardiovaskularnog sistema``, kako su je nazvali Robert Furchgott i saradnici, nagrađeno je Nobelovom nagradom i otvorilo je vrata revoluciji istraživanja na polju endotelne funkcije i vaskularne homeostaze (57). Danas se zna da je funkciono izmenjeni endotel predilekciono mesto nastanka ateroskleroze, a endotelna disfunkcija ne samo inicijator ovog procesa, već i amplifikator kaskadnog niza kasnijih događaja koji rezultiraju formiranjem plaka. Prema inflamacijskoj teoriji ruskog patologa Mečnika, disfunkcija endotela se smatra ključnim faktorom procesa ateroskleroze (58).

#### **1.2.1.1. Fiziologija vaskularnog endotela**

U bazalnim, fiziološkim uslovima, očuvanje integriteta endotelnih ćelija je od presudne važnosti za očuvanje vaskularne homeostaze. Endotel nije inertna barijera, već omogućava aktivnu komunikaciju između cirkulišuće krvi i glatkog mišićnog sloja zida krvnog suda. Na taj način, sistem ispoljava efekte koji mogu dovesti do jedne ili više promena: 1) vazokonstrikcija i vazodilatacija regulišu protok krvi kroz organe, 2) rast i/ili promene u fenotipskim karakteristikama glatkomišićnog sloja, 3) proinflamatorne ili antiinflamatorne promene, 4) održavanje protoka krvi i zaustavljanje krvarenja (59,60). Fiziološki, endotel u kontaktu sa nizom ćelijskih i humoralnih medijatora, odgovara lučenjem i/ili ekspimiranjem niza bioaktivnih molekula i na taj način podešava vaskularni tonus, reguliše ćelijski rast i molekularni transport, ispoljava antiinflamatorni efekat, inhibiše proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija, adheziju i migraciju leukocita, adheziju, agregaciju i aktivaciju trombocita, ispoljava antikoagulantni i profibrinolitički efekat (61).

Endotel igra presudnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska i optimalnog protoka krvi kontinuiranom modulacijom vaskularnog tonusa, balansirajući između vazodilatacije i vazokonstrikcije, sintezom vazodilatatora, NO i prostaciklina (PGI<sub>2</sub>), i vazokonstriktora, endotelina - 1 (ET-1) i endotelnog hiperpolarizujućeg faktora (eng. endothelium - derived hyperpolarizing factor - EDHF) (61,62). Vaskularni tonus je većinu vremena u

vazodilatatornom stanju, a autoregulacija se odvija pod dejstvom hemodinamskih sila, pulsatilne sile i sile trenja, koje delujući mehanički na zid krvnog suda stimulišu endotelnu NO sintetazu (eNOS) i sintezu NO. Ovaj slobodni radikal difunduje u glatkomišićni sloj, gde aktivacijom gvanil-ciklaze povećava produkciju cikličnog gvanozin-monofosfata (cGMP) što smanjuje intraćelijsku količinu  $Ca^{2+}$  i rezultira vazodilatacijom (63,64). NO takođe inhibiše proliferaciju, migraciju i diferencijaciju glatkih mišićnih ćelija u intimu krvnog suda. Stabilizuje I $\kappa$ B, inhibitoru subjedinicu NF- $\kappa$ B, koja održava ovaj proinflamatorni transkripcioni činilac u neaktivnom stanju i na taj način inhibiše ekspresiju leukocitnih adhezivnih molekula, produkciju hemokina i citokina (61,65). Smatra se da je bioraspoloživost najpotentnijeg vazodilatatora NO premisa vaskularnog zdravlja (66). PGI<sub>2</sub> ispoljava vazodilatatorno, antiagregaciono i citoprotektivno delovanje (67). Inhibicija proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija fiziološki je inhibiran inhibitorima faktora rasta poput NO, PGI<sub>2</sub>, trombospondina, transformišućeg faktora rasta-beta (TGF- $\beta$ ) i interferona-gama (INF- $\gamma$ ), kao i održavanjem balansa između jona  $Ca^{2+}$  (kontrakcija i proliferacija glatkih mišićnih ćelija) i cikličnog adenozin monofosfata, cAMP-a (vazorelaksacija i inhibicija proliferacije) (63). Adhezijski molekuli koji kontrolišu migraciju leukocita na vaskularnom endotelu, u fiziološkim uslovima, uopšte nisu ili su veoma malo ispoljeni na ćelijskoj površini (68). Intaktan vaskularni endotel onemogućava adheziju trombocita i odvaja neaktivne koagulacijske činioce od reaktivnih subendotelnih molekula, a uravnoteženim odnosom lučenja prokoagulantnih/antikoagulantnih i profibrinolitičkih/antifibrinolitičkih materija, (PAI-1, tkivni aktivator plazminogena (tPA), trombomodulin (TM), trombinom aktivisani inhibitor fibrinolize (TAFI), inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI)), doprinosi fiziološkom procesu održavanja ekvilibrijuma procesa koagulacije i fibrinolize (69,70,71,72).

### 1.2.1.2. Patofiziologija endotelne disfunkcije

Morfološki normalne arterije sa funkcionalno izmenjenim odgovorom endotela predstavljaju ciljno mesto rane ateroskleroze (63). Endotelnu disfunkciju karakteriše redukovana biorasploživost NO što remeti endotel zavisnu vazodilatatornu sposobnost krvnog suda (73). Međutim, imajući u vidu endotelne protektivne sposobnosti NO, endotelna disfunkcija podrazumeva i određeni stepen aktivacije endotelne ćelije koja menja inertni endotelni fenotip u proinflamatorni, proliferativni i prokagulantni (54,73,74). Pod dejstvom različitih stimulativnih agenasa, (mehanički, biološki, hemijski, inflamatorni, imunski, metabolički), kao odgovor na podražaje, dolazi do fenotipske promene endotelne ćelije, endotelne aktivacije (63). Dolazi do *de novo* genske ekspresije, sinteze proinflamatornih citokina i adhezivnih molekula. Povećana je ekspresija adhezivnih molekula (E-selektin, intraćelijski adhezivni molekul-ICAM-1, vaskularni ćelijski adhezivni molekul-VCAM-1) i propusnost krvnog suda. Takođe, dolazi do smanjenja produkcije i/ili smanjene ekspresije molekula poput trombomodulina, heparan sulfata, NO, PGI<sub>2</sub>, a povećane ekspresije faktora (vWF), PAI-1, tkivnog faktora (TF), trombocit aktivirajućeg faktora (eng. platelet activating factor – PAF), što čini da površina endotela postane protrombogena. Sintetišu se proinflamatorni citokini poput IL-6, hemokina (IL-8) što pojačava odgovor akutne faze i regrutuje monocite na mesto povrede (75). Različiti podražaji na površinu endotelne ćelije imaju zajednički imenilac, transkripcioni faktor, NF-κB te preko njega stimulišu transkripciju gena odgovornih za nastanak fenotipske konverzije endotelne ćelije (76). Fenotipska ekspresija endotelne aktivacije podrazumeva pet osnovnih karakteristika: ekspresiju leukocitnih adhezivnih molekula, produkciju citokina, promene oblika i permeabiliteta endotela, protrombotske promene i ushodnu regulaciju sopstvenih antigena (63,75).

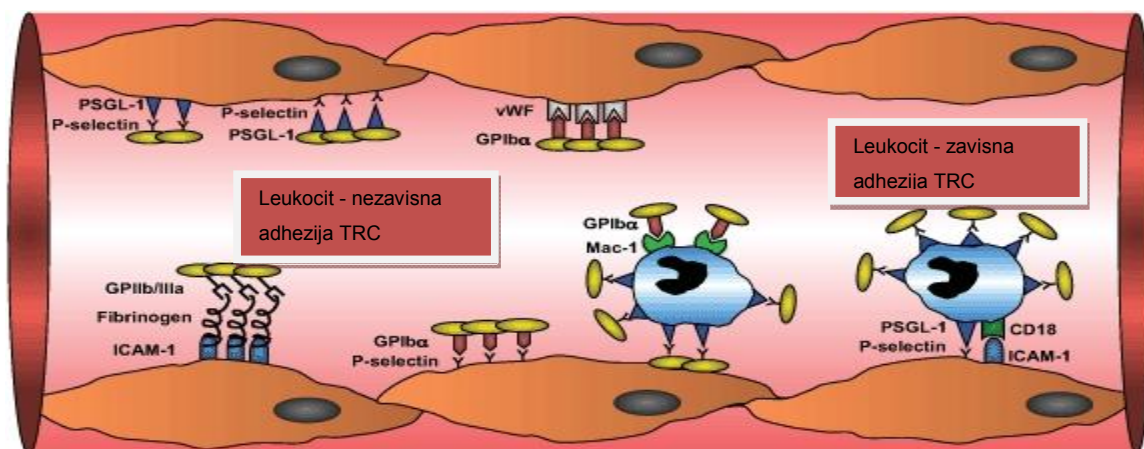
Uz aktivisani endotel dolazi do adhezivnim molekulama posredovanog kotrljanja leukocita, hemokinima inicirane leukocitne aktivacije i o integrinima zavisnog uspostavljanja

čvrstog kontakta, priljublivanja leukocita uz endotel. Ovi događaji su prethodnica ekstrasvazaciji leukocita u subendotelni prostor što je uslov za nastanak i razvoj aterosklerotskih promena na mestu endotelne disfunkcije (77).

Takođe je poznato da do privlačenja i adhezije trombocita uz zid krvnog suda može doći i mnogo pre nego što dođe do narušavanja integriteta endotelnog sloja i ogoljavanja subendotelne struktura, tj. već u fazi endotelne disfunkcije (78). Adhezija trombocita uz zid krvnog suda uslovljena je ekspresijom adhezivnih molekula na aktivisanim endotelnim ćelijama, trombocitima i leukocitima. Trombociti se vezuju uz zid krvnog suda direktnim kontaktom trombocit/endotelna ćelija ili trombocit/leukocit/endotelna ćelija, indirektno. Aktivisani trombociti pojačano ekspimiraju pojedine površinske antigene koji će omogućiti kontakt trombocita, endotela i leukocita, ali i sintetišu i luče materije koje potencijalno utiču na leukocite i endotelne ćelije indukujući njihovu dalju aktivaciju. Luče hemokin, CCL5, takođe poznat kao RANTES (eng. regulated on activation normal T cell expressed and secreted), koji vežući se uz glikozaminoglikane endotela dalje promovise leukocitnu adheziju i IL-8 koji dovodi do hemotakse monocita, neutrofila i T-limfocita (79).

Direktan kontakt trombocita i endotelne ćelije omogućen je vezivanjem P-selektina i P-selektin glikoproteinskog liganda (PSGL-1) ekspimiranih na trombocitima i endotelnim ćelijama, kao i putem GPIIb $\alpha$ , glikoproteinskog receptora trombocita koji se vezuje za vWF ili P-selektin, ekspimirane endotelno. Direktna adhezija trombocita na endotel može biti rezultat interakcije ICAM-1;fibrinogen,GPIIb/IIIa mehanizma (78,80,81). Indirektna interakcija trombocita i endotela, može biti posredovana stvaranjem trombocitno-leukocitnih agregata (78). (Slika 2.)

Slika 2. Mehanizmi adhezije trombocita uz aktivisani endotel – preuzeto i modifikovano prema Granger et al. (78)



Tesnom interakcijom aktivisanih endotelnih ćelija, leukocita i trombocita u toku odgovora na inflamatorne stimulse dolazi do pomeranja procesa hemostaze u pravcu prokoagulantnog, protrombotskog stanja (82).

Promena životnih navika, gubitak telesne mase, fizička aktivnost, prestanak pušenja, lekovi (statini, metformin, antioksidanti, blokatori Ca kanala, beta blokatori, folati, estrogen) mogu imati pozitivan efekat na endotelnu funkciju (83).

Proces endotelne aktivacije je reverzibilnog karaktera sve do momenta dok se ne iscrpe svi protektivni mehanizmi i dok ne dođe do apoptoze ovih ćelija i narušavanja integriteta endotelne barijere (54).

Tabela 1. Razlike između zdravog i disfunkcionalnog vaskularnog endotela

Funkcionalni vaskularni endotel	Disfunkcionalni vaskularni endotel
Vazodilatacija (↓ ET-1, ↑ NO, PGI <sub>2</sub> )	Vazokonstrukcija (↑ ET-1, ↓ NO, PGI <sub>2</sub> )
↓ Oksidativni stres	↑ Oksidativni stres (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , ONOO <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Antikoagulantni efekat (↓ PAI-1, vWF, P-selektin, TF)	Prokoagulantni efekat (↑ PAI-1, vWF, P-selektin, TF)
Antiinflamatorni efekat (↓ ICAM, VCAM, E-selektin, CRP, TNF-α, IL-6, MCP-1)	Proinflamatorni efekat (↑ ICAM, VCAM, E-selektin, CRP, TNF-α, IL-6, MCP-1)
Reparatorni mehanizmi (↑ EPCs)	Reparatorni mehanizmi (↓ EPC)
Oštećenje endotela (↓ CECs, EMPs)	Oštećenje endotela (↑ CECs, EMPs)

Legenda: ET-1-endotelin-1; NO-azot monoksid; PGI<sub>2</sub>-prostaciklin; PAI-1-inhibitor aktivatora plazminogena ;vWF- FonVilebrandov faktor; TF- tkivni faktor; ICAM-intraćelijski adhezivni molekul; VCAM- vaskularni ćelijski adhezivni molekul; CRP- C reaktivni protein; IL-6- interleukin 6; MCP-1-monocitni hemotaksni protein; EPC- endotelna progenitorska ćelija; CEC- cirkulišuća endotelna ćelija-; EMP- endotelna mikropartikula; O<sub>2</sub><sup>-</sup>-superoksid anjon; ONOO<sup>-</sup>-peroksinitrit; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vodonik peroksid;

### 1.2.1.3. Endotelna disfunkcija i tip 2 dijabetes melitusa

Glavni mehanizmi koji se dovode u vezu s nastankom endotelne disfunkcije u T2DM su hiperglikemija, hiperinsulinemija, insulinska rezistencija, dislipidemija, inflamacija i oksidativni stres (84).

#### 1.2.1.3.1. Hiperglikemija i endotelna disfunkcija

Hiperglikemija uzrokuje vaskularno oštećenje različitim mehanizmima koji uključuju aktivaciju poliolskog puta i stvaranje sorbitola, povećano stvaranje završnih produkata neenzimske glikozilacije, AGE (eng. advanced glycation end products), povećanom ekspresijom AGE receptora (eng. receptor for advanced glycation end products -

RAGE), aktivacijom različitih izoformi protein kinaze C (PKC), i aktivacijom heksozaminskog puta. Zajednički put u kojem se sastaju svi prethodni mehanizmi, i kojim nastavljaju da izazivaju vaskularno oštećenje, je put oksidativnog stresa koji vodi ka endotelnoj disfunkciji i narušavanju integriteta endotela (85).

U uslovima hronične hiperglikemije, zbog nemogućnosti metabolisanja glukoze u potpunosti aerobnom glikolizom, glukoza se metaboliše alternativnim putevima. Aktivacijom poliolskog puta, pod dejstvom enzima reduktaze aldoze, povećava se sinteza sorbitola koji deluje toksično (osmotska aktivnost), i smanjuje koncentraciju mioinozitola. U isto vreme, oksidacijom NAD(P)H (eng. nicotinamid adenine dinucleotide phosphate) i redukcijom NAD<sup>+</sup> (eng. nicotinamid adenine dinucleotid), stvara se redoks disbalans, smanjuje se bioraspoloživost NO što dodatno pojačava oksidativni stres (86).

Neenzimskom glikozilacijom proteina u uslovima hronične hiperglikemije nastaju intermedijerni produkti (aldimini, fruktozilizini) i ireverzibilni, završni produkti neenzimske glikozilacije - AGE. AGE su glikotoksini koji reaguju sa intraćelijskim strukturama, ekstraćelijskim matriksom i cirkulišućim proteinima, menjajući im strukturu i funkciju (87). Vezujući se uz RAGE endotelnih ćelija, monocita, makrofaga i glatkih mišićnih ćelija, indukuju oksidativni stres i proinflamatorni odgovor (88). Usled hiperglikemije, dolazi do pojačane glikozilacije LDL čestica (gLDL), njihove konformacijske promene i otežanog vezivanja uz LDL receptor, stvaraju se AGE-LDL koji imaju proinflamatorne i proaterogene karakteristike (86).

Hiperglikemija intraćelijski povećava sintezu diacil-glicerola (DAG) koji sledstveno aktivira PKC. Posledice aktivacije PKC su disbalans odnosa NO/ET-1, sa posledičnom otežanom vazodilatacijom, povećanje vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) sa sledstvenom angiogenezom i povećanom vaskularnom permeabilnošću, povećanje sinteze

kolagena tip IV i fibronektina, povećanje PAI-1, aktivacija NF- $\kappa$ B sa povećanom proinflamatornom genskom ekspresijom (87,89).

Hiperglikemija stimuliše povećanu produkciju superoksid anjona,  $O_2^-$ , aktivacijom puta ksantin i NAD(P)H oksidaze, ciklooksigenaze, mitohondrijalnog elektron transportnog lanca, poliolskog puta, autooksidacijom glukoze i formiranjem AGE (90).  $O_2^-$  zauzvrat povećava produkciju AGE i heksozamina, aktivira PKC, poliol (sorbitol) put i NF- $\kappa$ B i dovodi do produkcije proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), ekspresije adhezivnih molekula (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1), i ET -1, što zauzvrat generiše još više ovog slobodnog radikala (91,92). AGE menjaju funkciju različitih proteina, a aktivišući RAGE povećavaju intraćelijsku produkciju  $O_2^-$ . Eksperimentalno je dokazano da hiperglikemija smanjuje koncentraciju NO povećavajući produkciju reaktivnih kiseoničkih radikala, poput superoksid anjona,  $O_2^-$  (84,93).  $O_2^-$  se uz pomoć enzima SOD (superoksid dismutaza) pretvara u  $H_2O_2$  (vodonik peroksid) koji u interakciji sa NO stvara reaktivni oksid peroksinitrit (ONOO $^-$ ), koji lako prodire u ćeliju i indukuje ćelijsko oštećenje putem lipidne peroksidacije, inaktivacije enzima i proteina oksidacijom i nitracijom. Peroksinitrit u interakciji sa mitohondrijama indukuje oslobađanje proapoptotičkih činilaca, citohroma c i apoptotskog indukujućeg faktora (91). Disbalans između bioraspoloživosti NO i akumulacije reaktivnih kiseoničkih vrsta (eng. reactive oxygen species - ROS), vodi nastanku endotelne disfunkcije i smatra se snažnim prediktorom kardiovaskularnih komplikacija (94).

Za razliku od mikrovaskularnih komplikacija gde hiperglikemija ima dominantnu ulogu, u patogenezi makrovaskularnih komplikacija hiperglikemija je samo deo "slagalice", a svi ostali delovi (dislipidemija, insulinska rezistencija i inflamacija) doprinose da slika bude potpuna (87).



#### **1.2.1.3.2. Insulinska rezistencija i endotelna disfunkcija**

U uslovima insulinske rezistencije i posledične hiperinsulinemije, dolazi do smanjene aktivacije fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K), a pojačane aktivacije mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK), signalnog puta, koji reguliše biološki rast, mitogenezu i diferencijaciju, ali i insulinom stimulisanu sekreciju ET-1 (95). Usled smanjene aktivacije PI3K, smanjuje se produkcija NO, a povećava stvaranje ROS, što indukuje oksidativni stres. Takođe, aktivacijom ovog puta dolazi do ushodne regulacije PAI-1, povećane ekspresije adhezivnih molekula, VCAM-1 i E-selektina. Stvara se uslov za ispoljavanje vazokonstriktornog, proliferativnog, proaterogenog i protrombogenog fenotipa endotelne ćelije (96,97).

#### **1.2.1.3.3. Inflamacija i endotelna disfunkcija**

U T2DM registruje se hronična inflamcija niskog stepena, a brojni proinflamatorni citokini aktivišu vaskularni endotel. Registruje se povećan nivo IL-1, IL-6, CRP, TNF- $\alpha$  i fibrinogena. Ovi medijatori zapaljenskog procesa, regulišu vaskularnu permeabilnost, promenu vazoregulatornog odgovora, stimulišu adheziju leukocita uz endotel i deluju protrombogeno. TNF- $\alpha$  i IL-1 aktivišući NF- $\kappa$ B stimulišu ekspresiju gena za ICAM-1, IL-1, IL-6, VCAM-1, E – selektin, PAI-1 i TF. Takođe, TNF- $\alpha$  smanjuje ekspresiju eNOs i produkciju NO, a povećava ET-1 i nivo oksidativnog stresa (98, 86). CRP preko receptora na endotelnim ćelijama aktivise NF- $\kappa$ B i povećava ekspresiju ICAM-1, VCAM-1, E – selektina, monocitnog hemotaksnog proteina-1 (MCP-1) i ET-1, PAI-1 i smanjuje ekspresiju eNOs i posledičnu sintezu NO. Pospešuje preuzimanje oxLDL od strane makrofaga i stvaranje penastih ćelija što ubrzava proces ateroskleroze (99,100).

#### **1.2.1.3.4. Dislipidemija i endotelna disfunkcija**

U T2DM, visoka koncentracija SMK, uslovljena je njihovim prekomernim dotokom iz masnog tkiva i njihovim poremećenim preuzimanjem od strane skeletnih mišića. SMK

aktivišu PKC i narušavaju insulinom posredovanu aktivaciju PI3K i na taj način smanjuju bioraspoloživost NO (84,88). Stimulišu produkciju velike količine reaktivnih kiseoničkih radikala, koji aktivišući NF-κB, generišu sintezu proinflamatornih citokina što dalje produbljuje inflamatorni proces i povećava nivo oksidativnog stresa (85). Jetra odgovara na povećanje SMK produkcijom VLDL. Zbog njihove povećane produkcije, a smanjenog klirensa iz cirkulacije, stvara se hipertrigliceridemija. Povećana koncentracija triglicerida, smanjuje nivo HDL promovišući transport holesterola sa HDL na VLDL. U ovoj delipidacionoj kaskadi, u uslovima hipertrigliceridemije, nastaje subpopulacija malih gustih LDL čestica sa visokim aterogenim potencijalom (eng. small dense LDL – sdLDL) (84). Usled slabog vezivanja za LDL receptore, sdLDL lakše penetriraju u intimu krvnog suda i duže se zadržavaju u subendotelu (101). Ovde bivaju modifikovane glikozilacijom ili oksidacijom, a ovako modifikovane lipidne čestice imaju izrazita proaterogena dejstva na endotel. Oksidisani LDL promoviše ekspresiju adhezivnih molekula (ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina), deluju hemotaksno na monocite i T limfocite. Vezujući se uz receptore čistače na makrofazima, oksidisani LDL biva interniran unutar makrofaga i dolazi do stvaranja ‘penaste’ ćelije. Akumulacija ovih ćelija (usled bržeg stvaranja, a sporijeg odstranjivanja) uslovljava nastanak masne pruge, samog začetka aterosklerotskog procesa. Ovako transformisani makrofazi su aktivisani i luče proinflamatorne citokine koji delujući lokalno i sistemski, održavaju začarani krug dislipidemije i inflamacije (102).

### **1.2.2. Patogeneza dijabetične ateroskleroze**

Ateroskleroza je hronična, progresivna, multifaktorska, difuzna, zapaljenska bolest kod koje postoji poremećaj vaskularnog i metaboličkog sistema (103). Zahvata velike i arterije srednje veličine (aorta, karotidne, koronarne, cerebralne, ilijačne, renalne arterije) predilekciono na mestima vrtložnog krvnog toka (posebno arterijske račve). Kontinuirano praćen inflamacijom, proces evoluira od endotelne disfunkcije, subendotelnog nagomilavanja

makrofaga prepunih lipida, preko proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija, ekstraćelijske akumulacije lipida, ćelijske nekroze i apoptoze, procesa kalcifikacije sve do intimalne destrukcije i arterijske tromboze sa posledičnom ishemijom ciljnog organa (104,105). Proces ateroskleroze podrazumeva paralelno odvijanje dva ravnopravna procesa, arterioskleroze i ateromatoze koji za krajnji cilj imaju zadebljanje, otvrdnuće i kasnije suženje lumena krvnog suda koji više ne može da odgovori na aktuelne perfuzione potrebe tkiva. Patohistološki, u početku se stvara masna mrlja (subendotelna akumulacija "penastih ćelija", makrofaga bogatih lipidima), nastavlja se ekstraćelijsko gomilanje lipida i stvaranje nekrotičnog detritusa praćenog povećanom produkcijom ekstraćelijskog matriksa, migracijom i proliferacijom glatkih mišićnih ćelija (tranzitorna lezija), do stvaranja fibroznog plaka (lipidno jezgro okruženo vezivom i glatkim mišićnim ćelijama) koji vremenom raste i sužava lumen krvnog suda. Ukoliko dođe do nekroze unutar plaka, kalcifikacija i ulceracija, uz pojave fisure i rupture plaka, formira se tromb koji kompromituje delimično ili u potpunosti tok krvi u krvnom sudu (106).

Efekat dijabetesa na vaskularni zid daleko prevazilazi efekte na endotel i ćelije glatkih mišića, već podrazumeva sumirani uticaj na monocite/makrofage, trombocite, lipoproteine, produkciju i funkciju lokalnih vazoaktivnih supstanci, mehanizam koagulacije, kao i na lokalni odgovor krvnog suda na hipoksiju i stvaranje kolateralnih krvnih sudova. Iako se histološki razvoj dijabetičke ateroskleroze ne razlikuje od ateroskleroze koja nije povezana sa dijabetesom, raznolikost disfunkcionalnih mehanizama uključenih u njenu patogenezu značajno ubrzava sam proces, otežava terapijski pristup, a njegove prateće efekte na organizam čini veoma štetnim (107,108). "Dijabetički" endotel gubi antiinflamatorne, antiadhezivne, antiagregacione sposobnosti, eksprimira veliku količinu leukocitnih i trombocitnih adhezivnih molekula, promovise proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija. Smatra se da je disfunkcija endotela "sentinelni" događaj u razvoju ateroskleroze kod

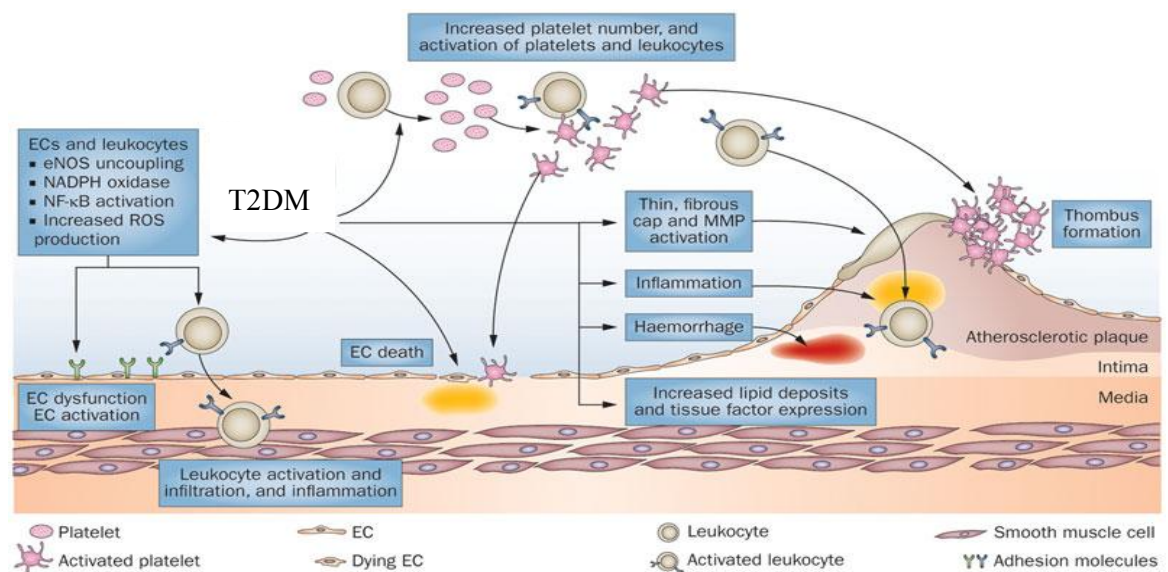
bolesnika sa T2DM (104,107). Specifična dislipidemija uz hiperglikemiju i stanje povećanog oksidativnog stresa omogućavaju kontinuirani priliv glikoziliranog i oksidisanog LDL kojeg lako interniraju nakupljeni i aktivisani makrofazi dovodeći do nastanka "penastih" ćelija i njihove akumulacije subendotelno. Proporcija oxLDL je povišena u T2DM zbog kontinuirane glikozilacije, hipertrigliceridemije i smanjenja HDL. OxLDL povećava produkciju citokina i ekspresiju novih adhezivnih molekula endotela, doprinoseći održavanju procesa inflamacije i ubrzavajući proces ateroskleroze (109). Brza akumulacija lipida uz sporiji proces uklanjanja uslovljava nastanak masnih pruga. Usled apoptoze penastih ćelija, formira se nekrotično jezgro, kaša raspadnutih penastih ćelija i oslobođenih lipida, gomilaju se nove penaste ćelije i stvara se lipidno jezgro. Glatkomišićne ćelije pod dejstvom citokina i faktora rasta proliferišu i migriraju prema intimi. Lipidno jezgro se okružuje vezivnim vlaknima, glatkim mišićnim ćelijama, limfocitima, monocitima te nastaje fibrozni plak (110,103).

Dijabetički plak je metabolički dinamična tvorevina. Hiperglikemija, insulinska rezistencija, hiperinsulinemija i oksidativni stres ubrzavaju rast plaka promovšući ekspresiju adhezivnih molekula, amplifikujući proinflamatorni odgovor, omogućavajući adheziju i aktivaciju monocita, makrofaga, T limfocita, trombocita, menjajući odnos NO/ET-1 stimulišući vazokonstrikciju, proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija (111). Hronični inflamatorni proces potpomaže nastanak, napredovanje i kliničke manifestacije ateroskleroze (103,112). Dijabetički plakovi se odlikuju većim stepenom zapaljenskog infiltrata (makrofazi, mastociti, T limfociti), većim nekrotičnim jezgrom, višim stepenom ekspresije receptora za AGE na makrofazima (RAGE), akumulacijom AGE i visokim stepenom oksidativnog stresa, što ih čini naročito vulnerabilnima (113).

Slabljenje fibrozne kape uslovljava apoptoza makrofaga i glatkih mišićnih ćelija u prisustvu velike količine oxLDL, velika količina izlučenih matriks metaloproteinaza i proteolitičkih enzima iz makrofaga i mastocita koji razgrađuju ekstraćelijski matriks,

mehaničko rastezanje. Visoki stepen inflamacije narušava integritet endotela i intime, a povećanje prokoagulantnih faktora (fibrinogen, vWF, TF, PAI-1) olakšavaju nastanak tromboze. Rupturom fibroznog omotača, oslobađa se veoma trombogeno lipidno jezgro (114). Pojačana ekspresija vWF, GPIb i GPIIb/IIIa olakšava trombocitnu adheziju, agregaciju i aktivaciju trombocita na mestu rupture plaka. Povećana ekspresija TF kao i povećanje FVII, trombina, PAI-1 uz smanjenje trombomodulina, aktivisanog proteina C, ATIII (antitrombina III) i tPA čini sredinu hiperkoagulabilnom i dodatno povećava rizik trombozne komplikacije na mestu ruptore plaka. Oslobodene mikropartikule povređenih endotelnih ćelija i cirkulišućih trombocita, nose TF i promovišu formiranje tromba na mestu povrede endotela i ruptore plaka (84, 115).

Slika 3. Evolucija aterosklerotskog plaka – preuzeto i modifikovano prema Csordas et al. (116)

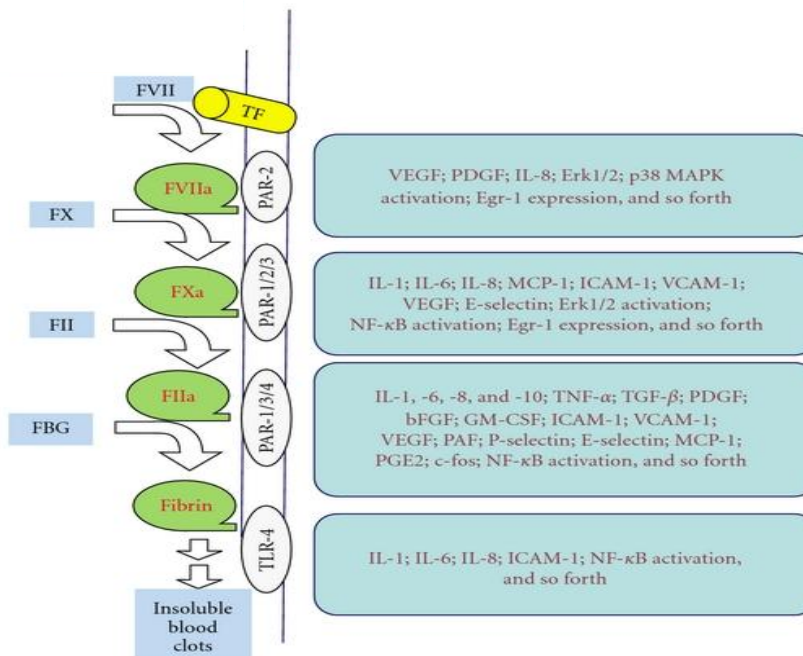


### 1.2.3. Circulus vitiosus: Koagulacija – Inflamacija - Tromboza

Povećana ekspresija TF može biti uslovljena stimulacijom ili oštećenjem endotela inflamatornim citokinima (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP), oxLDL-om, putem AGE i mehaničkim trenjem. S obzirom da je T2DM praćen hroničnom inflamacijom, koagulacioni sistem je stimulisan povećanom ekspresijom TF. Hiperkoagulabilno stanje T2DM je potpomognuto smanjenjem ATIII, heparin-kofaktora II, trombomodulina, aktivisanog proteina C i tPA, kao i povećanjem PAI-1. TF inicira aktivaciju koagulacione kaskade što rezultira konverzijom protrombina u trombin, aktivacijom trombocita i pretvaranjem fibrinogena u fibrin, a što je uslov stvaranja nerastvorljivog krvnog ugruška. U svakom segmentu spoljašnjeg puta koagulacione kaskade, dolazi do aktivacije različitih proinflamatornih medijatora putem PAR (eng. protease-activated receptor) i TLR-4 receptora (eng. toll-like receptor) što rezultira povećanjem ekspresije adhezivnih molekula, lučenjem interleukina, hemokina, faktora rasta. (Slika 4.) PAR receptori eksprimirani na različitim ćelijama (endotelne ćelije, monociti, trombociti) su "molekularni prekidač" koji diktira međusobnu komunikaciju hiperkoagulabilnog stanja i inflamacije. Stvara se uslov za adheziju, aktivaciju, agregaciju trombocita, ekspresiju TF, aktivaciju koagulacione kaskade i trombozu. U začaranom krugu, proinflamatorni medijatori stimulišu proces koagulacije i aktivacije trombocita, delujući prokoagulantno i protrombogeno, dok aktivisani trombociti i faktori koagulacije aktiviraju proinflamatorne procese (117,118).

Slika 4. Hiperkoagulabilnost i inflamacija – preuzeto i modifikovano prema Chu et al.

(117)



#### 1.2.4. Kliničke manifestacije makrovaskularne bolesti u dijabetes melitusu tip 2

Zavisno od anatomske lokalizacije, stepena suženja, dužine trajanja okluzije i posledične ishemije tkiva, različite su kliničke manifestacije aterosklerotične kardiovaskularne bolesti. Klinički se može manifestovati kao IBS, CVB i PAB (119, 120).

Ishemijska bolest srca (ili koronarna srčana bolest) je najčešća klinička manifestacija iz grupe kardiovaskularnih oboljenja. Bolesnici sa T2DM imaju 2-4 puta veću mogućnost da razviju IBS od nedijabetičara. Zavisno o stepenu suženja i dužini trajanja okluzije, IBS se može manifestovati u vidu stabilne ili nestabilne angine pektoris i akutnog infarkta miokarda. Stabilna angina pektoris se javlja ukoliko aterosklerotski plak sužava arterijski krvni sud, kompromitujući cirkulaciju i perfuziju tkiva u naporu, dok je snabdevanje miokarda u miru zadovoljavajuće. Različite prezentacije akutnog koronarnog sindroma (AKS) dele isti patofiziološki supstrat. Klasifikacija se bazira na elektrokardiogramu (EKG) i vrednostima

troponina. U skladu s tim razlikujemo sledeće kategorije: 1) bolesnici sa tipičnim akutnim bolom u grudima i perzistentnom ( $> 20$  minuta) elevacijom ST segmenta - AKS sa ST elevacijom (STE-AKS). Većina ovih bolesnika će na kraju razviti infarkt miokarda sa ST elevacijom (eng. ST elevation myocardial infarction - STEMI); 2) akutni infarkt miokarda bez elevacije ST segmenta (eng. non-ST elevation myocardial infarction -NSTEMI); 3) nestabilna angina pectoris (NAP). AKS je manifestacija ateroskleroze kojoj obično prethodi destabilizacija plaka, akutna tromboza izazvana rupturom ili erozijom aterosklerotskog plaka, sa ili bez prateće vazokonstrukcije, uzrokujući iznenadno i kritično smanjenje u krvnom protoku. U STEMI, tromb je bogat fibrinom i najčešće potpuno okluzivan, dok je u NSTEMI uglavnom trombocitni i delimično ili intermitentno okluzivan (121).

Rizik za nastanak CVB je tri puta veći kod dijabetičara nego u opštoj populaciji, a čak 10 puta veći u dijabetičara mlađih od 44 godine (119). Najčešće kliničke manifestacije CVB su cerebrovaskularni insult (CVI) po tipu ishemije i tranzitorni ishemijski atak (TIA), što zavisi od stepena suženja i dužini trajanja okluzije. Ishemijski moždani poremećaji najčešće su uzrokovani okluzijom malih (lakunarni CVI) ili velikih intrakranijalnih krvnih sudova, ali i oštećenjem aortnog luka, karotidne bifurkacije ili intrakranijalnih krvnih sudova. Rezultati studija ukazuju da je ekstrakranijalna i intrakranijalna karotidna stenoza uzrok oko 30% svih ishemijskih ataka (122).

U dijabetesu postoji povećan rizik za razvoj aterosklerotske bolesti ekstrakranijalnih karotidnih i vertebralnih krvnih sudova, kao i mezenteričnih, renalnih i krvnih sudova gornjih i donjih ekstremiteta. Zavisno od lokalizacije, dužine trajanja i stepenu suženja, bolest može proći asimptomatski ili sa simptomima okluzije velikih krvnih sudova (123,124,125). Najčešća prezentacija PAB u dijabetičara je aterosklerotska bolest krvnih sudova donjih ekstremiteta, a zavisno od stepena suženja može se klinički manifestovati od intermitentnih klaudikacija do ulceracija i gangrene. Periferna arterijska bolest ima 2-4 puta veću incidencu



u dijabetičara u odnosu na ostalu populaciju, a dijabetes posle pušenja predstavlja drugi po redu faktor rizika za razvoj ovog poremećaja (119,126).

### 1.3. BIOMARKERI VASKULARNOG ENDOTELELA

S obzirom da je endotelna disfunkcija najraniji događaj u procesu razvoja aterosklerotske lezije, procena stanja vaskularnog endotela mogla bi se smatrati ranim biomarkerom aterosklerotskog procesa (127). Iako su mnogobrojne kliničke studije ukazale na prediktivnu vrednost određenih biomarkera endotelne aktivacije u proceni rizika za nastanak KVB, njihovo određivanje je još uvek na nivou istraživačkog, a ne svakodnevnog rutinskog rada. Određivanje koncentracije solubilnih biomarkera moglo bi imati širu primenu jer su odraz stanja celokupnog vaskularnog korita, a laboratorijska tehnika određivanja treba da zadovolji kriterijume visoke senzitivnosti i specifičnosti, tačnosti, reproducibilnosti, jednostavnosti izvođenja, dostupnosti i naravno prihvatljivosti "cost-benefit" odnosa (128).

Biomarkeri, pokazatelji disfunkcije endotela, endotelne aktivacije i/ili oštećenja endotelne ćelije se razlikuju po svojoj senzitivnosti i specifičnosti jer oslikavaju ne samo aktivaciju endotelnih ćelija već i drugih, poput monocita, makrofaga, limfocita i trombocita. Specifični endotelni biomarkeri (eksprimirani samo na endotelnim ćelijama) su E-selektin, vaskularni mukozni adhezioni molekul adresin (eng. mucosal addressin cell-adhesion molecule-1-MadCAM-1), asimetrični dimetilarginin (ADMA) i cirkulišuće endotelne ćelije (CEC) (129). Neki od najčešće merenih biomarkera endotelne disfunkcije i/ili aktivacije, su selektini (E- i P-selektin), adhezivni proteini, pripadnici superfamilije imunoglobulina (ICAM-1, VCAM-1), ADMA, proinflamatorni markeri (IL-1, IL- 6, IL-18, CRP), hemokin IL-8, pro/antikoagulatni biomarkeri (vWF, PAI-1, TM). Kao markeri endotelnog oštećenja i reparacije detektuju se CEC, endotelne mikropartikule (EMP) i endotelne progenitorne ćelije (EPC) (129,130).

### 1.3.1. E- selektin

Selektini su adhezivni glikoproteini koji posreduju u kotrljanju i zadržavanju leukocita uz zid krvnog suda, što omogućava njihovo kasnije čvrsto vezivanje. E-selektin je prvi puta otkriven na površini humanih endotelnih ćelija umbilikalne vene (HUVEC). Bazalno, u stanju mirovanja, E-selektin nije eksprimiran, osim u sitnim krvnim sudovima dermisa. Ekspirira se samo na aktivisanim endotelnim ćelijama, što ga čini specifičnim markerom endotelne aktivacije na mestu inflamacije, a samim tim je i snažan proinflamatorni signal. Prethodno sintetisani pul E-selektina unutar endotelnih ćelija ne postoji te njegova ekspresija zavisi isključivo od transkripcione regulacije i potrebno je oko tri sata da se postigne njegova maksimalna ekspresija, a bazalne nivoe postiže unutar 16-24h od prestanka dejstva proinflamatornog stimulusa (78,131). Aktivacijom transkripcionog činioca, NF- $\kappa$ B, pod dejstvom proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ ), trombocitnog faktora 4 (eng. platelet factor 4 - PF4), oxLDL i AGE, indukuje se ekspresija E-selektina na endotelnim ćelijama. Vezuje se uz PSGL-1 ligand i E-selektin ligand (ESL-1), eksprimirane na neutrofilima, monocitima i limfocitima, omogućavajući njihovo zadržavanje i kotrljanje uz zid krvnog suda. Ekspresija E-selektina deluje proinflamatorno, ali i proaterogeno (132,133). Dokazana je ekspresija E-selektina na endotelnim ćelijama aterosklerotskog plaka, što znači da on igra bitnu ulogu ne samo u inicijaciji procesa ateroskleroze, već i u održavanju inflamatornog odgovora krvnog suda i procesu napredovanja aterosklerotske lezije. Solubilni E-selektin (sE-selektin) porekla je isključivo sa endotelnih ćelija, a oslobađa se u cirkulaciju nakon odljubljivanja sa površine endotelne ćelije (134). Kliničke studije su ukazale na povezanost povišenih vrednosti sE-selektina sa pušenjem, gojaznošću, hipertenzijom, hiperlipidemijom, insulinskom rezistencijom i dijabetesom (135).

### 1.3.2. P – selektin

P - selektin je adhezivna molekula koja se sastoji od N terminalnog, lektinom bogatog ekstraćelijskog domena, transmembranskog dela i kratkog intracitoplazmatskog repa. Sastavni je deo membrane trombocitnih  $\alpha$  granula i membrana Weibel – Paladeovih telašaca endotelnih ćelija (136). U stanju mirovanja, bazalno, eksprimiran je samo na krvnim sudovima intestinuma (78). Brza ekspresija P-selektina odvija se na poticaj leukotrienima, histaminom i trombinom unutar deset minuta, ali njegova sinteza *de novo*, odvija se nakon 2h, aktivacijom NF- $\kappa$ B proinflamatornim citokinima (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), trombinom i reaktivnim kiseoničkim radikalima. P-selektin se vezuje uz PSGL-1 ligand, eksprimiran na neutrofilima, monocitima i limfocitima te posreduje u najranijem kotrljanju i adheziji leukocita uz endotel. Interakcijom P-selektin - PSGL-1, takođe vezuje aktivisane trombocite uz leukocite i endotelne ćelije, olakšavajući njihovu adheziju uz endotel, učestvuje u aktivaciji endotela i monocita te ispoljava proinflamatorno i proaterosklerotsko dejstvo. Dokazana je ekspresija P-selektina na endotelu masnih pruga i aterosklerotskih plakova. Povećana ekspresija P-selektina na membrani aktivisanih trombocita zapažena je u dijabetesu, gojaznosti, hipertenziji i AKS. Odljubljivanjem P-selektina s površine ćelije, nastaje solubilna forma, sP-selektin (136). Ekspresiju P-selektina aktivisanih trombocita moguće je detektovati protočnom citometrijom, a ELISA metodologijom moguće je meriti plazmatski nivo sP-selektina (137,138). Predominantno je mišljenje da je poreklo sP-selektina uveliko sa aktivisanih trombocita te da odražava više stepen aktivacije trombocita nego endotela, ali konsenzus o tome još uvek ne postoji jer su rezultati istraživanja još uvek oprečni. Povišene vrednosti sP-selektina dokazane su u dijabetesu, pušenju, hipertenziji, a studije su pokazale i da povišen nivo sP-selektina može biti predikativan za nastanak neželjenog ishemijskog događaja u perifernoj arterijskoj bolesti i koronarnoj bolesti (136).

### 1.3.3. von Willebrand faktor - vWF

vWF je veliki adhezivni multimer, koji posreduje u adheziji i agregaciji trombocita na mestu povrede endotela, a nekovalentno vezan uz FVIII, transportuje ga i štiti u cirkulaciji od proteolitičke inaktivacije. Sintetiše se u endotelnim ćelijama i megakariocitima, a skladišti u Weibel – Paladeovim telašcima endotelnih ćelija i  $\alpha$  granulama trombocita. Primarni pre-pro-vWF je signalni peptid od 22 amino kiseline (AK), zatim nastaje pro-vWF od 741 AK, a na kraju multimer od 2050 AK. vWF ima mesta vezivanja za FVIII, GPIb, GPIIb/IIIa i kolagen tipa I, III, IV i VI (139,140). Aktivisane endotelne ćelije luče vWF abluminalno u subendotel, gde vezujući trombocite na mestu aktivacije i/ili povrede endotela, aktivno učestvuje u procesu aterotromboze (129,139,141). Luminalno sekretovan vWF odlazi u cirkulaciju, gde se vezuje uz FVIII, ogoljeni subendotelni kolagen i aktivisane trombocite na mestu povrede (141,142). Aktivisani endotel, pod dejstvom proinflamatornih citokina, luči subendotelno ultra velike hiperreaktivne multimerne vWF, koji inače bivaju dezintegrisani pomoću metaloproteinaze ADAMTS13 (eng. A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I repeats–13), ali s obzirom da u inflamaciji dolazi do smanjene sinteze ADAMTS13, to povećava proaterotrombozni potencijal ovih multimera (143). Povišena plazmatska koncentracija vWF smatra se pouzdanim, osetljivim markerom aktivacije i povrede endotela jer ima predominantno endotelno poreklo, iako ne može biti u potpunosti specifičan zbog postojanja njegove trombocitne komponente (129). Da bi nastao funkcionalan multimer vWF, od pro-vWF odvaja se vWF propeptid (vWFpp), neophodan činilac u multimerizaciji i skladištenju vWF. Paralelno povećanje nivoa vWF i vWFpp, ukazuje na akutnu prolaznu endotelnu aktivaciju, a povišen nivo vWF uz blago povišene vrednosti vWFpp ukazuju na hroničnu stimulaciju endotela (u dijabetesu, IBS, PAB) (142). vWFpp je veoma senzitivni marker jer se u potpunosti sekretuje u cirkulaciju (142), a pojedini autori ga

smatraju i specifičnim za endotel (129,144), mada se njegovo trombocitno poreklo ne može u potpunosti isključiti (142).

#### **1.3.4. Adhezivne molekule – imunoglobulinska superfamilija**

ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1 i MAdCAM-1 pripadaju Ig superfamiliji adhezivnih molekula koje učestvuju u leukocitnoj adhezionoj kaskadi na aktivisanom endotelu. Posreduju u čvrstom vezivanju i/ili migraciji monocita/makrofaga, limfocita i ostalih leukocita u subendotelni prostor učestvujući aktivno u procesu razvoja ateroskleroze. Aktivisane, disfunkcionalne endotelne ćelije ih ekspimiraju na poticaj različitih proinflamatornih citokina i faktora nepovoljnog metaboličkog miljea (hiperglikemija, hiperlipidemija, reaktivni kiseonički radikali) (129). Solubilne forme ovih adhezivnih molekula, nastale proteolitičkim cepanjem i odlublivanjem sa površina aktivisanih ćelija, cirkulišući su biomarker njihove aktivacije (145). sICAM-1 i sVCAM-1 su senzitivni, ali nespecifični markeri endotelne aktivacije jer se ekspimiraju na različitim imunskim ćelijama (monociti/makrofazi, limfociti), za razliku od MadCAM-1 koji je specifičan za endotel (129). Povišene vrednosti sICAM-1 i sVCAM-1 detektuju se u hipertenziji, gojaznosti, pušenju, hiperlipidemiji, insulinskoj rezistenciji i T2DM. (130,145,146,147).

#### **1.3.5. Pro-/antikoagulantni markeri endotelne aktivacije**

Endotelnom aktivacijom gube se antikoagulantne (TM, tPA), a kasnije i *de novo* sintetišu prokoagulantne molekule (PAI-1, vWF, TF, PAF), što endotel čini protrombogenom mikrookolinom (129). Trombomodulin je transmembranski glikoprotein, ekspimiran prvenstveno na endotelnim ćelijama, monocitima/makrofazima i neutrofilima. U kompleksu 1:1 sa trombinom aktivira protein C, koji potom inaktivira FVa i FVIIIa te ispoljava vazoprotektivno i antikoagulantno dejstvo (148). IL-1 i TNF- $\alpha$  osim što suprimiraju ekspresiju TM na površini endotelne ćelije, indukuju njeno proteolitičko isecanje. Dolazi do

povećanja nivoa solubilnog TM koji je senzitivn (ali nespecifičan) marker endotelne aktivacije i oštećenja (129,149). PAI-1, inhibitor tPA, se sintetise u endotelnim ćelijama, trombocitima i masnom tkivu (150,151). Gubitkom integriteta endotelne ćelije dolazi do povećane sinteze PAI-1, što ga čini senzitivnim, ali nespecifičnim markerom endotelne aktivacije (129,150). Povišen nivo PAI-1 se registruje u T2DM, a koreliše sa stepenom insulinske rezistencije i gojaznosti (130,147,150). Aktivacijom endotela pod dejstvom proinflammatoryh citokina, metaboličkih faktora, reaktivnih kiseoničkih radikala, turbulentnog toka krvi, dolazi do ekspriacije TF na endotelnim ćelijama te se smatra senzitivnim markerom endotelne aktivacije. S obzirom da se ekspriira i na aktivisanim monocitima, makrofazima i trombocitima, nije specifičan. Ispoljava snažno prokoagulantno i proinflammatoryno dejstvo te je uključen u proces razvoja aterotromboze (117,129).

### **1.3.6. Asimetrični dimetilarginin - ADMA**

Aktivacijom endotela na poticaj oxLDL dolazi do povećane sinteze asimetričnog dimetilarginina, endogenog inhibitora NOS, a samim tim i inhibicije sinteze NO. Smanjenje NO je praktično prvi korak na prelazu funkcionalnog fenotipa endotela u disfunkcionalni. ADMA se smatra ranim specifičnim markerom endotelne aktivacije. Povišen nivo ovog markera detektovan je u gojaznosti, hipertenziji, pušenju, dijabetesu, hiperholesterolemiji (152).

### **1.3.7. Biomarkeri endotelne povrede i reparacije**

Delovanjem različitih faktora rizika (metabolički, hemijski, biološki, mehanički) na endotel, dolazi do narušavanja njegovog integriteta i povrede endotelne ćelije. Sa aktivisane ili apoptotične endotelne ćelije odvajaju se membranske vezikule, endotelne mikropartikule (EMP), nastale remodeliranjem fosfolipidne membrane (153). Ove vezikule ekspriiraju fosfatidilserin i reprezentativne antigene endotelne ćelije (CD31, CD51, CD54, CD62E, CD105, CD106) što im daje prokoagulantne karakteristike (154). Normalno, u zdravih osoba

postoji mala količina cirkulišućih EMP, a njihova povišena koncentracija izmerena je u dijabetesu, AKS, CVI, hipertenziji, gojaznosti. Lokalno je dokazano prisustvo EMP unutar aterosklerotskog plaka (153). Prokoagulantne mikropartikule mogu biti izdvojene i sa aktivisanih trombocita (PMP) i monocita (mMP) (154). Na mestu vaskularne povrede dolazi do odvajanja endotelnih ćelija, a povišena koncentracija CEC, udružena je sa kliničkim stanjima poput dijabetesa, AKS, CVI, vaskulitisa. CEC ekspimiraju ICAM-1, VCAM-1, E-selektin, TF, vWF što im daje prokoagulantne i proinflatorne osobine. Mogućnost reparacije povređenog endotela imaju endogene progenitorske ćelije koje adheriraju i proliferišu na mestu povrede i diferenciraju se u endotelne ćelije. U dijabetesu je mogućnost reparacije ovim mehanizmom smanjena, a EPC negativno korelišu sa stepenom progresije bolesti. U cilju uspostavljanja endotelne integriteta, neophodno je uspostaviti balans između endotelne povrede čiji su pokazatelji EMP i CEC, i endogenog kapaciteta reparacije na koji ukazuju EPC. Novom strategijom multimarkerskog određivanja Indeksa vaskularne kompetencije (odnos između EMP, CEC i EPC), mogao bi se definisati individualni kardiovaskularni rizik svakog bolesnika (153).

### **1.3.8. Endokan**

Endokan je proteoglikan ekspimiran na endotelnim ćelijama, ćelijama pluća, bubrega i adipocitima. IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  povećavaju ekspresiju endokana. Smatra se da je endokan potencijalni specifični rani biomarker endotelne oštećenja, a podaci istraživanja za sada ukazuju na prisutnost povećane koncentracije endokana u sistemske inflamaciji, sepsi i tumorskim procesima (155).

### **1.3.9. C-reaktivni protein**

C-reaktivni protein, reaktant akutne faze, nije samo marker inflamatornog odgovora, već je i sam aktivni učesnik procesa ateroskleroze, od endotelne disfunkcije do rupture aterosklerotskog plaka. Danas je poznato da postoji lokalna, ekstrahepatička produkcija CRP



u adipocitima, monocitima, glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama, a detektovan je i kao deo aterosklerotske lezije (156,157,158). CRP doprinosi fenotipskoj modulaciji endotela u proinflamatorni i proaterosklerotski tip (156). CRP smanjuje bioaktivnost NOS, a tako i bioraspoloživost NO (159). Posreduje u aktivaciji i proliferaciji glatkih mišićnih ćelija u intimu, indukuje ekspresiju adhezivnih molekula poput ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina na površini endotelnih ćelija. Potiče sintezu IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  i MCP-1 u monocitima (156). Olakšava preuzimanje LDL čestica od strane makrofaga, ubrzava apoptozu endotelnih ćelija i inhibiše angiogenezu. Dokazano je da hiperglikemija potencira efekte CRP na endotelnu aktivaciju (160). CRP koreliše sa nivoom insulinske rezistencije, gojaznošću, dislipidemijom i hipertenzijom, a smatra se nezavisnim faktorom rizika za kardiovaskularni mortalitet u bolesnika sa T2DM (147).

## 1.4. TROMBOCITI

Trombociti su najmanji uobličeni ćelijski elementi krvi, bez jedra, diskoidnog oblika, prosečnog dijametra 2-5  $\mu\text{m}$ , srednjeg volumena 7-9 fl i debljine 0,5  $\mu\text{m}$ , koji potiču iz citoplazme megakariocita. Životni vek trombocita traje 7-10 dana ukoliko ne budu ranije uključeni u proces hemostaze ili tromboze (161).

Trombociti imaju ključnu ulogu u primarnoj hemostazi i stvaranju primarnog hemostaskog ugruška, kao i daljem odvijanju procesa koagulacije. Međutim, složenost i višestrukost trombocitnih funkcija omogućavaju trombocitima značajnu ulogu u nastanku vaskularnog inflamatornog odgovora i aterotromboze oslobađanjem proinflamatornih i mitogenih materija koje oštećuju inače tromboresistentnu površinu endotelne ćelije, privlače leukocite, stimulatorno deluju na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i doprinose razgradnji matriksa (162).

### 1.4.1. Morfologija i fiziologija trombocita

Karakteristična multifunkcionalnost trombocita uslovljena je njihovom ultrastrukturom (163). Perifernu zonu trombocita predstavlja plazmatska membrana koja se sastoji od dvosloja polarizovanih asimetrično raspoređenih fosfolipida (FL), koji održavaju membransku stabilnost mirujućih trombocita i ekstraćelijski smešten tanki sloj glikokaliksa koji se sastoji od membranskih glikoproteina (GP), glikolipida, mukopolisaharida i adsorbovanih plazmatskih proteina koji omogućavaju međućelijsku komunikaciju. Sadržaj polinezasićene arahidonske kiseline u FL membrane trombocita predstavlja depo supstrata od kojeg po potrebi nastaje tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), ključni posrednik trombocitne agregacije. U toku aktivacije trombocita, FL membrane se reorganizuju, eksponiraju se FL negativnog naboja koji predstavlja podlogu za odvijanje procesa koagulacije. Invaginacijom plazmatske membrane nastaje sistem otvorenih kanalića (engl. open canalicular system - OCS) koji protežući se u unutrašnjost trombocita predstavlja glavni komunikacioni put plazme i

trombocita, omogućava pražnjenje sadržaja granula tokom reakcije oslobađanja i stvaranje filopodia tokom aktivacije i adhezije trombocita. Gusti kanalikularni sistem zatvorenih kanalića (engl. dense tubular system - DTS), sekvstrirajući ili otpuštajući kalcijum reguliše aktivaciju trombocita (161). Citoskelet trombocita, koji se sastoji iz spektrina, aktina i marginalnog mikrotubularnog omotača, omogućava održavanje diskoidnog oblika trombocita (163). Tokom reakcije aktivacije trombocita, reorganizacija citoskeleta omogućava sferičnu promenu oblika, pružanje pseudopoda, kontrakciju i reakciju oslobađanja granula (161). Zona organela se sastoji od granula, lizosoma, peroksizoma, mitohondrija, mRNA i malog broja ribozoma. Trombociti su veoma metabolički aktivni, a mogu sintetisati i veoma malu količinu proteina zahvaljujući rezidualnoj mRNA. Tamne granule sadrže hemostatski aktivne molekule ATP (adenozin trifosfat), ADP (adenozin difosfat), serotonin, jone magnezijuma, kalcijuma i kateholamine, koji se sekretuju tokom aktivacije. Alfa granule sadrže mnogo bioaktivnih materija poput adhezivnih proteina, faktora koagulacije, proteaznih inhibitora, hemokina, mitogenih i angiogenetskih faktora (fibrinogen, vWF, fibronectin, trombospondin, vitronektin, P-selektin, GP IIb/IIIa, FV, FXI, FXIII, PF-4,  $\beta$ TG, PDGF, VEGF, IGF-1, PAI-1, IL-1 $\beta$ , RANTES, MCP-3, IL-8), materija odgovornih za inicijaciju i ubrzavanje procesa koagulacije, ali i razvoj lokalnog hroničnog inflamatornog odgovora, patogenezu aterotromboze, kao i obnovu oštećenog tkiva (164).

#### **1.4.2. Trombocitni receptori**

Membranski glikoproteini posreduju u interakciji trombocita sa okolinom prenoseći informacije u oba pravca i omogućavajući interakciju trombocita kako međusobno tako i sa zidom krvnog suda i leukocitima. Posredujući u kontaktu između trombocita i spoljašnje okoline, uslovljavajući njihovu reaktivnost sa nizom agonista i adhezivnih proteina, omogućavaju adheziju i aktivaciju trombocita, njihovo učešće u procesu hemostaze, tromboze, inflamatornom i imunom odgovoru, razvoju tumora i angiogenezi (161,164).

Tabela 2. Važni površinski receptori trombocita (164)

Naziv/familija	Ligand	Funkcija
GPIIb/IIIa; $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; integrin	Fbg, Fn, Vn, vWF	Adhezija, agregacija
GpIa/IIa; $\alpha_2\beta_1$ ; integrin	Kolagen	Adhezija
GPIc*/IIa; $\alpha_5\beta_1$ ; integrin	Fn	Adhezija
GPIc/IIa; $\alpha_6\beta_1$ ; integrin	Laminin	Adhezija
$\alpha_v$ /GPIIIa; $\alpha_v\beta_3$ ; integrin	Vn, Fbg, vWF, Fn, TSP, Osp	Adhezija
GPIb/IX/V; leucinski GP	vWF	Adhezija
ICAM-2; Ig familija	LFA-1	Trc-Le adhezija
GPVI- <i>FcR<math>\gamma</math></i> ; Ig familija	Kolagen	Adhezija
P-selektin; selektin	Sialyl-Lewis <sup>x</sup> , PSGL-1	Trc-Le adhezija
GPIV	Kolagen, TSP	Adhezija
ADP P2X1	ATP,ADP	Aktivacija
Leukosialin, sialophorin	ICAM-1	Adhezija
PAR-1; G-protein vezan	Trombin	Aktivacija
PAR-4; G-protein vezan	Trombin	Aktivacija
TP $\alpha$ /TP $\beta$ ; G-protein vezani	PGH <sub>2</sub> /TXA <sub>2</sub>	Aktivacija
$\alpha_2$ -adrenergički rec.; G-protein vezan	Adrenalin	Aktivacija
ADP P2Y1; G-protein vezan	ADP	Aktivacija
ADP P2Y12; G-protein vezan	ADP	Aktivacija

Legenda: GP-glikoprotein; Fbg-fibrinogen; Fn-fibronektin; Vn-vitronektin; vWF- von Vilebrandov faktor; ICAM-intraćelijska adhezivna molekula; PSGL-1–P-selektin glikoprotein ligand; TSP-trombospondin; Osp-osteopontin; Trc-trombociti; Le-leukociti, PAR-proteazom aktivirani receptor; LFA-1- leukocitni funkcijski antigen; TP $\alpha$ /TP $\beta$ - tromboksanski prostanoidni receptori; ADP- adenzin difosfat; ATP – adenzin trifosfat; PGH<sub>2</sub>- prostaglandin H<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>

Glavnu klasu trombocitnih receptora čine integrini, adhezivne i signalne molekule, prisutne na velikom broju ćelija, nekovalentno povezanih heterodimera, alfa i beta subjedinica. Obe subjedinice su transmembranski GP. Tri su glavne integrinske familije,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , i  $\beta_3$ .

GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) je dominantni trombocitni receptor, eksprimiran u količini od 80000-100000 receptora na površini mirujućeg trombocita. Vezujući vWF, fibronektin, vitronektin i fibrinogen, omogućava adheziju i agregaciju trombocita (164). U mirujućem stanju trombocita, receptori imaju mali afinitet za vezivanje liganda, a njihova aktivacija uslovljava povećanje ovog afiniteta (165). U aktivaciji  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrina i njegovoj konformacijskoj promeni, nakon indukcije različitim agonistima, ključnu ulogu igra citoskeletni protein talin-1, koji vezujući se uz citoplazmatski deo  $\beta$  podjedinice, povezuje receptor sa aktinom citoskeleta trombocita (166,167,168). Kindlin-3, citoskeletni protein takođe je koaktivator integrinskih receptora, a vezuje se istim afinitetom uz citoplazmatski deo  $\beta$  podjedinice kao i talin-1 (164,167,169). Vezivanje liganda uz  $\alpha_{IIb}\beta_3$  omogućeno je vezivanjem RGD (arginin-glicin-aspartam) sekvence smeštene na karboksiterminalnom kraju lanca liganda (164).

GP Ia/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ ) je integrinski receptor koji vezujući se za kolagen tipa I i IV posreduje u adheziji trombocita uz zid krvnog suda. Mesto vezivanja kolagena nalazi se na I domenu  $\alpha_2$  podjedinice ovog receptora, a pojačano je prisustvom dvovalentnog katjona (mangan, magnezijum). Afinitet za vezivanje kolagena pojačava se prethodnom aktivacijom (trombinom, ADP) i konformacijskom promenom ovog receptora (164).

GPVI - FcR $\gamma$  je glavni kolageni receptor odgovoran za indukciju intraćelijskog fluksa jona kalcijuma neophodnog za stabilnu i čvrstu adheziju trombocita (170).

Fibronektinski (GPIc\*/IIa), lamininski (GPIc/IIa) i vitronektinski ( $\alpha_v$ /GPIIIa) receptori imaju suportivnu ulogu u adheziji trombocita za subendotelni matriks (167).

GP Ib/IX/V (CD42ad) receptor pripada porodici leucinom bogatih GP i kompleks je četiri različita polipeptida GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX i GPV, u odnosu 2:2:2:1 (171,172). Vezuje se uz vWF, posredujući u procesu adhezije trombocita za subendotelni kolagen, što je naročito potpomognuto ubrzanim tokom krvi (173). Da bi došlo do interakcije GPIb sa vWF, receptor

mora biti aktivisan, a vWF strukturno izmenjen (174). Njihova interakcija je prvi korak procesa privlačenja i adhezije trombocita uz zid krvnog suda (172). Potom dolazi do restrukturiranja trombocitnog citoskeleta, širenja intraćelijskih signala što posreduje aktivaciju  $\alpha_{IIb}\beta_3$  kao i promenu oblika trombocita. Osim toga, ovaj receptor pomaže kotrljanje trombocita po površini zida krvnog suda vezujući se uz endotelni P-selektin, a interakciju trombocit-neutrofil pomaže vezivanjem uz Mac-1 (eng. Macrophage – 1 antigen) neutrofila (173).

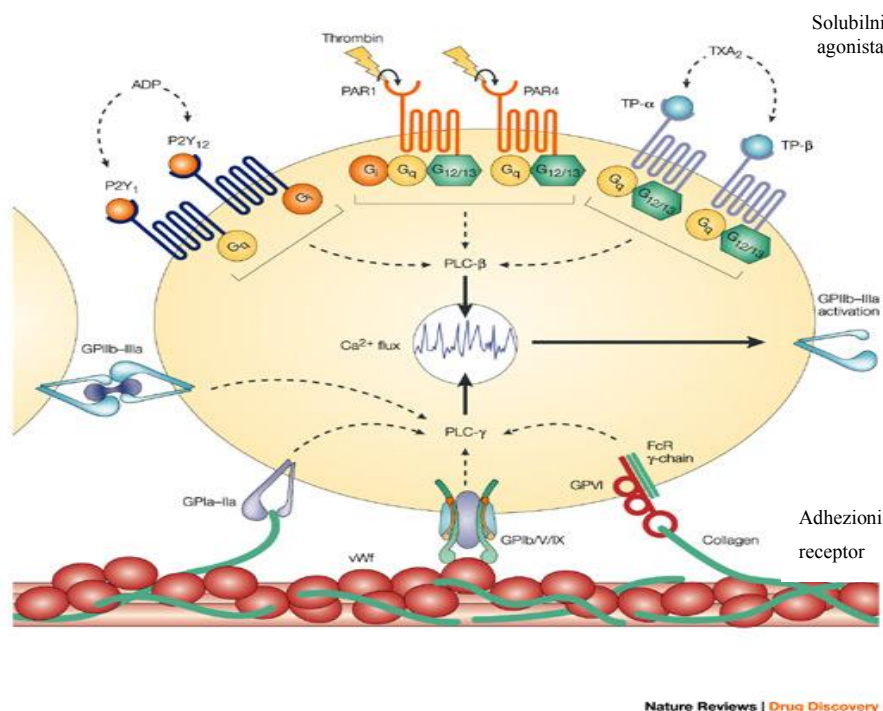
Familije receptora, poput proteazom aktivisanih receptora (PAR-1, PAR-2), tromboksanskih prostanoidnih receptora ( $TP\alpha$ ,  $TP\beta$ ) i purinergičkih receptora (P2Y1, P2Y12) vezani su za G-protein. Aktivacija ovih receptora solubilnim agonistima dovodi do aktivacije fosfolipaze C, koja razgrađuje fosfatidilinozitol do inozitol trifosfata (IP3) i DAG. IP3 oslobađa jone kalcijuma iz intraćelijskih rezervi, a DAG aktivira PKC (175).

Trombociti sadrže dve vrste receptora za trombin, PAR-1 i PAR-4, iz familije receptora aktivisanih proteazama, koji su vezani uz G- protein i građeni od sedam transmembranskih molekula. Usled visokog afiniteta za vezivanje trombina, male koncentracije ovog najsnažnijeg trombocitnog agoniste mogu aktivirati PAR-1, dok su njegove velike koncentracije neophodne za aktivaciju PAR-4 (173,176).

Purinergički receptori, P2Y<sub>1</sub>, P2X<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub> posreduju u aktivaciji trombocita ADP-om i ATP-om. Vezivanje ATP uz P2X<sub>1</sub> receptor rezultira intraćelijskim povećanjem Ca<sup>2+</sup> i promenom oblika trombocita i doprinosi aktivaciji trombocita indukovanoj malim količinama kolagena. Vezanjem ADP-a na receptor P2Y<sub>1</sub> dolazi do prolaznog porasta koncentracije intraćelijskog Ca<sup>2+</sup> što uzrokuje slabu, prolaznu agregaciju, no istodobno sinergističko delovanje ADP-a preko P2Y<sub>12</sub> receptora uslovljava trajnu aktivaciju i agregaciju trombocita. ADP indukuje i/ili posreduje u promeni oblika trombocita, reakciji oslobađanja, sintezi TXA<sub>2</sub>, aktivaciji  $\alpha_{IIb}\beta_3$  i agregaciji trombocita (177).

Preko tromboksanskih prostanoidnih receptora (TP $\alpha$  i TP $\beta$ ), efekte ostvaruje TXA<sub>2</sub>, snažan trombocitni agonista, stimulator reakcije oslobađanja sadržaja intraćelijskih granula i agregacije trombocita i potentan vazokonstriktor (178).

Slika 5. Glavni trombocitni receptori-preuzeto i modifikovano prema Jackson et al. (179)



### 1.4.3. Adhezija, aktivacija i agregacija trombocita

Trombociti cirkulišu u neaktivnom stanju, ali na mestu disfunkcije i/ili povrede endotela dolazi do njihove adhezije, aktivacije, promene oblika, agregacije i stvaranja prohemostatske površine (180,181). Adhezija trombocita započinje vezivanjem adhezivnih trombocitnih receptora za multiple ligande ogoljenog subendotelnog matriksa. U uslovima ubrzanog protoka krvi, inicijalna je interakcija između trombocitnog GP-Ib-V-IX i vWF vezanog uz subendotelni kolagen, a u uslovima usporenog protoka krvi, interakcija GPIa/IIa i GPVI sa kolagenom (180,182). Povećanu adhezivnost trombociti postižu grupisanjem i

povećanom ekspresijom adhezivnih receptora, njihovim konformacijskim promenama i otvaranjem neoepitopa, formiranjem pseudopoda sa većom dostupnošću receptora. Različite kombinacije veza integrinskih, leucinskih i ostalih trombocitnih receptora i subendotelnog matriksa pretvaraju u početku slabe adhezivne veze u stabilne i čvrste (164,173). Adherirani trombociti se aktiviraju, menjaju oblik formiranjem pseudopoda, šire se po endotelu čvrsto se priljubljujući. Dolazi do veoma bitne konformacijske promene  $\alpha_{IIb}\beta_3$  koji vezuje fibrinogen i vWF što je preduslov za još čvršću adheziju, ali i agregaciju trombocita. Aktivacija trombocita nastaje samom adhezijom trombocita za kolagen subendotela, (i za elemente eksponirane nakon rupture aterosklerotskog plaka), ali i trenjem, stimulacijom adrenalinom, serotoninom, PAF-om, trombinom, ADP-om, uz TXA<sub>2</sub>, činiocima nastalim pod određenim uslovima na mestu povrede krvnog suda. Solubilni agonisti vezujući se uz adekvatne receptore vezane sa G-proteinom indukuju aktivaciju fosfolipaze C, što za krajnji rezultat ima oslobađanje jona kalcijuma. Takođe se aktiviraju i fosfolipaza A<sub>2</sub> što rezultira odvajanjem arahidonske kiseline iz fosfatidilholina i njegovo metabolisanje do TXA<sub>2</sub> koji je potentan vazokonstriktor, stimulator agregacije trombocita i pomaže reakciju oslobađanja granula podstičući njihovu fuziju sa OCS. Povećanje intraćelijske koncentracije kalcijuma uslovljava kontrakciju aktina i miozina, reorganizaciju citoskeleta, formiranje pseudopoda, potiskivanje granula u centar trombocita što olakšava njihovo pražnjenje (164,180). Sekretijom tamnih granula otpušta se ADP, snažan agonista trombocitne agregacije koji deluje preko purinergičkih receptora, zatim serotonin, koji sinergistički deluje preko 5-HT<sub>2A</sub> (5-hidroksitriptaminski receptor 2A) te joni kalcijuma i kateholamini (183,180). DTS otpušta kalcijum, centralni okidač aktivacije i agregacije trombocita (184). Fuzija membrane  $\alpha$  granula i plazmatske membrane trombocita, omogućava ekspresiju P-selektina i CD40 liganda (CD40L).  $\alpha$  granule oslobađaju adhezivne proteine, mitogene faktore, faktore koagulacije, inhibitore proteaza koji amplifiraju procese adhezije, aktivacije i agregacije trombocita,



učestvuju u procesu koagulacije, ali i lokalnom inflamatornom odgovoru i procesu aterotromboze. Agregacija trombocita na mestu povrede krvnog suda omogućava stvaranje trombocitnog čepa, što je ujedno i najvažnija trombocitna funkcija. Premošćavanje dva trombocita fibrinogenom koji se vezuje uz GPIIb/IIIa pojedinačnog trombocita, centralni je događaj ovog procesa (180). Aktivacijom trombocita, na spoljnoj strani trombocitne membrane eksprimiraju se FL negativnog naboja. Eksponirani fosfatidil serin (PS) i ostali FL negativnog naboja, na površini slepljenih trombocita predstavljaju trombocitni činilac 3 (PF3) tj. katalitičku površinu za odvijanje procesa koagulacije što će dovesti do generisanja trombina. Prve stvorene količine trombina, na ćelijama koje eksprimiraju TF (monociti, endotelne ćelije) nisu dovoljne za stvaranje stabilnog fibrinskog ugruška, ali su dovoljne da aktiviraju trombocite i amplifiraju proces adhezije i agregacije (164,180). Fosfolipidna membrana aktivisanih trombocita je mesto vezivanja aktivisanih koagulacionih faktora i odvijanja procesa koagulacije, tj. stvaranja dovoljne količine trombina da pretvori rastvorljivi fibrinogen u fibrin i stabilizuje i učvrsti krvni ugrušak (164,170,180). Pod dejstvom kolagena i trombina, aktivisani trombociti odbacuju prokoagulantne vezikule, mikropartikule (eng. platelet-derived microparticles – PMPs) koje eksprimiraju PS, P-selektin, CD40L, vezuju FVIII, Va i Xa, omogućavajući stvaranje kompleksa protrombinaze na svojoj površini. PMPs se vezuju uz leukocite i endotelne ćelije, aktivišu ih i premoštavaju (164).

#### **1.4.4. Proinflamatorna i proaterosklerotska uloga trombocita**

U fiziološkim uslovima antiadhezivni fenotip endotela delovanjem NO, PGI<sub>2</sub> i ekto-ADP-aza onemogućava blizak kontakt trombocita i endotela (185). Inflamatorno izmenjeni endotel (u uslovima hiperlipidemije, hiperglikemije, pušenja, turbulentnog toka krvi) je inicijalni stimulans adhezije i aktivacije trombocita što može predstavljati kritični događaj u razvoju aterotromboze (186). Disfunkcionalni endotel eksprimira adhezivne molekule poput P-selektina, PSGL-1, vWF što omogućava njihovo vezivanje za adekvatne trombocitne

receptore (PSGL-1, P-selektin, GPIb) te omogućava kotrljanje i kasnije čvrstu adheziju trombocita uz endotel (187,188). Aktivisani trombociti luče inflamatorne, mitogene, hemotaksne, proadhezivne i vazokonstriktorne materije u lokalnu mikrookolinu (189). IL-1 $\beta$  sintetiše se (uz mRNA) u trombocitima nakon integrinima posredovane adhezije, a putem aktivacije NF- $\kappa$ B endotelnih ćelija, indukuje lučenje IL-6 i IL-8 te značajno potiče endotelnu ekspresiju ICAM-1,  $\alpha_v\beta_3$  i MCP-1 (170). CD40L, transmembranski protein, eksprimiran u aktivisanim trombocitima, važan je medijator aktivacije endotela i patogeneze aterotromboze (190). Aktivisani trombociti otpuštaju CD40L, a njegova solubilna forma sCD40L vezuje se uz CD40 receptor endotelnih i glatkomišićnih ćelija, leukocita, fibroblasta i trombocita. sCD40L aktivacijom NF- $\kappa$ B endotelnih ćelija, povećava ekspresiju ICAM-1, VCAM-1, E-selektina, P-selektina, otpuštanje IL-6 i TF, stvarajući proaterogeni i proinflamatorni endotelni fenotip (190,191). Takođe, posreduje u transmigraciji monocita u subendotel, migraciji i proliferaciji glatkih mišićnih ćelija kao i njihovom lučenju IL-1, IL-6 i IL-8 (190). Aktivisani adherirani trombociti, privlače leukocite i pomažu njihovu subendotelnu transmigraciju, amplifikujući tako inflamatorni odgovor zida krvnog suda što je osnova aterosklerotskog procesa. Interakcija leukocita i trombocita uspostavlja se vezanjem P-selektina trombocita sa PSGL-1 leukocita. Ova interakcija promoviše aktivaciju leukocitnih integrina Mac-1 i LFA-1, neophodnih za stabilnu leukocitno-trombocitnu adheziju. Mac-1 integrin je odgovoran za čvrstu adheziju leukocita i trombocita vezivanjem trombocitnih GPIb, ICAM-2 i JAM-3 (eng. junctional adhesive molecule 3) (170). Degranulacijom trombocita otpuštaju se hemokini u cirkulaciju ili se eksprimiraju na njihovoj površini. Sinergističnim dejstvom trombocitnih hemokina poput NAP-2, PF4,  $\beta$ -TG, RANTES, IL-8, održava se međusobna komunikacija leukocita, trombocita i endotela što doprinosi razvoju aterosklerotskog procesa stvarajući uslov za nastanak aterotrombozne komplikacije (192).

#### 1.4.5. Dijabetični trombociti

U T2DM postoje strukturne i funkcione promene trombocita koje dovode do njihove hronične aktivacije. Hiperaktivnost trombocita se može pripisati povećanom udelu mlađih, nezrelih, većih i reaktivnijih trombocita, specifičnom metaboličkom miljeu dijabetesa (hiperglikemija, insulinska rezistencija, hiperlipidemija) kao i vaskularnom oštećenju (193).

Hiperglikemija uzrokuje hiperreaktivnost trombocita na više načina. Neenzimskom glikacijom površinskih proteina smanjuje se fluidnost plazmatske membrane što povećava ukupnu trombocitnu adhezivnost (194). Trombociti dijabetičara eksprimiraju više adhezionih molekula poput CD31, CD36, CD42b, CD49b, CD62P, CD63, CD41, CD61 (195,196). Osmotskom aktivnošću, glikoza aktivira PKC (medijator trombocitne aktivacije), indukuje ekspresiju P-selektina i CD40L na površini trombocita te aktivira GPIIb/IIIa (193,197). Povećana ekspresija P-selektina uslovljava stvaranje više trombocitno-leukocitnih agregata (195). gLDL povećava intraćelijsku koncentraciju kalcijuma što povećava stepen degranulacije i agregabilnost trombocita. Hiperagregabilnost trombocita u uslovima insulinske rezistencije dovodi se u vezu sa povećanom intraćelijskom koncentracijom kalcijuma. Gojaznost, koja se javlja u sklopu metaboličkog sindroma i T2DM, dovodi se u vezu sa povećanim prometom trombocita, povećanim MPV, povećanom koncentracijom intraćelijskog kalcijuma i povišenim stepenom oksidativnog stresa. Takođe, u T2DM, ushodno je regulisan P2Y12 signalni put, što smanjuje koncentraciju cAMP-a i povećava adhezivnost, agregabilnost i prokoagulantnu aktivnost trombocita (193). Modulacija oksidativnog statusa sa povećanjem ROS, u T2DM, dovodi do poremećaja vaskularne i trombocitne funkcije. Povećana trombocitna produkcija  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  povećava stepen aktivacije trombocita (193,195). Usled ubrzanog metabolizma arahidonske kiseline, u dijabetičkim trombocitima je povećana sinteza TXA2. U T2DM povećan je nivo PMPs, a smatra se da ove čestice igraju naročito važnu ulogu u razvoju makrovaskularnih komplikacija u ovih bolesnika

aktivirajući endotelne ćelije i monocite te promovirajući vezivanje monocita za endotel (195). Povećan je procenat mladih, retikulisanih trombocita, koji su nezreli, sadrže više mRNA, povećan im je MPV. Sadrže veći broj tamnih granula, prisutna je povećana COX-2 aktivnost i imaju ukupno veći hemostatski potencijal od zrelih trombocita (198). Povećani procenat retikulisanih trombocita u bolesnika sa T2DM pozitivno koreliše sa abdominalnim tipom gojaznosti i insulinskom rezistencijom (199). U dijabetičara je povećan nivo sCD40L i sP-selektina, koji se odličuju sa površine aktivisanog trombocita, a smatra se da ukazuju na postojanje ubrzanog procesa ateroskleroze i protrombozno stanje. Intenzivna aktivacija i degranulacija trombocita dovode do otpuštanja inflamatornih, mitogenih, hemotaktnih i proadhezivnih materija što intenzivira komunikaciju trombocita sa endotelom i leukocitima (200).

Endotelna disfunkcija, prokoagulantno stanje, smanjen fibrinolizni potencijal, su mehanizmi koji doprinose ukupnom protrombotičkom potencijalu bolesnika sa T2DM. Međutim, hiperreaktivni trombociti, mesto su ukrštanja ovih mehanizama i imaju vodeću ulogu u nastanku i razvoju aterotromboze i njenih komplikacija (193).

#### **1.4.6. Markeri aktivacije trombocita**

Analiza markera trombocitne aktivacije bitna je za detekciju rane faze aterotrombotičkog procesa. Promene u nivou ekspresije trombocitnih receptora ili drugih površinskih molekula, nastalih usled intra- ili ekstraćelijskog odgovora na odgovarajuće stimulanse moguće je detektovati protočnom citometrijom korištenjem specifičnih monoklonskih antitela (201).

P-selektin (CD62P), uskladišten u  $\alpha$  granulama, eksprimira se na površini trombocita odmah po njegovoj aktivaciji. Smatra se "zlatnim standardom" markera trombocitne aktivacije. Povećana trombocitna ekspresija P-selektina detektovana je kod bolesnika sa T2DM, u gojaznosti, hipertenziji, u AKS, i CVB. Od klasičnih markera trombocitne

aktivacije, na plazmatskoj membrani trombocita moguće je detektovati CD40L, konstituent  $\alpha$  granula i CD63, koji se po aktivaciji trombocita translocira iz tamnih granula na plazmatsku membranu (201,202). Monoklonskim antitelom, PAC-1, detektuje se aktivisani, strukturno izmenjeni receptor kompleks, GPIIb/IIIa (201). Alternativnim markerima trombocitne aktivacije mogu se smatrati PMPs, vezane za trombocitnu membranu, koje sadrže CD62P, CD63 i PS te imaju i do sto puta jaču prokoagulantnu aktivnost od samih aktivisanih trombocita (201). Dokazano je da su PMPs povišene kod gojaznih, u hipertenziji, T2DM i AIM (203,136). Takođe, alternativnim markerom trombocitne aktivacije mogu se smatrati trombocitno-leukocitni agregati, primarno nastali interakcijom P-selektin - PSGL-1. Klinička upotreba detekcije ekspresije fosfatidil serina, merene vezivanjem aneksina V zavisno od kalcijuma, kao markera trombocitne aktivacije još uvek se ispituje (201).

## 1.5. ANTIAGREGACIONA TERAPIJA

Aktivacija i agregacija trombocita imaju ključnu ulogu u generisanju okluzivnog tromba na mestu ruptуре aterosklerotskog plaka. Takođe, trombociti utiču na mnogobrojne endotelne i inflamatorne odgovore u toku razvoja aterosklerotskog procesa (204). Intaktan vaskularni endotel prevenira adheziju i aktivaciju trombocita, koji se normalno nalaze u stanju mirovanja, ali u slučaju endotelne aktivacije, ogoljavanja subendotelnog matriksa, ruptуре aterosklerotskog plaka ili revaskularizacionih intervencija, dolazi do trombocitne adhezije, aktivacije i agregacije, inicijalnog događaja u nastanku tromboze arterijskog krvnog suda (205). Uvođenjem antiagregacione, antitrombocitne terapije koja efikasno deluje na arterijsku vaskulaturu i modulira ključne komponente odgovorne za nastanak tromba, povoljno se utiče na klinički ishod. S obzirom da je aktivacija trombocita uslovljena aktivacijom različitih trombocitnih receptora, potrebno je odrediti optimalnu antiagregacionu terapiju koja će efikasno prevenirati aterotrombozne komplikacije i postići pravi balans između supresije funkcije trombocita i povećanja rizika za nastanak krvarenja (205,206). Prema mehanizmu delovanja antitrombocitnu terapiju možemo podeliti na blokatore trombocitnih P2Y12 receptora, blokatore COX-1 enzima, blokatore trombocitnih GP IIb/IIIa receptora i blokatore trombocitnih PAR-1 receptora (207).

Cilj primene antitrombocitne terapije je da smanji, uspori ili zaustavi aktivaciju i agregaciju trombocita i formiranje tromba. Inhibicija trombocitne funkcije primenom dvojne antitrombocitne terapije (kombinovana primena aspirina i blokatora P2Y12 receptora) predstavlja kamen temeljac u prevenciji neželjenih ishemijskih događaja kod bolesnika sa AKS, uključujući i one sa perkutanom koronarnom intervencijom (eng. percutaneous coronary intervention – PCI) kako bi se smanjio rizik od proceduralnih i post-proceduralnih neželjenih ishemijskih događaja. Međutim, uprkos primeni dvojne antiagregacione terapije, postoji rizik od ponavljanih neželjenih ishemijskih događaja s obzirom da ovi antitrombocitni

lekovi (inhibiraju funkciju trombocita zavisnu od TXA2 i ADP-a) ne inhibiraju sve trombocitne aktivacione puteve, a registruje se i rezistencija na primenjenu terapiju u određenog broja bolesnika (207).

### **1.5.1. Tienopiridini (blokatori P2Y12 receptora)**

Tienopiridini (tiklopidin, klopidogrel, prasugrel) su neaktivni prolekovi koji se aktiviraju u jetri, a njihovi aktivni metaboliti se kovalentno, ireverzibilno vezuju uz trombocitni P2Y12 receptor trombocita. Ovim je onemogućena aktivacija P2Y12 receptora putem ADP-a, a samim tim i posledična aktivacija GP IIb/IIIa tj. sprečava se agregacija trombocita (208,209).

#### **1.5.1.1. Tiklopidin**

Tiklopidin se metaboliše u jetri dvostepenim mehanizmom. Prvo nastaje neaktivni metabolit 2-oxo-ticlopidin koje se pod dejstvom citohrom P450 (CYP450) enzimskog sistema pretvara u aktivnu formu leka (210). Zbog neželjenih efekata (leukopenija, neutropenija, trombocitopenija, pancitopenija, dijareja, povraćanje, holestaza, kožni osip, aplazija kosne srži) kao i zbog sporog početka njegovog dejstva (8-11 dana), tiklopidin nije više lek izbora primarne i sekundarne prevencije KVB (207,208).

#### **1.5.1.2. Klopidogrel - farmakokinetika, farmakodinamika, farmakogenomika**

Klopidogrel, noviji tienopiridinski derivat i jači inhibitor trombocitne agregacije, zamenio je gotovo u potpunosti primenu ticlopidina. Klopidogrel je prolek koji se apsorbuje u intestinum i pod dejstvom CYP450 metaboliše u jetri, dvostepenim mehanizmom. U prvom koraku, pod dejstvom CYP1A2, CYP2B6 i CYP2C19 nastaje 2-oxo-clopidogrel, a potom pod dejstvom CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2B6 i CYP2C19 nastaje aktivni metabolit. Oko 85% proleka se hidrolizira u neaktivni oblik koji se izlučuje iz organizma urinom i fecesom (211). Maksimalna koncentracija aktivnog metabolita postiže se nakon 1h od administracije leka, a njegov poluživot je veoma kratak, manje od sat vremena (212). Aktivni metabolit

klopidogrela sadrži reaktivnu tiolnu grupu koja se vezuje uz slobodne cisteinske rezidue (cys17 i cys270) P2Y<sub>12</sub> receptora, što ireverzibilno blokira vezivanje ADP-a i posledičnu aktivaciju ovog receptora. Plazmatska koncentracija aktivnog metabolita je dozno zavisna, kao i inhibicija agregacije trombocita. Signifikantna inhibicija trombocita postiže se nakon 1-2h, a njen maksimalan nivo se postiže za oko 4-5 sati od primene leka (208).

Takođe je dokazano da klopidogrel atenuira formiranje trombocitno-leukocitnih agregata (213), poništava ADP-om indukovanu trombocitnu ekspresiju CD40 liganda (214), kao i ekspresiju P-selektina (215). Na taj način klopidogrel doprinosi smanjenju proinflamatornog i proaterotrombotičkog potencijala koji leži u osnovi hroničnog procesa ateroskleroze i njenih akutnih komplikacija (215).

Dokaze o efikasnosti klopidogrela pokazale su mnogobrojne kliničke studije poput četiri dvostruko slepe studije izvedene na preko 80000 bolesnika: CAPRIE (eng. Clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events), CURE (eng. Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events), COMMIT (eng. Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) i CLARITY (eng. Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy). Ove studije su ukazale na prednost primene klopidogrela kao monoterapije u odnosu na monoterapiju aspirinom (CAPRIE) ili kombinovane terapije klopidogrel i aspirin u odnosu na monoterapiju aspirinom (CURE, COMMIT, CLARITY) u cilju sekundarne prevencije neželjenih ishemijskih događaja (kardiovaskularna smrt, nefatalni infarkt miokarda, ishemijski moždani udar (IMU), restenoze ciljne koronarne arterije) (207).

Međutim, odgovor na klopidogrel može varirati od smanjenog odgovora do potpune rezistencije na primenjeni lek, a što je udruženo sa visokim rizikom za nastanak nepovoljnog ishemijskog kliničkog događaja, uključujući i trombozu implantiranog stenta (216). Mehanizmi, potencijalno uključeni u nastanak smanjenog odgovora na terapiju klopidogrelom mogu biti genetski ili epigenetski te mogu delovati trajno ili prolazno. Genetske studije su



dokazale vezu između polimorfizma gena koji kodiraju sintezu CYP3A4, CYP3A5 i CYP2C19, enzima odgovornih za nastanak aktivnog metabolita klopidogrela u jetri i lošeg odgovora na klopidogrel. Polimorfizam nukleotida 681G>A na položaju u genu za sintezu CYP2C19\*2 je odgovoran za ispoljavanje fenotipa smanjenog odgovora na klopidogrel i nezavisni je prediktor odgovora na lek i nepovoljnog ishemijskog kliničkog događaja (216). Nešto ređi su CYP2C19\*3, CYP2C19\*4, CYP2C19\*5, CYP2C19\*6, CYP2C19\*7 i CYP2C19\*8 polimorfizmi koji se dovode u vezu sa lošijim terapijskim odgovorom. Inače, postoji razlika u rasnoj distribuciji ovih polimorfizama, tako da je u belaca najčešći CYP2C19\*2 polimorfizam. 2010. godine, Američka asocijacija za hranu i lekove (eng. United States Food and Drugs Administration - US FDA), je unela dodatno upozorenje u uputstvo o upotrebi klopidogrela o uticaju CYP2C19 genotipa. S obzirom da nije obuhvaćeno preporukama, ostavljeno je kliničaru na razmatranje da li će indikovati genetsko testiranje kod pojedinog bolesnika što je osnova budućnosti farmakogenomike (217). Polimorfizam gena MDR1 i ABCB1 koji kodiraju sintezu P-glikoproteina, intestinalnog transportera, uslovljavaju njegovu smanjenu apsorpciju i lošiji terapijski odgovor (218,219). Polimorfizam P2Y12 gena dovodi se u vezu sa smanjenim afinitetom za vezivanje aktivnog metabolita klopidogrela za P2Y12 receptor. Lošiji terapijski odgovor povezan je i sa primenom konkomitantne terapije poput blokatora kalcijumskih kanala, statina i inhibitora protonske pumpe (220). Atorvastatin ima visok afinitet za CYP3A4, a omeprazol za CYP2C19 te konkurentno inhibiraju metabolizam klopidogrela (221). FDA je unela preporuku o izbegavanju konkomitantne terapije omeprazolom i esomeprazolom uz primenu klopidogrela (220).

Dokazano je da različiti epigenetski faktori mogu trajno (limitiran kapacitet intestinalne apsorpcije, loša komplijansa, starije životno doba, gojaznost, dijabetes, smanjena sistolna funkcija, hiperholesterolemija) ili prolazno (povećan obrt trombocita, povećan broj

retikulisanih trombocita, zapaljenje, smanjena aktivnost ADAMTS-13, interakcija trombocita sa endotelnim ćelijama i monocitima) uticati na smanjen terapijski odgovor. Međutim, mehanizmi uticaja ovih faktora još uvek nisu potkrepljeni sa dovoljno dokaza i predmet su istraživanja (220).

### **1.5.1.3. Prasugrel**

Prasugrel je noviji tienopiridinski preparat, deset puta potentniji inhibitor agregacije trombocita od klopidozela. Posle brze apsorpcije, 80% leka se aktivira u jetri, a na njega ne utiče genski polimorfizam niti konkomitantna terapija (208). Iako se njegova primena čini superiornija u odnosu na klopidozel zbog manjeg varijabiliteta odgovora na terapiju, postoje ograničenja njegove primene zbog visokog rizika od krvarenja. TRITON-TIMI 38 studija (eng. Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel–Thrombolysis in Myocardial Infarction) ukazala je na prednost primene prasuzela u odnosu na klopidozel, ali uz visok rizik od krvarenja, posebno u starijih od 75 godina, osoba sa malom telesnom masom i onih koji su prethodno imali IMU ili TIA, što je postavljeno kao kontraindikacija za njegovu primenu (222).

### **1.5.2. Direktni inhibitori P2Y<sub>12</sub> receptora**

Tikagrelor je netienopiridinski, reverzibilni, direktni blokator P2Y<sub>12</sub> receptora koji ne zahteva metaboličku aktivaciju u jetri. Posle 12h nakon prekida terapije moguć je delimični oporavak funkcije trombocita. PLATO studija (eng. Platelet Inhibition and Patient Outcomes) je pokazala značajno smanjenje incidence nepovoljnog ishemičnog kliničkog događaja kod bolesnika sa STEMI i NSTEMI koji su planirani za PCI, pri primeni tikagrelora u odnosu na klopidozel, ali i pojavu učestalijeg krvarenja u grupi lečenih tikagrelorom (223).

GPIIb/IIIa inhibitori (tirofiban) su potentni antagonisti vezivanja fibrinogena za GPIIb/IIIa receptor i posledične agregacije trombocita. Efikasnost i bezbednost antagonista GP

IIb/IIIa najveća je kada se primenjuju intravenski, kod bolesnika sa visokim rizikom tokom PCI (121).

Antagonisti PAR-1 (vorapaxar, atopaxar) receptora inhibišu trombinom indukovanu agregaciju trombocita kompetitivnim vezivanjem uz PAR-1 receptor. Efekat primene ovih lekova u svrhu primarne i sekundarne prevencije aterotromboznih akcidenata se još uvek istražuje (224).

### **1.5.3. Aspirin**

Aspirin ireverzibilno inhibiše enzim ciklo-oksigenazu -1 (eng. cyclo-oxygenase – COX) i COX-2, acetilacijom serinskih rezidua, sprečavajući konverziju arahidonske kiseline u PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub> i njihovu konverziju u TXA<sub>2</sub> koji je potentni vazokonstriktorni činilac i agonista trombocita. Manjim intenzitetom inhibiše COX-2 nego COX-1 pa zato i vrlo malo zaostale aktivnosti COX-2 može indukovati agregaciju trombocita (209). Blokiranjem aktivacije NF-κB, olakšava inhibiciju aktivacije trombocita posredovane leukocitima. Inhibiše otpuštanje kiseoničkih radikala, elastaza, oksidaciju LDL. Sprečava adheziju monocita, inhibiše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i angiogenezu, a inhibicijom aktivacije NF-κB, inhibiše endotelnu ekspresiju ICAM-1, VCAM-1 i E-elektina, delujući antiinflamatorno i antiaterogeno. Neadekvatan efekat aspirina na trombocitnu funkciju može biti uslovljen polimorfizmom gena za COX-1 i COX-2, zatim povećanim obrtom trombocita i povećanom ekspresijom COX-2 u njima, neadekvatnim doziranjem leka, potom u inflamaciji i dijabetesu (225).



bude standardizovana, tačna i reproducibilna, a istovremeno jednostavna, brza, i jeftina. S obzirom da ni jedna metoda na tržištu ne zadovoljava potpuno sve navedene kriterijume, još uvek nema preporuke o rutinskom praćenju odgovora na antiagregacionu terapiju te se koristi više u svrhu istraživanja.

#### **1.5.4.1. LTA**

Svetlosna agregometrija (eng Light transmission aggregometry – LTA), smatra se istorijskim ‘‘zlatnim standardom’’ monitoringa funkcione aktivnosti trombocita i farmakodinamike antiagregacionog leka. Princip ove optičke metode se zasniva na detekciji promene turbiditeta (smanjenja optičkog denziteta) plazme bogate trombocitima nakon dodavanja adekvatnog agoniste (arahidonska kiselina, ADP). Njome se može vršiti monitoring terapije i aspirinom i klopidogrelom. Nedostaci ove metode su loša reproducibilnost, nedostatak standardizacije, dugotrajna preanalitička priprema i kompleksnost izvođenja (228).

#### **1.5.4.2. VerifyNow**

Ovo je POCT (eng. point-of care testing) metoda koja meri aglutinaciju čestica obloženih fibrinogenom nakon aktivacije trombocita agonistom (arahidonska kiselina - aspirin esej, ADP i PGE1 – P2Y12 receptor esej). Metoda je dostupna, automatizovana, brza, jednostavna, ne zahteva pripremu uzorka (puna krv). U proceni odgovora na terapiju klopidogrelom postoji dobra korelacija između ovog sistema i LTA (228).

#### **1.5.4.3. VASP**

Metoda se zasniva na merenju vazodilatator-stimulišućeg fosfoproteina (VASP) trombocita protočnom citometrijom. VASP je intraćelijski trombocitni protein koji je bazalno nefosforilisan. Kada dođe do inhibicije P2Y<sub>12</sub> dolazi do njegove fosforilacije. Tako količina fosforilisanog VASPa koreliše sa nivoom inhibicije P2Y<sub>12</sub> receptora. Prednost je visoka

selektivnost za P2Y<sub>12</sub> receptor. Metoda se zasniva na izračunavanju indeksa rezistencije trombocita (PRI) na osnovu koga bolesnike delimo na dobre i loše "respondere" (229,230).

#### 1.5.4.4. Multiplate analizator

Multiplate analizator (eng. multiple electrode aggegometry - MEA) zasniva rad na principu merenja promene impedance između dve elektrode na kojima je uz dodatak agonista (arahidonska kiselina, kolagen, ADP, TRAP) došlo do adhezije i agregacije trombocita. Računanjem površine pod krivom (AUC) dobija se uvid u aktivnost trombocita što se izražava u jedinicama mere AU/min. Dostupno je više vrsta testova koji služe za procenu odgovora na terapiju aspirinom (ASPI test) i tienopiridinima (ADP i ADP test HS). Metoda je brza, jednostavna, standardizovana, potrebno je malo uzorka pune krvi. Postoji visoka korelacija sa LTA (228). (detaljno objašnjeno u poglavlju metodologija)

#### 1.5.4.5. PFA-100

Ovaj sistem služi za procenu efekata terapije aspirinom, koristeći kolagen/adrenalin kertridž. Agregabilnost trombocita predstavlja se kao vreme potrebno za nastanka trombocitnog koaguluma oponašanjem *in vivo* uslova fiziološke brzine protoka krvi u arterijama u prisutnosti kolagena i adrenalina. Metoda je brza, jednostavna, koristi malo pune krvi, ali nedostatak je to što je pod uticajem koncentracije vWF, hematokrita i broja trombocita (228). „Aspirinsku rezistenciju,, definiše vreme stvaranje koaguluma < 193s (kolagen/adrenalin kertridž) (225).

U cilju boljeg sagledavanja rizika od nastanka tromboze u odnosu na sam odgovor na terapiju klopidogrelom, za sada su konsenzusom autora definisane granične vrednosti postojanja visoke reaktivnosti trombocita pod terapijom klopidogrela (eng. high on-treatment platelet reactivity – HPR): 1) >46% maksimalne agregacije indukovane sa 5µmol/l ADP (LTA), 2) 235 - 240 RU (VerifyNow P2Y<sub>12</sub> esej), 3) PRI >50% (VASP-P), 4) >468 AU/min (MEA-ADP). Ove vrednosti su utvrđene na velikom broju bolesnika sa AKS, sa ugrađenim

stentom. Postoji mogućnost da su drugačije cutt-off vrednosti za bolesnike sa AKS koji nisu podvrgnuti PCI, one sa drugim tipom ishemijske bolesti i dijabetičare (231).

#### **1.5.5. Indikacije za uvođenje antiagregacione terapije klopidogrelom i aspirinom**

Kod bolesnika sa IBS, primenjuje se dugoročno terapija aspirinom (100 mg/dan). U slučaju AKS (NSTEMI, STEMI), kao i PCI sa ugradnjom određene vrste stenta, BMS (eng. bare-metal-stent) ili DES (eng. drug eluting stent) i aortokoronarnog bajpasa (engl. coronary artery bypass grafting - CABG) indikuje se dvojna terapija aspirinom i klopidogrelom u trajanju do 12 meseci (121).

Zavisno od faktora rizika, u cilju primarne prevencije CVB indikuje se dugoročna terapija aspirinom u dozi od 100 mg/dan (232). U cilju sekundarne prevencije akutnog moždanog udara ili TIA, indikovana je monoterapija aspirinom u dozi 50-325 mg/dan ili monoterapija klopidogrelom 75 mg/dan (kod bolesnika sa netolerancijom aspirina). Kod bolesti ekstrakranijalnih vertebralnih arterija, dugoročno se preporučuje uzimanje malih doza aspirina ili klopidogrela u slučaju njegove netolerancije (233,234,235).

Opšta preporuka za uvođenje dugoročne antiagregacione terapije kod bolesnika sa PAB načelno postoji, ali se razlikuje u odnosu na specifična vaskularna područja jer ne postoji još uvek dovoljno dokaza na osnovu izvedenih kliničkih studija. Kod bolesti karotidnih arterija, dugoročno, bez obzira na simptome, preporučuje se uzimanje malih doza aspirina ili klopidogrela u slučaju njegove netolerancije. Posle ugradnje karotidnog stenta, indikovana je dvojna terapija aspirinom i klopidogrelom, ali nije definisano njeno optimalno vreme trajanja. Posle revaskularizacije donjih ekstremiteta, indikovana je primena dvojne antiagregacione terapije (aspirin, tienopiridin) u trajanju od najmanje jednog meseca (124).

Prema preporukama Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za lečenje diabetes mellitusa, potrebno je razmotriti primenu aspirina u dozi od 75-162 mg/dan, kao primarnu prevenciju KVB u pacijenata sa T2DM i povišenim KV rizikom: muškarci stariji od 50 god i

žene starije od 60 god koji imaju minimalno jedan KV faktor rizika (pozitivna porodična anamneza za KVB, hipertenzija, pušenje, dislipidemija, albuminurija). Aspirin se u istoj dozi preporučuje u okviru sekundarne prevencije bolesnika sa T2DM i dijagnozom postojeće KVB. U slučaju netolerancije aspirina, preporučuje se primena klopidogrela u dozi od 75 mg/dan. Kombinovana, dvojna terapija aspirinom (75-162mg/dan) i klopidogrelom (75 mg/dan) preporučuje se u trajanju od godinu dana nakon AKS kod bolesnika sa T2DM (14).



## 2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Pretpostavke na kojima se zasniva istraživanje su:

1. Vrednosti bioloških markera endotelne aktivacije, aktivacije i agregabilnosti trombocita u bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa su povišeni u odnosu na njihove vrednosti u zdravoj populaciji.
2. U dijabetičnoj populaciji bolesnika postoji značajno veća učestalost rezistencije na primenjenu antitrombocitnu terapiju tienopiridinima, nego u nedijabetičnoj populaciji bolesnika.

### **Ciljevi:**

1. Proceniti i uporediti nivoe biomarkera, pokazatelja endotelne aktivacije, aktivacije i agregabilnosti trombocita u bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na njihove vrednosti u zdravoj populaciji.
2. Uporediti efikasnost primenjene antitrombocitne terapije tienopiridinima u bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa i bolešću arterijskih krvnih sudova u odnosu na efikasnost ove terapije i u nedijabetičnoj populaciji bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Vrsta studije

Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona prospektivna studija, a izvedena je u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije, odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog Centra Vojvodine kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Studija je sprovedena u periodu od januara 2013. godine do decembra 2015. godine u Centru za laboratorijsku medicinu Kliničkog Centra Vojvodine.

#### 3.2. Ispitanici

U ispitivanje je uključeno 100 ispitanika oba pola, starosti od 33 do 70 godina života, kod kojih je prethodno utvrđeno postojanje neke od kliničkih manifestacija bolesti arterijskih krvnih sudova (IBS, CVB, PAB) koji kao antitrombocitnu terapiju uzimaju tienopiridinski preparat, klopidoarel. Od toga, 50 uključenih ispitanika imalo je dijagnozu dijabetes melitus tipa 2, a 50 su bili bolesnici bez dijabetesa. Kontrolnu grupu je činilo 30 klinički i biohemijski zdravih ispitanika, nepušača koji su prema polnoj i dobnoj strukturi odgovarali ispitivanim grupama bolesnika.

##### 3.2.1. Konstrukcija i način izbora uzorka

###### Uslovi za uključivanje u studiju

*Uslovi za uključivanje u prvu grupu ispitanika – Grupa I - T2DM:*

- prethodno postavljena dijagnoza dijabetes melitusa tip 2 (prema postojećim parametrima za utvrđivanje glikoregulacije od strane nadležnog endokrinologa) kod kojih nije došlo do promene u vrsti i/ili dozi dosadašnje terapije oralnim antidijabeticima kao ni moguće udružene terapije hipolipemicima unazad tri meseca
- prethodno klinički verifikovana bolest arterijskih krvnih sudova (infarkt miokarda, stabilna ili nestabilna angina pectoris, CVI po tipu ishemije, TIA, PAB); kliničku

verifikaciju bolesti arterijskih krvnih sudova su vršili nadležni specijalisti kardiolozi, neurolozi i vaskularni hirurzi

- kontinuirana antiagregaciona terapija tienopiridinom, u trajanju najmanje tri nedelje pre uključivanja bolesnika u studiju (sa ili bez prateće terapije aspirinom)

*Uslovi za uključivanje u drugu grupu ispitanika – Grupa II - nonDM:*

- prethodno klinički verifikovana bolest arterijskih krvnih sudova (infarkt miokarda, stabilna ili nestabilna angina pektoris, CVI po tipu ishemije, TIA, PAB); kliničku verifikaciju bolesti arterijskih krvnih sudova su vršili nadležni specijalisti kardiolozi, neurolozi i vaskularni hirurzi
- kontinuirana antiagregaciona terapija terapija tienopiridinom, u trajanju najmanje tri nedelje pre uključivanja bolesnika u studiju (sa ili bez prateće terapije aspirinom)

Uslovi za isključivanje iz studije

- osobe mlađe od 18 godina
- ispitanici koji nisu pristali na uključivanje svojim potpisom saglasnosti za učešće u studiji
- klinički verifikovano postojanje malignog oboljenja, autoimunskog oboljenja, insuficijencije jetre, terminalne isuficijencije bubrega, neke od akutnih komplikacija dijabetes melitusa
- terapija kortikosteroidima i drugim imunosupresivima, oralnim kontraceptivnim sredstvima, hormonskom supstitucionom terapijom, tj. medikamentna terapija koja može uticati na nivo serumskih biomarkera endotelne disfunkcije
- primena antikoagulantne terapije

- trudnoća
- izražena anemija (Hb < 10 g/dl) i trombocitopenija (<100 x 10<sup>9</sup>/l)
- drastična promena u dosadašnjem nivou fizičke aktivnosti, u telesnoj masi i ishrani (prelaz na vegetarijanski način ishrane, restriktivne dijetete) u poslednja tri meseca; aktivno pušenje i konzumiranje alkohola

#### Uslovi za uključivanje u kontrolnu grupu

- klinički i biohemijski zdravi ispitanici, nepušači, bez promena u dosadašnjem nivou fizičke aktivnosti, u telesnoj masi i ishrani u poslednja tri meseca koji prema polnoj i dobnoj strukturi odgovaraju ispitivanoj grupi bolesnika

### **3.2.2. Protok ispitivanja**

Na osnovu anamnestičkih podataka i podataka iz medicinske dokumentacije, eliminisani su oni ispitanici koji nisu odgovarali u potpunosti kriterijumima za uključivanje u ispitivanje. Ispitanici koji su odgovarali kriterijumima za uključivanje u studiju su klasifikovani prema polu, godinama i postojanju T2DM. Svi ispitanici su anketirani o životnim navikama (fizička aktivnost, pušenje, konzumiranje alkohola, ishrana, uzimanje suplemenata), a takođe su uzeti podaci o pratećoj terapiji, porodičnoj anamnezi, ranijim oboljenjima.

Svakom ispitaniku je pre samog uključivanja u ispitivanje detaljno objašnjen cilj istraživanja, proces dijagnostičke obrade i njegovo učešće u njemu. Saglasnost za učešće u studiji bolesnici su overili svojim potpisom nakon pročitanoog teksta za informisanje pacijenta.

Nakon adekvatne pripreme u vidu dvanaestočasovnog prekonocnog gladovanja, u jutarnjim časovima (od 7-9h), svim ispitanicima je izvršeno uzimanje uzoraka venske krvi iz kubitalne vene. Krv je uzorkovana našte, nakon polučasovnog mirovanja, u sedećem položaju sa posebnom pažnjom da se izazove što kraća venska staza. Uzorkovanje je vršeno u četiri

plastične vakuum epruvete. Jedan uzorak je sakupljan u vakuum epruvetu sa antikoagulansom K<sub>2</sub>EDTA, drugi u epruvetu sa 0,11M tri-Na-citratom kao antikoagulansom u finalnoj koncentraciji 1:10, a treći u vakuum epruvetu sa Li-heparinom. Četvrti uzorak krvi uzorkovan je u vakuum epruvetu bez antikoagulansa sa serum separator gelom i aktivatorom koagulacije. Citratna plazma za koagulacione testove je odvajana nakon šestominutnog centrifugiranja na 2700g (4000rpm) na sobnoj temperaturi. Serum je izdvajan iz epruvete bez antikoagulansa centrifugiranjem na 1000g (2500rpm) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Alikvoti seruma (za analize sE-selektin i sP-selektin), u količini od najmanje 500 mikrolitara zapremine, zamrzavani su odmah nakon izdvajanja i čuvani na -80°C. Svi ostali uzorci su analizirani u roku od 3h od momenta uzorkovanja. Sve laboratorijske analize izvedene su u Centru za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine.

Svi ispitanici u grupama sa dijabetesom i bez dijabetesa, klinički su praćeni godinu dana u cilju utvrđivanja nastanka ponovnog aterotromboznog akcidenta.

### **3.3. Metode ispitivanja**

#### **3.3.1. Antropometrijski parametri**

Svakom od ispitanika je izmerena telesna masa, telesna visina, obim struka i na osnovu ovih podataka izračunati su parametri Indeks telesne mase (ITM) i Odnos obima struka i telesne visine (WHtR – Waist to height ratio). Telesna visina (TV) merena je antropometrom po Martinu, u stojećem stavu sastavljenih peta i odmaknutih prstiju, ruku opuštenih uz telo. Dobijene vrednosti izražene su u centimetrima (cm). Za merenje telesne mase (TM) korišćena je medicinska decimalna vaga, a vrednosti su izražene u kilogramima (kg). Merenje obima struka (OS) vršeno je fleksibilnom mernom trakom u stojećem stavu, na središnjoj liniji između najniže tačke rebrarnog luka i prednje gornje bedrene bodlje karlične kosti. Abdominalna gojaznost definisana je prema NCEP ATP III preporukama, (OS > 102 cm

muškarci, OS > 88 cm žene) (236). Pomoću dobijenih vrednosti izmerenih antropometrijskih parametara izračunavan je ITM kao odnos telesne mase i kvadrata telesne visine izražene u metrima -  $ITM (kg/m^2) = TM (kg) / TV (m^2)$ . Step en uhranjenosti definisan je prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) na normalnu uhranjenost (ITM 18,5-24,9), prekomernu uhranjenost (ITM 25,0-29,9) i gojaznost (ITM  $\geq 30$ ) (237). Odnos obima struka i visine izračunat je prema formuli  $WHtR = OS (cm) / TV (cm)$ , a abdominalna gojaznost je definisana vrednostima  $WHtR > 0,5$  (238).

Vrednosti krvnog pritiska merene su sfigomanometrom, metodom po Riva Rocciju, dva puta nakon petominutnog mirovanja. Dobijene vrednosti izražene su u militerima živinog stuba (mmHg).

### **3.3.2. Laboratorijske analize**

U cilju laboratorijske analize parametara metabolizma glukoze urađeni su glikemija i insulinemija našte, glikozilirani hemoglobin (HbA1c) iz bazalnog uzorkovanja pune venske krvi. Primenjeni su sledeći laboratorijski principi: 1. Koncentracija glukoze u serumu je određivana Glucose Hexokinase II metodom (standardni enzimatski UV test) na biohemijском analizatoru ADVIA® 1800 Chemistry, Siemens Healthcare Diagnostics, Nemačka, komercijalnim setovima istog proizvođača. Referentni interval: 3,9 – 6,1 mmol/l. 2. koncentracija imunoreaktivnog insulina (IRI) određivana je imunometrijski, elektrohemiluminiscentnom metodom (Elektrochemiluminescent Imunnoassay - ECLIA) na automatizovanom analizatoru Elecsys 2010 uz korišćenje komercijalnih setova firme COBAS-Roche Diagnostics, USA. Referentni interval – 3,0 – 25,0 mIU/l 3. nivo glikoziliranog hemoglobina A1c (HbA1c) određivan je dvostepenim imunološkim testom sa fazom pripreme uzorka za kvantitativno određivanje koncentracije HbA1c u uzorcima pune krvi hemiluminiscentnom metodom sa mikropartilulama (chemiluminescent microparticle immunoassay - CMIA) sa fleksibilnim protokolima testa (Chemiflex) na automatizovanom

analizatoru ARCHITECT ci4100, *Abbott Laboratories, USA*, komercijalnim setovima istog proizvođača. Referentne vrednosti za HbA1c prema Međunarodnoj federaciji za kliničku hemiju (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) su 20 - 42 mmol/mol. Terapijski cilj vrednosti HbA1c za bolesnike sa dijabetesom je HbA1c < 53 mmol/mol (239).

Na osnovu izmerenih koncentracija glukoze i insulina izračunat je indeks za procenu insulinske rezistencije pomoću sledećeg matematičkog modela – model homeostaze:

$HOMA-IR = \text{glukoza (mmol/l)} \times \text{insulin (mU/l)} / 22.5$ . Insulinska rezistencija je definisana kao vrednost indeksa insulinske rezistencije,  $HOMA-IR \geq 2,5$  (240).

U cilju laboratorijske analize parametara inflamacije ispitanika urađene su sledeće laboratorijske analize: 1. Sedimentacija (SE) je određivana metodom po Westergreen-u; 2. kompletna krvna slika (KKS) određivana je na hematološkom automatskom analizatoru CELL- DYN Sapphire, *Abbott Laboratories, USA*, metodom protočne citometrije, uz korišćenje komercijalnih setova iste firme; 3. iz parametara KKS, broja neutrofila i broja limfocita, izračunavan je marker subkliničke inflamacije, odnos neutrofila/limfocita (eng. neutrophil-lymphocyte ratio – NLR); 4. koncentracija hsCRP određivana je iz uzorka seruma lateks pojačanom imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom biohemijском analizatoru analizatoru ADVIA® 1800 Chemistry, Siemens Healthcare Diagnostics, Nemačka komercijalnim setovima istog proizvođača. Analitička senzitivnost testa je 0,16 mg/l. Referentni interval je 0 – 5,0 mg/l; 5. Određivanje koncentracije fibrinogena u citratnoj plazmi je vršeno koagulacionom metodom po Klausu (Clauss), na koagulometru SIEMENS BCSxp, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Nemačka, uz korišćenje Multifibren\*U komercijalnog seta istog proizvođača, u referentnom opsegu 1,86-4,86 g/l (241).

U cilju procene globalne očuvanosti funkcionalnosti koagulacionog mehanizma određivano je aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT) i protrombinsko vreme (PT) uz pomoć automatizovanog koagulometra SIEMENS BCSxp, proizvođača Siemens

Healthcare Diagnostics, Marburg, Nemačka. aPTT test je izvođen uz pomoć reagensa Dade Actin FS aktivirani PTT reagens, proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Nemačka. PT test izvođen je uz pomoć reagensa Thromborel S, proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Nemačka. Rezultati aPTT-a i PT-a izražavani su kao R (ratio), koji se dobija kada se rezultat ovih testova za određeni uzorak plazme izražen u sekundama podeli sa vrednošću rezultata komercijalne kontrolne plazme, takođe izraženog u sekundama. Nivo D dimera je određivan latex imunoesej metodologijom uz korišćenje reagensa D-dimer Latex Reagent, proizvođača Instrumentation Laboratory, Milano, Italija, pomoću koagulometra IL-ACL TOP 500 CTS, proizvođača Instrumentation Laboratory, Milano, Italija. Referentni interval: 0-230 ng/ml.

Parametri lipidskog statusa određivani su na automatskom analizatoru ARCHITECT ci4100, Abbott Laboratories, USA, uz korišćenje komercijalnih setova istog proizvođača. Ukupni holesterol određivan je u serumu standardnim enzimskim postupkom uz enzim holesterol esterazu, a trigliceridi standardnim enzimskim postupkom uz enzim lipazu. Određivanje holesterola u HDL frakciji vršeno je u serumu direktnom enzimskom metodom za kvantitativno određivanje HDL holesterola. Vrednosti LDL holesterola (Friedewald i saradnici) (242) i non-HDL holesterola (ukupni holesterol-HDL holesterol), kao i indeks ateroskleroze (LDL holesterol / HDL holesterol) i aterogeni odnosi (ukupni holesterol / HDL holesterol i non-HDL holesterol / HDL holesterol) dobijeni su računskim putem. Izgled seruma je procenjivan Frižiderskim testom, stajanjem seruma na +4°C 24 časa.

U cilju analize homocisteina, kao protrombogenog biomarkera kardiovaskularnog rizika, primenjeni su sledeći principi: 1. koncentracija ukupnog homocisteina određivana je u plazmi jednostepenim imunotestom za kvantitativno određivanje L - homocysteina, koristeći CMIA tehnologiju sa fleksibilnim protokolima za testove (Chemiflex), na automatizovanom analizatoru ARCHITECT ci4100, Abbott Laboratories, USA, komercijalnim setovima istog



proizvođača. Referentni interval: 5,0 - 12,0  $\mu\text{mol/l}$ ; 2. koncentracije vitamina B12 i folne kiseline određivane su iz uzorka seruma CMIA metodom na istom automatskom analizatoru uz korišćenje komercijalnih setova proizvođača *Abbott Laboratories, USA*. Referentni interval za serumsku koncentraciju B12 iznosi 138 - 652  $\text{pmol/l}$ , a za folnu kiselinu 7,0 – 45,3  $\text{nmol/l}$ .

Ostale laboratorijske analize, u cilju isključenja funkcijskih oboljenja jetre i bubrega, obuhvatile su određivanje serumske koncentracije aspartat - aminotransferaze (AST), alanin – aminotransferaze (ALT), gama glutamil-transferaze (GGT), ureje, kreatinina i mokraćne kiseline na automatskom biohemijijskom analizatoru ADVIA 1800 Chemistry, Siemens Healthcare Diagnostics, Nemačka, uz korišćenje komercijalnih setova istog proizvođača.

Broj trombocita i trombocitni parametri, MPV, PCT i PDW određivani su pomoću automatizovanog hematološkog brojača CELL-DYN Sapphire, Abbott Lab.,USA. Procenat retikulisanih trombocita, %rP, određivan je na istom hematološkom brojaču, kao integralni deo fluorescentnog eseja protočne citometrije za određivanje retikulocita. Ova metoda omogućava razdvajanje zrelih eritrocita, trombocita i leukocita od retikulocita. Mešavina prediluirane krvi i retikulocitnog reagensa, koji sadrži fluorescentnu boju CD4K53 za RNA, prenosi se u protočnu ćeliju i osvetljava snopom svetlosti na 488nm. Obradom različitih uglova rasapa svetlosti i fluorescencije (na 530nm) omogućava se prvo odvajanje trombocita od eritrocita, a potom se izdvajaju posebno retikulisani trombociti uz korekciju pozadinske fluorescencije zavisne o veličini ćelije (243,244).

Von Willebrand faktor (vWF) je određivan u citratnoj plazmi reagensom za kvantitativno imunoturbidimetrijsko određivanje antigena von Willebrand-ovog faktora (vWFAg), proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics, Nemačka, na koagulacionom analizatoru istog proizvođača. Test se zasniva na sledećem principu: Male polistirenske partikule za koje su kovalentno vezana specifična antitela, aglutiniraju kada se mešaju sa uzorcima koji sadrže von Willebrand-ov antigen. Ova aglutinacija se detektuje turbidimetrijski

kao povišenje turbiditeta koji je proporcionalan nivou antigena koji se nalazi u uzorku.

Referentni interval: 57,3 - 173,1%.

### **3.3.3. Određivanje sE-selektina**

Serumska koncentracija sE-selektin-a je određivana ELISA tehnikom (Enzyme-linked immunosorbent Assay), proizvođača R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA.

Za određivanje koncentracije solubilne adhezione molekule, sE-selektin-a u serumu, krv je uzimana u epruvetu sa serum separator gelom. Nakon 30 minuta, serum je izdvojen centrifugiranjem 15 minuta na 1000g (2500rpm). Izdvojeni uzorci seruma su odmah zamrzavani u alikvotima minimalne zapremine 500 $\mu$ l i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$  do momenta analize. Neposredno pre izvođenja analize uzorci su odmrzavani na sobnoj temperaturi. Svi uzorci su nakon odmrzavanja diluirani u odnosu 1:10, a potom su jednokratno određivani u seriji.

Princip testa omogućava kvantitativno određivanje sE-selektina u serumu, "sandwich" enzim imunoesej tehnikom. Čašice mikrotitarskih pločica su obložene čvrsto vezanim monoklonskim antitelima specifičnim za sE-selektin. Nakon što se standardi i uzorci seruma odpipetiraju u ove čašice, prisutan sE-selektin (u standardu i uzorcima seruma) se vezuje uz antitela. Nakon toga se ispiranjem otklanjaju sve nevezane materije. Potom se u čašice dodaju enzim-vezana monoklonska antitela specifična za sE-selektin koja vezivanjem za sE-selektin prave formu "sandwich-a". Ispiranjem se uklanja preostala količina nevezanih antitela, a dodavanjem supstrat solucije u čašice, omogućava se razvijanje određene boje čiji intenzitet je proporcionalan količini sE-selektina, vezanom u inicijalnom koraku ovog postupka. Dodavanjem stop solucije nakon određenog vremena, zaustavlja se reakcija i meri se intenzitet boje (optički denzitet) čitačem na talasnoj dužini od 450 nm (uz pozadinsku korekciju na 540 nm).

Standardna kriva je konstruisana na osnovu koncentracija standarda. Koncentracija sE-selektina svakog uzorka očitavana je prema odgovarajućoj absorbanci istog uzorka sa standardne krive. Svaki rezultat se množio sa faktorom 10 (zbog prethodne dilucije). Koncentracije sE-selektina su izražene u jedinicama ng/ml.

#### **3.3.4. Određivanje sP-selektina**

Serumska koncentracija sP-selektin-a je određivana ELISA tehnikom (Enzyme-linked immunosorbent Assay), proizvođača R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA.

Za određivanje koncentracije, sP-selektin-a u serumu, krv je uzimana u epruvetu sa serum separator gelom. Nakon 30 minuta, serum je izdvojen centrifugiranjem 15 minuta na 1000g (2500rpm). Izdvojeni uzorci seruma su odmah zamrzavani u alikvotima minimalne zapremine 500 $\mu$ l i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$  do momenta analize. Svi uzorci su nakon odmrzavanja diluirani u odnosu 1:20, a potom su jednokratno određivani u seriji.

Princip testa omogućava kvantitativno određivanje sP-selektina u serumu, "sandwich" enzim imunoesej tehnikom. Čašice mikrotitarskih pločica su obložene čvrsto vezanim monoklonskim antitelima specifičnim za sP-selektin. Nakon što se standardi i uzorci seruma odpipetiraju u ove čašice, prisutan sP-selektin (u standardu i uzorcima seruma) se vezuje uz antitela. Potom se u čašice dodaju poliklonska antitela specifična za sP-selektin, koja su konjugovana sa "horseradish" peroksidazom. Ispiranjem se uklanja preostala količina nevezanih konjugovanih antitela, a dodavanjem supstrat solucije u čašice, omogućava se razvijanje određene boje čiji intenzitet je proporcionalan količini sP-selektina, vezanom u inicijalnom koraku ovog postupka. Dodavanjem stop solucije nakon određenog vremena, zaustavlja se reakcija i meri se intenzitet boje (optički denzitet) čitačem na talasnoj dužini od 450 nm (uz pozadinsku korekciju na 620 nm).

Standardna kriva je konstruisana na osnovu koncentracija standarda. Koncentracija sP-selektina svakog uzorka očitavana je prema odgovarajućoj absorbanci istog uzorka sa standardne krive. Svaki rezultat se množio sa faktorom 20 (zbog prethodne dilucije). Koncentracije sP-selektina su izražene u jedinicama ng/ml.

### **3.3.5. Određivanje agregabilnosti trombocita**

Agregabilnost trombocita je određivana impedantnom agregometrijom (Multiple Electrode Aggregometry - MEA) na Multiplate analizatoru, Dynabyte, Minhen, Nemačka. Multiplate agregometar je analizator kojim se ispituje funkcija trombocita iz uzorka pune krvi i koji omogućava istovremeno ispitivanje pet različitih uzoraka krvi ili dejstvo pet različitih trombocitnih agonista na funkciju trombocita u jednom uzorku. Dostupno je nekoliko Multiplate testova: ASPI test, ADP test, ADP test HS, TRAP test, COL test i RISTO test, proizvođača COBAS-Roche Diagnostics, koji se međusobno razlikuju prema agonisti koji se koristi da bi indukovao proces agregacije trombocita.

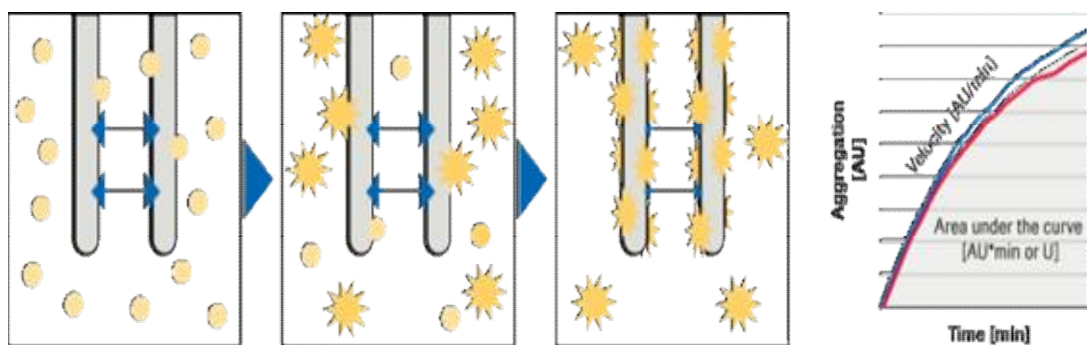
Slika 7. Multiplate agregometar



Aparat registruje promenu električnog otpora – impedance, između dve elektrode uronjene u ispitivani uzorak krvi. Povećanje električnog otpora zasniva se na čvrstoj adheziji i

agregaciji aktivisanih trombocita na površini senzora elektroda što povećava električni otpor između dve senzorne žice, a veći stepen agregacije daje veći električni otpor. Aparat detektuje promenu električne impedance, pretvara je grafički u agregacionu krivu sa određenim nagibom u funkciji vremena. Računanjem površine pod krivom (AUC) dobija se uvid u aktivnost trombocita što se izražava u jedinicama mere AU/min (10 AU/min = 1 U). Svaki uzorak se ispituje u duplikatu, što povećava reproducibilnost analize.

Slika 8. Princip rada Multiplate agregometra



Uzorak krvi za merenje agregabilnosti trombocita sakupljan je vađenjem krvi iz kubitalne vene nakon kratke, minimalne venske staze u plastičnu vakuum epruvetu sa 135 U/ml Litijum Heparina. Svi uzorci su analizirani unutar tri sata od uzorkovanja. 0,3 ml heparinizirane krvi je prebačeno u kivetu za testiranje i razblaženo prethodno zagrejanim fiziološkim rastvorom na 37°C, u odnosu 0,3 ml uzorka i 0,3 ml sol NaCl 0,9%. Ova smeša je inkubirana 3 minuta, a potom je dodato 20 µl pojedinog reagensa; TRAP - 6 (Trombin receptor aktivirajući peptid; 32µM) za TRAP test, ADP (adenozin difosfat; 6,5µM) za ADP test i ASPI (arahidonska kiselina; 0,5 mM) za ASPI test u svaku kivetu. Vreme merenja promene električne impedance između dve elektrode trajalo je za svaki test 6 minuta.

S obzirom da TRAP test koristi za procenu efekta primenjene terapije glikoproteinskih inhibitora IIb/IIIa, a da na njegovu vrednost nema uticaja primenjena terapija acetilsalicilnom

kiselinom i vrlo malo klopidogrelom, ovaj test je služio kao početna, ukupna bazalna vrednost agregabilnosti trombocita u uslovima kada su bolesnici već prethodno započeli terapiju klopidogrelom i/ili aspirinom. Referentni interval: 92 – 151 U

Vrednosti ADP testa su ukazivale na stepen agregabilnosti trombocita indukovani ADP-om. Pošto je klopidogrel antagonist P2Y<sub>12</sub> receptora, receptora za ADP, ovim testom je procenjivan odgovor na terapiju klopidogrelom, tj. efekat klopidogrela na agregabilnost trombocita. Vrednosti ADP-a, smatrane su merom postojeće, rezidualne aktivnosti trombocita pod dejstvom primenjene terapije klopidogrelom, a veća dobijena vrednost ovog testa, ukazivala je na veću rezidualnu agregabilnost trombocita. Referentni interval: 55 – 117 U

Pošto acetilsalicilna kiselina inhibiše stvaranje arahidonske kiseline, a ASPI test upravo ukazuje na stepen agregabilnosti trombocita indukovanim arahidonskom kiselinom, ASPI test je korišten za procenu odgovora na terapiju acetilsalicilnom kiselinom. Veća dobijena vrednost ASPI testa, ukazivala je na veću rezidualnu agregabilnost trombocita pod terapijom aspirinom. Referentni interval: 79 – 141 U (245)

Individualni odgovor na primenjenu antiagregacionu terapiju je procenjivan i na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita (%SAT) nakon primenjene antiagregacione terapije što je izračunato sledećim formulama:

Procena antiagregacionog efekta klopidogrela:  $\%SAT_{adp} = 100 \times (1 - ADP/TRAP)$

Procena antiagregacionog efekta aspirina:  $\%SAT_{aspi} = 100 \times (1 - ASPI/TRAP)$

### **3.4. Osnovne metode statističke obrade podataka**

Prikupljeni podaci su prikazani na standardni deskriptivni način: apsolutni i relativni brojevi za opisne varijable, srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za numeričke varijable sa normalnom raspodelom (Kolmogorov-Smirnov test), odnosno sa medijanom i 25% i 75% percentilima za ostale. Komparacija vrednosti analiziranih varijabli je vršena:

Studentovim T-testom, neparametrijskim analizama (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test), kao i  $\chi^2$  - testom.

Korelacionom analizom su ispitane povezanosti prikupljenih parametara (Pearson-ov koeficijent linearne korelacije odnosno Spearman-ov koeficijent korelacije ranga).

U cilju idenifikacije parametara koji su nezavisno povezani sa parametrima agregabilnosti trombocita i odgovora na antiagregacionu terapiju urađena je multivarijantna linearna regresiona analiza kontrolisana za uticaj pola.

U cilju ispitivanja statističke značajnosti razlika između podgrupa napravljenih na osnovu podele prema kvartilima vrednosti ADP testa unutar ispitivanih grupa, urađena je analiza ANOVA sa Fischer-ovim LSD post hoc testom.

Izabrani nivoi značajnosti su: statistički značajno  $p < 0,05$ , odnosno nema statističke značajnosti  $p > 0,05$ .

Za statističku obradu podataka korišten je program SPSS, verzija 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza podataka u odnosu na ispitivane grupe

#### 4.1.1. Demografske karakteristike ispitivanih grupa i kontrolne grupe

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 130 ispitanika oba pola, koji su podeljeni na sledeći način:

U Grupi I – (T2DM) je uključeno 50 ispitanika sa T2DM, kod kojih je prethodno utvrđeno postojanje neke od kliničkih manifestacija bolesti arterijskih krvnih sudova (AIM, stabilna ili nestabilna angina pectoris, CVI po tipu ishemije, TIA, PAB), a koji kao antitrombocitnu terapiju uzimaju tienopiridinski preparat, klopidogrel. Prosečno vreme trajanja dijabetesa je iznosilo 55,29 meseci (median 36,0 (12-67)) meseci. Ovu grupu je činilo 18 žena (18/50; 36%) i 32 (32/50; 64%) muškarca, a njihova prosečna starost je iznosila 57,4 godine.

U Grupi II - (nonDM) je uključeno 50 ispitanika koji ne boluju od dijabetesa, ali kod kojih je prethodno utvrđeno postojanje neke od kliničkih manifestacija bolesti arterijskih krvnih sudova (AIM, stabilna ili nestabilna angina pectoris, CVI po tipu ishemije, TIA, PAB), a koji kao antitrombocitnu terapiju uzimaju tienopiridinski preparat, klopidogrel. U ovu grupu ispitanika je uključeno 18 žena (18/50; 36%) i 32 (32/50; 64%) muškarca. Prosečna starost ispitanika u ovoj ispitivanoj grupi je iznosila 54,6 godina.

Kontrolnu grupu je činilo 30 zdravih ispitanika, 12 (12/30; 40%) žena i 18 (18/30; 60%) muškaraca, prosečne starosti 54,9 godina.

Iz Tabele 1 se vidi da između ispitanika sve tri grupe nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji po polu ( $p = 0,924$ ), kao ni u odnosu na prosečnu starost ispitanika ( $p = 0,189$ ).



Tabela 1. Demografski podaci ispitanika u odnosu na ispitivane grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Muškarci	32 (64)	32 (64)	18 (60)	1,000	0,905	0,905
Godine života (god)	57,4±7,29	54,6±8,23	54,9±9,65	0,071	0,190	0,875

Legenda: podaci su prikazani kao  $X \pm SD$  ili  $n$  (%)

$p$  - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

$p^*$  - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

$p^{**}$  - statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.2. Kliničke karakteristike ispitanika u odnosu na ispitivane grupe

Između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pušačke navike, tj. u odnosu na broj ispitanika koji nikada nije pušio (62% vs. 52%;  $p = 0,317$ ) i bivših pušača (38% vs. 48%;  $p = 0,317$ ). Takođe, nije bilo značajne razlike u bavljenju fizičkom aktivnošću (26% vs. 32%;  $p = 0,659$ ), kao ni u korišćenju suplemenata (30% vs. 26%;  $p = 0,824$ ). Isti procenat ispitanika u obe grupe je imao pozitivnu porodičnu anamnezu za kardiovaskularne bolesti (80% vs. 80%;  $p = 1,000$ ). U posmatranim grupama (Grupa I i Grupa II) nije bilo statistički značajnih razlika u prisustvu IBS (84% vs. 82%;  $p = 0,793$ ), CVB (20% vs. 12%;  $p = 0,280$ ) i PAB (42% vs. 40%;  $p = 0,841$ ). Takođe, nije bilo značajne razlike u procentu zastupljenosti izvedene PCI između ispitivanih grupa (68% vs. 80%;  $p = 0,254$ ). (Tabela 2)

U periodu od 12 meseci kliničkog praćenja od trenutka uključivanja ispitanika u studiju, ponovni aterotrombozni akcident je imalo 7 ispitanika iz Grupe I (T2DM) i 2 ispitanika iz Grupe II (nonDM), (14% vs. 4%;  $p = 0,162$ ). (Tabela 2)

Vrednosti krvnog pritiska su bile statistički značajno veće kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike Grupe II (nonDM): sistolni krvni pritisak ( $142 \pm 12,3$  vs.  $125 \pm 21,8$  mmHg;  $p < 0,001$ ) i dijastolni krvni pritisak ( $88,8 \pm 8,12$  vs.  $79,3 \pm 11,0$  mmHg;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Klinički podaci ispitanika u odnosu na ispitivane grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	p
Pušenje (bivši pušač)	19 (38)	24 (48)	0,317
Pušenje (nikada)	31 (62)	26 (52)	0,317
Fizička aktivnost	13 (26)	16 (32)	0,659
Porodična anamneza	40 (80)	40 (80)	1,000
Suplementi	15 (30)	13 (26)	0,824
IBS	42 (84)	41 (82)	0,793
PAB	21 (42)	20 (40)	0,841
CVB	10 (20)	6 (12)	0,280
PCI	34 (68)	40 (80)	0,254
SKP (mmHg)	142±12,3	125±21,8	<0,001
DKP (mmHg)	88,8±8,12	79,3±11,0	<0,001
Ponovna aterotromboza	7 (14)	2 (4)	0,162

Legenda: podaci su prikazani kao  $X \pm SD$  ili  $n$  (%)

IBS – ishemijska bolest srca; PAB – periferna arterijska bolest; CVB

– cerebrovaskularna bolest; PCI – perkutana koronarna intervencija;

SKP – sistolni krvni pritisak; DKP – dijastolni krvni pritisak

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

Svi ispitanici, uključeni u obe posmatrane grupe, bili su na terapiji tienopiridinskim preparatom, klopidogrelom. 68% ispitanika iz Grupe I (T2DM), kao i 72% ispitanika iz Grupe II (nonDM) je bilo na terapiji Aspirinom,  $p = 0,827$ . Ispitanici u grupi sa T2DM duže su koristili antiagregacionu terapiju (mediana 7,5 meseci (3-24) vs. mediana 4,5 meseci (3-10);  $p = 0,061$ ), ali bez statistički značajne razlike. Svi ispitanici iz Grupe I (T2DM) su bili na terapiji metforminom, prosečno u trajanju 55,29 meseci (median 36,0 (12-67)). U

posmatranim grupama (Grupa I i Grupa II) nije bilo statistički značajnih razlika u konkomitantnoj terapiji: blokatori protonske pumpe (28% vs. 26%;  $p = 1,000$ ), statini (84% vs. 82%;  $p = 1,000$ ), blokatori Ca kanala (10% vs. 8%;  $p=1,000$ ), beta blokatori (88% vs. 84%;  $p= 0,773$ ), ACE inhibitori (92% vs. 88%;  $p = 0,739$ ). (Tabela 3)

*Tabela 3. Osnovni podaci o terapiji u ispitivanim grupama bolesnika*

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	<b>p</b>
Klopidogrel	50 (100)	50 (100)	1,000
Aspirin	34 (68)	36 (72)	0,827
Dužina antiagregacione terapije	7,5 (3-24)	4,5 (3-10)	0,061
Metformin	50 (100)	-	-
Blokatori protonske pumpe	14 (28)	13 (26)	1,000
Statini	42 (84)	41 (82)	1,000
Blokatori Ca kanala	5 (10)	4 (8)	1,000
Beta blokatori	44 (88)	42 (84)	0,773
ACE inhibitori	46 (92)	44 (88)	0,739

*Legenda: podaci su prikazani kao n (%) ili medijana (25-75 percentil)*

*p - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)*

#### 4.1.3. Antropometrijske karakteristike ispitanika u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Utvrđeno je postojanje statistički značajno viših vrednosti TM ( $93,3 \pm 17,3$  vs.  $74,6 \pm 13,5$  kg;  $p < 0,001$ ), ITM ( $30,8 \pm 4,17$  vs.  $25,2 \pm 3,54$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ), OS ( $108,8 \pm 12,2$  vs.  $91,8 \pm 11,3$  cm;  $p < 0,001$ ) i WHtR ( $0,63 \pm 0,06$  vs.  $0,53 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM). (Tabela 4)

Statistički značajno više vrednosti TM ( $93,3 \pm 17,3$  vs.  $75,6 \pm 12,6$  kg;  $p < 0,001$ ), ITM ( $30,8 \pm 4,17$  vs.  $24,8 \pm 2,93$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ), OS ( $108,8 \pm 12,2$  vs.  $87,1 \pm 10,5$  cm;  $p < 0,001$ ) i WHtR ( $0,63 \pm 0,06$  vs.  $0,50 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) su konstatovane kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz KG. (Tabela 4)

Nije bilo statistički značajne razlike u svim poređenim antropometrijskim parametrima između ispitivane Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe zdravih ispitanika ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre). (Tabela 4)

Tabela 4. Poređenje antropometrijskih parametara između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
TM (kg)	93,3±17,3	74,6±13,5	75,6±12,6	<0,001	<0,001	0,748
TV (cm)	173±9,4	172±9,8	174±8,1	0,436	0,726	0,297
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	30,8±4,17	25,2±3,54	24,8±2,93	<0,001	<0,001	0,665
OS (cm)	108,8±12,2	91,8±11,3	87,1±10,5	<0,001	<0,001	0,066
WHtR	0,63±0,06	0,53±0,06	0,50±0,05	<0,001	<0,001	0,009

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

TM – telesna masa; TV – telesna visina; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.4. Parametri metabolizma glukoze u ispitivanim i kontrolnoj grupi

U Tabeli 5 su prikazani rezultati poređenja ispitivanih parametara metabolizma glukoze između ispitivanih grupa, kao i između ispitivanih i kontrolne grupe zdravih ispitanika. Utvrđeno je postojanje statistički značajno viših vrednosti glukoze ( $7,67 \pm 2,33$  vs.  $5,55 \pm 0,54$  mmol/l;  $p < 0,001$ ), insulina ( $18,3 \pm 7,14$  vs.  $11,7 \pm 6,23$  mU/l;  $p < 0,001$ ), HOMA-IR ( $6,14 \pm 2,61$  vs.  $2,91 \pm 1,57$ ;  $p < 0,001$ ), HOMA-B ( $49,5 \pm 24,0$  vs.  $39,4 \pm 22,8$ ,  $p = 0,034$ ) i HbA1c ( $51,0 \pm 13,8$  vs.  $37,1 \pm 2,78$  mmol/mol;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM). (Tabela 5)

Svi parametri metabolizma glukoze imaju statistički značajno više vrednosti kod ispitanika u Grupi I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz KG: glukoza ( $7,67 \pm 2,33$  vs.  $5,14 \pm 0,48$  mmol/l;  $p < 0,001$ ), insulin ( $18,3 \pm 7,14$  vs.  $10,4 \pm 4,48$  mU/l;  $p < 0,001$ ), HOMA-IR ( $6,14 \pm 2,61$  vs.  $2,41 \pm 1,07$ ;  $p < 0,001$ ), HOMA-B ( $49,5 \pm 24,0$  vs.  $37,4 \pm 17,2$ ;  $p = 0,019$ ) i HbA1c ( $51,0 \pm 13,8$  vs.  $34,7 \pm 3,06$  mmol/mol;  $p < 0,001$ ). (Tabela 5)

Statistički značajno više vrednosti glukoze ( $5,55 \pm 0,54$  vs.  $5,14 \pm 0,48$  mmol/l;  $p = 0,001$ ) i HbA1c ( $37,1 \pm 2,78$  vs.  $34,7 \pm 3,06$  mmol/mol;  $p = 0,001$ ) su konstatovane kod ispitanika u Grupi II (nonDM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe zdravih, dok nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima insulina, HOMA-IR i HOMA-B između ispitanika u ove dve grupe ( $p > 0,05$ ; za sve parametre). (Tabela 5)

Tabela 5. Poređenje parametara metabolizma glukoze između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Glukoza (mmol/l)	7,67±2,33	5,55±0,54	5,14±0,48	<0,001	<0,001	0,001
Insulin (mU/l)	18,3±7,14	11,7±6,23	10,4±4,48	<0,001	<0,001	0,328
HOMA-IR	6,14±2,61	2,91±1,57	2,41±1,07	<0,001	<0,001	0,132
HOMA-B	49,5±24,0	39,4±22,8	37,4±17,2	0,034	0,019	0,684
HbA1c (mmol/mol)	51,0±13,8	37,1±2,78	34,7±3,06	<0,001	<0,001	0,001

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze); HOMA-B – sekretorni indeks insulina (model homeostaze); HbA1c – glikozilirani hemoglobin

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.5. Parametri inflamacije u ispitivanim i kontrolnoj grupi

U Tabeli 6 su prikazani ispitivani inflamatorni parametri u grupama bolesnika i kontrolnoj grupi zdravih. Uočene su statistički značajno više vrednosti SE (15,2; medijana = 14,5 (7-20) vs. 10,3; medijana = 10 (5-12) mm/h;  $p = 0,005$ ) i hsCRP ( $4,14 \pm 4,46$  vs.  $1,95 \pm 2,34$  mg/l;  $p = 0,003$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM). Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima leukocita, neutrofila, limfocita, NLR i fibrinogena ( $p > 0,05$ ; za sve parametre) između ovih ispitivanih grupa. (Tabela 6)

Uočene su statistički značajno više vrednosti SE (15,2; medijana = 14,5 (7-20) vs. 6,37; medijana = 6 (4-8) mm/h;  $p < 0,001$ ), leukocita ( $7,23 \pm 1,96$  vs.  $6,04 \pm 1,60$ ;  $p = 0,006$ ), neutrofila ( $4,20 \pm 1,68$  vs.  $3,22 \pm 1,04$ ;  $p = 0,005$ ), fibrinogena ( $3,77 \pm 0,91$  vs.  $3,10 \pm 0,57$  g/l;  $p = 0,001$ ) i hsCRP ( $4,14 \pm 4,46$  vs.  $0,77 \pm 0,58$  mg/l;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Uočena je

takođe viša vrednost NLR u grupi dijabetičara u odnosu na KG, ali bez statističke značajnosti ( $2,10 \pm 1,61$  vs.  $1,56 \pm 0,62$ ;  $p = 0,085$ ). (Tabela 6)

Statistički značajno više vrednosti SE (10,3; medijana = 10 (5-12) vs. 6,37; medijana = 6 (4-8) mm/h;  $p = 0,003$ ), leukocita ( $7,21 \pm 1,99$  vs.  $6,04 \pm 1,60$ ;  $p = 0,008$ ), neutrofila ( $4,07 \pm 1,37$  vs.  $3,22 \pm 1,04$ ;  $p = 0,005$ ), fibrinogena ( $3,58 \pm 0,79$  vs.  $3,10 \pm 0,57$  g/l;  $p = 0,005$ ) i hsCRP ( $1,95 \pm 2,34$  vs.  $0,77 \pm 0,58$  mg/l;  $p = 0,008$ ), su konstatovane kod ispitanika Grupe II (nonDM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe. Vrednosti NLR takođe su bile više u Grupi II ispitanika u odnosu na KG, ali bez statističke značajnosti ( $1,89 \pm 0,88$  vs.  $1,56 \pm 0,62$ ;  $p = 0,079$ ). (Tabela 6)

*Tabela 6. Poređenje parametara inflamacije između ispitivanih i kontrolne grupe*

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
SE (mm/h)	14,5 (7-20)	10 (5-12)	6 (4-8)	0,005	<0,001	0,003
Leukociti (n)	$7,23 \pm 1,96$	$7,21 \pm 1,99$	$6,04 \pm 1,60$	0,956	0,006	0,008
Neutrofili (n)	$4,20 \pm 1,68$	$4,07 \pm 1,37$	$3,22 \pm 1,04$	0,674	0,005	0,005
Limfociti (n)	$2,29 \pm 0,78$	$2,34 \pm 0,74$	$2,18 \pm 0,68$	0,746	0,515	0,334
NLR	$2,10 \pm 1,61$	$1,89 \pm 0,88$	$1,56 \pm 0,62$	0,420	0,085	0,079
Fibrinogen (g/l)	$3,77 \pm 0,91$	$3,58 \pm 0,79$	$3,10 \pm 0,57$	0,265	0,001	0,005
hsCRP (mg/l)	$4,14 \pm 4,46$	$1,95 \pm 2,34$	$0,77 \pm 0,58$	0,003	<0,001	0,008

*Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$  i kao medijana (25-75 percentil); SE – sedimentacija; NLR – odnos neutrofila/limfocita; hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein*

*p* - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

*p\** - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

*p\*\** - statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.6. Parametri metabolizma lipida u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Analizom parametara metabolizma lipida uočeno je da nema statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre) u vrednostima ovih ispitivanih parametara između Grupe I (T2DM) u odnosu na Grupu II (nonDM). (Tabela 7)

Vrednost triglicerida je bila statistički značajno viša ( $1,90 \pm 0,95$  vs.  $1,34 \pm 0,79$  mmol/l;  $p = 0,009$ ), a vrednost HDL-holesterola statistički značajno niža ( $1,10 \pm 0,27$  vs.  $1,42 \pm 0,34$  mmol/l;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe zdravih. Međutim, nije bilo razlike u ostalim ispitivanim lipidskim parametrima između ove dve ispitivane grupe ( $p > 0,05$ ; za sve parametre). (Tabela 7)

Statistički značajno niže vrednosti ukupnog holesterola ( $4,49 \pm 0,74$  vs.  $5,20 \pm 0,85$  mmol/l;  $p < 0,001$ ), HDL-HOL ( $1,09 \pm 0,21$  vs.  $1,42 \pm 0,34$  mmol/l;  $p < 0,001$ ), LDL-HOL ( $2,67 \pm 0,62$  vs.  $3,24 \pm 0,82$  mmol/l;  $p = 0,001$ ) i nonHDL-HOL ( $3,40 \pm 0,71$  vs.  $3,85 \pm 0,9$  mmol/l;  $p = 0,015$ ) su konstatovane kod ispitanika iz Grupe II (nonDM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe. (Tabela 7)



Tabela 7. Poređenje parametara metabolizma lipida između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
UK holesterol (mmol/l)	4,75±1,17	4,49±0,74	5,20±0,85	0,187	0,069	<0,001
TG (mmol/l)	1,90±0,95	1,60±0,75	1,34±0,79	0,086	0,009	0,145
HDL-HOL (mmol/l)	1,10±0,27	1,09±0,21	1,42±0,34	0,895	<0,001	<0,001
LDL-HOL (mmol/l)	2,79±1,10	2,67±0,62	3,24±0,82	0,506	0,054	0,001
nonHDL-HOL (mmol/l)	3,65±1,16	3,40±0,71	3,85±0,91	0,190	0,422	0,015
LDL/HDL	2,75±1,29	2,52±0,69	2,43±0,90	0,257	0,231	0,623
nonHDL/HDL	3,56±1,48	3,23±0,96	2,94±1,22	0,194	0,056	0,233
Uk HOL/HDL	4,40±1,48	4,23±0,96	3,94±1,22	0,503	0,153	0,233

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

UK holesterol – ukupni holesterol; TG – trigliceridi

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.7. Parametri metabolizma homocisteina u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Nije bilo statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre) u vrednostima homocisteina, vitamina B12 i folne kiseline između poređenih grupa ispitanika i kontrolne grupe, kao ni između ispitivanih grupa T2DM i nonDM, međusobno. (Tabela 8)

Tabela 8. Poređenje parametara metabolizma homocisteina između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Homocistein ( $\mu\text{mol/l}$ )	12,4 $\pm$ 3,9	11,5 $\pm$ 3,68	11,2 $\pm$ 3,89	0,243	0,186	0,723
Vitamin B12 ( $\text{pmol/l}$ )	271 $\pm$ 149	262 $\pm$ 130	249 $\pm$ 83,4	0,762	0,472	0,625
Folna kiselina ( $\text{nmol/l}$ )	16,7 $\pm$ 6,55	15,5 $\pm$ 6,91	17,3 $\pm$ 9,09	0,369	0,723	0,311

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

$p$  - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

$p^*$  - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

$p^{**}$  - statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.8. Biomarkeri endotelne aktivacije i aktivacije trombocita u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Uočene su statistički značajno više vrednosti vWF<sub>Ag</sub> ( $172 \pm 75,2$  vs.  $146 \pm 40,6$ ;  $p = 0,045$ ), sP-selektina ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $84,0 \pm 21,8$  ng/ml;  $p = 0,042$ ) i sE-selektina ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $31,8 \pm 10,5$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM). (Tabela 9)

Svi parametri aktivacije endotela i trombocita imaju statistički značajno više vrednosti kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe: vWF Ag ( $172 \pm 75,2$  vs.  $130 \pm 33,8$  %;  $p = 0,007$ ), sP-selektin ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $76,7 \pm 16,2$  ng/ml;  $p = 0,004$ ) i sE-selektin ( $45,1 \pm 18,1$  vs.  $27,2 \pm 11,2$  ng/ml;  $p < 0,001$ ). (Tabela 9)

Kod ispitanika iz Grupe II (nonDM) u odnosu na ispitanike iz KG, nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima vWF Ag, sP-selektina i sE-selektina između ove dve ispitivane grupe ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre). (Tabela 9)

Tabela 9. Poređenje parametara endotelne i trombocitne aktivacije između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
vWF Ag (%)	$172 \pm 75,2$	$146 \pm 40,6$	$130 \pm 33,8$	0,045	0,007	0,074
sP-selektin (ng/ml)	$95,2 \pm 31,8$	$84,0 \pm 21,8$	$76,7 \pm 16,2$	0,042	0,004	0,116
sE-selektin (ng/ml)	$45,1 \pm 18,1$	$31,8 \pm 10,5$	$27,2 \pm 11,2$	$< 0,001$	$< 0,001$	0,064

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

vWF – Von Willebrandov faktor

p - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* - statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.9. Parametri koagulacije u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Uočene su statistički značajno niže vrednosti aPTT ( $0,897 \pm 0,086$  vs.  $0,934 \pm 0,070$ ;  $p = 0,022$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM) dok nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti PT ( $1,02 \pm 0,06$  vs.  $1,04 \pm 0,08$ ;  $p = 0,193$ ). Analizom vrednosti D dimera uočena je njegova statistički značajno viša

vrednost kod bolesnika sa T2DM u odnosu na ispitanike bez dijabetesa (medijana = 233 (176-331) vs. 183 (139-243) ng/ml;  $p = 0,014$ ). (Tabela 10)

Statistički značajno niže vrednosti aPTT ratio ( $0,897 \pm 0,086$  vs.  $0,942 \pm 0,070$ ;  $p = 0,019$ ) i PT ratio ( $1,02 \pm 0,06$  vs.  $1,07 \pm 0,07$ ;  $p = 0,001$ ) su konstatovane kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz KG. Vrednosti D dimera su bile statistički značajno više u grupi ispitanika sa T2DM u odnosu na ispitanike kontrolne grupe zdravih (medijana = 233 (176-331) vs. 138 (103-231) ng/ml;  $p = 0,003$ ). (Tabela 10)

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima aPTT ratio, PT ratio i D dimera, između grupe ispitanika bez dijabetesa i kontrolne grupe, ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre). (Tabela 10)

*Tabela 10. Poređenje parametara koagulacije između ispitivanih i kontrolne grupe*

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	<b>p</b>	<b>p*</b>	<b>p**</b>
aPTT ratio (R)	0,897±0,086	0,934±0,070	0,942±0,070	0,022	0,019	0,627
PT ratio (R)	1,02±0,06	1,04±0,08	1,07±0,07	0,193	0,001	0,081
D-dimer (ng/ml)	233 (176-331)	183 (139-243)	138 (103-231)	0,014	0,003	0,239

*Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$  i kao medijana (25-75 percentil)  
aPTT – aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme ; PT – protrombinsko vreme  
p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)  
p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)  
p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)*

#### 4.1.10. Analiza trombocitnih pokazatelja i odgovora na antiagregacionu terapiju

##### 4.1.10.1. Trombocitni pokazatelji u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Analiziranjem trombocitnih pokazatelja, konstatovana je samo statistički značajno viša vrednost %rP ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,30 \pm 1,30$  %;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM), dok nije bilo statistički značajne razlike u ostalim ispitivanim trombocitnim pokazateljima (trombociti, MPV, PDW, PCT;  $p > 0,05$ ; za sve parametre). (Tabela 11)

Statistički značajno više vrednosti %rP ( $3,47 \pm 1,30$  vs.  $2,29 \pm 1,23$  %;  $p < 0,001$ ) su konstatovane kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, dok nije bilo statistički značajne razlike u ostalim ispitivanim trombocitnim pokazateljima (trombociti, MPV, PDW, PCT;  $p > 0,05$ ; za sve parametre) između ove dve ispitivane grupe. (Tabela 11)

Nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ; za sve parametre) u svim ispitivanim trombocitnim pokazateljima između ispitanika Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe zdravih. (Tabela 11)

Tabela 11. Poređenje trombocitnih pokazatelja između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Trombociti (n)	252±58,9	257±75,8	244±54,1	0,764	0,509	0,420
MPV (fl)	7,95±0,96	7,88±0,96	8,05±0,73	0,691	0,649	0,408
PDW	16,3±1,04	16,2±0,60	15,9±1,14	0,439	0,137	0,216
PCT (%)	0,20±0,04	0,20±0,06	0,20±0,04	0,781	0,821	0,690
%rP (%)	3,47±1,30	2,30±1,30	2,29±1,23	<0,001	<0,001	0,970

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

MPV – srednji volumen trombocita; PDW – raspodela trombocita po volumenu; PCT – trombokrit; %rP – procenat retikulisanih trombocita;

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.1.10.2. Parametri agregabilnosti trombocita i odgovora na antiagregacionu terapiju u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Analiziranjem parametara agregabilnosti trombocita i odgovora na terapiju klopidogrelom, uočene su statistički značajno više vrednosti agregacije trombocita indukovane ADP-om (ADP testa) ( $70,3 \pm 22,0$  vs.  $56,9 \pm 19,7$  U;  $p = 0,002$ ), odnosno statistički značajno niže vrednosti procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrelom, %SATadp, ( $31,6 \pm 12,4$  vs.  $48,6 \pm 12,6$  %;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe I (T2DM) u odnosu na ispitanike iz Grupe II (nonDM). Takođe, statistički su značajno niže vrednosti procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita kod ispitanika na terapiji aspirinom, %SATaspi, ( $59,6 \pm 13,8$  vs.  $68,6 \pm 10,4$  %;  $p = 0,003$ ) u grupi sa T2DM u odnosu na ispitanike u grupi nonDM, dok je vrednost ASPI testa (agregabilnost trombocita indukovana arahidonskom kiselinom) kod bolesnika sa T2DM bila viša u odnosu na bolesnike bez dijabetesa ( $58,2 \pm 30,1$  vs.  $48,1 \pm 26,4$  U;  $p = 0,079$ ), ali bez statističke značajnosti. (Tabela 12)

Statistički značajno niže vrednosti ADP testa ( $70,3 \pm 22,0$  vs.  $82,6 \pm 17,0$  U;  $p = 0,011$ ) i ASPI testa ( $58,2 \pm 30,1$  vs.  $90,7 \pm 20,8$  U;  $p < 0,001$ ) su uočene u ispitanika na antiagregacionoj terapiji klopidogrelom i aspirinom u grupi sa T2DM u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika koja nije koristila ovu terapiju. Takođe, statistički su značajno više vrednosti %SATadp ( $31,6 \pm 12,4$  vs.  $21,7 \pm 8,01$  %;  $p < 0,001$ ) i %SATaspi ( $59,6 \pm 13,8$  vs.  $14,3 \pm 9,32$  %;  $p < 0,001$ ) u Grupi I (T2DM) u odnosu na kontrolnu grupu. (Tabela 12)

Statistički značajno niže vrednosti ADP testa, tj. agregacije indukovane ADP-om ( $56,9 \pm 19,7$  vs.  $82,6 \pm 17,0$  U;  $p < 0,001$ ) i ASPI testa ( $48,1 \pm 26,4$  vs.  $90,7 \pm 20,8$  U;  $p < 0,001$ ), uočene su kod ispitanika na terapiji klopidogrelom i aspirinom (Grupa I – nonDM) u odnosu na ispitivanu kontrolnu grupu koja nije uzimala ovu terapiju. Takođe,

statistički su značajno više vrednosti %SATadp ( $48,6 \pm 12,6$  vs.  $21,7 \pm 8,01$  %;  $p < 0,001$ ) i %SATaspi ( $68,6 \pm 10,4$  vs.  $14,3 \pm 9,32$  %;  $p < 0,001$ ) kod ispitanika iz Grupe II (nonDM) u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe. (Tabela12)

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrednosti agregacije trombocita uz agonist TRAP (TRAP test) između poređenih grupa ispitanika i kontrolne grupe, kao ni između ispitivanih grupa T2DM i nonDM, međusobno, ( $p > 0,05$ ; sve). (Tabela 12)

*Tabela 12. Poređenje parametara agregabilnosti trombocita i odgovora na antiagregacionu terapiju između ispitivanih i kontrolne grupe*

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
TRAP (U)	103±24,8	110±22,4	106±19,0	0,140	0,632	0,360
ADP (U)	70,3±22,0	56,9±19,7	82,6±17,0	0,002	0,011	<0,001
%SATadp (%)	31,6±12,4	48,6±12,6	21,7±8,01	<0,001	<0,001	<0,001
ASPI (U)	58,2±30,1	48,1±26,4	90,7±20,8	0,079	<0,001	<0,001
%SATaspi (%)	59,6±13,8	68,6±10,4	14,3±9,32	0,003	<0,001	<0,001

*Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;*

*TRAP – agregacija trombocita indukovana trombin receptor aktivišućim peptidom (TRAP test); ADP – agregacija trombocita indukovana adenozin difosfatom (ADP test); ASPI – agregacija trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (ASPI test);*

*%SATadp - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrela*

*%SATaspi - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom*

*p - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)*

*p\* - statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)*

*p\*\* - statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)*

#### **4.1.11. Biohemijski parametri u ispitivanim i kontrolnoj grupi**

Uočene su statistički značajno više vrednosti uree ( $6,08 \pm 1,43$  vs.  $5,36 \pm 1,33$  mmol/l;  $p = 0,010$ ) i kreatinina ( $84,6 \pm 18,3$  vs.  $76,7 \pm 18,0$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $p = 0,033$ ) kod ispitanika u Grupi I (T2DM) u odnosu na ispitanike Grupe II (nonDM), dok nije bilo

značajne razlike u vrednostima mokraćne kiseline, AST, ALT i GGT između ovih ispitivanih grupa ( $p > 0,05$ ; za sve parametre). (Tabela 13)

Statistički značajno više vrednosti ureje ( $6,08 \pm 1,43$  vs.  $4,97 \pm 1,07$ ;  $p < 0,001$ ) su konstatovane kod ispitanika Grupe I (T2DM) u odnosu na kontrolnu grupu. Nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima kreatinina, mokraćne kiseline, AST, ALT, GGT između ove dve ispitivane grupe. (Tabela 13)

Nije bilo statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre) u vrednostima ispitivanih biohemijskih parametara (urea, kreatinin, mokraćna kiselina, AST, ALT, GGT) između ispitanika Grupe II (nonDM) u odnosu na vrednosti istih ispitivanih parametara u kontrolnoj grupi zdravih. (Tabela 13)

*Tabela 13. Poređenje pojedinih biohemijskih parametara između ispitivanih i kontrolne grupe*

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Urea (mmol/l)	6,08±1,43	5,36±1,33	4,97±1,07	0,010	<0,001	0,185
Kreatinin (µmol/l)	84,6±18,3	76,7±18,0	77,6±16,1	0,033	0,088	0,826
Mokraćna kis. (µmol/l)	343±68,4	326±88,1	320±96,1	0,288	0,213	0,765
AST (U/l)	21,1±7,25	27,8±37,7	21,9±5,20	0,223	0,593	0,402
ALT (U/l)	24,6±12,4	28,5±20,2	22,8±10,6	0,252	0,503	0,157
GGT (U/l)	29,7±26,2	27,4±26,7	29,6±31,1	0,660	0,988	0,734

*Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;*

*AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; GGT – gama glutamil transpeptidaza*

*p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)*

*p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)*

*p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)*



#### 4.1.12. Eritrocitni pokazatelji u ispitivanim i kontrolnoj grupi

Nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ; za sve ispitivane parametre) u broju eritrocita, količini hemoglobina, vrednostima hematokrita, kao ni u vrednostima MCV, MCH i MCHC između ispitanika Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM) kao ni u vrednostima ovih parametara između ispitivanih grupa (T2DM i nonDM) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih.

Uočena je značajno viša vrednost RDW u ispitivanim grupama T2DM i nonDM, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ( $12,1 \pm 0,66$  vs.  $11,7 \pm 0,48$ ;  $p = 0,015$  i  $12,3 \pm 1,25$  vs.  $11,7 \pm 0,48$ ;  $p = 0,038$ ), dok nije bilo razlike u ovom ispitivanom parametru između ispitivanih Grupe I i Grupe II, ( $12,1 \pm 0,66$  vs.  $12,3 \pm 1,25$ ;  $p=0,426$ ). (Tabela 14)

Tabela 14. Poređenje eritrocitnih pokazatelja između ispitivanih i kontrolne grupe

Parametar	Grupa I (T2DM)	Grupa II (nonDM)	KG	p	p*	p**
Eritrociti (n)	4,70±0,35	4,71±0,4	4,68±0,47	0,947	0,787	0,762
Hemoglobin (g/dl)	14,5±1,05	14,4±1,15	14,4±1,23	0,503	0,682	0,880
Hematokrit (%)	42,1±3,09	41,6±4,86	41,7±3,38	0,506	0,574	0,900
MCV (fl)	89,7±4,20	89,8±4,98	89,4±4,40	0,881	0,785	0,712
MCH (pg)	30,9±1,71	30,6±2,14	30,9±1,67	0,468	0,953	0,573
MCHC (g/dl)	34,5±1,11	34,1±1,02	54,9±77,5	0,069	0,065	0,060
RDW (%)	12,1±0,66	12,3±1,25	11,7±0,48	0,426	0,015	0,038

Legenda: podaci u tabeli su prikazani kao  $X \pm SD$ ;

MCV – srednji volumen eritrocita; MCH – srednja količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC – srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitima; RDW – mera varijabilnosti veličine eritrocita;

p – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i Grupe II (nonDM)

p\* – statistička značajnost između Grupe I (T2DM) i kontrolne grupe (KG)

p\*\* – statistička značajnost između Grupe II (nonDM) i kontrolne grupe (KG)

#### 4.2. Korelaciona analiza ispitivanih parametara u grupi bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2 (Grupa I - T2DM)

Vrednost agregacije uz agonist TRAP (TRAP test) je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa brojem trombocita ( $r = 0,354$ ;  $p = 0,012$ ), vrednosti PCT-a ( $r = 0,411$ ;  $p = 0,003$ ), ADP testom ( $r = 0,786$ ;  $p < 0,001$ ), ASPI testom ( $r = 0,403$ ;  $p = 0,004$ ) i nivoom D dimera ( $r = 0,336$ ;  $p = 0,017$ ). (Tabela 15, Grafikoni 1 i 2)

Tabela 15. Korelacije TRAP testa sa trombocitnim parametrima i parametrima koagulacije

Parametar	r	p
Trombociti (n)	0,354	0,012
PCT (%)	0,411	0,003
ADP (U)	0,786	<0,001
ASPI (U)	0,403	0,004
D dimer (ng/ml)	0,336	0,017

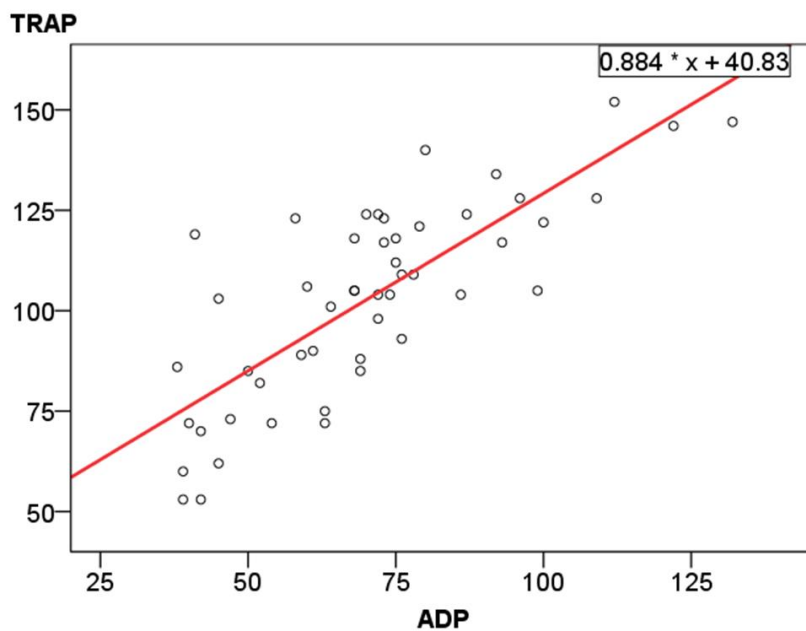
Legenda: PCT – trombokrit; ADP – agregacija trombocita indukovana adenozin difosfatom (ADP test); ASPI – agregacija trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (ASPI test)

U grupi ispitanika sa T2DM vrednost agregacije uz agonist TRAP statistički značajno pozitivno koreliše sa brojem neutrofila ( $r = 0,349$ ;  $p = 0,013$ ), NLR-om ( $r = 0,472$ ;  $p = 0,001$ ) i fibrinogenom ( $r = 0,288$ ;  $p = 0,042$ ). (Tabela 16)

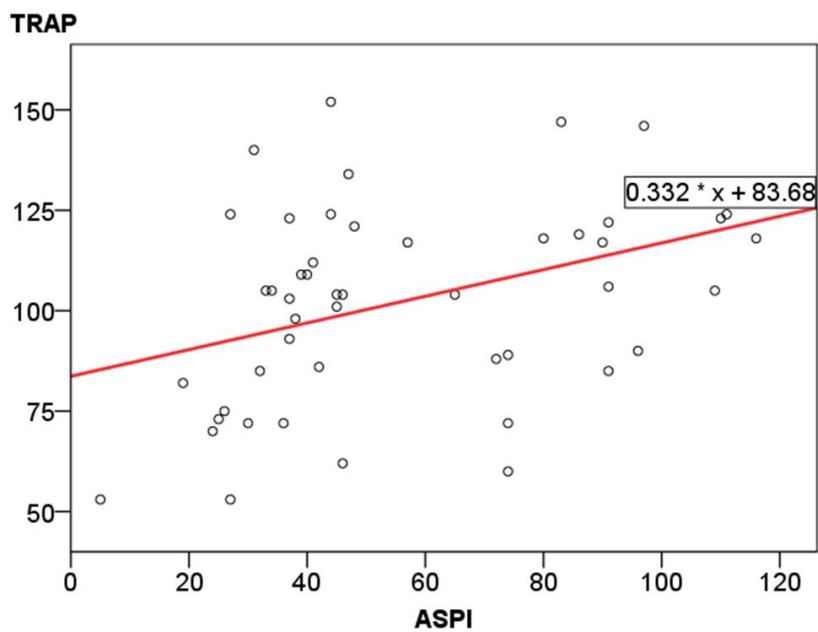
Tabela 16. Korelacije TRAP testa sa parametrima inflamacije

Parametar	r	p
Neutrofili (n)	0,349	0,013
NLR	0,472	0,001
Fibrinogen (g/l)	0,288	0,042

Legenda: NLR – odnos neutrofila/limfocita



Grafikon 1. Korelacija agregacije trombocita uz agoniste TRAP i ADP



Grafikon 2. Korelacija agregacije trombocita uz agoniste TRAP i arahidonsku kiselinu (ASPI)

Korelacionom analizom je uočena statistički značajna pozitivna povezanost agregacije uz agonist ADP sa ITM-e ( $r = 0,292$ ;  $p = 0,039$ ), insulinom ( $r = 0,392$ ;  $p = 0,005$ ) i HOMA-IR ( $r = 0,319$ ;  $p = 0,024$ ). (Tabela 17)

Tabela 17. Korelacije ADP testa sa antropometrijskim parametrima i parametrima glukoze

Parametar	r	p
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,292	0,039
Insulin (mU/l)	0,392	0,005
HOMA-IR	0,319	0,024

Legenda: ITM – indeks telesne mase; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze)

U odnosu na ispitivane parametre inflamacije, u ovoj grupi je uočena statistički značajna pozitivna korelacija agregacije uz ADP sa brojem leukocita ( $r = 0,308$ ;  $p = 0,029$ ), brojem neutrofila ( $r = 0,494$ ;  $p < 0,001$ ), NLR-om ( $r = 0,515$ ;  $p < 0,001$ ) i hsCRP-om ( $r = 0,356$ ;  $p = 0,011$ ). (Tabela 18)

Tabela 18. Korelacije ADP testa sa parametrima inflamacije

Parametar	r	p
Leukociti (n)	0,308	0,029
Neutrofilni (n)	0,494	<0,001
NLR	0,515	<0,001
hsCRP (mg/l)	0,356	0,011

Legenda: NLR – odnos neutrofila/limfocita; hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein

U Grupi I - T2DM, vrednost agregacije uz ADP (ADP testa) je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa brojem trombocita ( $r = 0,335$ ;  $p = 0,017$ ), PCT-a ( $r = 0,396$ ;  $p = 0,004$ ), %rP ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,049$ ), nivoom D dimera ( $r = 0,352$ ;  $p = 0,012$ ) i ASPI testom ( $r = 0,438$ ;  $p = 0,001$ ). (Tabela 19)

Uočen je izuzetno visok stepen statistički značajne negativne povezanosti vrednosti ADP testa i %SATadp ( $r = -0,577$ ;  $p = <0,001$ ). (Tabela 19 i Grafikon 3)

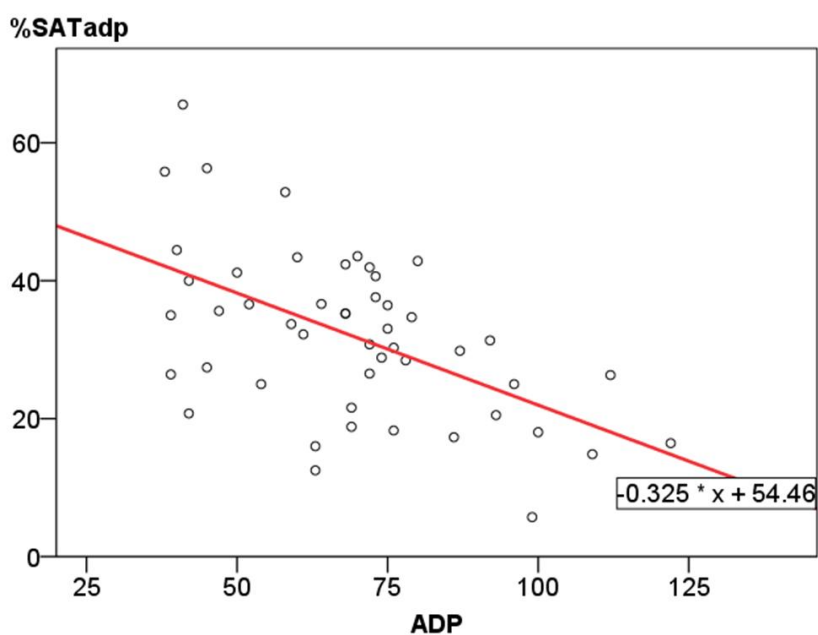
Tabela 19. Korelacije ADP testa sa trombocitnim parametrima i parametrima koagulacije

Parametar	r	p
Trombociti (n)	0,335	0,017
PCT (%)	0,396	0,004
% rP (%)	0,302	0,049
D dimer (ng/ml)	0,352	0,012
ASPI (U)	0,438	0,001
%SATadp	-0,577	<0,001

Legenda: PCT – trombokrit; %rP – procenat retikulisanih trombocita;

ASPI – agregacija trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (ASPI test);

%SATadp - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrela



Grafikon 3. Korelacija agregacije uz agonist ADP i %SATadp

U ispitivanoj grupi bolesnika sa T2DM, %SATadp je u statistički značajno negativnoj korelaciji sa telesnom masom (TM) ( $r = -0,368$ ;  $p = 0,009$ ), indeksom telesne mase (ITM) ( $r =$

-0,381;  $p = 0,006$ ), obimom struka (OS) ( $r = -0,387$ ;  $p = 0,006$ ) i WHtR-om ( $r = -0,340$ ;  $p = 0,016$ ). (Tabela 20)

*Tabela 20. Korelacije %SATadp sa antropometrijskim parametrima*

Parametar	r	p
TM (kg)	-0,368	0,009
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	-0,381	0,006
OS (cm)	-0,387	0,006
WHtR	-0,340	0,016

*Legenda: TM - telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine*

U ovoj ispitivanoj grupi, %SATadp statistički je značajno negativno korelisao sa nivoom insulina ( $r = -0,331$ ;  $p = 0,019$ ) i sa HOMA-IR ( $r = -0,349$ ;  $p = 0,013$ ). (Tabela 21)

*Tabela 21. Korelacije %SATadp sa parametrima metabolizma glukoze*

Parametar	r	p
Insulin (mU/l)	-0,331	0,019
HOMA-IR	-0,349	0,013

*Legenda: HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze)*

%SATadp je statistički značajno negativno povezan sa brojem neutrofila ( $r = -0,298$ ;  $p = 0,003$ ) i hsCRP-om ( $r = -0,288$ ;  $p = 0,043$ ) u grupi ispitanika sa T2DM. (Tabela 22)

*Tabela 22. Korelacije %SATadp sa parametrima inflamacije*

Parametar	r	p
Neutrofili (n)	-0,298	0,003
hsCRP (mg/l)	-0,288	0,043

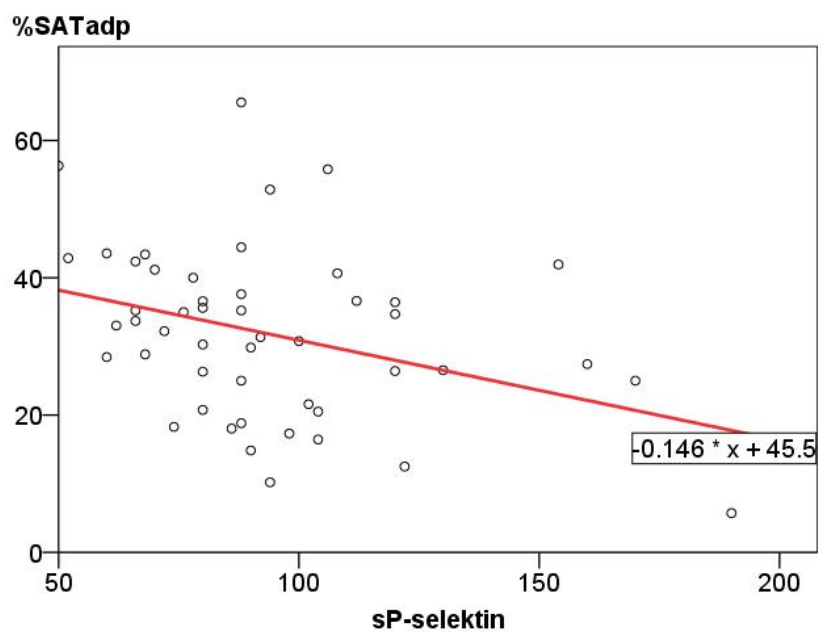
*Legenda: hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein*

Uočava se statistički značajno negativna korelacija %SATadp sa %rP ( $r = -0,302$ ;  $p = 0,049$ ), nivoom sE-selektina ( $r = -0,369$ ;  $p = 0,008$ ) i sP-selektina ( $r = -0,374$ ;  $p = 0,007$ ). (Tabela 23 i Grafikoni 4 i 5)

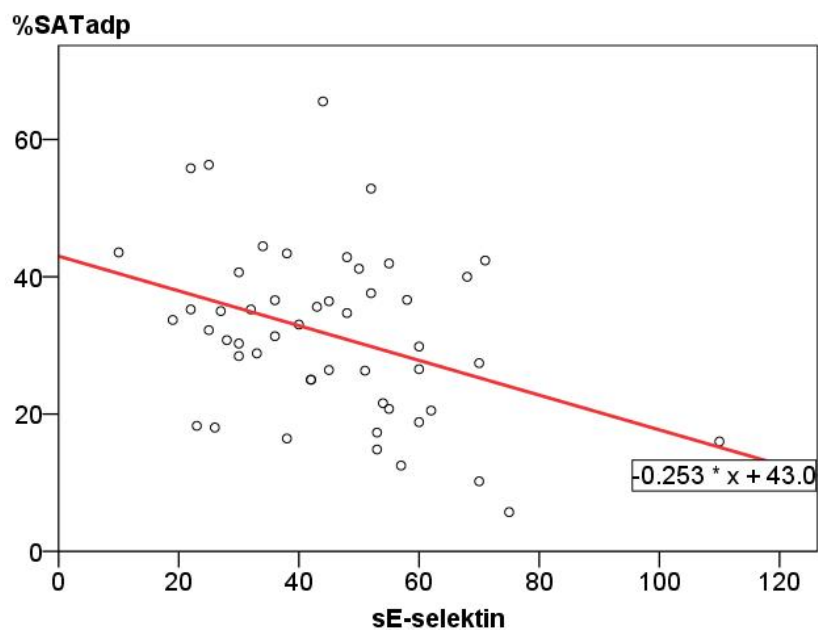
Tabela 23. Korelacije %SATadp sa biomarkerima aktivacije endotela i trombocita

Parametar	r	p
%rP	-0,302	0,049
sE-selektin (ng/ml)	-0,369	0,008
sP-selektin (ng/ml)	-0,374	0,007

Legenda: %rP – procenat retikulisanih trombocita



Grafikon 4. Korelacija %SATadp sa sP-selektinom



Grafikon 5. Korelacija %SATadp sa sE-selektinom

Vrednost agregacije indukovane arahidonskom kiselinom, ASPI testa, statistički značajno pozitivno koreliše sa brojem trombocita ( $r = 0,346$ ;  $p = 0,014$ ) i PCT-om ( $r = 0,329$ ;  $p = 0,020$ ). (Tabela 24)

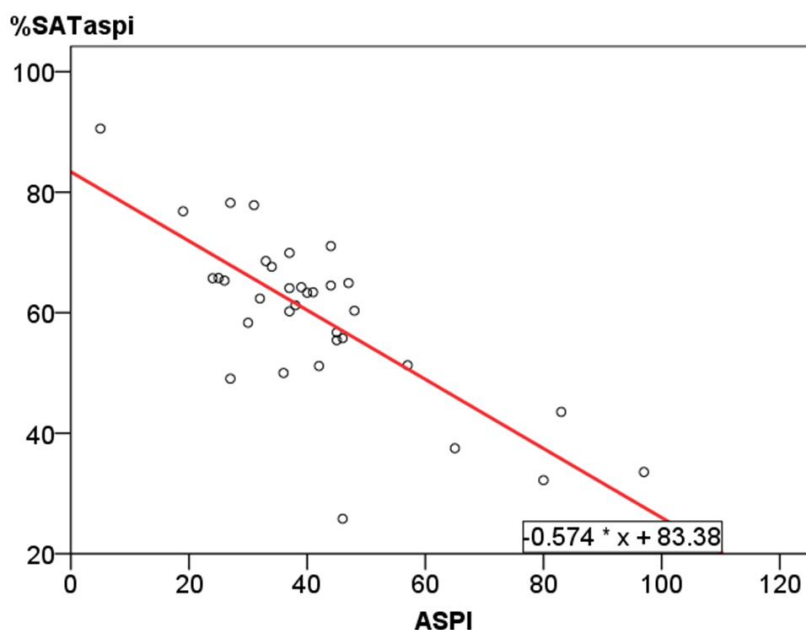
Uočava se izuzetno visok stepen negativne povezanosti vrednosti ASPI testa i %SATaspi ( $r = -0,757$ ;  $p = <0,001$ ) u grupi ispitanika sa T2DM. (Tabela 24 i Grafikon 6)

Tabela 24. Korelacije ASPI testa sa trombocitnim parametrima

Parametar	r	p
Trombociti (n)	0,346	0,014
PCT (%)	0,329	0,020
%SATaspi	-0,757	<0,001

Legenda: PCT – trombokrit; %SATaspi - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom





Grafikon 6. Korelacija %SATaspi sa agregacijom indukovanom arahidonskom kiselinom (ASPI test)

%SATaspi statistički značajno negativno koreliše sa %rP ( $r = -0,427$ ;  $p = 0,019$ ) i vWF Ag-om ( $r = -0,380$ ;  $p = 0,027$ ). (Tabela 25)

Tabela 25. Korelacije %SATaspi sa pojedinim laboratorijskim i kliničkim parametrima

Parametar	r	p
%rP	-0,427	0,019
vWF Ag (%)	-0,380	0,027

Legenda: %rP – procenat retikulisanih trombocita; vWF Ag - Fon Vilebrandov faktor

U grupi ispitanika sa T2DM, %rP je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa TM ( $r = 0,375$ ;  $p = 0,013$ ), ITM ( $r = 0,365$ ;  $p = 0,016$ ), OS ( $r = 0,435$ ;  $p = 0,004$ ) i WHtR ( $r = 0,373$ ;  $p = 0,014$ ). (Tabela 26)

Tabela 26. Korelacije %rP sa antropometrijskim parametrima

Parametar	r	p
TM (kg)	0,375	0,013
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,365	0,016
OS (cm)	0,435	0,004
WHtR	0,373	0,014

Legenda: TM - telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine

Takođe, %rP statistički značajno pozitivno koreliše sa HOMA-IR (r = 0,409; p= 0,006) i HbA1c (r = 0,314; p= 0,040). (Tabela 27)

Tabela 27. Korelacije %rP sa parametrima metabolizma glukoze

Parametar	r	p
HOMA-IR	0,409	0,006
HbA1c (mmol/mol)	0,314	0,040

Legenda: HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze); HbA1c - glikozilirani hemoglobin

Analizirajući povezanost %rP sa parametrima inflamacije, uočena je statistički značajno pozitivna korelacija sa brojem neutrofila (r = 0,345; p = 0,024), hsCRP-om (r = 0,374; p = 0,014) i fibrinogenom (r= 0,312; p= 0,042). (Tabela 28)

Tabela 28. Korelacije %rP sa parametrima inflamacije

Parametar	r	p
Neutrofili (n)	0,345	0,024
hsCRP (mg/l)	0,374	0,014
Fibrinogen (g/l)	0,312	0,042

Legenda: hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein

U odnosu na biomarkere endotelne i trombocitne aktivacije, %rP statistički značajno pozitivno koreliše sa nivoom sP-selektina ( $r = 0,341$ ;  $p = 0,025$ ) i vWFAg-om ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,022$ ). (Tabela 29)

Tabela 29. Korelacije %rP sa biomarkerima aktivacije endotela i trombocita

Parametar	r	p
sP-selektin (ng/ml)	0,341	0,025
vWFAg (%)	0,348	0,022

Legenda: vWF Ag - Von Willebrandov faktor

Analizirajući povezanost koncentracija sE-selektina sa antropometrijskim parametrima, u Grupi I – T2DM, uočili smo statistički značajno pozitivnu korelaciju sa TM ( $r = 0,390$ ;  $p = 0,005$ ), ITM ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,006$ ), OS ( $r = 0,380$ ;  $p = 0,007$ ), WHtR ( $r = 0,313$ ;  $p = 0,027$ ). Takođe, koncentracija sE-selektina je statistički značajno pozitivno povezana sa HOMA-IR ( $r = 0,339$ ;  $p = 0,016$ ). (Tabela 30)

Tabela 30. Korelacije sE-selektina sa antropometrijskim parametrima i parametrima metabolizma glukoze

Parametar	r	p
TM (kg)	0,390	0,005
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,380	0,006
OS (cm)	0,380	0,007
WHtR	0,313	0,027
HOMA-IR	0,339	0,016

Legenda: TM - telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze)

U istoj ispitivanoj grupi, nivo sE-selektina je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa brojem leukocita ( $r = 0,344$ ;  $p = 0,014$ ), neutrofila ( $r = 0,342$ ;  $p = 0,015$ ) i hsCRP-om ( $r = 0,351$ ;  $p = 0,013$ ). (Tabela 31)

Tabela 31. Korelacije sE-selektina sa parametrima inflamacije

Parametar	r	p
Leukociti (n)	0,344	0,014
Neutrofili (n)	0,342	0,015
hsCRP (mg/l)	0,351	0,013

Legenda: hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein

Koncentracija sP-selektina kod ispitanika sa T2DM je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa svim ispitivanim antropometrijskim parametrima: TM ( $r = 0,398$ ;  $p = 0,004$ ), ITM ( $r = 0,312$ ;  $p = 0,027$ ), OS ( $r = 0,395$ ;  $p = 0,005$ ) i sa WHtR ( $r = 0,282$ ;  $p = 0,047$ ). (Tabela 32)

Takođe, uočena je i pozitivna povezanost koncentracije sP – selektina sa HOMA – IR ( $r = 0,286$ ;  $p = 0,044$ ). (Tabela 32)

Tabela 32. Korelacije sP-selektina sa antropometrijskim parametrima i parametrima metabolizma glukoze

Parametar	r	p
TM (kg)	0,398	0,004
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,312	0,027
OS (cm)	0,395	0,005
WHtR	0,282	0,047
HOMA-IR	0,286	0,044

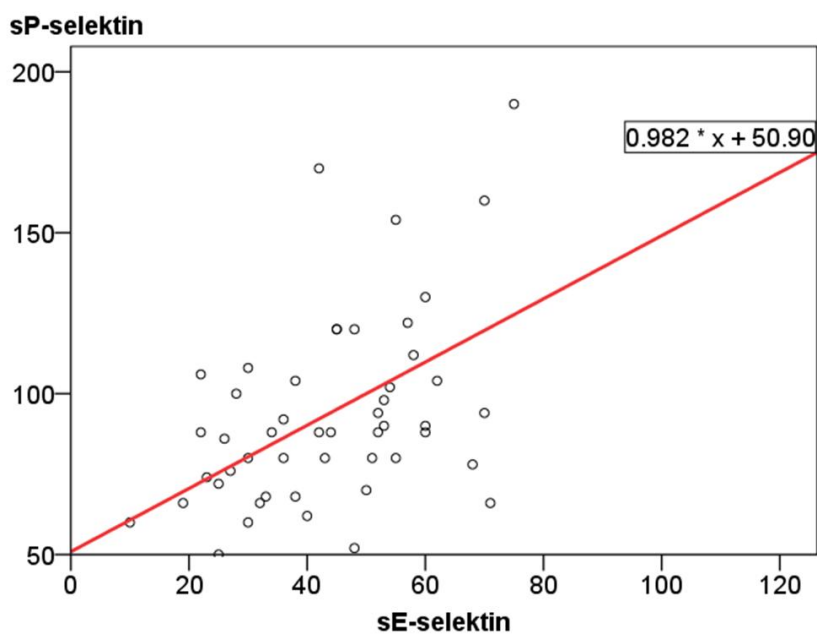
Legenda: TM - telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze)

Kod ispitanika sa T2DM, nivo sP-selektina je statistički značajno pozitivno povezana sa PCT-om ( $r = 0,305$ ;  $p = 0,031$ ), %rP ( $r = 0,341$ ;  $p = 0,025$ ), hsCRP-om ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,008$ ) i nivoom sE – selektina ( $r = 0,560$ ;  $p < 0,001$ ). (Tabela 33 i Grafikon 7)

Tabela 33. Korelacije sP-selektina sa trombocitnim parametrima, parametrima inflamacije i endotelne aktivacije

Parametar	r	p
PCT (%)	0,305	0,031
%rP	0,341	0,025
hsCRP (mg/l)	0,369	0,008
sE – selektin (ng/ml)	0,560	<0,001

Legenda: PCT – trombokrit; %rP – procenat retikulisanih trombocita; hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein



Grafikon 7. Korelacija sP - selektina i sE - selektina

Vrednost sistolnog krvnog pritiska (SKP) je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa nivoom sE-selektina ( $r = 0,423$ ;  $p = 0,002$ ), sP-selektina ( $r = 0,314$ ;  $p = 0,026$ ) i vWF Ag-om ( $r = 0,289$ ;  $p = 0,042$ ) u Grupi I bolesnika sa T2DM. (Tabela 34)

Vrednost dijastolnog krvnog pritiska (DKP) statistički je značajno pozitivno korelisala sa nivoom sE-selektina ( $r = 0,374$ ;  $p = 0,007$ ). Uočena je takođe i slaba pozitivna povezanost vrednosti DKP sa nivoom sP-selektina i vWF Ag-om, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 34)

*Tabela 34. Korelacije SKP i DKP sa markerima endotelne i trombocitne aktivacije*

Parametar	SKP		DKP	
	r	p	r	p
sE-selektin (ng/ml)	0,423	0,002	0,374	0,007
sP-selektin (ng/ml)	0,314	0,026	0,250	0,080
vWF Ag (%)	0,289	0,042	0,175	0,225

*Legenda: SKP - sistolni krvni pritisak; DKP - dijastolni krvni pritisak; vWF Ag - Faktor Vilebrandov faktor*

#### 4.3. Korelaciona analiza ispitivanih parametara u grupi bolesnika bez dijabetesa (Grupa II – nonDM)

U grupi bolesnika bez dijabetesa, vrednost agregacije uz agonist TRAP (TRAP test) je statistički značajno korelirala sa brojem neutrofila ( $r = 0,477$ ;  $p < 0,001$ ) dok nije bilo statistički značajne povezanosti sa NLR-om ( $r = 0,022$ ;  $p = 0,881$ ) i koncentracijom fibrinogena ( $r = 0,156$ ;  $p = 0,280$ ). Takođe, vrednost agregacije uz agonist TRAP je bila statistički značajno povezana sa brojem trombocita ( $r = 0,517$ ;  $p < 0,001$ ), PCT-om ( $r = 0,577$ ,  $p < 0,001$ ) i ADP testom ( $r = 0,695$ ;  $p < 0,001$ ), ali nije uočena statistički značajna korelacija sa nivoom ASPI testa ( $r = 0,232$ ;  $p = 0,105$ ) i D-dimerom ( $r = 0,012$ ;  $p = 0,935$ ). (Tabela 35)

Tabela 35. Korelacije TRAP testa sa pojedinim laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
Neutrofili (n)	0,477	<0,001
NLR	0,022	0,881
Fibrinogen (g/l)	0,156	0,280
Trombociti (n)	0,517	<0,001
PCT (%)	0,577	<0,001
ADP (U)	0,695	<0,001
ASPI (U)	0,232	0,105
D-dimer (ng/ml)	0,012	0,935

*Legenda: NLR – odnos neutrofila/limfocita; PCT – trombokrit; ADP – agregacija trombocita indukovana adenzin difosfatom (ADP test); ASPI – agregabilnost trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (ASPI test);*

U Grupi II (nonDM) vrednost agregacije uz agonist ADP nije u statistički značajnoj korelaciji sa ITM-e ( $r = 0,173$ ;  $p = 0,228$ ), insulinom ( $r = -0,069$ ;  $p = 0,633$ ), HOMA-IR ( $r = -0,049$ ;  $p = 0,738$ ), brojem leukocita ( $r = 0,274$ ;  $p = 0,054$ ), brojem neutrofila ( $r = 0,276$ ;  $p = 0,052$ ), NLR-om ( $r = 0,025$ ;  $p = 0,865$ ), hsCRP-om ( $r = 0,066$ ;  $p = 0,649$ ), brojem

trombocita ( $r = 0,148$ ;  $p = 0,306$ ), PCT-om ( $r = 0,244$ ;  $p = 0,088$ ), %rP ( $r = 0,152$ ;  $p = 0,296$ ) i D-dimerom ( $r = 0,065$ ;  $p = 0,652$ ). (Tabela 36)

U ovoj ispitivanoj grupi, uočena je značajna pozitivna povezanost agregacije trombocita indukovane ADP-om sa nivoom agregacije indukovane arahidonskom kiselinom (ASPI test) ( $r = 0,315$ ;  $p = 0,026$ ), kao i izuzetno visoki stepen negativne korelacije agregacije uz ADP sa %SATadp ( $r = -0,792$ ;  $p < 0,001$ ). (Tabela 36)

Tabela 36. Korelacije ADP testa sa antropometrijskim i laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,173	0,228
Insulin (mU/l)	-0,069	0,633
HOMA-IR	-0,049	0,738
Leukociti (n)	0,274	0,054
Neutrofili (n)	0,276	0,052
NLR	0,025	0,865
hsCRP (mg/l)	0,066	0,649
Trombociti (n)	0,148	0,306
PCT (%)	0,244	0,088
% rP	0,152	0,296
D-dimer (ng/ml)	0,065	0,652
ASPI (U)	0,315	0,026
%SATadp	-0,792	<0,001

Legenda: ITM – indeks telesne mase; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze); NLR – odnos neutrofila/limfocita; hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein; PCT – trombokrit; %rP – procenat retikulisanih trombocita; ASPI – agregacija trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (ASPI test); %SATadp - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrela

Uočeno je da %SATadp nije bio u statistički značajnoj korelaciji ni sa jednim ispitivanim antropometrijskim parametrom: TM ( $r = -0,087$ ;  $p = 0,547$ ), ITM ( $r = -0,006$ ;  $p = 0,968$ ), OS ( $r = 0,065$ ;  $p = 0,652$ ) i WHtR ( $r = -0,001$ ;  $p = 0,996$ ), kao ni sa ispitivanim laboratorijskim parametrima metabolizma glukoze: insulin ( $r = -0,046$ ;  $p =$



0,750), HOMA-IR ( $r = -0,055$ ;  $p = 0,704$ ). Takođe, nije bilo statistički značajne korelacije %SATadp sa parametrima inflamacije, endotelne i trombocitne aktivacije: broj neutrofila ( $r = -0,001$ ;  $p = 0,996$ ), hsCRP ( $r = 0,045$ ;  $p = 0,757$ ), %rP ( $r = 0,148$ ;  $p = 0,310$ ), sE-selektin ( $r = -0,109$ ;  $p = 0,452$ ) i sP-selektin ( $r = -0,048$ ;  $p = 0,741$ ). (Tabela 37)

Tabela 37. Korelacije %SATadp sa antropometrijskim i laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
TM (kg)	0,087	0,547
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	-0,006	0,968
OS (cm)	0,065	0,652
WHtR	-0,001	0,996
Insulin (mU/l)	-0,046	0,750
HOMA-IR	-0,055	0,704
Neutrofili (n)	-0,001	0,996
hsCRP (mg/l)	0,045	0,757
%rP	0,148	0,310
sE-selektin (ng/ml)	-0,109	0,452
sP-selektin (ng/ml)	-0,048	0,741

Legenda: TM – telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije (model homeostaze); hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein; %rP – procenat retikulisanih trombocita

U Grupi II (nonDM) vrednost agregacije indukovane arahidonskom kiselinom (ASPI test) je u statistički značajno pozitivnoj korelaciji sa brojem trombocita ( $r = 0,280$ ;  $p = 0,049$ ) i PCT-om ( $r = 0,345$ ;  $p = 0,014$ ). Takođe se uočava i izuzetno visok stepen negativne korelacije ASPI testa sa %SATaspi ( $r = -0,898$ ;  $p = <0,001$ ). (Tabela 38)

Tabela 38. Korelacije agregacije ASPI sa laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
Trombociti (n)	0,280	0,049
PCT (%)	0,345	0,014
%SATaspi	-0,898	<0,001

Legenda: PCT – trombokrit; %SATaspi - procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom

U Grupi II (nonDM), %SATaspi nije u statistički značajnoj korelaciji sa %rP ( $r = 0,119$ ;  $p = 0,498$ ) i vWF Ag ( $r = -0,220$ ;  $p = 0,196$ ). (Tabela 39)

Tabela 39. Korelacije %SATaspi sa laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
%rP	0,119	0,498
vWF Ag (%)	-0,220	0,196

Legenda: %rP – procenat retikulisanih trombocita; vWF Ag - Von Willebrandov faktor

U grupi bolesnika sa nonDM %rP nije statistički značajno korelisao sa ispitivanim antropometrijskim parametrima, TM ( $r = 0,004$ ;  $p = 0,980$ ), ITM ( $r = 0,187$ ;  $p = 0,198$ ), OS ( $r = 0,023$ ;  $p = 0,878$ ) i WHtR ( $r = 0,097$ ;  $p = 0,507$ ), kao ni sa ispitivanim laboratorijskim parametrima metabolizma glukoze i parametrima inflamacije: HOMA-IR ( $r = 0,032$ ;  $p = 0,827$ ) i HbA1c ( $r = 0,096$ ;  $p = 0,513$ ), broj neutrofila ( $r = 0,192$ ;  $p = 0,187$ ), hsCRP ( $r = 0,108$ ;  $p = 0,460$ ) i fibrinogen ( $r = 0,053$ ;  $p = 0,719$ ). Takođe nije bilo statistički značajne korelacije %rP sa sP-selektinom ( $r = 0,061$ ;  $p = 0,678$ ) i vWF Ag-om ( $r = 0,046$ ;  $p = 0,755$ ) u grupi bolesnika bez dijabetesa. (Tabela 40)

Tabela 40. Korelacije %rP sa antropometrijskim i laboratorijskim parametrima

Parametar	r	p
TM (kg)	0,004	0,980
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	0,187	0,198
OS (cm)	0,023	0,878
WHtR	0,097	0,507
HOMA-IR	0,032	0,827
HbA1c (mmol/mol)	0,096	0,513
Neutrofili (n)	0,192	0,187
hsCRP (mg/l)	0,108	0,460
Fibrinogen (g/l)	0,053	0,719
sP-selektin (ng/ml)	0,061	0,678
vWFAg (%)	0,046	0,755

Legenda: TM - telesna masa; ITM – indeks telesne mase; OS – obim struka; WHtR – odnos obima struka i telesne visine; HOMA – IR – indeks insulinske rezistencije(model homeostaze); HbA1c – glikozilirani hemoglobin; hsCRP - visoko osetljivi C- reaktivni protein; vWF Ag - Fon Vilebrandov faktor

U Grupi II (nonDM) vrednost sistolnog krvnog pritiska (SKP) nije u statistički značajnoj korelaciji sa sE-selektinom ( $r = -0,128$ ;  $p = 0,3777$ ), sP-selektinom ( $r = -0,245$ ;  $p = 0,086$ ) i vWFAg-om ( $r = 0,142$ ;  $p = 0,324$ ). (Tabela 41)

Takođe, ni vrednost dijastolnog krvnog pritiska (DKP) nije statistički značajno korelirala sa vrednostima sE-selektina ( $r = -0,060$ ;  $p = 0,679$ ), sP-selektina ( $r = -0,090$ ;  $p = 0,534$ ) i vWFAg-om ( $r = 0,024$ ;  $p = 0,870$ ). (Tabela 41)

Tabela 41. Korelacije SKP i DKP sa pokazateljima endotelne aktivacije

Parametar	SKP		DKP	
	r	p	r	p
sE-selektin	-0,128	0,377	-0,060	0,679
sP-selektin	-0,245	0,086	-0,090	0,534
vWFAg	0,142	0,142	0,024	0,870

Legenda: SKP - sistolni krvni pritisak; DKP - dijastolni krvni pritisak; vWF Ag - Fon Vilebrandov faktor

#### 4.4. Multivarijantna linearna regresiona analiza u grupi bolesnika sa T2DM

U grupi bolesnika sa T2DM, utvrđena je nezavisna povezanost TRAP testa sa aPTT-om ( $B = 3,64$ ;  $p = 0,005$ ) i fibrinogenom ( $B = 9,61$ ;  $p = 0,009$ ). (Tabela 42)

Tabela 42. Nezavisni prediktori TRAP testa (konstanta modela = -21,39)

<b>TRAP</b>	<b>R=0,477</b>	<b>p= 0,002</b>
aPTT	B= 3,64	p= 0,005
fibrinogen	B= 9,61	p= 0,009

Takođe, multivarijantnom linearnom regresionom analizom je utvrđena nezavisna povezanost agregacije trombocita indukovane ADP-om (ADP test) sa indeksom telesne mase (ITM) ( $B = 1,43$ ;  $p = 0,043$ ) i aPTT-om ( $B = 2,75$ ;  $p = 0,016$ ) (Tabela 43).

Tabela 43. Nezavisni prediktori ADP testa (konstanta modela = -40,63)

<b>ADP</b>	<b>R=0,439</b>	<b>p= 0,007</b>
ITM	B= 1,43	p= 0,043
aPTT	B= 2,75	p= 0,016

U istoj grupi bolesnika, uočena je nezavisna povezanost %ASPI/TRAP sa vWF Ag-om ( $B = -0,063$ ;  $p = 0,014$ ) i PT – om ( $B = 4,00$ ;  $p = 0,021$ ) (Tabela 44).

Tabela 44. Nezavisni prediktor %ASPI/TRAP (konstanta modela = 26,75)

<b>%ASPI/TRAP</b>	<b>R=0,531</b>	<b>p= 0,006</b>
vWF Ag	B= - 0,063	p= 0,014
PT	B= 4,00	p= 0,021

#### 4.5. Analiza ispitivanih podgrupa u odnosu na stepen rezidualne aktivnosti trombocita

##### 4.5.1. Analiza agregabilnosti trombocita i odgovora na antitrombocitnu terapiju u podgrupama prema kvartilnoj distribuciji ADP testa kod bolesnika sa T2DM (Grupa I)

###### Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi I – T2DM

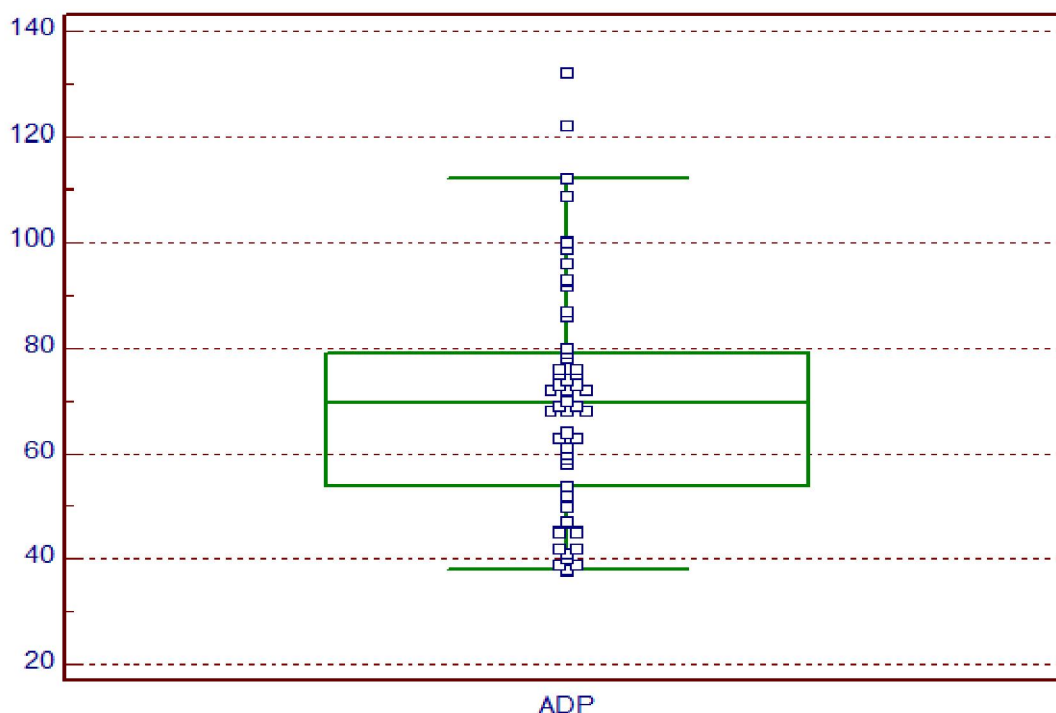
Urađena je podela na četiri podgrupe unutar Grupe I - T2DM na osnovu kvartilne distribucije ADP testa, prema čijoj vrednosti se definiše rezidualna aktivnost trombocita pod dejstvom terapije klopidozola. (Tabela 45 i Grafikon 8)

U ovoj ispitivanoj grupi, kod sedam bolesnika došlo je do ponovljenog aterotromboznog akcidenta, i to kod 2 (15%) u drugom kvartilu, 2 (15%) u trećem i 3 (25%) u četvrtom kvartilu.

Tabela 45. Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi I – T2DM

	<i>Kvartil I</i> <i>n=12</i>	<i>Kvartil II</i> <i>n=13</i>	<i>Kvartil III</i> <i>n=13</i>	<i>Kvartil IV</i> <i>n=12</i>
<i>ADP (U)</i>	<53,50	53,50-69,50	69,60-79,25	>79,25
<i>Ponovna tromboza</i>	0	2(15)	2(15)	3(25)

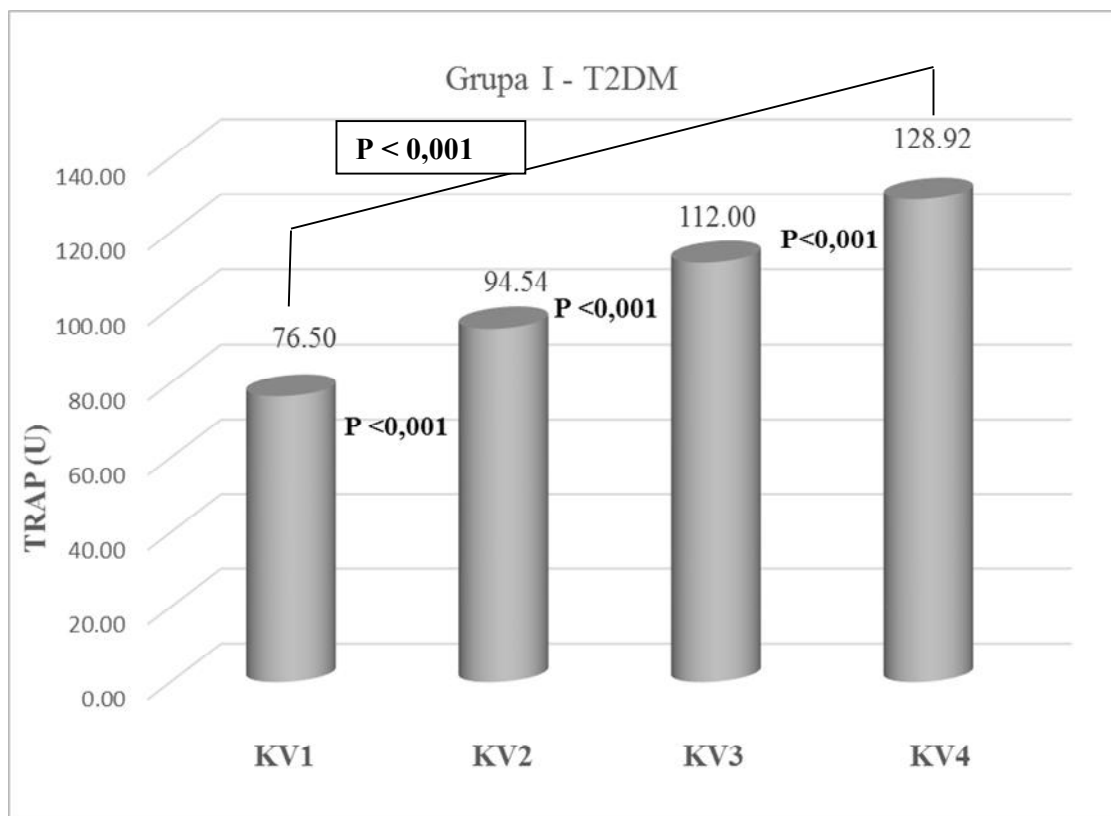
*Legenda: Rezultati su prikazani kao n (%)*



Grafikon 8. Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi I – T2DM

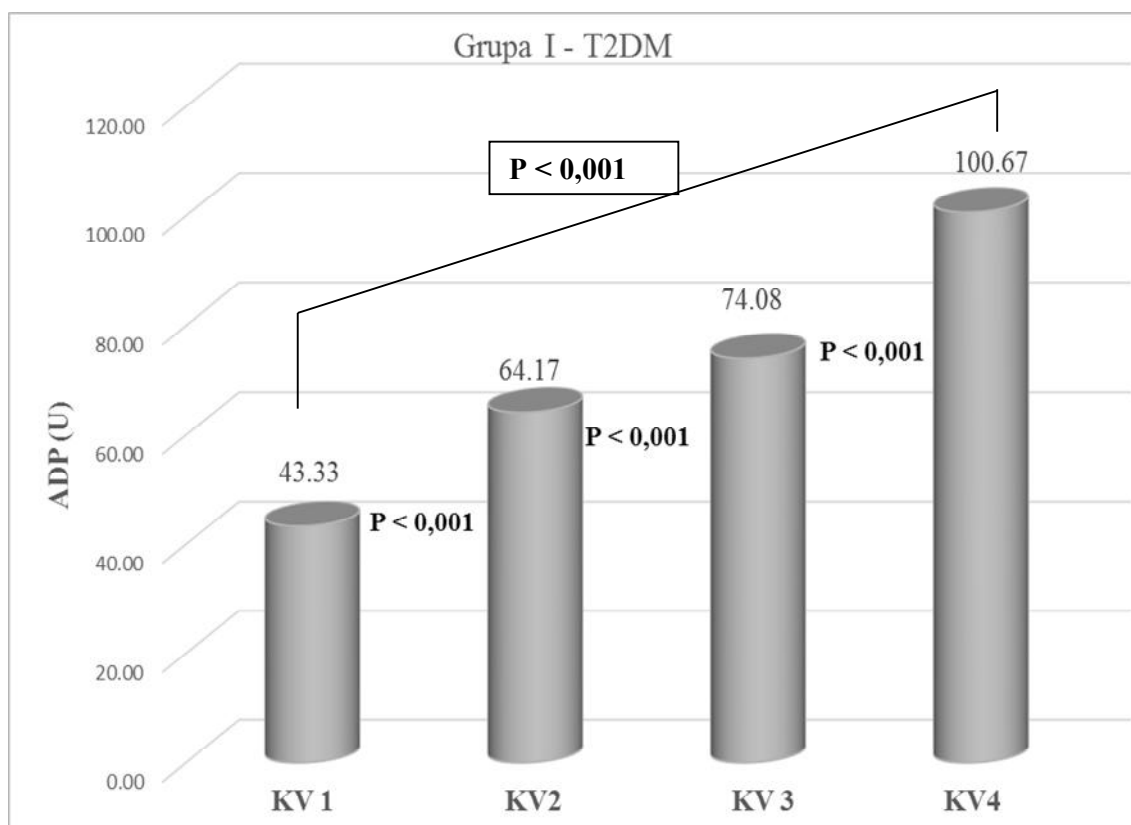
Primenom Fišerovog LSD testa (post hoc test), urađeno je poređenje nivoa TRAP testa, ADP testa, %SAT<sub>adp</sub>, ASPI testa i %SAT<sub>aspi</sub> između podgrupa konstruisanih prema ADP kvartilnoj distribuciji.

Uočava se da postoji statistički signifikantan porast vrednosti TRAP testa, tj. ukupne bazalne agregabilnosti trombocita od najmanjeg do najvećeg kvartila, sa statistički signifikantnom razlikom na nivou  $p < 0,001$  između svakog pojedinog ispitivanog kvartila; ( $76,50 \pm 19,91$  vs.  $94,54 \pm 16,67$  vs.  $112,00 \pm 10,22$  vs.  $128,92 \pm 15,69$  U;  $p < 0,001$ ). Ispitanici u četvrtom kvartilu imaju statistički signifikantno najvišu ukupnu bazalnu agregabilnost trombocita. (Tabela 46 i Grafikon 9)



Grafikon 9. Distribucija vrednosti TRAP testa prema kvartilima u Grupi I – T2DM

Grafikon 10 prikazuje porast vrednosti ADP-a, tj. rezidualne aktivnosti trombocita nakon primenjene terapije klopidoogrelom, od najmanjeg do najvećeg kvartila, sa statistički signifikantnom razlikom na nivou  $p < 0,001$  između svakog pojedinog ispitivanog kvartila; ( $43,33 \pm 4,52$  vs.  $64,17 \pm 4,84$  vs.  $74,08 \pm 2,59$  vs.  $100,67 \pm 15,44$  U;  $p < 0,001$ ). (Tabela 46)

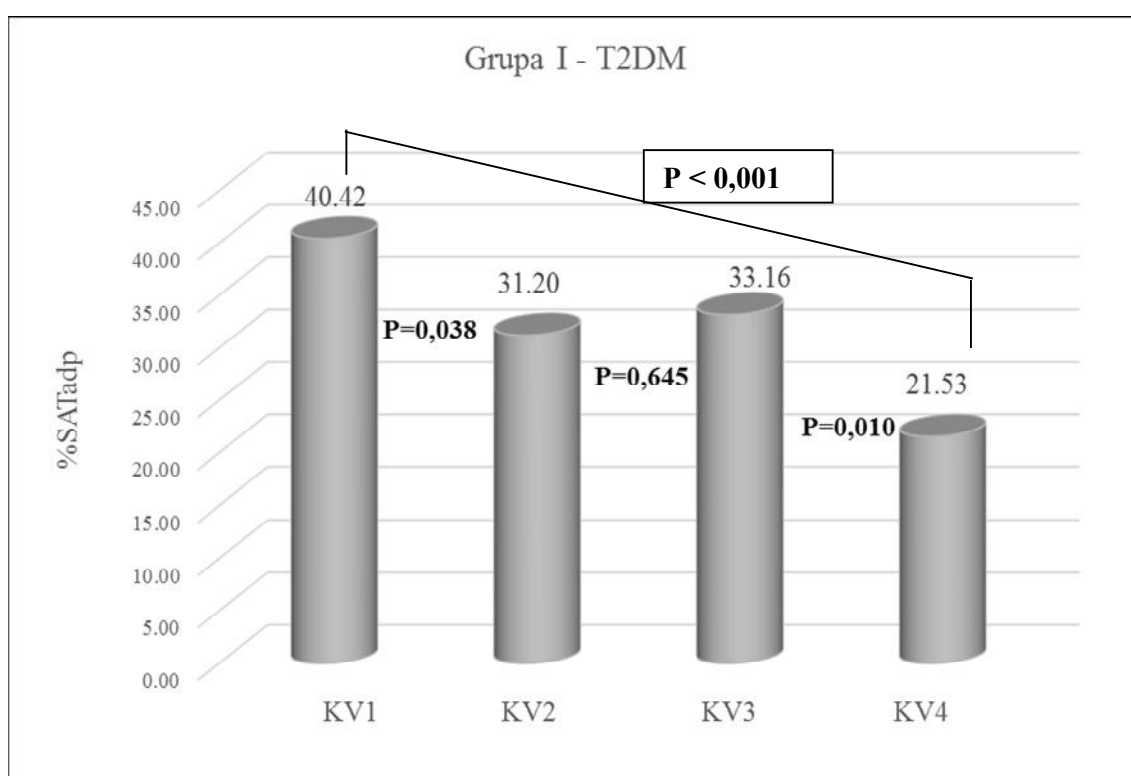


Grafikon 10. Distribucija vrednosti ADP testa prema kvartilima u Grupi I – T2DM

Analizirajući odgovor na terapiju klopidogrelom, a na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, ( $\%SAT_{adp} = 100 \times (1 - ADP/TRAP)$ ), ustanovljeno je da postoji tendencija signifikantnog pada nivoa  $\%SAT_{adp}$  počevši od prvog prema četvrtom kvartilu. Uočeno je da su najveći procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, imali ispitanici u prvom kvartilu ADP-a, gde je preostala i najmanja rezidualna aktivnost trombocita te je nivo  $\%SAT_{adp}$  prvog kvartila signifikantno viši u odnosu na  $\%SAT_{adp}$  drugog kvartila ( $40,42 \pm 13,33$  vs.  $31,20 \pm 11,82\%$ ;  $p=0,038$ ). Nije bilo signifikantne razlike u  $\%SAT_{adp}$  između drugog i trećeg kvartila ( $31,20 \pm 11,82$  vs.  $33,16 \pm 7,03\%$ ;  $p=0,645$ ). Signifikantno niži  $\%SAT_{adp}$  su imali ispitanici u podgrupi četvrtog kvartila u odnosu na  $\%SAT_{adp}$  trećeg kvartila ( $21,53 \pm 10,16$  vs.  $33,16 \pm 7,03\%$ ;  $p=0,010$ ). (Grafikon 11 i Tabela 46)



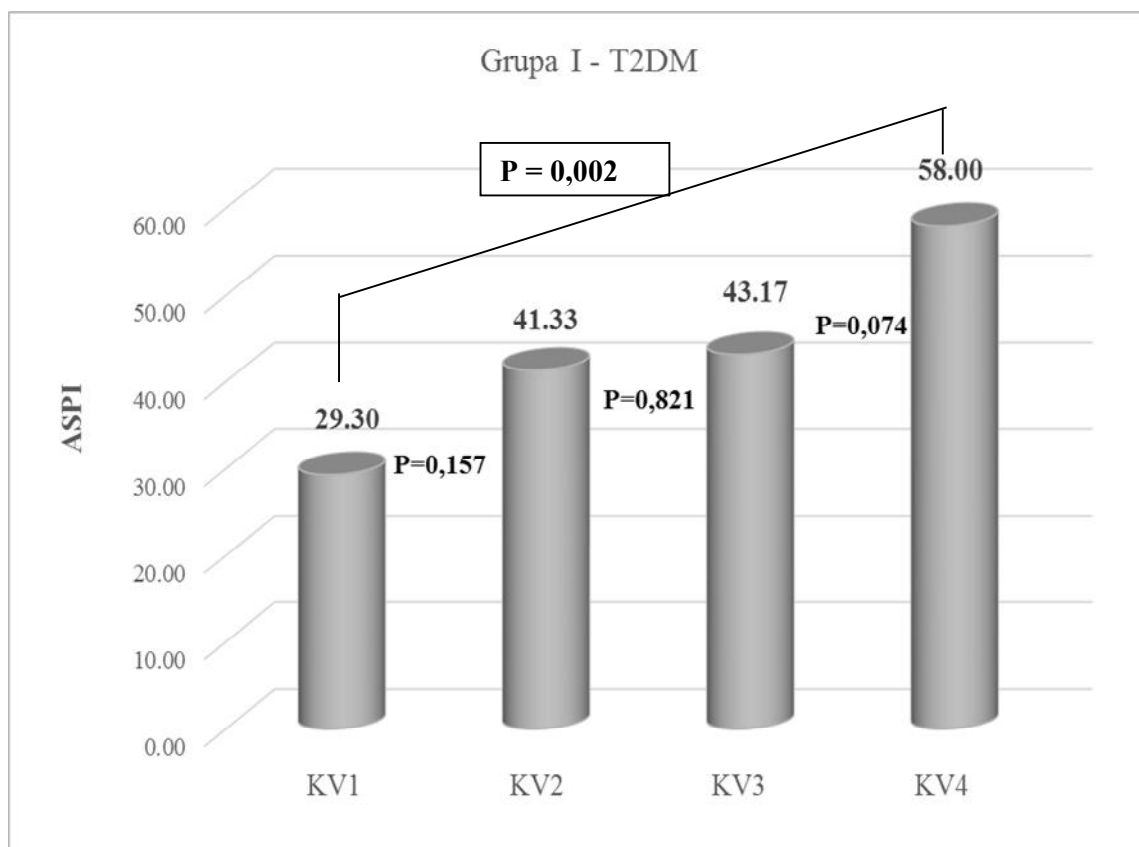
Na osnovu prethodnih analiza, u četvrtom kvartilu je konstatovan najlošiji odgovor na terapiju klopidogetrom procenjen putem %SATadp kao i najviša vrednost rezidualne aktivnosti trombocita procenjena vrednošću ADP testa. Takođe, najbolji odgovor na terapiju klopidogetrom ustanovljen je kod ispitanika u prvom kvartilu, gde je bio najveći %SATadp i najmanja rezidualna aktivnost trombocita procenjena ADP testom. (Tabela 46 i Grafikoni 10 i 11)



Grafikon 11. Distribucija vrednosti %SATadp prema kvartilima u Grupi I – T2DM

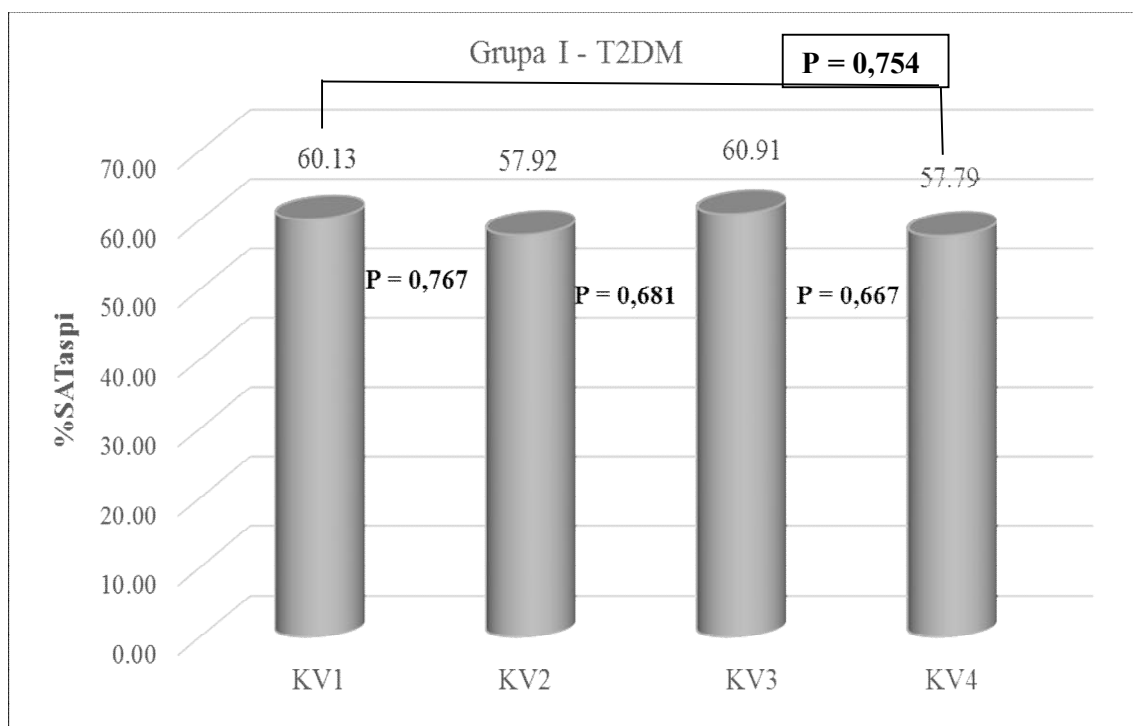
Grafikon 12 prikazuje tendenciju postepenog porasta vrednosti ASPI testa u odnosu na ispitivane kvartile, sa statistički signifikantnom razlikom između prvog i četvrtog kvartila ( $29,30 \pm 12,02$  vs.  $58,00 \pm 25,83$ ;  $p = 0,002$ ). Međutim, nije bilo statistički signifikantne razlike između vrednosti ASPI testa između prvog i drugog ( $29,30 \pm 12,01$  vs.  $41,33 \pm 19,98$ ;

p=0,157), drugog i trećeg (41,33±19,98 vs. 43,17±9,96; p=0,821) kao ni između trećeg i četvrtog kvartila (43,17±9,96 vs. 58,00±25,83; p=0,074). (Tabela 46 i Grafikon 12)



Grafikon 12 . Distribucija vrednosti ASPI testa prema kvartilima u Grupi I – T2DM

Analizirajući odgovor na terapiju aspirinom, na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, (%SATaspi = 100 x (1-ASPI/TRAP)), ustanovljeno je da ne postoji razlika u procentu sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom između poređenih podgrupa prema kvartilnoj raspodeli (p>0,05;sve). (Tabela 46 i Grafikon 13)



Grafikon 13. Distribucija vrednosti %SATaspi prema kvartilima u Grupi I – T2DM

U Grupi I - T2DM izdvaja se i signifikantan porast broja trombocita od prvog do četvrtog kvartila sa statistički značajnom razlikom broja trombocita drugog, trećeg i četvrtog kvartila u odnosu na prvi kvartil. Takođe postoji tendencija porasta %rP od prvog do četvrtog kvartila, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 46)

Izdvaja se takođe i statistički signifikantan porast koncentracije insulina sa statistički značajno višim vrednostima insulina u četvrtom kvartilu u odnosu na njegove koncentracije u prvom i drugom kvartilu. Uporedo sa vrednostima insulina, raste i vrednost HOMA-IR, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 46)

Uočene su i statistički značajno više vrednosti broja neutrofila i NLR u četvrtom kvartilu u odnosu na vrednosti prvog i drugog kvartila, kao i statistički značajno više vrednosti koncentracije hsCRP-a u četvrtom kvartilu u odnosu na vrednosti prvog kvartila. (Tabela 52)

Vrednosti D - dimera pokazuju tendenciju porasta od prvog ka četvrtom kvartilu, ali bez statističke značajnosti. (Tabela 46)

Tabela 46. Analiza laboratorijskih parametara prema kvartilima ADP-a u Grupi I – T2DM

Parametar	1 kvartil n =12	2 kvartil n=13	3 kvartil n=13	4 kvartil n=12
TRAP (U)	76,50 ±19,91	94,54± 16,67*	112,00 ± 10,22*§	128,92 ±15,69*§†
ADP (U)	43,33 ±4,52	64,17 ± 4,84*	74,08 ± 2,59*§	100,67 ±15,44*§†
%SATadp	40,42±13,33	31,20±11,82*	33,16±7,03	21,53±10,16*§†
ASPI (U)	29,30±12,02	41,33±19,98	43,17±9,96	58,00±25,83*
%SATaspi	60,13±17,55	57,92±13,64	60,91±9,89	57,79±16,87
Trombociti (n)	203,25±49,0	254,69±48,3 *	278,54±65,4 *	271,41± 44,5*
%rP	2,89±1,15	3,13±1,01	3,93±1,39	3,76±1,42
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	29,53±4,99	30,18±3,49	31,23±3,56	32,60±4,52
OS (cm)	105,25±4,27	106,77±2,97	109,38±9,99	113,92±12,79
IRI (mU/l)	15,58±5,42	16,64±4,51	18,10±9,11	23,21±6,86 *§
HOMA-IR	5,10±2,26	5,71±1,97	6,72±3,33	7,02±2,50
Neutrofili (n)	3,83±1,18	3,54±1,23	4,17±1,28	5,32±2,38*§
NLR	1,55±0,70	1,68±0,85	2,07±0,64	3,14±2,83 * §
hsCRP (mg/l)	1,73±1,53	3,79±3,33	5,58±3,48*	5,35±2,20 *
D – dimer (ng/ml)	220,91±123,66	285,69±137,90	273,38±149,76	362,08±142,42

\* LSD Fisher`s, (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi I kvartila

§ LSD Fisher`s, (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi II kvartila

†LSD, Fisher`s (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi III kvartila

#### 4.5.2. Analiza agregabilnosti trombocita i odgovora na antitrombocitnu terapiju u podgrupama prema kvartilnoj distribuciji ADP testa kod bolesnika bez dijabetesa (Grupa II – nonDM)

##### Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi II– nonDM

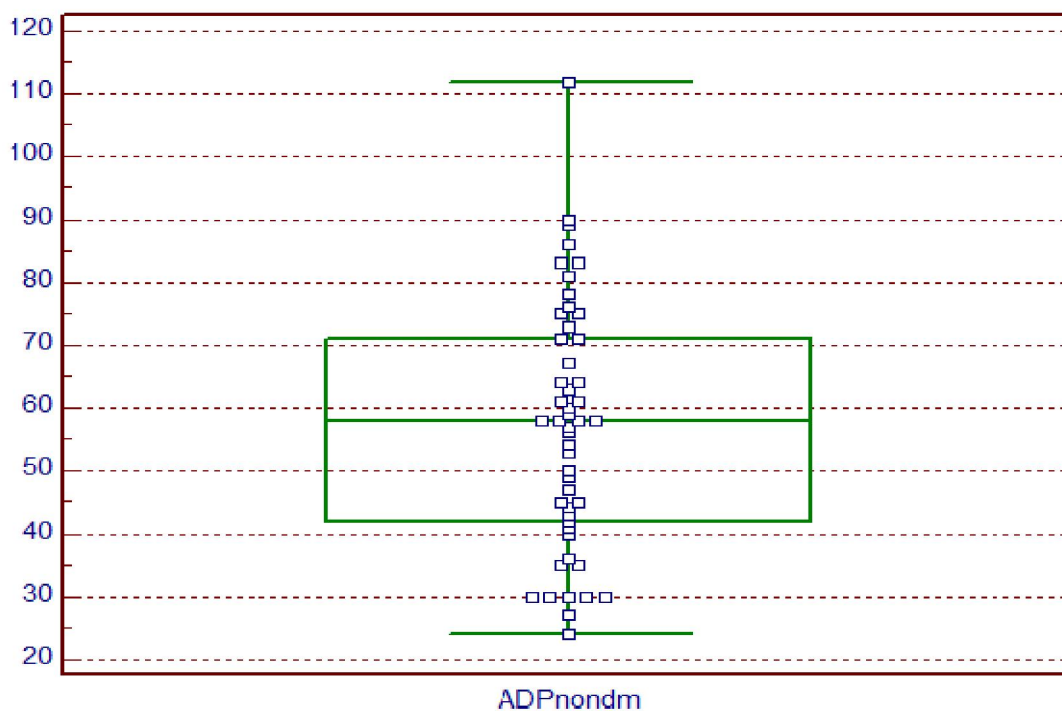
Urađena je podela na četiri podgrupe unutar Grupe II - nonDM na osnovu kvartilne distribucije ADP testa, prema čijoj vrednosti se definiše rezidualna aktivnost trombocita pod dejstvom terapije klopidozola. (Tabela 47 i Grafikon 14)

U ovoj ispitivanoj grupi, kod dva bolesnika došlo je do ponovljenog aterotromboznog akcidenta, i to 1 (6%) u drugom kvartilu i 1 (8%) u četvrtom kvartilu.

Tabela 47. Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi II-nonDM

<i>Parametar</i>	<i>Kvartil I</i> <i>n=12</i>	<i>Kvartil II</i> <i>n=16</i>	<i>Kvartil III</i> <i>n=10</i>	<i>Kvartil IV</i> <i>n=12</i>
<i>ADP (U)</i>	<i>&lt; 41,70</i>	<i>41,70 - 58,00</i>	<i>58,10 - 71,50</i>	<i>&gt;71,50</i>
<i>Ponovna tromboza</i>	<i>0</i>	<i>1(6)</i>	<i>0</i>	<i>1(8)</i>

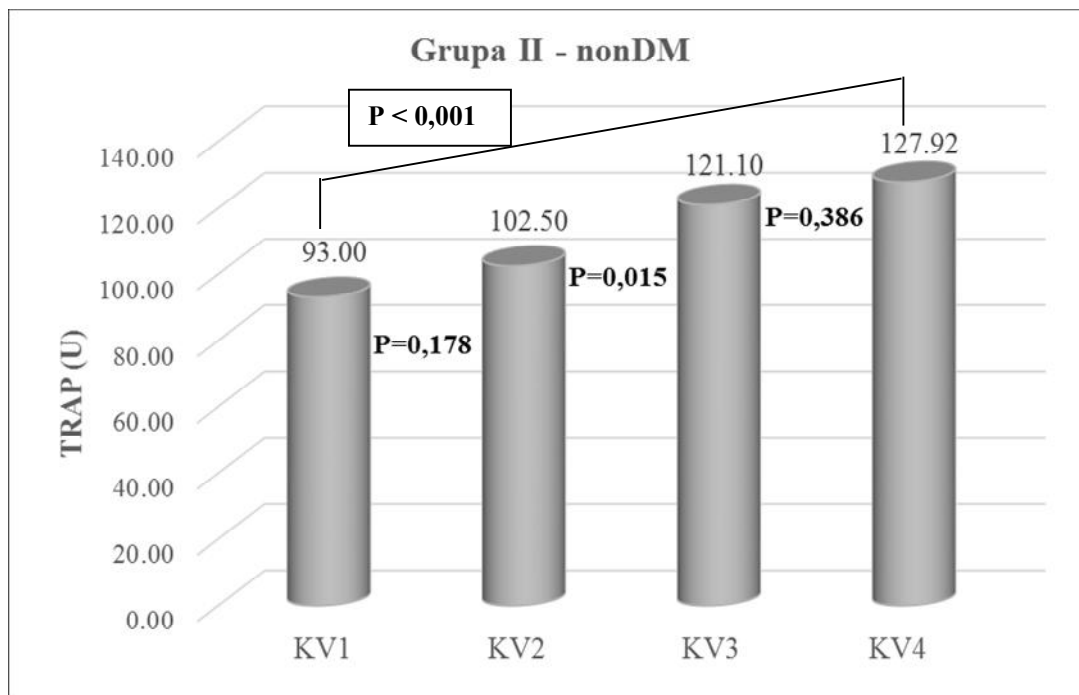
*Legenda: Rezultati su prikazani kao n (%)*



Grafikon 14. Podela na kvartile prema vrednosti ADP testa u Grupi II – nonDM

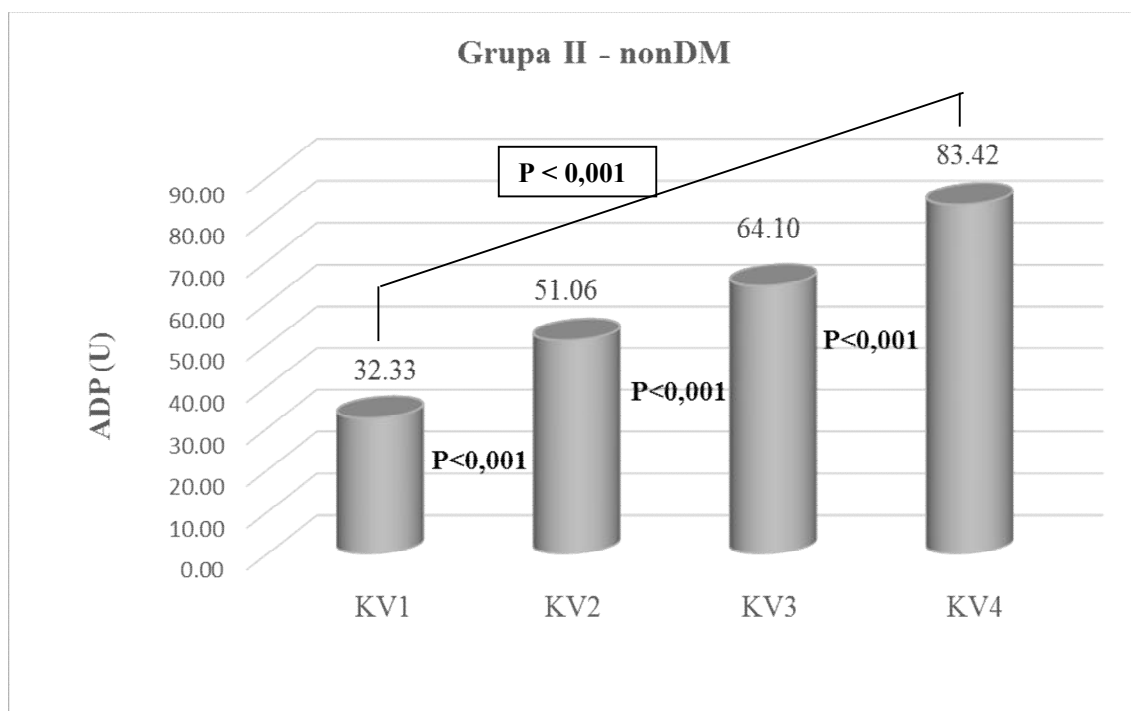
Primenom Fišerovog LSD testa (post hoc test), urađeno je poređenje nivoa TRAP testa, ADP testa, %SATadp, ASPI testa i %SATaspi između podgrupa konstruisanih prema ADP kvartilnoj distribuciji.

Grafikon 15 prikazuje signifikantan porast vrednosti TRAP testa od prvog do četvrtog kvartila ( $93,0 \pm 18,04$  vs.  $127,90 \pm 19,27$  U;  $p < 0,001$ ). Takođe se uočava signifikantno viša vrednost TRAP testa između drugog i trećeg kvartila ( $102,50 \pm 17,54$  vs.  $121,10 \pm 18,07$  U;  $p = 0,015$ ), dok nema razlike između vrednosti TRAP testa između prvog i drugog ( $93,00 \pm 18,04$  vs.  $102,50 \pm 17,54$ ;  $p = 0,178$ ) kao ni između trećeg i četvrtog kvartila ( $121,10 \pm 18,07 \pm 127,90 \pm 19,27$  U;  $p = 0,386$ ). (Grafikon 15 i Tabela 48)



Grafikon 15 . Distribucija vrednosti TRAP testa prema kvartilima u Grupi II –nonDM

Grafikon 16 prikazuje porast vrednosti ADP testa, tj. rezidualne aktivnosti trombocita od najmanjeg do najvećeg kvartila, sa statistički signifikantnom razlikom na nivou  $p < 0,001$  između svakog pojedinog ispitivanog kvartila; ( $32,33 \pm 5,10$  vs.  $51,06 \pm 6,09$  vs.  $64,10 \pm 4,31$  vs.  $83,42 \pm 10,61$  U;  $p < 0,001$ ). (Grafikon 16 i Tabela 48)



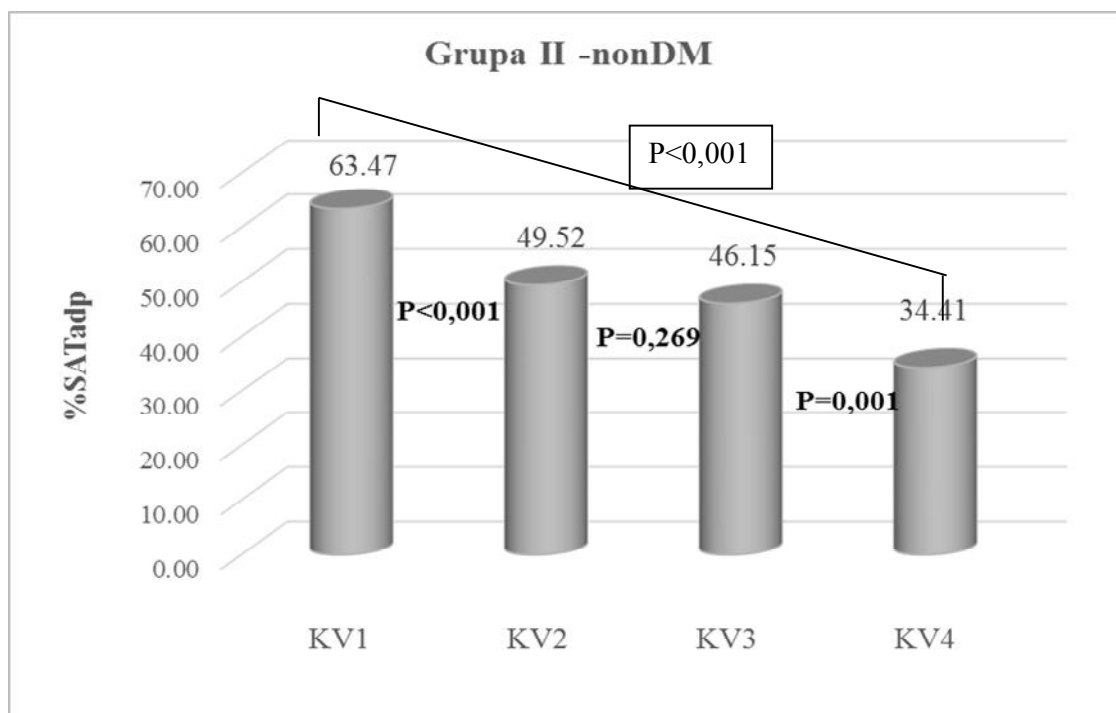
Grafikon 16. Distribucija vrednosti ADP testa prema kvartilima u Grupi II – nonDM

Analizirajući odgovor na terapiju klopidogetrom, na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, ( $\%SAT_{adp} = 100 \times (1 - ADP/TRAP)$ ), ustanovljeno je da postoji tendencija signifikantnog pada nivoa  $\%SAT_{adp}$  počevši od prvog prema četvrtom kvartilu. Uočeno je da su najveći procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, imali ispitanici u prvom kvartilu ADP-a, gde je preostala i najmanja rezidualna aktivnost trombocita te je nivo  $\%SAT_{adp}$  prvog kvartila signifikantno viši u odnosu na  $\%SAT_{adp}$  drugog kvartila ( $63,50 \pm 10,95$  vs.  $49,50 \pm 5,64$  %;  $p < 0,001$ ). Nije bilo signifikantne razlike u  $\%SAT_{adp}$  između drugog i trećeg kvartila ( $49,50 \pm 5,64$  vs.  $46,10 \pm 7,79$  %;  $p = 0,269$ ). Signifikantno niži  $\%SAT_{adp}$  su imali ispitanici u podgrupi četvrtog kvartila u odnosu na  $\%SAT_{adp}$  trećeg kvartila ( $34,40 \pm 4,63$  vs.  $46,10 \pm 7,79$  %;  $p = 0,001$ ). (Tabela 48 i Grafikon 17)

Na osnovu prethodnih analiza, u četvrtom kvartilu je konstatovan najlošiji odgovor na terapiju klopidogetrom procenjen putem  $\%SAT_{adp}$  kao i najviša vrednost rezidualne aktivnosti trombocita procenjena vrednošću ADP testa. Takođe, najbolji odgovor na terapiju

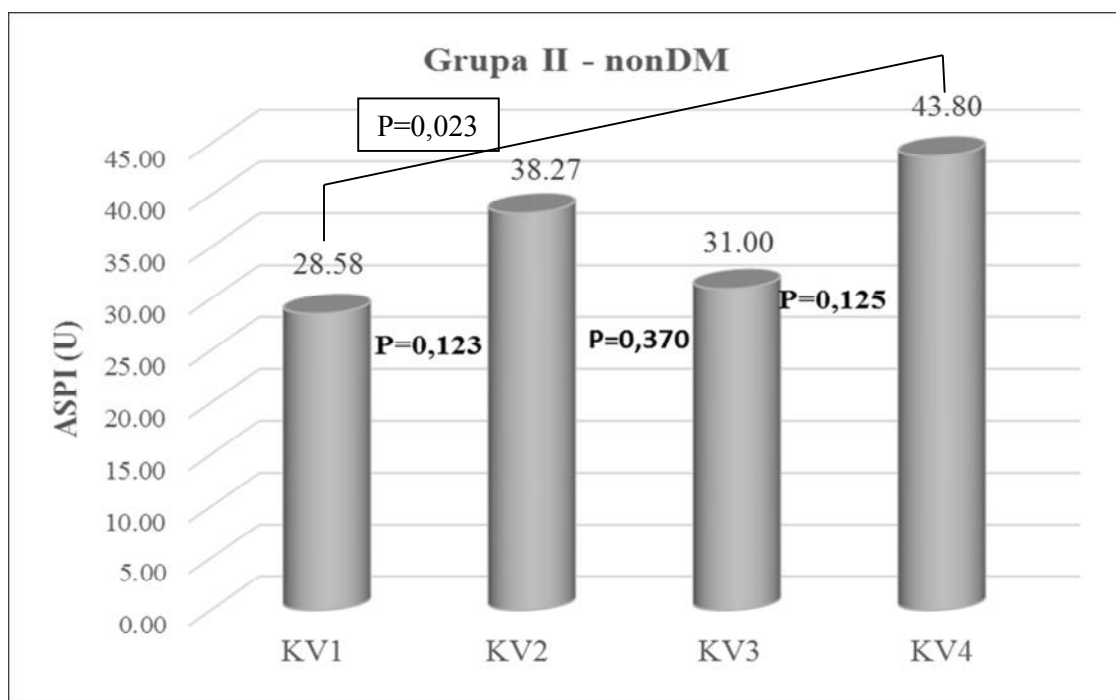


klopidogrelom ustanovljen je kod ispitanika u prvom kvartilu, gde je bio najveći %SATadp i najmanja rezidualna aktivnost trombocita procenjena ADP testom. (Grafikoni 16 i 17)



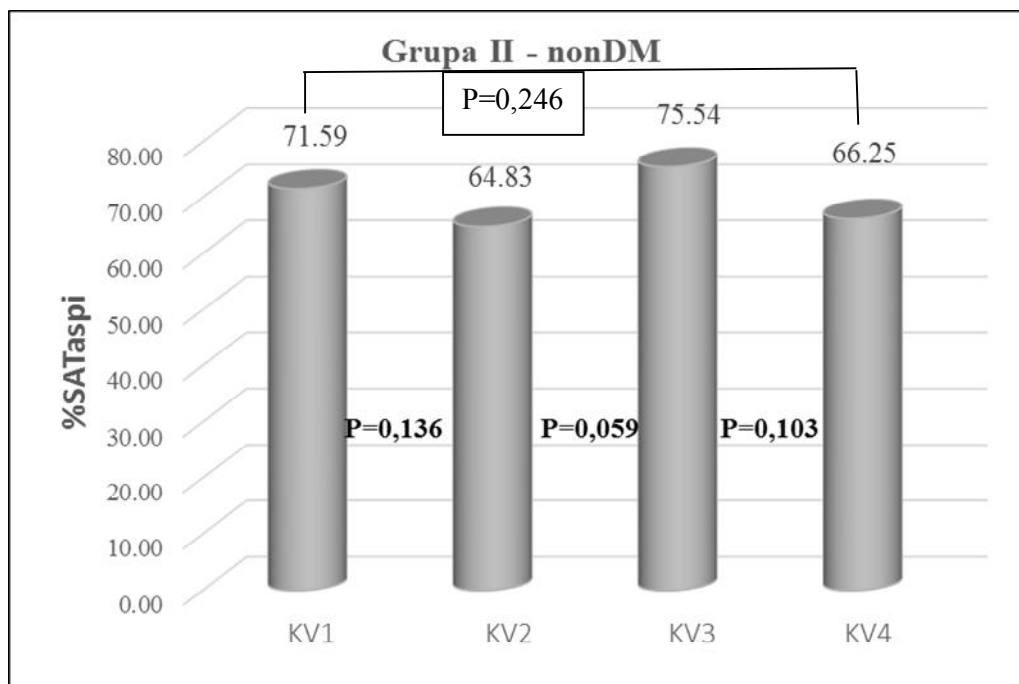
Grafikon 17. Distribucija vrednosti %SATadp prema kvartilima u Grupi II –nonDM

Grafikon 18 prikazuje statistički signifikantnu razliku u vrednosti ASPI testa između prvog i četvrtog kvartila ( $28,00 \pm 10,68$  vs.  $43,80 \pm 15,59$ ;  $p=0,023$ ). Međutim, nije bilo statistički signifikantne razlike između vrednosti ASPI testa između prvog i drugog ( $28,0 \pm 10,68$  vs.  $38,3 \pm 19,06$ ;  $p=0,123$ ), drugog i trećeg ( $38,3 \pm 19,06$  vs.  $31,0 \pm 6,96$ ;  $p=0,370$ ) kao ni između trećeg i četvrtog kvartila ( $31,0 \pm 6,96$  vs.  $43,8 \pm 15,59$ ;  $p=0,125$ ). (Tabela 48 i Grafikon 18)



Grafikon 18. Distribucija vrednosti ASPI testa prema kvartilima u Grupi II – nonDM

Analizirajući odgovor na terapiju aspirinom, na osnovu procenta sniženja bazalne agregabilnosti trombocita, ( $\%SAT_{aspi} = 100 \times (1 - ASPI/TRAP)$ ), ustanovljeno je da ne postoji razlika u procentu sniženja bazalne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom između poređenih podgrupa prema kvartilnoj raspodeli ( $p > 0,005$ ; sve). (Tabela 48 i Grafikon 19)



Grafikon 19. Distribucija vrednosti %SATaspi prema kvartilima u Grupi II – nonDM

U Tabeli 48 izdvojio se i statistički značajno veći broj trombocita i neutrofila u trećem kvartilu u odnosu na njihove vrednosti u prvom i drugom kvartilu.

Posmatrajući ostale analizirane parametre (%rP, ITM, OS, IRI, HOMA-IR, NLR, hsCRP i D-dimer) nije primećen trend njihovog porasta od prvog do četvrtog kvartila. (Tabela 48)

Tabela 48. Analiza laboratorijskih parametara prema kvartilima ADP-a u Grupi II – nonDM

Parametar	1 kvartil n=12	2 kvartil n=16	3 kvartil n=10	4 kvartil n=12
TRAP (U)	93,0±18,04	102,50±17,54	121,10±18,07	127,90±19,27
ADP (U)	32,33 ±5,10	51,06 ± 6,09	64,10 ± 4,31*§	83,42 ±10,61*§
%SATadp	63,50±10,95	49,50±5,64*	46,10±7,79*	34,40±4,63*§†
ASPI (U)	28,00±10,68	38,3±19,06	31,0±6,96	43,8±15,59*
%SATaspi	71,6±9,65	64,8±11,59	75,5±5,66	66,2±10,37
Trombociti (n)	232,25±56,62	247,87±56,52	318,20±52,02*§	241,20±56,05
%rP	2,16±1,73	2,60±1,17	2,31±1,16	2,06±1,15
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	25,42±3,48	26,22±3,34	24,39±2,59	24,18±4,42
OS (cm)	90,16±11,24	97,25±9,34	89,70±9,98	88,08±13,38
IRI (mU/l)	11,19±6,84	12,73±7,02	12,47±6,13	10,25±4,84
HOMA-IR	2,67±1,75	3,27±1,72	3,06±1,56	2,51±1,20
Neutrofili (n)	3,38±0,80	3,84±1,27	5,08±1,54*§	4,21±1,43
NLR	1,58±0,55	2,14±1,28	2,03±0,69	1,74±0,48
hsCRP (mg/l)	1,33±1,58	2,74±1,03	1,87±1,94	1,59±2,18
D – dimer (ng/ml)	209,75±89,82	181,31±87,62	211,40±72,09	221,58±153,29

\* LSD Fisher's (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi I kvartila

§ LSD Fisher's (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi II kvartila

† LSD Fisher's (post hoc test), statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednost u podgrupi III kvartila

## 5. DISKUSIJA

Dijabetes melitus je kompleksna metabolička bolest tokom koje nastaju brojne promene na različitim segmenatima vaskularnog korita. Iako je veza između T2DM i nastanka kardiovaskularnih bolesti davno ustanovljena, razotkrivanje kompleksnih patofizioloških procesa koji dovode do različitih vaskularnih događaja je i dalje predmet istraživanja. Uzročno posledične veze pojedinih komponenata specifičnog metaboličkog miljea T2DM (visceralni tip gojaznosti, insulinska rezistencija, hiperinsulinizam, hiperglikemija, aterogena dislipidemija) indukuju odvijanje začaranog kruga unutar samog zida krvnog suda promovišući aterogenezu i nastanak aterotromboznih komplikacija. Ovi procesi obuhvataju endotelnu disfunkciju, oksidativni stres, hroničnu inflamaciju, hiperaktivnost i aktivaciju trombocita te narušavanje ravnoteže procesa koagulacije i fibrinolize od najranijih faza razvoja samog dijabetesa (4,246). Istraživanje kompleksnih uzročno posledičnih veza ovog složenog metaboličko - vaskularnog poremećaja, omogućava ne samo primarnu prevenciju nastanka već i efikasnu terapiju već nastalih aterotromboznih komplikacija.

Rezultati naše studije ukazuju na postojanje značajno povišenih koncentracija cirkulišućih biomarkera endotelne aktivacije, sE-selektina i vWF Ag-a, povišenog nivoa biomarkera trombocitne aktivacije, sP-selektina, kao i visokog stepena rezidualne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrelom udruženo sa višim stepenom rezistencije na ovu vrstu antiagregacione terapije kod bolesnika sa T2DM u odnosu na bolesnike sa arterijskim ishemijskim oboljenjem bez dijabetesa. Takođe, u grupi dijabetičara su učestaliji ponovljeni aterotrombozni akcidenti.

Ispitivanjem smo utvrdili da je u grupi dijabetičara prisutan specifičan metaboličko – inflamatorni status koji se ogleda u postojanju gojaznosti, visceralnog tipa, prisustva insulinske rezistencije, hiperinsulinemije, hiperglikemije, dislipidemije i hronične

inflamatorne komponente niskog stepena. U ovih bolesnika postoji značajno viši stepen endotelne i trombocitne aktivacije uz postojanje hiperkoagulabilnosti u odnosu na ispitanike bez dijabetesa.

Analizom niza metaboličkih, inflamatornih, trombocitnih i endotelnih parametara, utvrdili smo postojanje povezanosti nepovoljnog metaboličkog statusa, endotelne disfunkcije, inflamacije i aktivacije trombocita, kako međusobno, tako i sa stepenom agregabilnosti trombocita pod dejstvom terapije klopidogrela i odgovorom na ovu vrstu antitrombocitne terapije u grupi bolesnika sa T2DM.

Antitrombocitna terapija je kamen temeljac moderne farmakoterapije kardiovaskularnih aterotromboznih bolesti, a dvojna antitrombocitna terapija klopidogrelom i aspirinom je najčešće primenjivana u lečenju akutnih ishemijskih događaja (247). Takođe, ovaj vid terapije se smatra superiornim u odnosu na primenu samog aspirina u cilju prevencije rekurentnih aterotromboznih ataka što je od posebnog značaja kod bolesnika sa T2DM (248).

Mnogobrojne studije su ukazale na to da uprkos primeni dvojne antiagregacione terapije, u jednog broja bolesnika dolazi do ponavljanih aterotromboza. Istraživanjem ovog fenomena, uspostavljena je moguća veza između stepena rezidualne trombocitne aktivnosti, merene različitim laboratorijskim testovima, i nepovoljnog kliničkog ishoda, što ukazuje da u osnovi ovih kliničkih događaja leži zapravo rezistencija na antiagregacionu terapiju (247). Smanjen odgovor na terapiju klopidogrelom, bez obzira na primenu dvojne antiagregacione terapije, smatra se jednim od najvažnijih razloga za nastanak ponavljanih ishemijskih događaja. Međutim, brojne studije koje su ispitivale fenomen rezistencije na klopidogrel, pokazale su veliku različitost objavljenih rezultata, kako s laboratorijske, tako i sa kliničke tačke gledišta te je interindividualna varijabilnost odgovora na primenjeni klopidogrel postao klinički entitet koji se sve više istražuje (216, 249). Ono što bi mogao biti uzrok disperzije rezultata učestalosti i stepena rezistencije na terapiju klopidogrelom jeste svakako dizajn

opservacionih studija koje su koristile različite dozne režime, pratile često heterogene grupe bolesnika u različitim vremenskim intervalima te koristile različite vrste laboratorijske evaluacije funkcije trombocita nakon primenjene terapije (250). Takođe, nisu sve studije na jednak način tretirale moguće farmakogenomske, farmakodinamske i farmakokinetske mehanizme nastanka rezistencije na ovaj lek (247). Veliki problem predstavlja mogućnost upoređivanja rezultata ovih studija usled korištenja različitih laboratorijskih metodologija u cilju evaluacije odgovora na antitrombocitnu terapiju (216). Laboratorijska rezistencija na klopido­gre­l (in vitro neadekvatno blokiranje trombocitne reaktivnosti bez obzira na primenjenu antitrombocitnu terapiju) ovisi uveliko o primenjenoj metodologiji, načinu i vremenu uzorkovanja krvi, primenjenoj dozi leka i izabranoj graničnoj vrednosti koja kvantifikuje rezidualnu trombocitnu aktivnost u toku antitrombocitne terapije što je i jedan od razloga širokog raspona od 4 – 44% detektovane rezistencije na klopido­gre­l u različitim studijama (216, 249, 251). S kliničke tačke gledišta, manifestacije rezistencije na klopido­gre­l su ipak manje učestale (249). U zavisnosti od dizajna studije, heterogenosti grupa uključenih ispitanika i vremenskog intervala praćenja, incidenca nepovoljnog ishemijskog događaja kod bolesnika na terapiji klopido­gre­lom varira od 0,6%, kod kratkoročnog praćenja unutar mesec dana nakon PCI, (252) do 19,7%, kod dvogodišnjeg praćenja ispitanika sa T2DM (253).

Pošto su uočeni nedostaci praćenja efikasnosti odgovora na terapiju klopido­gre­lom merenjem promene vrednosti ADP-om indukovane agregabilnosti pod terapijom, u odnosu na njenu bazalnu vrednost pre uvođenja terapije, 2010. godine, konsenzusom je predloženo laboratorijsko praćenje apsolutnog nivoa reaktivnosti trombocita pod terapijom (eng. on-treatment platelet reactivity). Ovo se smatralo boljom laboratorijskom merom tromboznog rizika nego do tada primenjivani odgovor na terapiju klopido­gre­lom. Na osnovu mnogobrojnih izvedenih kliničkih studija, definisane su granične vrednosti ovog parametra, merenog različitim laboratorijskim metodologijama, ali samo u cilju stratifikacije rizika za

ishemijski događaj nakon PCI, uključujući restenozu stenta i bez posebnog izdvajanja bolesnika sa dijabetesom i/ili onih sa AKS kod kojih nije izvedena PCI, kao i bolesnika sa drugim tipom ishemijske bolesti (231).

Veoma mali broj do sada izvedenih prospektivnih studija, koje su ispitivale efikasnost primenjene terapije klopidogetrom, su posebno izdvojile grupu bolesnika sa T2DM, bez obzira na saznanje o hiperaktivnosti "dijabetičkih" trombocita *per se* (247). Poslednje studije ukazuju na to da je prevalenca rezistencije na klopidogetrom veća u dijabetičara u odnosu na bolesnike bez dijabetesa (216, 254) te da dugotrajna dvojna terapija nije efikasnija kod dijabetičara u odnosu na primenu samog aspirina (254, 255). Kompleksne multikauzalne veze između različitih kliničkih, genetskih i ćelijskih faktora mogle bi biti uzrokom lošeg odgovora na klopidogetrom i povećanu aktivnost trombocita pod antitrombocitnom terapijom (220, 255, 256). Različiti metabolički, inflamatorni i ćelularni poremećaji koji uslovljavaju nastanak endotelne disfunkcije, prokoagulantnog stanja i trombocitne hiperaktivnosti svakako povećavaju aterotrombozni rizik kod bolesnika sa T2DM (193).

U našoj studiji, procenu efikasnosti antiagregacione terapije vršili smo metodom impedantne agregometrije (MEA). Istraživanja su pokazala da postoji visok stepen korelacije ove metode sa LTA koja se smatrala istorijskim "zlatnim standardom" monitoringa trombocitne funkcije (257), postoji mogućnost detekcije visokog stepena rezidualne reaktivnosti trombocita pod terapijom klopidogetrom (258), a pojedine studije su ukazale na dobru specifičnost i senzitivnost ove metodologije u predikciji rizika za nastanak tromboze nakon ugradnje stenta (252, 259). Unazad nekoliko godina, izvedeno je više studija koje su ukazale ne samo na visok stepen korelacije, već i usaglašenost najčešće upotrebljivanih laboratorijskih metoda za procenu funkcije trombocita (impedantna agregometrija, VASP, VerifyNow i LTA) pod dejstvom antitrombocitne terapije klopidogetrom, što ukazuje na mogućnost njihovog paralelnog korištenja (260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269).



(Prilog 1 i 2) Takođe, određeni autori su napravili iskorak u tim studijama i jasno ukazali na prednost korištenja Multiplate agregometrije kao pouzdane metode evaluacije funkcije trombocita u odnosu na druge pomenute metode u proceni rizika za nastanak nepovoljnog ishemijskog događaja. (261, 259). Imajući u vidu ove podatke, u našoj studiji, u cilju ispitivanja mogućnosti procene efikasnosti primenjene antitrombocitne terapije tienopiridinima impedantnom agregometrijom u bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova nismo komparirali metodu impedantne agregometrije sa drugim metodama testiranja funkcije trombocita već smo prihvatili impedantnu agregometriju kao metodu izbora.

Imajući u vidu novije preporuke o mogućnostima evaluacije efekta antitrombocitne terapije tienopiridinima, (231) merili smo nivo ADP testa, čije vrednosti su ukazivale na ADP-om indukovanu agregabilnost trombocita tj. stepen trombocitne reaktivnosti pod terapijom klopidogetrom. Nivo izmerenog ADP-a, smatran je merom postojeće, rezidualne agregabilnosti trombocita pod dejstvom primenjene terapije.

Osim toga, u cilju procene odgovora na terapiju klopidogetrom izračunavali smo procenat sniženja ukupne bazalne agregabilnosti trombocita nakon primenjene terapije klopidogetrom, %SATadp. Na ovaj način smo hteli da evaluiramo odgovor na terapiju klopidogetrom i njegovu sposobnost da redukuje agregabilnost trombocita. Izmereni nivo TRAP testa, služio je kao mera ukupne bazalne agregabilnosti trombocita kod bolesnika na terapiji klopidogetrom (i aspirinom) jer terapija klopidogetrom ispoljava veoma mali uticaj, a terapija acetilsalicilnom kiselinom nema uticaja na njegovu vrednost.

Gremmel i autori su ispitali mogućnost korištenja TRAP testa kao pozitivne kontrole prilikom evaluacije rezidualne trombocitne agregabilnosti indukovane ADP-om kod ispitanika na terapiji klopidogetrom. Najveći stepen linearne korelacije uočen je upravo između ADP-om i TRAP-om indukovane agregabilnosti ( $r=0,72;p<0,001$ ) merene metodom impedantne agregometrije (MEA) za razliku od ostalih testiranih metodologija gde je stepen

korelacije bio znatno niži ili odsutan. Smatra se da je uzrok ovako visoke korelacije sam princip laboratorijske metodologije kojom se detektuje agregabilnost trombocita indukovana ovim agonistima, ali da postoji mogućnost *in vitro* većeg uticaja klopido-rela na TRAP-om indukovanu agregabilnost. Autori su zaključili da upotreba TRAP testa kao pozitivne kontrole može biti ograničena samo na MEA metodologiju, uz opreznu interpretaciju rezultata kod pojedinog bolesnika (270). Kada smo u našoj studiji testirali korelaciju TRAP-om i ADP-om indukovane agregabilnosti, uočili smo takođe snažan stepen povezanosti između ovih parametara u obe ispitivane grupe: Grupa I -T2DM ( $r=0,786$ ;  $p<0,001$ ); Grupa II – nonDM ( $r=0,695$ ;  $p<0,001$ ). Na taj način, unutar same metode impedantne agregometrije, koristili smo zapravo dva načina evaluacije agregabilnosti trombocita pod terapijom klopido-grelom, i to opšte prihvaćenim merenjem nivoa ADP testa, kao i utvrđivanjem %SATadp, kao pokazateljem odgovora na terapiju klopido-grelom, a koji su pokazali visok stepen međusobne inverzne korelacije (ADP:%SATadp;  $r= -0,577$ ;  $p<0,001$ ).

Svi bolesnici, u obe ispitivane grupe, bili su na kontinuiranoj terapiji klopido-grelom u dozi od 75 mg/dan. Analiziranjem ispitivanih parametara agregabilnosti i odgovora na terapiju klopido-grelom, uočili smo da bolesnici sa T2DM imaju statistički značajno više vrednosti ADP testa ( $70,3\pm 22,0$  vs.  $56,9\pm 19,7$  U;  $p=0,002$ ) u odnosu na bolesnike bez dijabetesa koji su takođe lečeni klopido-grelom, što znači da kod ovih bolesnika postoji mnogo viši stepen rezidualne agregabilnosti trombocita, bez obzira na primenjenu antiagregacionu terapiju klopido-grelom. Takođe, srednja vrednost ADP-om indukovane agregabilnosti u grupi dijabetičara, nalazi se gotovo u sredini referentnog intervala za primenjenu metodu (55 – 117 U), što dodatno govori u prilog nedovoljnoj supresiji agregabilnosti trombocita primenjenim klopido-grelom. Uočljiva je i mnogo manja razlika između nivoa ADP testa u dijabetičara nego bolesnika bez dijabetesa u odnosu na iste vrednosti u KG bez terapije klopido-grelom ( $70,3\pm 22,0$  vs.  $56,9\pm 19,7$  vs.  $82,6\pm 17,0$  U). S obzirom da nije bilo statistički značajne razlike

u nivou bazalne agregabilnosti trombocita, procenjene TRAP testom, između ove dve ispitivane grupe u našoj studiji, a uočen je značajno niži stepen procenta sniženja bazalne agregabilnosti, %SATadp, u dijabetičara u odnosu na ispitanike bez dijabetesa ( $31,6 \pm 12,4$  vs.  $48,6 \pm 12,6$  %;  $p < 0,001$ ), smatrali smo da bi za to bi mogla biti odgovorna upravo povišena rezidualna aktivnost trombocita kod ovih bolesnika. Ovakvi nalazi ADP-om indukovane agregabilnosti i %SATadp ukazuju na ukupno smanjen odgovor na terapiju klopidogetrom kod dijabetičara tj. viši stepen rezistencije na primenjenu terapiju u odnosu na bolesnike bez dijabetesa. (Tabela 12)

Smanjen odgovor na terapiju klopidogetrom može biti uzrokovan nizom genetskih, metaboličkih i celularnih faktora kao i uticajem prateće terapije u vidu statina, blokatora kalcijumskih kanala i pojedinih inhibitora protonske pumpe (271). Ograničenje naše studije se ogleda u tome što se nismo bavili ispitivanjem genetskih determinanti odgovora na klopidogetrom, ali što se tiče konkomitantne terapije koju su uzimali bolesnici, nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa, tako da je potencijalni uticaj ovih lekova na terapijski odgovor klopidogetrom bio jednak u svih ispitanika. (Tabela 3)

Iako postoji više determinanti odgovora na antitrombocitnu terapiju, mi smo ispitivali dve, za populaciju dijabetičara veoma važne determinante, a to su hiperreaktivnost "dijabetičnih" trombocita i endotelna disfunkcija. Upravo ove dve determinante su uveliko uslovljene postojanjem specifičnog metaboličko - inflamatornog statusa bolesnika sa dijabetesom. S obzirom da su dijabetičari zbog svog specifičnog metaboličkog miljea populacija bolesnika ne samo sa visokim kardiovaskularnim rizikom, već i rizikom za nastanak rekurentnih arterijskih ishemijskih događaja (255), u našoj studiji smo ispitivali pojedine laboratorijske parametre, pokazatelje metaboličkog statusa, parametre inflamacije, endotelne i trombocitne aktivacije, njihove međusobne kao i povezanosti sa pokazateljima odgovora na antitrombocitnu terapiju.

Analiziranjem antropometrijskih parametara uočili smo da bolesnici sa T2DM, imaju statistički značajno više vrednosti ITM u odnosu na ispitanike sa arterijskom bolešću krvnih sudova koji nemaju dijabetes ( $30,8 \pm 4,17$  vs.  $25,2 \pm 3,54$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ). Takođe, ITM je statistički značajno viši kod bolesnika sa T2DM u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, dok nije bilo statistički značajne razlike između srednje vrednosti ITM između grupe ispitanika bez dijabetesa i KG. Daljim ispitivanjem distribucije masnog tkiva u odnosu na postojanje perifernog ili abdominalnog tipa gojaznosti, merenjem obima struka i odnosa obima struka i telesne visine, WHtR, utvrdili smo da su ispitanici sa T2DM imali statistički značajno više vrednosti ovih antropometrijskih parametara kako u odnosu na KG tako i na ispitivanu grupu bolesnika bez dijabetesa, a da nije bilo statistički značajne razlike u srednjoj vrednosti OS i WHtR između grupe bez dijabetesa i kontrolne grupe zdravih ispitanika. (Tabela 4)

Vrednosti ispitivanih antropometrijskih parametara, ukazuju na postojanje visceralnog, abdominalnog tipa gojaznosti. Gojaznost karakterišu različiti endokrini, inflamatorni, neurohumoralni i celularni poremećaji, a njihovo dinamično uzajamno delovanje čini patofiziološku osnovu nastanka insulinske rezistencije, a sa gojaznošću povezana insulinska rezistencija predstavlja visok rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti (272,273,274). Hsieh i autori su ukazali na značajan doprinos WHtR, kao pokazatelja visceralne distribucije masnog tkiva, u predikciji koronarne srčane bolesti (275,276).

Ispitanici sa T2DM imali su statistički značajno više vrednosti indeksa insulinske rezistencije, HOMA-IR, u odnosu na ispitanike bez dijabetesa ( $6,14 \pm 2,61$  vs.  $2,91 \pm 1,57$ ;  $p < 0,001$ ) kao i kontrolne grupe zdravih, ( $6,14 \pm 2,61$  vs.  $2,41 \pm 1,07$ ;  $p < 0,001$ ) dok nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima HOMA-IR između grupe bolesnika bez dijabetesa i KG. Takođe, dijabetičari su imali signifikantno više vrednosti insulina našte u odnosu na druge dve ispitivane grupe što je u skladu sa činjenicom da rezistenciju na

delovanje insulina, u slučaju očuvanog sekretornog kapaciteta  $\beta$  ćelija pankreasa, prati kompenzatorna hiperinsulinemija, a što je potkrepljeno rezultatom statistički značajno višeg sekretornog indeksa, HOMA-B, kod bolesnika sa T2DM u odnosu na grupu bez dijabetesa i KG. Iako na terapiji metforminom, kod bolesnika sa T2DM, konstatovane su statistički značajno povišene vrednosti glukoze ( $7,67 \pm 2,33$  vs.  $5,55 \pm 0,54$  vs.  $5,14 \pm 0,48$  mmol/l) i HbA1c ( $51,0 \pm 13,8$  vs.  $37,1 \pm 2,78$  vs.  $34,7 \pm 3,06$  mmol/mol) u odnosu na druge dve ispitivane grupe, mada se srednja vrednost HbA1c, u grupi dijabetičara, nalazila u okviru željenog terapijskog opsega prema ADA preporukama (14). (Tabela 5)

Podaci prospektivne Verona studije pokazali su da prisustvo metaboličkog sindroma, čiju okosnicu čini insulinska rezistencija, a koja je uveliko prisutna kod naših ispitanika sa dijabetesom, povećava čak pet puta rizik za razvoj koronarne, periferne i cerebrovaskularne bolesti u osoba sa T2DM (277), a da je HOMA-IR, direktni nezavisni prediktor nastanka kardiovaskularnih događaja u osoba sa T2DM (278). Smatra se da insulinska rezistencija nezavisno od ostalih klasičnih faktora rizika doprinosi nastanku različitih kardiovaskularnih bolesti te da predstavlja vezu dijabetesa i nastanka kardiovaskularnih bolesti čak i bez prisustva glukozne intolerancije i hiperglikemije (279).

Analizom lipidskih parametara uočili smo da u našoj grupi dijabetičara postoje statistički značajno više vrednosti triglicerida ( $1,90 \pm 0,95$  vs.  $1,34 \pm 0,79$  mmol/l;  $p=0,009$ ) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Nivo triglicerida u ovoj grupi, bio je viši i u odnosu na ispitanike bez dijabetesa, ali na granici statističke značajnosti ( $1,90 \pm 0,95$  vs.  $1,60 \pm 0,75$  mmol/l;  $p=0,086$ ). Takođe, nivo HDL holesterola, kod dijabetičara, bio je statistički značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika ( $1,10 \pm 0,27$  vs.  $1,42 \pm 0,34$  mmol/l;  $p<0,001$ ), dok nije bilo razlike u odnosu na grupu bez dijabetesa. (Tabela 7)

Ovakav nalaz u skladu je sa činjenicom da je osnovna odlika aterogene dislipidemije koja se javlja u sklopu insulinske rezistencije upravo hipertrigliceridemija usled pojačanog

fluksa SMK u jetru i sinteze VLDL-a, a što je praćeno i snižavanjem nivoa HDL holesterola (280). Ostali lipidski parametri nisu se statistički značajno razlikovali između grupe dijabetičara i bolesnika bez dijabetesa i kontrolne grupe zdravih, što može biti objašnjeno time da je preko 80% ispitanika u obe ispitivane grupe bolesnika sa arterijskom bolešću krvnih sudova bilo kontinuirano na terapiji hipolipemicima (statini) i to najmanje tri meseca pre samog uključivanja u studiju.

Analizom parametara inflamacije, uočeno je da su ispitanici sa T2DM imali statistički značajno više vrednosti sedimentacije, fibrinogena, hsCRP-a, kao i broja leukocita i neutrofila u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, dok su vrednosti sedimentacije i hsCRP-a ( $4,14 \pm 4,46$  vs.  $1,95 \pm 2,34$  mg/l;  $p=0,003$ ) bile značajno više i u odnosu na ispitanike bez dijabetesa. (Tabela 6)

Ispitivani nivo hsCRP-a, ukazuje na postojanje hronične inflamatorne komponente niskog stepena kod bolesnika sa T2DM (281). Hronična inflamacija se smatra važnom karikom koja povezuje gojaznost, insulinsku rezistenciju i dijabetes, i igra izuzetno važnu ulogu u razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih komplikacija kod ovih bolesnika. Niz kliničkih studija ukazao je na postojanje hronične inflamatorne komponente procenjivane merenjem nivoa fibrinogena, hsCRP-a i broja leukocita u osoba sa metaboličkim sindromom, visceralnim tipom gojaznosti i dijabetesom (282). Gojaznost predstavlja proinflamatorno stanje, a adipociti i makrofazi masnog tkiva sekretujuć proinflamatorne citokine poput IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , na različite načine doprinose patogenezi insulinske rezistencije, T2DM i makrovaskularne bolesti (283,284). IL-6 stimuliše produkciju CRP-a u jetri, ali je poznato da se i sam CRP može proizvoditi u adipocitima. Niz kliničkih prospektivnih studija dokazao je da CRP nije samo inflamatorni marker, već i aktivni učesnik, efektor procesa ateroskleroze koji predstavlja prediktor razvoja ne samo koronarne srčane bolesti već i rekurentnih kardiovaskularnih događaja (285). Rezultati studija pokazuju da je i povišena koncentracija

fibrinogena povezana sa aterosklerozom i rizikom od nastanka koronarne srčane bolesti (286,287). Pojedini autori su ukazali na to da je prediktivna vrednost fibrinogena čak slična onoj za hsCRP, a zajednički efekat oba, veći je od individualnog efekta svakog pojedinačnog markera (288,289).

T2DM smatra se generalno hiperkoagulabilnim stanjem sa pomeranjem ekvilibrijuma između procesa koagulacije i fibrinolize u pravcu koagulacije. U uslovima endotelne disfunkcije i hrončne inflamacije, gube se antikoagulantna i profibrinolitička svojstva endotela. U začaranom krugu inflamacije, aktivacije endotela i trombocita, stimuliše se proces koagulacije, stvarajući prokoagulantno - protrombogenu sredinu sa visokim rizikom za nastanak aterotromboze (248).

Analiziranjem parametara koagulacije, uočili smo statistički značajno skraćanje koagulacionih testova, odnosno niže vrednosti aPTT-R (aPTT ratio) u dijabetičara u odnosu na ispitivanu grupu bez dijabetesa ( $0,897 \pm 0,086$  vs.  $0,934 \pm 0,070$ ;  $p=0,022$ ), kao i u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika ( $0,897 \pm 0,086$  vs.  $0,942 \pm 0,070$ ;  $p=0,019$ ). PT-R (PT ratio) je signifikantno niži u grupi bolesnika sa T2DM u odnosu na kontrolnu grupu ( $1,02 \pm 0,06$  vs.  $1,07 \pm 0,07$ ;  $p=0,001$ ), dok nije bilo značajne razlike PT-a u odnosu na ispitanike bez dijabetesa ( $1,02 \pm 0,06$  vs.  $1,04 \pm 0,08$ ;  $p=0,193$ ). (Tabela 10)

Značajno kraće aPTT i PT kod bolesnika sa dijabetesom reflektuje globalnu stimulisnost koagulacionog mehanizma. Usled hronične inflamacije i endotelne disfunkcije u dijabetičara, nastanku hiperkoagulabilnog stanja doprinose i povećana aktivnost trombocita, ekspresija TF-a, ekspresija vWF-a, smanjenje tPA, trombomodulina i aktivisanog proteina C, uz povećanje PAI-1, koncentracije fibrinogena i FVIII. Naši rezultati su u skladu sa objavljenim rezultatima mnogih studija koje su ukazale na hiperkoagulabilno stanje T2DM, upravo standardnim laboratorijskim testovima za procenu koagulacionog mehanizma poput PT-a i aPTT-a (290). Acang i autori su zaključili da je kraći PT i aPTT kod dugogodišnjih

dijabetičara i onih sa makrovaskularnim komplikacijama (291). Zhao i autori su ukazali na povišene vrednosti fibrinogena i znatno kraće aPTT što može biti posledica akumulacije cirkulišućih aktivisanih faktora koagulacije i smanjenja antikoagulantnih činilaca. Kraći aPTT je osetljiv marker povećanog tromboznog rizika i nastanka nepovoljnog ishemijskog događaja (292).

Nivo D – dimera bio je signifikantno viši u dijabetičara u odnosu na obe ispitivane grupe (233 (176-331) vs. 183 (139-243) vs. 138 (103-231) ng/ml). Rezultati naše studije su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su takođe ukazali na povećanu koncentraciju D dimera u osoba sa T2DM (293). Aso i autori su dokazali povećanu koncentraciju D dimera i PAI-1 u dijabetičara, kao i stimulisano procesa koagulacije i fibrinolize. Ispitivanjem parametara koagulacije i fibrinolize, zaključili su da je fibrinolitička kompenzacija hiperkoagulabilnog stanja nedovoljna u gojaznih dijabetičara, većinom zbog povećane sinteze PAI-1 (294). Korelacija nivoa D-dimera sa ukupnom agregabilnošću trombocita, iskazanom TRAP testom i rezidualnom agregabilnošću trombocita pod terapijom klopidogetrom, procenjenom ADP testom, može govoriti u prilog tome da je povećana funkcijska aktivnost trombocita kod dijabetičara značajan doprinosni činiac hiperkoagulabilnosti kod ovih bolesnika. Komarov i autori su utvrdili da D – dimer može biti nezavisni prediktor aterotromboznih događaja kod bolesnika sa PVB te da merenjem ovog parametra možemo izdvojiti osobe sa visokim rizikom za aerotrombozne komplikacije (295).

Merenjem koncentracije sE – selektina i vWF Ag – a, u mogućnosti smo da procenimo stanje endotelne funkcije, s obzirom da je oštećeni endotel ishodište ovih markera u krvi (296). Analizom solubilne forme specifičnog markera endotelne aktivacije, adhezivne molekule E-selektina, sE-selektina, uočili smo da je njegov nivo bio signifikantno viši u bolesnika sa T2DM u odnosu na bolesnike bez dijabetesa (45,1±18,1 vs. 31,8±10,5 ng/ml;p<0,001) i kontrolnu grupu zdravih ispitanika (45,1±18,1 vs. 27,2±11,2



ng/ml;  $p < 0,001$ ), dok nije bilo statistički značajne razlike u nivou ovog endotelnog markera između grupe bolesnika bez dijabetesa i kontrolne grupe zdravih. Plazmatski nivo vWF Ag, markera kojim smo takođe procenjivali stepen endotelne aktivacije, bio je statistički značajno viši u bolesnika sa T2DM u odnosu na grupu ispitanika bez dijabetesa ( $172 \pm 75,2$  vs.  $146 \pm 40,6$  %;  $p = 0,045$ ), kao i u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ( $172 \pm 75,2$  vs.  $130 \pm 33,8$  %;  $p = 0,007$ ). Nivo ovog markera bio je viši i u ispitanika bez dijabetesa u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, ali bez statistički značajne razlike. (Tabela 9)

Naši rezultati ukazuju na prisustvo značajnog stepena visceralnog tipa gojaznosti, insulinske rezistencije, hiperinsulinemije, hiperglikemije, dislipidemije i hronične inflamatorne komponente u bolesnika sa dijabetesom. Dokazano je da ovako nepovoljni metabolički uslovi kompleksnim mehanizmima hronično stimulišu vaskularni endotel i dovode do fenotipske promene endotelnih ćelija, a njihova antikoagulantna svojstva menjaju u protrombogena (193). Smatra se da povišeni nivoi, sE – selektina i vWAg-a, mogu biti ogledalo fenotipski izmenjenog vaskularnog endotela, kao i da sadrže bitan prediktivni potencijal u odnosu na kliničku manifestaciju pojedinih kardiovaskularnih oboljenja (141, 297, 298). S obzirom da naši dosadašnji rezultati ukazuju na značajan stepen aktivacije endotela kod bolesnika sa dijabetesom ispitivali smo međusobne povezanosti markera endotelne aktivacije sa metaboličkim i inflamatornim komponentama u ispitivanoj grupi dijabetičara.

Utvdili smo postojanje značajne pozitivne korelacije sE – selektina sa antropometrijskim parametrima, pokazateljima visceralnog tipa gojaznosti (ITM, OS, WHtR), kao i sa indeksom insulinske rezistencije, HOMA-IR. Naši rezultati su u skladu sa nizom izvedenih studija koje su ukazale na postojanje povezanosti ovih elemenata metaboličkog sindroma sa nastalom endotelnom disfunkcijom (299, 300), a Matsumoto i autori su ukazali na nezavisnu povezanost stepena insulinske rezistencije sa nivoom sE-selektina (301). Takođe,

povišen nivo sE -selektina, u našoj studiji je korelisao pozitivno sa inflamatornim parametrima, brojem leukocita, neutrofila i hsCRP-om, što je u skladu sa već objavljenim rezultatima studija koje su ukazale na povezanost nivoa ovog biomarkera endotelne disfunkcije sa markerima inflamacije. Ovakva vrsta i stepen povezanosti prethodnih parametara mogla bi se objasniti time da u uslovima insulinske rezistencije i hronične inflamacije, dolazi do hronične stimulacije vaskularnog endotela sa *de novo* genskom ekspresijom, sintezom proinflamatornih citokina i različitih adhezivnih molekula, što se između ostalog ogleda i u ekspresiji E-selektina (302,303). Sam CRP može delovanjem preko receptora na endotelnim ćelijama stimulisati transkripciju, sintezu i ekspresiju E-selektina (99). Detektovanjem solubilnih formi endotelnih biomarkera, dobijamo na neki način uvid u dešavanje na samom endotelu. Takođe smo uočili korelaciju nivoa sE – selektina sa vrednostima sistolnog i dijastolnog pritiska, kao i korelaciju vWF Ag-a sa nivoom sistolnog krvnog pritiska. Pojedini autori su ukazali na postojanje povišenih vrednosti sE-selektina u hipertenzivnih osoba u odnosu na normotenzivne (304,305). Danas je sve više dokaza da konstantan mehanički poticaj turbulentnim tokom krvi može dovesti do promene funkcije i strukture endotelne ćelije, kao i modulacije relevantnih gena za sintezu adhezivnih molekula preko različitih transkripcionih činilaca (306). Doprinosni faktor fenotipske konverzije ćelije kod naših dijabetičara bi mogao biti i to što se u uslovima insulinske rezistencije stimulacijom MAPK-ET1 puta uz smanjenu stimulaciju P13K-NO, smanjuje sinteza NO, a povećava ET-1, što dovodi do disbalansa između vazodilatacije i vazokonstrikcije stvarajući uslov za nastanak hipertenzije i neadekvatan odgovor krvnog suda na različite hemodinamske poticaje. Takođe, NO fiziološki stabilizuje NF-kB, održavajući ovaj transkripcioni činilac u neaktivnom stanju. U uslovima insulinske rezistencije, fenotip endotela se menja u vazokonstriktor, proaterogen i protrombogen, povećavajući rizik za nastanak aterotromboze (61,96). Eksperimentalno je dokazano da pod dejstvom turbulentnog toka krvi, u uslovima dejstva sile

mehaničkog trenja, dolazi do konformacijske promene vWF-a, njegove povećane ekspresije i posledičnog povećanog stepena adhezivnosti trombocita (307).

U cilju utvrđivanja stepena aktivacije trombocita, merili smo koncentraciju solubilne forme P-selektina, sP selektin. Nivo sP-selektina bio je statistički značajno viši kod bolesnika s T2DM u odnosu na ispitanike u grupi dijabetesa ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $84,0 \pm 21,8$  ng/ml;  $p=0,042$ ) i kontrolnoj grupi ( $95,2 \pm 31,8$  vs.  $76,7 \pm 16,2$  ng/ml;  $p=0,004$ ), dok nije bilo statistički značajne razlike u nivou sP-selektina između grupe ispitanika bez dijabetesa i kontrolne grupe zdravih. (Tabela 9)

Merenjem sP-selektina, dobijamo uvid u stanje aktivnosti trombocita, jer je predominantno trombocitnog porekla iako postoji njegova endotelna komponenta (136). Ovo je potkrepljeno eksperimentalnim dokazom da stimulacijom endotela dezmopresinom dolazi do porasta plazmatske koncentracije vWF-a, ali ne i sP-selektina (308). S obzirom da se P-selektin eksprimira samo na aktivisanim trombocitima, njegova povećana ekspresija na trombocitima dijabetičara, govori u prilog njihove hiperreaktivnosti. Saboor i autori su ukazali na povećanu ekspresiju CD62P na trombocitima bolesnika sa T2DM, a odljubljivanjem s njihove površine, nastaje solubilna forma čiji nivo možemo da merimo, a koji koreliše sa stepenom aktivacije trombocita (202). Nivo sP-selektina u našoj studiji, korelisao je sa nivoom sistolnog krvnog pritiska, što se može objasniti pojačanom aktivacijom trombocita pod dejstvom turbulentnog toka krvi, kao i pojačanom adhezivnošću i agregabilnošću trombocita indukovanom mehaničkom silom. Rioldino i autori su dokazali smanjenje sP-selektina sa normalizacijom krvnog pritiska (309).

Takođe, nivo sP-selektina je u grupi dijabetičara korelisao sa antropometrijskim parametrima, ITM, OS i WHtR-om, kao i sa indeksom insulinske rezistencije, HOMA-IR. Povišen nivo sP-selektina u ovih bolesnika ukazuje na povećanu aktivaciju trombocita, a korelacija ovih parametara sa nivoom sP-selektina, verovatno na značajan doprinos

komponenti metaboličkog sindroma trombocitnoj aktivaciji. Fiziološki, insulin putem IRS-1 receptora antagonizuje efekte trombocitnih agonista kao što su ADP, kolagen, epinefrin, PAF. U uslovima insulinske rezistencije, ovo delovanje je oslabljeno, što samim tim olakšava trombocitnu aktivaciju. Studije su pokazale da smanjenjem ITM i HOMA-IR, dolazi do smanjenja ekspresije pojedinih markera trombocitne aktivacije (307). Ekspresija P-selektina na površini trombocita, takođe je indukovana i osmotskom aktivnošću glukoze kod osoba sa dijabetesom (193).

Brojnim studijama je dokazano da dijabetičari imaju povišene nivoe inflamatornih markera i markera trombocitne aktivacije (310,311,312). Danas se zna da su trombociti veoma aktivni učesnici u procesu inflamacije, a ekspresija P-selektina i PSGL-1 uveliko doprinose ovoj ulozi trombocita. Međusobna komunikacija trombocita i leukocita amplifikuje kako leukocitnu, tako i trombocitnu aktivaciju, omogućava stvaranje trombocitno leukocitnih agregata, olakšavajući im na taj način adheziju uz endotel (200, 307). Nivo sP-selektina u grupi bolesnika sa dijabetesom, koreliše sa nivoom inflamatornog markera hsCRP-a, što bi moglo ići u prilog tome da sistemska inflamacija doprinosi trombocitnoj aktivaciji (293). Međutim, poznato je da je CRP, kao i P –selektin, veoma aktivan učesnik aterotromboznog procesa, ali pošto njihova korelacija ne daje informacije o kauzalnosti njihovog međusobnog odnosa, ne može se izvesti zaključak o mehanizmu njihove povezanosti, te da li je ona direktna ili indirektna.

Ukupna bazalna agregabilnost trombocita procenjena TRAP testom pozitivno je korelisala sa inflamatornim markerima, brojem neutrofila, NLR-om i fibrinogenom. Multivarijantnom linearnom regresijom dokazana je nezavisna povezanost fibrinogena sa nivoom TRAP testa. Ovo bi moglo ukazivati na to da na povećan ukupni potencijal reaktivnosti trombocita utiče proces inflamacije. Ang i saradnici su ukazali na nezavisnu

negativnu povezanost povišenog nivoa fibrinogena kod bolesnika sa dijabetesom sa odgovorom na klopidogrel (313).

Ispitivanjem međusobne povezanosti antropometrijskih parametara sa pokazateljima odgovora na terapiju klopidogrelom, u grupi dijabetičara smo uočili značajnu pozitivnu korelaciju ITM sa nivoom rezidualne agregabilnosti trombocita, procenjene ADP testom, kao i značajnu negativnu korelaciju ovog antropometrijskog parametra sa %SATadp. Multivarijantnom linearnom regresionom analizom, ukazali smo na postojanje nezavisne povezanosti između nivoa ITM i ADP testa. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjem Anga i saradnika koji su ispitujući odgovor na terapiju klopidogrelom u dijabetičara, utvrdili postojanje nezavisne povezanosti ITM sa odgovorom na terapiju klopidogrelom (313). U istraživanju Gremmela i autora, ITM je bio takođe nezavisno povezan sa ADP indukovanom agregabilnošću trombocita merenom MEA metodom (3314). Iako kod gojaznih osoba postoji mogućnost varijabilnosti kinetike farmakodinamskog odgovora na klopidogrel, još uvek ne postoje preporuke o povećanja preporučene doze od 75mg/dan u svrhu pokušaja prevazilaženja rezistencije, (315) ali se prema novijim istraživanjima može razmišljati u pravcu povećanja inicijalne doze klopidogrela pri izvođenja PCI (316).

Rezidualna agregabilnost trombocita indukovana ADP-om, značajno je pozitivno korelirala sa nivoom insulina i indeksom insulinske rezistencije, HOMA-IR u grupi dijabetičara. Daljim analiziranjem, u istoj ispitivanoj grupi, uočili smo značajnu, inverznu korelaciju antropometrijskih parametara, OS i WHtR, sa odgovorom na terapiju klopidogrelom, procenjenom pomoću %SATadp, kao i inverznu korelaciju ovog parametra sa nivoom insulina i HOMA-IR. Ovakvi rezultati ukazuju na znatan negativan doprinos visceralnog tipa gojaznosti i postojanja insulinske rezistencije, bitnih komponenti metaboličkog sindroma, smanjenom odgovoru na terapiju klopidogrelom u dijabetičara. U uslovima insulinske rezistencije, a usled neosetljivosti IRS-1 receptora, izostaje antagonistički

efekat insulina na dejstvo ADP-a. Iako još nije potpuno rasvetljen mehanizam, smatra se da je neosetljivost IRS-1 receptora odgovorna i za povećanje intraćelijske koncentracije kalcijuma što vodi pojačanoj trombocitnoj aktivaciji, degranulaciji i agregaciji. Osim toga, u uslovima hiperglikemije, a usled osmotske aktivnosti glikoze eksprimiraju se na površini trombocita P-selektin i CD40L, a neenzimskom glikacijom površinskih proteina, receptora, povećava se ukupni adhezivni i agregabilni potencijal trombocita (194). Naši rezultati ukazuju na značajnu negativnu korelaciju sP-selektina i odgovora na terapiju klopidogetrom procenjenog putem %SATadp što dodatno govori u prilog veoma važnoj ulozi hiperaktivnosti trombocita u smanjenom odgovoru na klopidogetrom.

U dijabetičara smo takođe uočili značajnu pozitivnu povezanost ADP-om indukovane agregabilnosti trombocita sa parametrima inflamacije, brojem leukocita, neutrofila, NLR-om i hsCRP-om, kao i značajnu negativnu korelaciju %SATadp sa brojem neutrofila i hsCRP-om. Ovi rezultati govore u prilog negativnom uticaju hronične inflamacije, karakteristične za gojaznost i dijabetes, na odgovor na terapiju klopidogetrom. Trombociti igraju veoma bitnu ulogu u inflamatornom odgovoru ekspresijom CD40L i P-selektina na površini trombocita. CD40L se smatra potentnim stimulatorom vaskularne inflamacije i čini vezu između inflamacije i aktivacije trombocita. Takođe, CD40L, zajedno sa P-selektinom eksprimiranim na površini aktivisanog trombocita omogućava stvaranje trombocitno-leukocitnih agregata, promovišući na taj način proces inflamacije i aterotromboze. Ge i autori su u svom istraživanju istakli povećane vrednosti hsCRP-a, IL-6 i P-selektina u osoba sa rezistencijom na klopidogetrom, a prezentovali su i visok stepen korelacije sCD40L sa agregabilnošću trombocita (317).

Značajna negativna povezanost nivoa sE – selektina i %SATadp ukazuje na negativan uticaj endotelne disfunkcije na odgovor terapijom klopidogetrom kod dijabetičara. Fujisue i saradnici su izveli prvu studiju u kojoj su dokazali direktnan negativan uticaj endotelne

disfunkcije na povišenu trombocitnu reaktivnost tokom primene dvojne antiagregacione terapije. Procenu periferne endotelne funkcije su vršili merenjem indeksa reaktivne hiperemije. Zaključili su da je endotelna disfunkcija nezavisno povezana sa visokim nivoom rezidualne reaktivnosti trombocita tokom primene antitrombocitne terapije i to kod osoba kod kojih su prethodno isključili genetsku predispoziciju za rezistenciju na klopidogrel (318).

Vrednosti sE-selektina i sP-selektina su pokazale visok stepen korelacije u obe ispitivane grupe (Grupa I-T2DM;  $r = 0,560$ ). Ovo bi moglo ukazivati na to da stepen endotelne aktivacije može determinisati stepen trombocitne aktivacije. Uzimajući u obzir zajedničke imenioce endotelne i trombocitne aktivacije (insulinska rezistencija, inflamacija, dislipidemija, hipertenzija) kao i mehanizam interakcije trombocita i endotela, stepen aktivacije endotela i trombocita su međusobno povezani. U uslovima insulinske rezistencije, trombociti su neosetljivi na delovanje NO i PGI<sub>2</sub> koje bi inače proizvodovao intaktni endotel. Međutim, u uslovima insulinske rezistencije, endotelna disfunkcija dodatno može indukovati nastanak tromboznog procesa povećavajući trombocitnu reaktivnost neadekvatnom tj. smanjenom produkcijom NO i PGI<sub>2</sub>, povećanom ekspresijom adhezionih molekula, poput PSGL-1, ICAM-1, zatim ekspresijom vWF-a, a što direktno ili indirektno putem trombocitno-leukocitnih agregata, uslovljavaju trombocitnu adheziju i njihovu posledičnu agregaciju (130,319).

Prednost naše studije je što smo ispitivali povezanost endotelne disfunkcije, trombocitne aktivacije i odgovora na terapiju klopidogrelom u mirnoj fazi, najmanje tri meseca nakon izvedene PCI ili nakon bilo kojeg utvrđenog aterotromboznog akcidenta. Na taj način smo izbegli uticaj periproceduralnih i postproceduralnih faktora u slučaju PCI koji dovode do povećane ekspresije TF-a, vWF-a, adhezivnih molekula endotela, ali i pojačane aktivnosti trombocita u ranoj fazi nakon ishemijskog događaja ili PCI. Na taj način smo

pokušali da što više objektiviziramo doprinos metaboličkog miljea dijabetičara na endotelnu i trombocitnu funkciju i odgovor na antiagregacionu terapiju.

Smatra se da bolesnici sa T2DM imaju povećan trombocitni promet i posledično povećan broj nezrelih, retikulisanih trombocita, (6,193,255,256), a pojedine studije su ukazale na to da rP mogu ispoljiti negativan uticaj na odgovor na terapiju klopidogetrom (198,320). Retikulisani trombociti su mlađi, nezreliji trombociti, imaju veći broj tamnih granula, i hemostatski su mnogo potentniji od zrelih trombocita. Sadrže mRNA, koja im bez obzira na kratkotrajno prisustvo u cirkulaciji pre potpunog sazrevanja, što iznosi oko 24 časa, omogućava sintezu različitih proteina. Tako je omogućena sinteza različitih proteinskih receptora, GP IIb/IIIa, proteina i enzima alfa granula, fibrinogena, vWF-a, P-selektina, PF-4 i COX-2 (321).

Oslanjajući se na ova saznanja, u našoj studiji smo želeli da ispitamo ima li razlike u %rP između ispitivanih grupa te da li je %rP na bilo koji način povezan sa odgovorom na terapiju klopidogetrom u bolesnika sa dijabetesom. Uočili smo da je %rP statistički značajno viši u grupi dijabetičara u odnosu na grupu ispitanika bez dijabetesa ( $3,47 \pm 1,30\%$  vs.  $2,30 \pm 1,30\%$ ;  $p < 0,001$ ) i kontrolnu grupu zdravih ( $3,47 \pm 1,30\%$  vs.  $2,29 \pm 1,23\%$ ;  $p < 0,001$ ), dok se %rP između grupe ispitanika bez dijabetesa i KG nije uopšte razlikovao ( $2,30 \pm 1,30$  vs.  $2,29 \pm 1,23\%$ ). (Tabela 11) Međutim, prilikom interpretacije dobijenih rezultata i njihovog poređenja sa rezultatima drugih studija, zapazili smo da podaci o nivou %rP u različitim studijama variraju, a zavisni su uveliko o specifično primenjenoj metodologiji merenja u pojedinim studijama. Na tržištu su komercijalno dostupne dve, u potpunosti automatizovane laboratorijske metode, Sysmex, koji određuje frakciju nezrelih trombocita (eng. immature platelet fraction – IPF) i Abbott CELL-DYN Sapphire, koji detektuje retikulisane trombocite. Metodologija koju smo koristili u našem istraživanju je određivanje rP na pomenutom Abbott-ovom hematološkom analizatoru. Nažalost, rezultati, u smislu upoređivanja nivoa rP,



ove dve metodologije su neuporedivi jer obe metode zahtevaju svoj vlastiti referentni opseg. Hoffmann i autori su u velikoj epidemiološkoj studiji merenjem rP na automatizovanom hematološkom brojaču Abbott CELL-DYN Sapphire u čak 8089 ispitanika utvrdili referentne vrednosti od 0,4 – 6,0% za %rP utvrđivanih ovom metodom, ali bez diferenciranja različitosti u odnosu na pol ispitanika (244). Utvrđena srednja vrednost %rP zdravih ispitanika uključenih u kontrolnu grupu u našem istraživanju iznosila je  $2,29 \pm 1,23\%$  (u rasponu od 0,54 - 4,55 %), što je u saglasnosti ne samo sa istraživanjem Hoffmann-a i saradnika već i drugih ranije izvedenih studija koje su ispitivale vrednosti %rP u zdravih ispitanika na Abbott Sapphire hematološkom analizatoru (322,323,324).

Studije koje su ukazale na povezanost povećanog %rP i smanjenog odgovora na klopidoarel, uključivale su ili zdrave dobrovoljce (320) ili bolesnike sa arterijskim ishemijskim bolestima, od kojih je bilo veoma malo bolesnika sa T2DM koje nisu posebno izdvojile kao ispitivanu grupu (198). Teško je bilo uporediti rezultate ovih studija sa našim, jer su pojedini autori izneli značajno više vrednosti %rP (198) koristeći metodu protočne citometrije i bojenje tiazol narandžastim, koja nije dovoljno standardizovana (243). Takođe, ove studije nisu istraživale povezanost između rP, odgovora na antitrombocitnu terapiju i metaboličkog profila bolesnika sa T2DM.

U našem istraživanju, uočili smo signifikantnu povezanost između %rP u grupi dijabetičara sa antropometrijskim parametrima, indikatorima gojaznosti, naročito visceralnog tipa, ITM, WHtR i OS, kao i sa povišenim vrednostima indeksa insulinske rezistencije HOMA-IR, što može ukazivati na to da elementi metaboličkog sindroma u vidu visceralne gojaznosti i insulinske rezistencije mogu uticati na povećan promet trombocita u bolesnika sa T2DM. Vaduganathan i autori su ukazali na postojanje povišenog %rP u bolesnika sa metaboličkim sindromom koji je prisutan u najvećeg broja bolesnika sa T2DM (325). Osim toga, u ispitivanoj grupi dijabetičara, %rP je pozitivno korelisao sa nivoom HbA1c. Lee i sar.

su ispitujući nivo IPF-a kod bolesnika sa T2DM i metaboličkim sindromom, došli do zaključka da što je lošije regulisan dijabetes melitus, nivo IPF-a je veći (326). Novija studija koja je ispitivala uticaj glikemijske kontrole merenjem HbAc na trombocitnu agregaciju i promet trombocita, ukazala je na povezanost trombocitnog prometa i HbA1c kod bolesnika već u pre-dijabetesnoj fazi, kada još uvek nisu na terapiji (327). U našoj studiji, uočena je značajna povezanost %rP sa proinflamatornim parametrima, hsCRP-om, brojem neutrofila i fibrinogenom. U nedavnoj studiji Larsena i autora ukazano je na povezanost nivoa hsCRP-a sa brojem nezrelih trombocita (eng. immature platelet count – IPC) i nivoom trombopoetina, što ukazuje na stimulisući uticaj hronične inflamacije na trombocitni promet (328). S obzirom da je u našem istraživanju ukazano na postojanje hronične inflamatorne komponente niskog stepena kod bolesnika sa T2DM, inflamacija bi mogla biti jedan od stalnih doprinosnih faktora povećanja %rP kod ovih bolesnika. U ispitivanoj grupi bez dijabetesa, osim što je %rP bio identičan %rP u ispitivanoj kontrolnoj grupi, nije zapažena značajna povezanost sa do sada pomenutim parametrima, što govori u prilog tome da pozitivna korelacija %rP sa metaboličko – inflamatornim parametrima, može ukazivati na to da loš metabolički profil dijabetičara indukuje ubrzan promet trombocita.

%rP je korelisao pozitivno, snažno sa vrednostima markera aktivacije trombocita i endotela, sP-selektinom i vWF Ag-om u grupi bolesnika sa dijabetesom, dok ova vrsta povezanosti nije uočena u grupi bolesnika bez dijabetesa.

Vrednosti vWF Ag su bile statistički značajno više u našoj ispitivanoj grupi bolesnika sa dijabetesom u odnosu na grupu bez dijabetesa i kontrolnu grupu zdravih. Pozitivna korelacija %rP sa nivoom vWF Ag u grupi dijabetičara može ukazivati na to da specifičan metaboličko - inflamatorni status bolesnika sa T2DM indukuje endotelnu disfunkciju koja se očituje između ostalog i povećanjem vWF Ag, a koja doprinosi ubrzanom trombocitnom prometu i povećanju broja retikulisanih trombocita. Poznato je da na mestu povrede endotela

dolazi do ekspozicije vWF, a jedan od mehanizama direktne interakcije endotela i trombocita, adhezije i aktivacije na mestu endotelne povrede, je upravo njihovo vezivanje uz vWF, što značajno doprinosi procesu aterotromboze (329).

Analizirajući povezanost markera trombocitnog prometa i trombocitne aktivacije, u bolesnika sa dijabetesom, uočili smo statistički značajnu korelaciju %rP sa koncentracijom solubilnog P – selektina što govori u prilog tome da se retikulisani trombociti nalaze u aktivisanom stanju. rP imaju sposobnost da sintetišu određene količine P - selektina što je jedan od doprinosnih faktora njihovog hemostatskog potencijala (321). Grove i sar su u svojoj studiji ukazali na visok stepen korelacije retikulisanih trombocita i sP-selektina (321).

U našoj studiji dokazali smo postojanje značajne pozitivne povezanost između %rP i ADP testa, kao markera rezidualne agregabilnosti trombocita, kao i negativnu korelaciju %rP sa odgovorom na terapiju klopidogrelom, %SATadp. Naši rezultati su u skladu sa objavljenim podacima o učestalijem lošem odgovoru na klopidogrel kod dijabetičara sa T2DM (255) i korelaciji odgovora na terapiju klopidogrelom sa %rP (198,199). Pojedine studije su pokazale da je povećan procenat retikulisanih trombocita povezan sa značajno povećanom trombocitnom agregabilnosti i aktivacijom čak i pod dvojnog antitrombocitnom terapijom (198,330) te da mogu biti i nezavisni prediktor kardiovaskularne smrti i potencijalno korisni u poboljšanju stratifikacije rizika u bolesnika sa AKS (331). U našoj grupi bolesnika bez dijabetesa nisu uočene značajne korelacije između %rP i indikatora odgovora na terapiju klopidogrelom što može biti uzrokovano time da su svi bolesnici na hroničnoj antitrombocitnoj terapiji i od akutnog aterotromboznog akcidenta je prošlo najmanje tri meseca.

Doprinos rP lošem odgovoru na terapiju klopidogrelom kod bolesnika sa T2DM može potencijalno biti uzrokovan na više načina: rP mogu sintetisati P2Y12 receptore na koje nije delovao primenjeni klopidogrel; to je pul trombocita na koji još uvek nije delovao primenjeni

lek; rP sadrže više tamnih granula, hemostatski aktivnih molekula i površinskih receptora što ih čini hiperreaktivnima te se vrlo lako aktiviraju i vrše adheziju i agregaciju, (321) posebno u uslovima disfunkcionalnog endotela kao što je endotel dijabetičara. Takođe, povećana ekspresija P-selektina na rP, omogućava njihovu kako direktnu komunikaciju sa endotelom tako i mogućnost stvaranja trombocitno-leukocitnih agregata koji lako adheriraju na disfunkcionalni endotel i samim tim stvaraju uslove za nastanak novog aterotromboznog akcidenta (136). Interakcijom trombocita sa oštećenim endotelom dolazi do njihove adhezije i agregacije sa posledičnom potrošnjom na mestu razvoja aterotromboznog procesa. Prateći inflamatorni medijatori ovog procesa, poput IL-6, stimulišu lučenje trombopoetina i posledičnu produkciju trombocita, a u cirkulaciju se oslobađaju mlađi, reaktivniji, hemostatski potentniji trombociti, koji su znak ubrzanog prometa trombocita. Na ovaj način aterotrombozni proces doprinosi povećanom prometu trombocita, a mlađi, reaktivniji trombociti zbog svoje veće reaktivnosti doprinose ne samo lošem odgovoru na antitrombocitnu terapiju već i daljem razvoju aterotromboznog procesa (332).

Korelacija %rP sa parametrima, indikatorima lošeg metaboličkog profila, i markera hiperreaktivnosti trombocita i lošeg odgovora na antiagregacionu terapiju, može ukazivati na to da loš metabolički profil dijabetičara utičući na promet trombocita i povećanje %rP, može biti jedan od doprinosećih faktora lošeg odgovora na antitrombocitnu terapiju i ponavljanja aterotromboza.

Evaluirajući odgovor na terapiju klopidogrelom u podgrupama bolesnika sa dijabetesom, napravljenim prema kvartilnoj distribuciji nivoa ADP-a, tj. stepenu rezidualne agregabilnosti trombocita u toku terapije, uočili smo da je ukupna bazalna agregabilnost trombocita procenjena TRAP testom statistički značajno rasla od prvog do četvrtog kvartila ( $76,50 \pm 19,91$  vs.  $94,54 \pm 16,67$  vs.  $112,00 \pm 10,22$  vs.  $128,92 \pm 15,69$  U;  $p < 0,001$ ). Takođe, vrednosti rezidualne agregabilnosti trombocita procenjene ADP testom, statistički su se

značajno povećavale od prvog do četvrtog kvartila ( $43,33 \pm 4,52$  vs.  $64,17 \pm 4,84$  vs.  $74,08 \pm 2,59$  vs.  $100,67 \pm 15,44$  U;  $p < 0,001$ ).

Samo u prvom kvartilu, (definisanom kao  $ADP < 53,5$  U), srednja vrednost ADP testa ( $43,33$  U) je bila ispod donje granice referentnog intervala za primenjenu metodu ( $55 - 117$  U), što može ukazivati na zadovoljavajuću supresiju agregabilnosti trombocita primenjenim klopidogetrelom. Takođe, samo u ovoj podgrupi bolesnika nije došlo do ponavljanih aterotromboza. S obzirom da je u podgrupi prvog kvartila postojao najniži stepen bazalne agregabilnosti trombocita uz najnižu rezidualnu agregabilnost pod terapijom klopidogetrelom, i %SATadp je bio najviši u ovoj podgrupi ( $40,42\%$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike između %SATadp između drugog i trećeg kvartila, a broj ponavljanih tromboza je bio jednak u obe podgrupe ( $2/13$ ).

Kod bolesnika u četvrtom kvartilu postojao je najveći stepen rezidualne agregabilnosti trombocita, sa srednjom vrednosti ADP testa od  $100,67$  U, što je gotovo na gornjoj granici referentnog intervala za primenjenu metodu. S obzirom da je u ovom kvartilu postojala najviša bazalna agregabilnost procenjena TRAP testom, sa najvećom rezidualnom agregabilnosti pod terapijom klopidogetrela i %SATadp ( $21,53\%$ ) je bio najmanji u ovih bolesnika. Ova vrednost je bila gotovo identična vrednosti %SATadp od  $21,70\%$  u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika koji nisu primali terapiju. U ovoj podgrupi, postojao je i najveći broj ponavljanih aterotromboza ( $3/12$ ).

Klinički entitet rezistencije na antiagregacionu terapiju sve više se deli na dva podentiteta, "laboratorijsku" i "kliničku" rezistenciju. "Laboratorijska" rezistencija se definiše kao *in vitro* neadekvatno blokiranje trombocitne reaktivnosti bez obzira na primenjenu antitrombocitnu terapiju, a "klinička" rezistencija je pojava neželjenog ishemijskog kardiovaskularnog događaja u određenog bolesnika za vreme primene antitrombocitne terapije (247). Rezultati naše studije su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na to

da svaki bolesnik sa uočenom laboratorijskom rezistencijom ne mora završiti neminovno sa neželjenim ishemijskim akcidentom, kao što ni svaki ponovljeni aterotrombozni akcident ne mora biti praćen nalazom laboratorijske rezistencije, iako kod dela bolesnika postoji preklapanje ovih nalaza (247).

Bolesnici sa najmanjom rezidualnom agregabilnosti procenjenom ADP testom imali su najbolji, a oni sa najvećom rezidualnom agregabilnosti trombocita, najlošiji odgovor na klopido-rel. Takođe smo uvideli da je procena odgovora na terapiju klopido-grelom merenjem agregabilnosti trombocita indukovane ADP-om i procenom %SAT<sub>ADP</sub> dala kompatibilne rezultate. S obzirom da smo prethodno utvrdili njihov visok stepen korelacije, ova dva načina evaluacije funkcije trombocita pod terapijom klopido-grelom bi možda mogla biti paralelno u upotrebi, mada su potrebna dalja prospektivna ispitivanja koja bi potvrdila stepen usaglašenosti ove dve metode procene unutar same impedantne agregometrije, kao i potencijalni doprinos samog %SAT<sub>ADP</sub> u individualnoj proceni rizika za nastanak nepovoljnog ishemijskog događaja kod pojedinog bolesnika.

Angiolillo i saradnici su izveli prospektivnu studiju u kojoj su takođe pratili bolesnike sa T2DM na kontinuiranoj terapiji klopido-grelom i nakon stratifikacije u podgrupe prema nivou ADP testa, zaključili da su bolesnici sa najvećim stepenom rezidualne agregabilnosti indukovane ADP-om oni koji imaju najlošiji odgovor na klopido-grel tj. oni koji su imali najveći rizik za nastanak nepovoljnog ishemijskog događaja u toku antitrombocitne terapije. Utvrdili su da bolesnici sa najvišom rezidualnom agregabilnosti trombocita, na kontinuiranoj dvojnjoj terapiji, u hroničnoj fazi koronarne srčane bolesti, imaju tri puta veći rizik za nepovoljan ishod bolesti u dvogodišnjem periodu praćenja (253). Pošto su autori u ovoj studiji koristili LTA metodologiju za određivanje agregabilnosti trombocita, nismo bili u mogućnosti da direktno uporedimo vrednosti trombocitne agregabilnosti indukovane ADP-om u pojedinim kvartilima sa ovim vrednostima u našoj studiji. Različita metodologija i jeste

veliki problem u utvrđivanju granične vrednosti rezidualne agregabilnosti koja bi bila najpouzdanija u predikciji nepovoljnog ishoda u odnosu na pojedinu laboratorijsku metodu kod bolesnika sa dijabetesom.

Analizirajući pojedine antropometrijske, metaboličke i inflamatorne parametre u pojedinim kvartilima, uočili smo značajno više vrednosti nivoa insulina, broja neutrofila, NLR-a i hsCRP-a u četvrtom u odnosu na njihove vrednosti u prvom kvartilu. Takođe se uočava i trend porasta rP, ITM, OS, kao i indeksa insulinske rezistencije od prvog do četvrtog kvartila što govori u prilog ubrzanijeg trombocitnog prometa, i nepovoljnijeg metaboličko - inflamatornog miljea u četvrtom kvartilu gde postoji i najveća rezidualna trombocitna agregabilnost i najlošiji odgovor na terapiju, za razliku od prvog kvartila gde je odgovor najbolji.

Nepovoljan metabolički milje dijabetičara značajno doprinosi hiperreaktivnosti trombocita koja može biti delom odgovorna za neadekvatan odgovor na terapiju klopidogetrom (254,256,333). Smatra se da su bolesnici sa T2DM koji imaju pojačanu trombocitnu aktivnost u posebnom riziku za nastanak nepovoljnih kardiovaskularnih događaja u odnosu na bolesnike bez dijabetesa (254,334) što su delom i pokazali naši rezultati mnogo učestalijih ponavljanih aterotromboza u dijabetičara u odnosu na bolesnike bez dijabetesa.

Sagledavajući vrednosti parametara rezidualne agregabilnosti trombocita u bolesnika bez dijabetesa uočavaju se mnogo niže vrednosti ADP testa u svim kvartilima u odnosu na iste u dijabetičara, što generalno ukazuje na bolju supresibilnost agregabilnosti trombocita u ovih bolesnika, posebno u prvom i drugom kvartilu. %SATadp takođe je viši u svim kvartilima u odnosu na %SATadp u dijabetičara, a procenat ponovnih tromboza je znatno niži nego kod bolesnika sa dijabetesom. Analizirajući pojedine parametre koji bi mogli imati uticaja na aktivnost trombocita i odgovor na terapiju klopidogetrom (%rP, ITM, OS, IRI, HOMA-IR, broj neutrofila, NLR, hsCRP), izuzev broja neutrofila, nije primećen trend

njihovog porasta od prvog do četvrtog kvartila. Ovi rezultati dodatno mogu govoriti u prilog tome da metabolički milje dijabetičara nepovoljno utičući na odgovor na terapiju klopidogetrelom može uzrokovati češće aterotrombozne akcidente kod ovih bolesnika.

2010. godine, na osnovu prospektivne studije Sibbinga i saradnika, koja je izvedena na 1600 bolesnika, konsenzusom je definisana granična vrednost nivoa rezidualne agregabilnosti (reaktivnosti) trombocita indukovane ADP-om pod terapijom klopidogetrelom (468 AU/min), merene metodom impedantne agregometrije (Multiplate), koja je imala najbolju prediktivnu vrednost za nastanak rekurentnog ishemijskog događaja, ali samo u cilju stratifikacije rizika u periodu prvih mesec dana nakon PCI (252, 231). Poznato je da je u ranoj fazi rizik za trombozu stenta najveći, a odgovor na terapiju klopidogetrelom često najlošiji baš zbog različitih peri – i postproceduralnih varijabli koji utiču na funkciju kako trombocita tako i endotela (335). Takođe, u studiji nisu posebno izdvojeni bolesnici sa dijabetesom za koje se zna da su populacija sa povišenim rizikom za ponavljane arterijske trombozne akcidente (252). Pošto testiranje funkcije trombocita u toku antitrombocitne terapije nije ušlo u prvi red preporuka, 2013. godine objavljena je revizija prethodnog konsenzusa, sa novim konceptom definisanja terapijskog opsega koji podrazumeva definisanje granične vrednosti visoke i niske agregabilnosti trombocita indukovane ADP-om pod terapijom, povezane sa rizikom za trombozu ili krvarenje. Nažalost nisu utvrđene granične vrednosti za MEA metodu u proceni dugoročnog ishemijskog rizika, za bolesnike na kontinuiranoj terapiji, kao ni za bolesnike sa dijabetesom. Međutim, prihvaćeno je da se ishemijski rizik uvećava pod uticajem različitih varijabli, između kojih su dijabetes i povišen ITM. Zbog toga se smatra da bi trebalo razmotriti testiranje funkcije trombocita pod terapijom klopidogetrelom, kod dijabetičara i gojaznih bolesnika, u proceni ishemijskog rizika za pojedinog bolesnika (336).

Da bi se utvrdila granična vrednost sa najboljom predikcijom kako kratkoročnog, tako i dugoročnog rizika za ponavljanje arterijske tromboze kod bolesnika sa T2DM, neophodno je



izvođenje prospektivne studije koja će pratiti bolesnike ne samo u ranoj fazi nakon vaskularnog akcidenta, već i u kasnoj fazi, u toku sprovođenja kontinuirane terapije klopido-grelom. U ove studije bi bilo potrebno uključiti i bolesnike sa AKS koji nisu podvrgnuti PCI i one sa drugim tipovima ishemijskih vaskularnih oboljenja.

Samo rezultati dobro dizajniranih, kompatibilnih i međusobno uporedivih prospektivnih studija, mogli bi ukazati na to da li individualno praćenje odgovora na antitrombocitnu terapiju, a koje se zasniva na dobro definisanom laboratorijskom nalazu rezistencije na lek, vodi poboljšanju dugoročnog kliničkog ishoda.

Iako je izveden veliki broj laboratorijskih i kliničkih israživanja koja su evaluirala odgovor na aspirin, i dalje postoje nedoumice u vezi definisanja pojma aspirinske rezistencije. Ako posmatramo sa laboratorijskog stanovišta, aspirinsku rezistenciju možemo definisati kao izostanak inhibitorynog dejstva aspirina na trombocitnu agregaciju, a sa kliničke tačke gledišta to bi bio nepovoljan klinički ishemijski događaj kod bolesnika za vreme terapije aspirinom (225,228,247). Različitost objavljenih rezultata o postojanju rezistencije ili smanjenog odgovora na terapiju aspirinom uveliko ovisi upravo o vrsti laboratorijske metodologije koja je upotrebljena u svrhu procene terapijskog odgovora, kao i o dizajnu same studije. Stoga je poređenje rezultata ovih istraživanja veoma otežano. Iako su proizvođači dali referentne intervale ili predložili granične vrednosti na osnovu kojih se može laboratorijski detektovati odgovor na antiagregaciono dejstvo aspirina, a prospektivnim studijama je i testirana prediktivna vrednost pojedinih testova, još uvek nema konsenzusa ili preporuke o korišćenju pojedine metode sa određenom graničnom vrednošću koja će imati dobru predikciju rizika za neopovoljan ishemijski događaj (247,321).

Procenu efikasnosti antiagregacione terapije aspirinom, vršili smo merenjem nivoa ASPI testa, čije su vrednosti ukazivale na stepen rezidualne agregabilnosti trombocita pod terapijom aspirinom. Takođe, izračunavali smo i procenat sniženja ukupne bazalne

agregabilnosti trombocita nakon primenjene terapije aspirinom,  $\%SAT_{aspi} = 100 \times (1 - ASPI/TRAP)$ . Izmereni nivo TRAP testa, služio je kao mera bazalne agregabilnosti trombocita.

68% (34/50) bolesnika u ispitivanoj grupi dijabetičara i 72% (36/50) u grupi bez dijabetesa, bilo je na kontinuiranoj terapiji aspirinom u dozi od 100 mg/dan. Analiziranjem ispitivanih parametara agregabilnosti i odgovora na terapiju aspirinom, uočili smo da bolesnici sa T2DM imaju nešto više vrednosti ASPI testa u odnosu na bolesnike bez dijabetesa koji su uzimali aspirin ( $58,2 \pm 30,1$  vs.  $48,1 \pm 26,4$  U;  $p=0,079$ ). Kada smo izračunali procenat sniženja bazalne agregabilnosti trombocita,  $\%SAT_{aspi}$ , bolesnika koji su koristili terapiju aspirinom u grupi ispitanika sa dijabetesom, uočen je statistički značajno manji stepen  $\%SAT_{aspi}$  u odnosu na isti parametar kod ispitanika bez dijabetesa ( $59,6 \pm 13,8$  vs.  $68,6 \pm 10,4\%$ ;  $p=0,003$ ). Međutim, potrebno je napomenuti da su vrednosti ASPI testa u obe grupe ispitanika bile značajno ispod granice referentnog intervala za primenjenu metodu impedantne agregometrije (79 – 141 U), što ukazuje na postojanje supresije trombocitne funkcije primenjenom acetilsalicilnom kiselinom, a samim tim i smanjenu mogućnost agregabilnosti trombocita uz pomoć agoniste arahidonske kiseline. Procenat sniženja bazalne agregabilnosti je prevazilazio 50% u obe ispitivane grupe, što bi moglo ukazivati na dobar odgovor na aspirin u obe grupe bolesnika, uz primedbu da postoji diskretno slabiji odgovor na terapiju aspirinom u bolesnika sa dijabetesom. U prilog ovome ide i rezultat poređenja vrednosti agregabilnosti indukovane arahidonskom kiselinom između ispitivanih grupa na terapiji aspirinom i kontrolne grupe bez terapije. Vrednosti ASPI testa su bile statistički značajno niže u ispitivanim grupama na terapiji aspirinom u poređenju sa vrednostima ovog testa u kontrolnoj grupi bez terapije ( $58,2 \pm 30,1$  vs.  $48,1 \pm 26,4$  vs.  $90,7 \pm 20,8$  U).  $\%SAT_{aspi}$  između ispitivanih grupa pod terapijom aspirinom i kontrolne grupe bez terapije, ukazao je na statistički značajno više procentualno sniženje bazalne agregabilnosti trombocita u grupama

ispitanika na terapiji aspirinom u odnosu na KG ( $59,6 \pm 13,8$  vs.  $68,6 \pm 10,4$  vs.  $14,3 \pm 9,32\%$ ).

(Tabela 12)

Dijabetes, gojaznost i hronična inflamacija su samo neka od kliničkih stanja koja se povezuju sa smanjenim odgovorom na aspirin (225). Različite izvedene laboratorijske (337,338,339) i kliničke studije su ukazale na to da kod dijabetičara može biti prisutan smanjen odgovor na terapiju aspirinom (340,341,342).

Iako je u našoj studiji terapijski odgovor na aspirin, prema referentnom intervalu ASPI testa za primenjenu metodu impedantne agregometrije (MEA), bio zadovoljavajući u obe ispitivane grupe, uočili smo značajan stepen negativne povezanosti %SATaspi sa %rP i vWF Ag, u grupi bolesnika sa dijabetesom, dok u grupi bez dijabetesa nije bilo korelacije između pomenutih parametara.

Uočena statistički značajna povezanost %rP sa odgovorom na terapiju aspirinom je u skladu sa ranije objavljenim podacima (198,343). Ovo se može objasniti time da su rP, pul nezrelih trombocita, koji još uvek nije bio izložen delovanju aspirina i kod kojeg postoji COX-1 koja omogućava sintezu TXA<sub>2</sub>, kao i time da je u mladim, retikulisanim trombocitima prisutna neinhibisana COX-2 aktivnost (321,343). Wurtz i autori su ukazali na poteškoće prilikom interpretacije i upoređivanja rezultata izvedenih studija koje su se bavile uticajem trombocitnog prometa na antitrombocitni efekat aspirinom, upravo zbog korištenja različitih testova kojima se utvrđuje trombocitna funkcija, te da te razlike treba obavezno uzeti u obzir prilikom evaluacije odgovora na antitrombocitnu terapiju (344).

Multivarijantnom linearnom regresionom analizom, utvrđena je inverzna nezavisna povezanost vWF Ag sa odgovorom na terapiju aspirinom u grupi bolesnika sa dijabetesom, koji je procenjen pomoću %SATaspi. Gianetti i saradnici su utvrdili da je nivo vWF Ag dobar prediktor odgovora na terapiju aspirinom procenjen PFA-100 metodom. Nedostatak je što je i sama ova metodologija delimično pod uticajem vWF-a. Takođe su utvrdili da je lošiji

odgovor na terapiju povezan sa niskim nivoom ADAMTS-13, što je govorilo u prilog patofiziološkom mehanizmu povezanosti smanjenja ovog tipa matriks metaloproteinaze i postojanja visoko reaktivnih multimera vWF koji fiziološki bivaju dezintegrisani ovim enzimom (345). Prilikom interpretacije ovog rezultata treba uzeti u obzir da se dijabetes (346) i hronična inflamacija povezuju sa postojanjem smanjenog nivoa ADAMTS-13, a samim tim i postojanjem biološki ultra velikih hiperreaktivnih multimera vWF za koje se intenzivno vezuju trombociti promovišući na taj način trombozni i inflamatorni proces na mestu povrede endotela (143). Takođe, na disfunkcionalnom i oštećenom endotelu dijabetičara, eksprimirani vWF igra jednu od prvih i najvažnijih uloga u procesu interakcije endotela i trombocita što inicira hemostazni mehanizam i posledično stvaranje tromba (345). Zbog toga, vWF igra veoma važnu ulogu u nastanku aterotromboznog procesa i ishemijskih događaja. S obzirom da metoda impedantne agregometrije nije pod uticajem vWF-a, ovo bi moglo ukazivati na to da bi vWF Ag mogao biti prediktor smanjenog odgovora na terapiju aspirinom procenjenu na ovaj način u grupi dijabetičara, ali potrebna su opsežnija prospektivna klinička istraživanja na većem broju bolesnika u cilju procene kliničkog značaja ovih rezultata i sagledavanja mehanizama odgovornih za utvrđene veze.

Kada smo evaluirali odgovor na terapiju aspirinom u podgrupama bolesnika sa dijabetesom na osnovu kvartilne distribucije prema nivou ADP-a, uvideli smo da najniži nivo agregabilnosti indukovane arahidonskom kiselinom postoji u prvom, a najveći u četvrtom kvartilu ( $29,30 \pm 12,02$  vs.  $58,00 \pm 25,83$  U;  $P < 0,002$ ), dok nije bilo značajne razlike ovih vrednosti između pojedinih kvartila, jer je nivo ASPI testa postepeno rastao. (Grafikon 12) Uočili smo da je nivo ASPI testa u svim kvartilima bio daleko ispod donje granice referentnog intervala za primenjenu metodu, čak i u gornjem kvartilu, gde je bilo najviše ponavljanih tromboznih akcidenata. Sagledavajući odgovor na terapiju aspirinom pomoću %SATaspi nismo uočili razliku između kvartila i procenat sniženja bazalne agregabilnosti je u svim

kvartilima prelazio 50%, bez međusobne značajne razlike ( $60,13 \pm 17,55$  vs.  $57,92 \pm 13,64$  vs.  $60,91 \pm 9,89$  vs.  $57,79 \pm 16,87$  %).

Ovakvi rezultati mogli bi ići u prilog stanovištu da je za nastanak ponavljanih aterotromboza kod bolesnika na dvojnjoj antitrombocitnoj terapiji, prevashodno zaslužan odgovor na terapiju klopidogetrom, a ne aspirinom (216,249,347).

Evaluirajući odgovor na terapiju aspirinom, u podgrupama bolesnika bez dijabetesa, na osnovu kvartilne distribucije prema nivou ADP-a, uvideli smo da najniži nivo agregabilnosti indukovane arahidonskom kiselinom postoji u prvom, a najveći u četvrtom kvartilu, dok nije bilo značajne razlike između pojedinih kvartila. (Grafikon 18) Međutim nivoi ASPI testa u svim kvartilima su bili veoma niski i značajno ispod donje granice referentnog intervala za primenjenu metodu ( $28,00 \pm 10,68$  vs.  $38,3 \pm 19,06$  vs.  $31,0 \pm 6,96$  vs.  $43,8 \pm 15,59$  U). Procenjujući odgovor na terapiju aspirinom pomoću %SATaspi, uočeno je da je procenat sniženja bazalne agregabilnosti u svim kvartilima daleko prevazilazio 50%, bez međusobne značajne razlike između pojedinog kvartila ( $71,6 \pm 9,65$  vs.  $64,8 \pm 11,59$  vs.  $75,5 \pm 5,66$  vs.  $66,2 \pm 10,37$  %).

Bolesnici sa T2DM su usled kompleksnih metaboličkih, celularnih i inflamatornih poremećaja izloženi visokom ishemijskom riziku i ponavljanju aterotromboznih dešavanja. Praćenje efekta antitrombocitne terapije kod ovih bolesnika i detekcija smanjenog odgovora na primenjenu terapiju mogla bi dovesti do njene optimizacije i značajno doprineti usporavanju progresije procesa aterotromboze. Individualna procena rizika nepovoljnog kliničkog ishoda pojedinog dijabetičnog bolesnika mogla bi biti korak bliže personalizovanom terapijskom pristupu. Zbog toga je neophodan kontinuiran razvoj laboratorijske dijagnostike i izvođenje dobro dizajniranih prospektivnih studija koje će sagledati sa različitih aspekata odgovor na antitrombocitnu terapiju u ovoj posebno vulnerabilnoj skupini bolesnika i dati odgovore na još uvek mnoga otvorena pitanja.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije cirkulišućih biomarkera endotelne aktivacije, sE – selektina i vWF Ag-a, značajno su povišene kod bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na njihove koncentracije kod zdravih ispitanika.
2. Serumska koncentracija solubilnog biomarkera trombocitne aktivacije, sP – selektina, značajno je povišena kod bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na njihove koncentracije kod zdravih ispitanika.
3. Procenat retikulisanih trombocita, %rP, markera trombocitnog prometa, kao i koncentracije biomarkera endotelne i trombocitne aktivacije, sE – selektina, vWF Ag-a i sP – selektina, značajno su povišene u grupi bolesnika sa bolešću arterijskih krvnih sudova u tipu 2 dijabetes melitusa u odnosu na grupu ispitanika bez dijabetesa.
4. Nije bilo statistički značajne razlike u nivou bazalne agregabilnosti trombocita merene TRAP testom, između grupe ispitanika sa tipom 2 dijabetes melitusa, ispitanika bez dijabetesa i kontrolne grupe zdravih ispitanika.
5. Kod bolesnika sa tipom 2 dijabetesa, postoji trend značajno veće učestalosti rezistencije na primenjenu antitrombocitnu terapiju tienopiridinima u odnosu na nedijabetičnu populaciju, tj. uočen je trend učestalijeg ponavljanja ishemijskih ataka u odnosu na bolesnike bez dijabetesa, a što je uslovljeno značajno višim stepenom rezidualne agregabilnosti trombocita pod terapijom klopidogrelom.
6. Bolesnici sa T2DM imali su znatno viši stepen rezistencije na antitrombocitnu terapiju klopidogrelom u odnosu na bolesnike bez dijabetesa, procenjene stepenom rezidualne agregabilnosti trombocita, ADP test, kao i procentom sniženja ukupne bazalne agregabilnosti trombocita, %SATadp, metodom impedantne agregometrije.

7. Međusobna povezanost ispitivanih biomarkera endotelne i trombocitne aktivacije (sE – selektina, vWF Ag-a, sP – selektina), kao i markera prometa trombocita (%rP) sa metaboličko-inflamatornim parametrima i sa indikatorima odgovora na antiagregacionu terapiju, može ukazivati na to da nepovoljan metabolički milje dijabetičara može biti jedan od doprinosnih faktora lošem odgovoru na antitrombocitnu terapiju klopidogrelom.
8. S obzirom na utvrđeni visoki stepen rezistencije na antitrombocitnu terapiju tienopiridinima, kao i trend učestalijeg ponavljanja ishemijskih ataka u bolesnika sa tipom 2 dijabetes melitusa u odnosu na bolesnike bez dijabetesa, a što je uslovljeno značajno višim stepenom rezidualne agregabilnosti trombocita pod terapijom, u bolesnika sa tipom 2 dijabetesa bi bilo dobro evaluirati odgovor na primenjenu tienopiridinsku antitrombocitnu terapiju, a sve u cilju njene optimizacije u ovih bolesnika.

## 7. LITERATURA

1. Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013;34(39):3035-87.
2. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji 2010. Registar za dijabetes u Srbiji. Izveštaj br. 5.
3. Laakso M. Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes From Population to Man to Mechanisms. *Diabetes Care* 2010; 33(2): 442–9.
4. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology and Management. *JAMA* 2002;287:2570-81.
5. van Leuven SI, Franssen R, Kastelein JJ, Levi M, Stroes ESG, Tak PP. Systemic inflammation as a risk factor for atherothrombosis. *Reumatology* 2008;47:3-7.
6. Colwell JA, Nesto RW. Platelet in diabetes: Focus on prevention of ischemic events. *Diabetes Care* 2003;26:2181-8.
7. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thrombosis Haemost* 2004;2:1282-91.
8. Angiolillo DJ. Antiplatelet Therapy in Diabetes: Efficacy and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Directions. *Diabetes Care* 2009;32(4):531-40.
9. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 1:S42-7.
10. Ostenson CG. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: An overview. *Acta Physiol Scand* 2001; 171:241-7.
11. Billings LK, Florenz JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1212:59-77.



12. Karaderi T, Drong AW, Lindgren CM. Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Obesity-Related Traits. *Curr Diab Rep* 2015; 15(10):83.
13. Powers AC. Diabetes mellitus. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, ed. *Principles of Harrison's Internal Medicine*. 17<sup>th</sup> ed. Mc Graw Hill 2008:2275-304.
14. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse Diabetes mellitus. Drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje. 2 izdanje. 2012.
15. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia Is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 2008; 31(Suppl 2):262-8.
16. Abdul-Ghani MA, deFronzo RA. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:1-19.
17. Shulman G. Unraveling the Cellular Mechanism of Insulin Resistance in Humans: New Insights from Magnetic Resonance Spectroscopy. *Physiology* 2004;19(4):183-90.
18. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881-7.
19. Klöting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299(3):506-15.
20. Kraemer FB, Shen WJ. Hormone-sensitive lipase:control of intracellular tri-diacylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* 2002; 43:1585–94.
21. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:473-81.
22. Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, et al. Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med* 2007;120:3–8.

23. Jiang J, Torok N. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2008;6:1–7.
24. Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* 1996;19:390–3.
25. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 2005;36:232–40.
26. Sniderman AD, Faraj M. Apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:633–37.
27. Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Godoy-Matos AF, Geloneze B, et al. Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics* 2006;61:433–40.
28. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(12):2127–31.
29. Choi KM, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;75:235–40.
30. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Oziomek E, Adamska A, Karolczuk-Zarachowicz M, et al. Increased serum interleukin-18 concentration is associated with hypoadiponectinemia in obesity, independently of insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:221–5.
31. Al-Shukaili A, AL-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Al-Abri S, Al-Lawati J, Al-Maskari M. Analysis of Inflammatory Mediators in Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol* 2013;(2013):1-7.
32. Festa A, D’Agostino R, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome. *Circulation* 2000;102:42-7.

33. Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol* 2003;148(5):535-42.
34. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17(1):4-12.
35. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007;148:241-51.
36. Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulangue A, Massiera F, Teboul M, Ailhaud G, et al. The Adipose Renin-Angiotensin System Modulates Systemic Markers of Insulin Sensitivity and Activates the Intrarenal Renin-Angiotensin System. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:1-6.
37. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
38. Stern M, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 2004;27(11):2676-81.
39. Isomaa BA. A major health hazard: The metabolic syndrome. *Life Sci* 2003;73:2395-411.
40. Mikhail N. The metabolic syndrome: insulin resistance. *Curr Hypertens Rep* 2009;11(2):156-8.
41. Alexander CM., Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes* 2003;52:1210-14.
42. American Diabetes Association. The Cardiometabolic Risk Initiative. Available from <http://professional.diabetes.org/resourcesforprofessionals.aspx?cid=60379>.

43. Wilson PWF, Meigs JB. Cardiometabolic risk: a Framingham perspective. *Int J Obes* 2008; 32:17–20.
44. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The Metabolic Syndrome. *Endocr Rev* 2008;29(7):777-822.
45. Micić D, Stamenković-Pejković D, Polovina S. Metabolički sindrom diabetes mellitus tip 2 i kardiovaskularni poremećaji. *Medicinski glasnik* 2010;15(34):19-42.
46. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome 2006. Available from <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
47. Meigs JB. Epidemiology of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: Translation From Population to Prevention. *Diabetes Care* 2010;33:1865–71.
48. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lonas F, McQueen M. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364(9438):937–52.
49. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* 2008; 26(2):77-82.
50. Stratton I, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000;321:405.
51. Gerich JE. Type 2 diabetes mellitus is associated with multiple cardiometabolic risk factors. *Clinical Cornerstone* 2007;8(3):53-68.
52. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:150-9.
53. Boras J, Ljubičić A. Makrovaskularne komplikacije šećerne bolesti. *Medix* 2009;80:136-42.
54. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* 2007;115:1285-95.

55. Ventura HO. Profiles in Cardiology. Rudolph Virchow and Cellular Pathology. Clin Cardiol 2000;(23):550-2.
56. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol 1977;86(3): 675–84.
57. SoRelle R. Nobel Prize Awarded to Scientists for Nitric Oxide Discoveries. Circulation 1998;98:2365-6.
58. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340(2):115-26.
59. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. Endocr Rev 2001;22(1):36-52.
60. Hadi HAR, Suwaidi JAI. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Vasc Health Risk Manag 2007;3(6):853-76.
61. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth 2004; 93(1):105-13.
62. Ozkor MA, Quyyumi AA. Endothelium - Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. Cardiol Res Pract 2011;2011:156146.
63. Đurić D. Endotel i aterogeneza. U: Đurić MD (ur.). Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija: sa međunarodno prihvaćenim preporukama za prevenciju ateroskleroze. Društvo fiziologa Srbije (Kragujevac: Grafičar), Beograd, 2005, 29-43.
64. Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Ribeiro V, Duarte JA, Oliveira J. Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness. Rev Port Cardiol 2009;28(10):1121-51.
65. Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. Heart Fail Rev 2003;8(1):71-86.
66. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004;109(23):27-32.

67. Vane J, Corin RE. Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(6):571-8.
68. Selaković V, Čolić M, Milosavljević P. Inflatorna reakcija i athezijski molekuli u ishemiji mozga. *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(6): 661–7.
69. Gale AJ, Griffin JH. Characterization of a thrombomodulin binding site on protein C and its comparison to an activated protein C binding site for factor Va. *Proteins* 2004;54(3):433-41.
70. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-Protein C-EPCR System. *Thromb Vasc Biol* 2004;24:1374-83.
71. Gader AGMA. Tissue Factor Pathway Inhibitor [TFPI]: A Natural Coagulation Inhibitor and Potential Therapeutic Agent – A Review *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2009; 4(1):1–15.
72. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles. *Physiology* 2002; 17(2): 56-61.
73. Hadi HAR, Carr CS, Suwaidi JAI. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1(3);183-98.
74. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* 2013;123(2):540-1.
75. Hunt BJ. Endothelial cell activation. *BMJ* 1998;316:1328-9.
76. Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF- $\kappa$ B and I- $\kappa$ B: An Inducible Regulatory System in Endothelial Activation. *J Exp Med* 1994;179:503-12.
77. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.
78. Granger DN, Senchenkova E. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

79. Pavlović P, Tavčioski D, Stamenković E. Agregacija trombocita, disfunkcija endotela i akutni infarkt miokarda. *Vojnosanitetski Pregl* 2009; 66(4):323-7.
80. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Res* 2004; 114: 447–53.
81. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92:507–15.
82. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Zapaljenski proces u aterogenezi: nove činjenice o starom plamenu. *Med Pregl* 2012; LXV(9-10):388-95.
83. Obrenović-Kirćanski BB. Endothelial dysfunction reversibility. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(5): 337–43.
84. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and Vascular Disease. Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation* 2003;108:1527-1532.
85. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction – A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2216-31.
86. Van den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation* 2010;2010:1-15.
87. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. *Banting Lecture* 2004. *Diabetes* 2005;54:1615-25.
88. Xu J, Zou MH. Molecular Insights and Therapeutic Targets for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation* 2009;120:1266-86.
89. Gutterman DD. Vascular Dysfunction in Hyperglycemia Is Protein Kinase C the Culprit? *Circ Res* 2002; 90: 5-7.

90. Geraldès P, King GL. Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications. *Circ Res* 2010; 106(8): 1319–31.
91. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.
92. Popov D. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2010;189-95.
93. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Craeger MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001;103:1618-23.
94. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:e14-e22.
95. Muniyapa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular action of insulin. *Endocr Rev* 2007;28(5):463-91.
96. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297(3):568-77.
97. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010; 53(7): 1270–87.
98. Iantorno M, Campia U, Di Danieli N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, Tesauro M. Obesity, Inflammation and endothelial dysfunction. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2014;28(2):169-176.
99. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: Risk marker or mediator an atherothrombosis? *Hypertension* 2004;44:6-11.
100. Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fc gamma receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:995–1001.



101. Đerić M. Patofiziologija I klinički značaj aterogenog lipoproteinskog fenotipa i LDL čestica male gustine. *Jugoslav Med Biochem* 2003; 22 (2):101– 7.
102. Osterud B, Bjorklid E. Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev* 2003; 83(4):1069-112.
103. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Ateroskleroza u svetlu postojećih naučnih teorija. *Medicinska istraživanja* 2008;42 (2):29-36.
104. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 2015;209(1):13.
105. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
106. Đukić A. Poremećaji metabolizma organskih materija. U: Živančević-Simonović S (ur.). *Opšta patološka fiziologija*, Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Kragujevac, 2002, 423-440.
107. Siracuse JJ, Chaikof EL. The Pathogenesis of Diabetic Atherosclerosis. In: G.V. Shrikhande and J.F. McKinsey (eds.), *Diabetes and Peripheral Vascular Disease: Diagnosis and Management*, Contemporary Diabetes, Springer Science+Business Media New York 2012, DOI 10.1007/978-1-62703-158-5\_2.
108. Federici M, Lauro R. Review article: diabetes and atherosclerosis--running on a common road. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22( Suppl 2):11-5.
109. Verges B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol* 2009;23(6):681-5.
110. Đerić M. Patogeneza ateroskleroze. U. Stošić Z, ed. *Patološka fiziologija*. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, 2012.159-165.
111. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin Resistance, Hyperglycemia, and Atherosclerosis. *Cell Metab* 2011; 14(5): 575–85.
112. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454:470–7.

113. Virmani R, Burke AP, Kolodgie F. Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 2006; 22(Suppl B): 81–4.
114. Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic Plaque Destabilization. Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies. *Circ Res* 2014; 114: 214-26.
115. Paneni F, Beckman JA, Craeger M, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013;34:2436-46.
116. Csordas A, Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:219-230.
117. Chu AJ. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. *Int J Inflamm* 2011;2011:1-30.
118. Borissoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364:1746-60.
119. Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical consequence and Medical Therapy: Part II. *Circulation* 2003;108(13):1655-61.
120. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Craeger MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur Heart J* 2013; 34(31): 2436–43.
121. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse. Ishemijska bolest srca. Beograd 2012.
122. Muntean C, Mitrea A, Mota M, Tudorica V. Type 2 Diabetes and its Implications in Cerebrovascular Disease. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases* 2012; 19(1):81–8.

123. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *Eur Heart J* 2011;32; 2851-906.
124. ESC preporuke za dijagnozu i lečenje periferne arterijske bolesti. *Srce i krvni sudovi* 2012; 31(3): 195-250.
125. Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001; 358: 1257–64.
126. American Diabetes Association. Peripheral Arterial Disease in People With Diabetes. Consensus Statement. *Diabetes Care* 2003;26:3333-41.
127. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*. 2003; 108: 2054-59.
128. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:168-75.
129. Zhang J, DeFelice AF, Hanig JP, Colatsky T. Biomarkers of Endothelial Cell Activation Serve as Potential Surrogate Markers for Drug-induced Vascular Injury. *Toxicologic Pathology* 2010;38:856-71.
130. Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanidis C. Diabetes Mellitus-Associated Vascular Impairment. *JACC* 2013;62(8)667-76.
131. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol Rev* 1999; 79(1):181-213.
132. Galkina E, Ley K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2292-301.
133. Hopkins PN. Molecular Biology of Atherosclerosis. *Physiol Rev* 2013;93(3):1317-542.
134. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187(2):584-9.

135. Roldan V, Marin F, Lip GYH, Blan AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. *Thromb Haemost* 2003;90:1-13.
136. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003;24:2166–79.
137. Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, Scharenberg J, de Korte D, van der Meer PF. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. *Transfusion* 2008;48(7):1439-46.
138. Chung I, Choudhury A, Patel J, Lip GY. Soluble, platelet-bound, and total P-selectin as indices of platelet activation in congestive heart failure. *Ann Med* 2009;41(1):45-51.
139. Mannucci PM. von Willebrand Factor A Marker of Endothelial Damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1359-62.
140. Federici AB. vWF propeptide:a useful marker in vWD. *Blood* 2006;108(10):3229-30.
141. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. Von Willebrand Factor in Cardiovascular Disease. *Circulation* 2008;117:1449-59.
142. Haberichter SL. Von Willebrand factor propeptide.biology and clinical utility. *Blood* 2015;126(15):1753-61.
143. Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheiflinger F, Wagner DD. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* 2008;205(9):2065-74.
144. Louden C, Brott D, Katein A, Kelly T, Gould S, Jones H, et al. Biomarkers and Mechanisms of Drug-Induced Vascular Injury in Non-Rodents. *Toxicol Pathol* 2006;34:19–26.
145. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 2004;15(2):91-8.
146. Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in

children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism* 2005;54(8):1020-6.

147. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(9):3171-82.

148. Califano F, Giovannello T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, et al. Clinical importance of thrombomodulin serum levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2000;4:59-66.

149. Chong AY, Blann AD, Lip GYH. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure. *Q J Med* 2003;96:253–67.

150. Kubisz P, Stančiakova L, Staško J, Galajda P, Mokaň M. Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2. *World J Diabetes* 2015;6(3):423-31.

151. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* 2004;104(13):3943 – 8.

152. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev* 2010;6(2):82-90.

153. Sabatiera F, Camoin-Jau a L, Anfosso F, Sampol a J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009; 13(3): 454-71.

154. Franca CN, de Oliveira Izar MC, do Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FAH. Microparticles as Potential Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Arq Bras Cardiol* 2015;104(2):169-74.

155. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*, 2011; 16(S1): S11–S21.

156. Paffen E, de Maat MPM. C - reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 2006;71:30-9.
157. Yeh ETH. A new perspective on the biology of C-reactive protein. *Circ Res* 2005;97:609-11.
158. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Macrophage Conditioned Medium Induces the Expression of C-Reactive Protein in Human Aortic Endothelial cells. *AJP* 2005; 166(4):1265-71.
159. Hein TW, Singh U, Vasquez-Vivar J, Devaraj S, Kuo L, Jialal I. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis* 2009;206(1):61-8.
160. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation Part I. *Circulation* 2003;108:1917-23.
161. White JG. Platelet structure. In: Michelson AD. ed. *Platelets*. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2013.
162. Mitić G. Molekularne osnove primarne hemostaze i tromboze. U: Mostarica M. eds. *Klinička hematologija*, Beograd, Zavod za udžbenike, 2010.
163. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *ScientificWorld Journal* 2014;3:1-16.
164. Smyth SS, Whiteheart S, Italiano JE, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, et al., eds. *Williams hematology*, New York: McGraw-Hill, 2005.
165. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin N. Signaling: The Platelet Paradigm. *Blood* 1998;91(8):2645-57.
166. Banno A, Ginsberg MH. Integrin activation. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(2): 229–34.

167. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Michelson AD. eds. Platelets. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2013.
168. Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ : activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 2007;5(7):1345-52.
169. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 2008;14:325 -30.
170. Kaplan ZS, Jackson SP. Antiplatelet therapy: The role of platelets in atherothrombosis. *Haematology* 2011;2011(1):51-61.
171. Wu Y, Asazuma N, Kaneo Satoh, Yutaka Yatomi, Toshiro Takafuta, Michael C. Berndt, and Yukio Ozaki Interaction between vonWillebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 2003;101:3469-76.
172. Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Platelet receptors activated via multimerization: GPVI, GPIb-IX-V, and CLEC-2. *J Thromb Haemost* 2013;11(Suppl. 1):330-9.
173. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev* 2013;93(1):327-58.
174. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafervon AI. Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest* 1991; 88(5): 1568-73.
175. Offermanns S. Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors *Circulation Research* 2006;99: 1293-1304.
176. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407:258-64.
177. Kunapuli SP. P2 Receptors and Platelet Activation. *Scientific World Journal*. 2002;13(2):424-33.
178. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cel Signal* 2004;16:521-33.

179. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:775-89.
180. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin Thromb and Hemost* 2005;31(4):381-92.
181. Kickler TS. Platelet biology-an overview. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* 2006;2:79-85.
182. Chen J, Lopez JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium *Microcirculation* 2005;12(3):235-46.
183. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001;86:222-23.
184. Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP. Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol* 2003;160(7):1151-61.
185. Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005;12(3):247-58.
186. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357(24):2482-94.
187. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008;111(11):5271-81.
188. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191(8):1413-22.
189. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009; 103(Suppl A):4-10.
190. Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(8):669-77.



191. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011;11(4):264-74.
192. Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as Immune Cells. Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
193. Ferreiro JL, Gomez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2010;7(4):251-9.
194. Vinik AI, Erbas T, Prak TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:1476-85.
195. Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 2013; 37:423-8.
196. Eibl N, Krugluger W, Streit G, Schratlbauer K, Hopmeier P, Schernthaner G. Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2004;34(3):205-9.
197. Gremmel T, Kopp CW, Seidinger D, Koppensteiner R, Steiner S, Panzer S. Impact of diabetes on platelet activation in different manifestations of atherosclerosis. *Swiss Med Wkly* 2013;143:w1380.
198. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *JACC* 2008;52(9):743–9.
199. Mijović R, Kovačević N, Žarkov M, Stošić Z, Čabarkapa V, Mitić G. Reticulated platelets and antiplatelet therapy response in diabetic patients. *J Thromb Thrombolysis* 2015; 40:203–10.
200. Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. Platelets structural, functional and metabolic alterations in diabetes mellitus. *Pak J physiol* 2012;8(2):40-3.
201. Nagy B Jr, Debreceni IB, Kappelmayer J. Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *eJIFCC* 2012;23(4):1-11.

202. Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. Comparison of platelet CD markers between normal individuals and untreated patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hematol Thromb Dis* 2013;2(1):1-4.
203. Csongradi E, Nagy B Jr, Fulop T, Varga Z, Karanyi Z, Magyar MT, et al. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost* 2011;106:683-92.
204. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:1-11.
205. Gurbel PA, Tantry US. Combination Antithrombotic Therapies. *Circulation*. 2010;121:569-83.
206. Tantry US, Etherington A, Bliden KP, Gurbel PA. Antiplatelet therapies; current strategies and future trends. *Future Cardiol* 2006;2: 343–366.
207. Aleksandrić S, Tomašević M, Dobrić M, Beleslin B, Tasić I. Antitrombocitna terapija u sekundarnoj prevenciji. *Srce i krvni sudovi* 2011; 30(4): 224-33.
208. Wallentin L. P2Y12 inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J* 2009;30:1964-77.
209. Cattaneo M. Aspirin and Clopidogrel. Efficacy, Safty, and the Issue of Drug Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1980-7.
210. Yoneda K, Iwamura R, Kishi H, Mizukami Y, Mogami K, Kobayashi S. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat *in vitro* metabolites. *Br J Pharmacol* 2004; 142(3): 551–7.
211. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20(7): 463–5.
212. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, et al. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004;92:311-6.

213. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet – leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1982-8.
214. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001;12(2):74-82.
215. Evangelista V, Manarini S, Dell'Elba G, Martelli N, Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet PS. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* 2005;94(3):568-77.
216. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120:311-21.
217. Giusti B, Gori AM, Marucci R, Abbate R. Current status of clopidogrel pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2012;13(16):1671-1674.
218. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Nov;80(5):486-501.
219. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 2010 16;376(9749):1312-9.
220. Giusti B, Gori AM, Marucci R, Saracini C, Vestrini A, Abbate R. Determinants to optimize response to clopidogrel in acute coronary syndrome. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2010;3:33-50.
221. Wang ZY, Chen M, Zhu LL, Yu LS, Zeng S, Xiang MX, Zhou Q. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2015;11:449–67.
222. Schafer JA, Kjesbo NK, Gleason PP. Critical review of prasugrel for formulary decision makers. *J Manag Care Pharm* 2009; 15(4):335-43.

223. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. PLATO Investigators, Freij A, Thorsén M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361(11):1045-57.
224. Chatterjee S, Sharma A, Mukherjee D. PAR-1 antagonists: current state of evidence. *J Thromb Thrombolysis* 2013;35(1):1-9.
225. Mehta JL, Mohandas B. Aspirin resistance: Facts or fiction? A point of view. *World J Cardiol* 2010;2(9):280-8.
226. Bhatt DL, Hulot JS, Moliterno DJ, Harrington RA. Antiplatelet and Anticoagulation Therapy for Acute Coronary Syndromes. *Circ Res* 2014;114:1929-43.
227. Lenk E, Spannagl M. Platelet function testing-guided antiplatelet therapy. *eJIFCC* 2013;24(3-4):90-6.
228. Sambu N, Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72(4):683-96.
229. Gachet C, Aleil B. Testing antiplatelet therapy. *Eur Heart J* 2008;10(Suppl A):28-34.
230. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3(1): 85-92.
231. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(12):919-33.
232. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Prevencija cerebrovaskularnih bolesti. Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj zaštiti; Beograd, 2005.
233. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse. Ishemijski moždani udar. Beograd, 2012.

234. Sacco R, Adams R, Albers G, Albers MJ, Benavente O, Furie K et al. Guidelines for Prevention of Stroke in Patients With Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *Stroke* 2006; 37: 577-617.
235. Bell AD, Roussin A, Cartier R, Chan WS, Douketis JD, Gupta A. The Use of Antiplatelet Therapy in the Outpatient Setting: Canadian Cardiovascular Society Guidelines. *Canadian Journal of cardiology* 2011;27(3):1-59.
236. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
237. Republička stručna komisija za izradu implementaciju vodiča u kliničkoj praksi Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Gojaznost Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Beograd, 2004.
238. Browning LM, Hsieh SD, Ashwell M: A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0.5 could be a suitable global boundary value. *Nutr Res Rev* 2010, 23:247–269.
239. American Diabetes Association. Position Statement: Standards of Medical Care in Diabetes - 2010. In: *Diabetes Care* 2010;33 (Suppl1):S11–S61.
240. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
241. Mackie J, Lawrie AS, Kitchen S, Gaffney PJ, Howarth D, Lowe GD. A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Claus and PT-derived fibrinogen. *Thromb Haemost* 2002; 87:997-1005.
242. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
243. Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(8):1107–17.

244. Hoffmann JJ, van den Broek NM, Curvers J. Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1635–40.
245. Multiplate analyzer – Cobas. [www.cobas.com/home/.../multiplate-analyzer.html](http://www.cobas.com/home/.../multiplate-analyzer.html).
246. Nesto RW. Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *Am J Med* 2004;116:11S-22S.
247. Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drug resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2009;30:426-35.
248. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, Yuan H, Charlton RK, Bernardo E. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the optimizing antiplatelet therapy in diabetes mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation* 2007;115:708–16.
249. Vlachojannis GJ, Dimitropoulos G, Alexopoulos D. Clopidogrel resistance: current aspects and future directions. *Hellenic J Cardiol* 2011;52:236–45.
250. Sweeney JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet drug ‘resistance’. Part 1: mechanisms and clinical measurements. *Nature Reviews Cardiology* 2009;6:273-82.
251. Gorog DA, Sweeney JM, Fuster V. Antiplatelet drug ‘resistance’. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs – fact or artifact? *Nature Reviews Cardiology* 2009;6:365-73.

252. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, et al. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(10):849-56.
253. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(16):1541-7.
254. Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int J Endocrinol* 2011; doi:10.1155/2011/742719.
255. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Circulation* 2011;123:798–813.
256. Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Platelet adenosine diphosphate P2Y12 receptor antagonism: benefits and limitations of current treatment strategies and future directions. *Rev Esp Cardiol* 2010;63(1):60–76.
257. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thrombosis and Haemostasis* 2008; 99: 121–6.
258. Plášek J, Homza M, Gumulec J, Ryzí M, Stančík R, Šípula D. Resistance to antiplatelet treatment: The clinical relevance of platelet function assays. *Cor et Vasa* 2012;54(5):e305-13.
259. Siller-Matula JM, Christ G, Lang IM, Delle-Karth G, Huber K, Jilma B. Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010; 8: 351–9.
260. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in

high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol* 2009; 131(6):834-42.

261. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Miranda M, Gori AM, Marcucci R, et al. Comparison of methods for monitoring residual platelet reactivity after clopidogrel by point-of-care tests on whole blood in high-risk patients. *Thromb Haemost* 2010;104(2):287-92.

262. Ko YG, Suh JW, Kim BH, Lee CJ, Kim JS, Choi D, et al. Comparison of 2 point-of-care platelet function tests, VerifyNow Assay and Multiple Electrode Platelet Aggregometry, for predicting early clinical outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2011;161(2):383-90.

263. Woo KS, Kim BR, Kim JE, Goh RY, Yu LH, Kim MH, Han JY. Determination of the prevalence of aspirin and clopidogrel resistances in patients with coronary artery disease by using various platelet-function tests. *Korean J Lab Med* 2010 Oct;30(5):460-8.

264. Park Y, Jeong YH, Kim IS, Yun SE, Kwon TJ, Hwang SJ, Kwak CH, Hwang JY. The concordance and correlation of measurements by multiple electrode and light transmittance aggregometries based on the pre-defined cutoffs of high and low on-treatment platelet reactivity. *Platelets* 2012;23(4):290-8.

265. Tsantes A, Ikonomidis I, Papadakis I, Kottaridi C, Tsante A, Kalamara E, et al. Evaluation of the role of the new INNOVANCE PFA P2Y test cartridge in detection of clopidogrel resistance. *Platelets* 2012;23(6):481-9.

266. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. The influence of proton pump inhibitors on the antiplatelet potency of clopidogrel evaluated by 5 different platelet function tests. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010 Nov;56(5):532-9.

267. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Comparison of methods to evaluate clopidogrel-mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation. *Thromb Haemost* 2009;101(2):333-9.



268. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. The influencing factors for clopidogrel-mediated platelet inhibition are assay-dependent. *Thromb Res* 2011;128(4):352-7.
269. Stellbaum C, Ayrat Y, Morguet A, Schultheiss HP, Rauch U. Doubling the clopidogrel dose in patients with reduced responsiveness to the standard dose is associated with a limited effectiveness as evaluated by impedance aggregometry. *Cardiovasc Revasc Med* 2012;13(3):159-66.
270. Gremmel T, Calatzis A, Steiner S, Kaider A, Seidinger D, Koppensteiner R, Kopp CW, Panzer S. Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? *Platelets* 2010; 21(7): 515–21.
271. Ngyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel. A review of evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(8):1157-64.
272. Amato MC, Guarnotta V, Giordano C. Body composition assessment for the definition of cardiometabolic risk. *J Endocrinol Invest* 2013;36(7):537-43.
273. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Dev* 2007; 21: 1443-55.
274. Hayashi T, Boyko EJ, McNeely MJ, Leonetti DL, Kahn SE, Fujimoto WY. Visceral adiposity, not abdominal subcutaneous fat area, is associated with an increase in future insulin resistance in Japanese Americans. *Diabetes* 2008;57(5):1269-75.
275. Hsieh SD, Yoshinaga H. Abdominal fat distribution and coronary heart disease risk factors in men waist/height ratio as a simple and useful predictor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19: 585 – 9.
276. Hsieh SD, Yoshinaga H. Waist/height ratio as a simple and useful predictor of coronary heart disease risk factors in women. *Intern Med* 1995;34:1147-52.
277. Bonora E, Targher G, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, et al. The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet Med* 2004;21(1):52-8.

278. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, et al. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2002;25(7):1135-41.
279. Bonora E. Insulin resistance as an independent risk factor for cardiovascular disease: clinical assessment and therapy approaches. *Av Diabetol* 2005; 21: 255-61.
280. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2000;106(4):453- 8.
281. Kushner J, Samols D, Megrey M. A Unifying Biologic Explanation for ‘‘High-Sensitivity’’ C-Reactive Protein and ‘‘Low-Grade’’ Inflammation. *Arthritis Care & Research* 2010;62(4):442-6.
282. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology* 2004;25(1):4-7.
283. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 2010;33(4):920-2.
284. Pereira SS, Alvarez-Leite JJ. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep* 2014; 3:422–31.
285. Kamath DY, Xavier D, Pais P. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) & cardiovascular disease: An Indian perspective. *Indian J Med Res* 2015;142(3):261-8.
286. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477–82.
287. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant metaanalysis. *JAMA* 2005;294:1799–809.

288. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Additive value of immunoassay-measured fibrinogen and high-sensitivity C-reactive protein levels for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 2006;114:381–7.
289. Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 2012;367:1310–20.
290. Lippi G, Franchini M, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, et al. Epidemiological association between fasting plasma glucose and shortened APTT. *Clin Biochem* 2009;42: 118–20.
291. Acang N, Jalil FD. Hypercoagulation in diabetes mellitus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24 Suppl 1: 263–6.
292. Zhao Y, Zhang J, Zhang J\*, Wu J. Diabetes Mellitus Is Associated with Shortened Activated Partial Thromboplastin Time and Increased Fibrinogen Values. *PLoS ONE* 2011; 6(1): e16470. doi:10.1371/journal.pone.0016470.
293. Yano Y, Ohmori T, Hoshide S, Madoiwa S, Yamamoto K, Katsuki T, et al. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J* 2008;29(14):1729-38.
294. Aso Y, Matsumoto S, Fujiwara Y, Tayama K, Inukai T, Takemura Y. Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: association with increased plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism* 2002;51(4):471-6.
295. Komarov AL, Panchenko EP, Dobrovolsky AB, Karpov YA, Deev AD, Titaeva EV. D-dimer and platelet aggregability are related to thrombotic events in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur Heart J* 2002;23:1309-16.
296. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:803-15.

297. Blann AD, Waite MA. von Willebrand factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in predicting the progression of atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 1996 ;7(2):143-7.
298. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM 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: 4219-25.
299. Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Nikolajuk A, Otziomek E, Górska M, Kowalska I, Strączkowski M. Relationships of serum soluble E-selectin concentration with insulin sensitivity and metabolic flexibility in lean and obese women. *Endocrine* 2014;45(3):422-9.
300. Matsumoto K, Sera Y, Nakamura H, Ueki Y, Miyake S. Serum concentrations of soluble adhesion molecules are related to degree of hyperglycemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;55(2):131-8.
301. Matsumoto K, Miyake S, Yano M, Ueki Y, Tominaga Y. High serum concentrations of soluble E-selectin in patients with impaired glucose tolerance with hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* 2000; 152(2):415–20.
302. Kim J, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Molecular and Pathophysiological Mechanisms. *Circulation* 2006; 113: 1888-904.
303. Biondi – Zoccai GGL, Abbate A, Liuzzo G, Biasucci LM. Atherothrombosis, Inflammation, and Diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(7): 1071-7.
304. Palomo I, Marín P, Alarcón M, Gubelin G, Viñambre X, Mora E, Icaza G. Patients with essential hypertension present higher levels of sE-selectin and sVCAM-1 than normotensive volunteers. *Clin Exp Hypertens* 2003;25(8):517-23.

305. De Caterina R, Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A, Almerigogna F, Basta G, et al. Soluble E-selectin in essential hypertension: A correlate of vascular structural changes. *Am J Hypertens* 2001;14(3):259-66.
306. Chiu J-J, Chien S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol Rev* 2011;91(1):10.
307. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *PNAS* 2007;104(19):7899-903.
308. Jilma B, Eichler HG, Vondrovic B, Breiteneder H, Kyrle PA, Kirzeweger E et al. Effects of desmopressin on circulating P selectin. *Br J Haematol.* 1996;96:432–6.
309. Riondino S, Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Di Veroli C, Marigliano V et al. Platelet hyperactivity in hypertensive older patients is controlled by lowering blood pressure. *J Am Geriatr Soc* 1999;47(8):943–7.
310. Song Y, Manson JE, Tinker L, Rifai N, Cook NR, Hu FB, et al. Circulating levels of endothelial adhesion molecules and risk of diabetes in an ethnically diverse cohort of women. *Diabetes* 2007;56(7):1898-904.
311. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(9):3171-82.
312. Aref S, Sakrana M, Hafez AA, Hamdy M. Soluble P-selectin levels in diabetes mellitus patients with coronary artery disease. *Hematology* 2005;10(3):183-7.
313. Ang L, Palakodeti V, Khalid A, Tsimikas S, Idrees Z, Tran P, et al. Elevated Plasma Fibrinogen and Diabetes Mellitus Are Associated With Lower Inhibition of Platelet Reactivity With Clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(13):1052-9.
314. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Obesity is associated with poor response to clopidogrel and an increased susceptibility to protease activated receptor-1 mediated platelet activation. *Transl Res* 2013;161(5):421-9.

315. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernandez C, et al. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol* 2004;16(4):169-74.
316. Bonello-Palot N, Armero S, Paganelli F, Mancini J, De Labriolle A, Bonello C, et al. Relation of body mass index to high on-treatment platelet reactivity and of failed clopidogrel dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009;104(11):1511-5.
317. Ge H, Zhou Y, Liu X, Nie X, Wang Z, Guo Y, et al. Relationship between plasma inflammatory markers and platelet aggregation in patients with clopidogrel resistance after angioplasty. *Angiology* 2012;63(1):62-6.
318. Fujisue K, Sugiyama S, Ono T, Matsuzawa Y, Akiyama E, Sugamura K, et al. Effects of Endothelial Dysfunction on Residual Platelet Aggregability After Dual Antiplatelet Therapy With Aspirin and Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circ Cardiovasc Interv* 2013;6:452-9.
319. Siasos G, Oikonomou E, Zaromitidou M, Kioufis S, Kokkou E, Mourouzis K, et al. Clopidogrel response variability is associated with endothelial dysfunction in coronary artery disease patients receiving dual antiplatelet therapy. *Atherosclerosis* 2015;242:102-8.
320. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, Guthikonda S, Kleiman NS. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis* 2012;33:137-42.
321. Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *Dan Med J* 2012;59(9):B4506.
322. Costa O, van Moer G, Jochmans K, Jonckheer J, Damiaens S, De Waele M. Reference values for new red blood cell and platelet parameters on the Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:967-9.

323. Gordillo M, de la Iglesia S, Lemes A, Lopez Brito J, Garcia Bello M, Molero T. Reticulated platelets (RP) counts by Cell-Dyn Sapphire (Abbott) method. Preliminary data. *Int J Lab Hematol* 2011;33(Suppl 1):118.
324. Lang S, David R, Cohen J. Reticulated platelet normal ranges on CELL-DYN Sapphire. *Int J Lab Hematol* 2013;35(Suppl 1):112.
325. Vaduganathan M, Alviar CL, Arikan ME. Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J* 2008;156(5):1002-e1.
326. Lee EY, Kim SJ, Song YJ, Choi SJ, Song J. Immature platelet fraction in diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Thromb Res* 2013; 132:692–5.
327. Neergaard-Petersen S, Hvas A-M, Grove EL, Larsen SB, Gregersen S, Kristensen SD. The Influence of Haemoglobin A1c Levels on Platelet Aggregation and Platelet Turnover in Patients with Coronary Artery Disease Treated with Aspirin. *PLoS ONE* 2015;10(7):e0132629. doi:10.1371/journal.pone.0132629.
328. Larsen SB, Grove EL, Hvas A-M, Kristensen SD. Platelet turnover in stable coronary artery disease—Influence of thrombopoietin and low-grade inflammation. *PLoS One* 2014;9(1):e85566. doi:10.1371/journal.pone.0085566.
329. Steinhubl SR, Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005;5(6):399-408.
330. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccchia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008;99(5):930-5.
331. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Casola G, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost* 2013;109(5):846-53.
332. Lordkipanidze M. Platelet Turnover in Atherothrombotic Disease. *Curr Pharm Des* 2012;18:5328-43.

333. Frelinger AL, Michelson AD, Wiviott SD, Trenk D, Neumann FJ, Miller DL, et al. Intrinsic platelet reactivity before P2Y12 blockade contributes to residual platelet reactivity despite high-level P2Y12 blockade by prasugrel or high-dose clopidogrel. Results from PRINCIPLE-TIMI 44. *Thromb Haemost* 2011;106(2):219-26.
334. Lundström A, Laska AC, Von Arbin M, Jörneskog G, Wallén H. Glucose intolerance and insulin resistance as predictors of low platelet response to clopidogrel in patients with minor ischemic stroke or TIA. *Platelets* 2014;25(2):102-10.
335. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(14):1505-16.
336. Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(24):2261-73.
337. Mortensen SB, Larsen SB, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Reduced platelet response to aspirin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2010; 126:e318-22.
338. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P et al. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005; 54:2430-5.
339. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res* 2004; 113:101-13.
340. Ogawa H, Nakayama M, Morimoto T, Uemura S, Kanauchi M, Doi N et al. Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300:2134-41.
341. De Berardis G, Sacco M, Strippoli GF, Pellegrini F, Graziano G, Tognoni G, Nicolucci A. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b4531.



342. Ertugrul DT, Tatal E, Yuldiz M, Akin O, Yalcin AA, Ure OS et al. Aspirin resistance is associated with glycemic control, the dose of aspirin, and obesity in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(6):2897-901.
343. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, Delao T, Bergeron AL, Dong F, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost* 2007;5:490–496
344. Wurtz M, Wulff LN, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Influence of renal function and platelet turnover on the antiplatelet effect of aspirin. *Thromb Res* 2012;129:434–40.
345. Gianetti J, Parri MS, Della Pina F, Marchi F, Koni E, De Caterina A, et al. Von Willebrand Factor Antigen Predicts Response to Double Dose of Aspirin and Clopidogrel by PFA-100 in Patients Undergoing Primary Angioplasty for ST Elevation Myocardial Infarction. *The Scientific World Journal* 2013;2013:1-8.
346. Skeppholm M, Kallner A, Kalani M, Jörneskog G, Blombäck M, Wallén HN. ADAMTS13 and von Willebrand factor concentrations in patients with diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20(8):619-26.
347. Neki NS. Clopidogrel Resistance: Current Issues. *J Enam Med Col* 2016; 6(1):38–46.

Prilog 1

Autor, godina, referenca	Ispitivana grupa	Evaluirane laboratorijske metode	Vreme uzorkovanja i veličina uzorka	Antitrombocitna terapija pre testiranja	Rezultati
Paniccia 2009 (260)	AKS; PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [APACT-4004 aggregometer, LABiTec, Ahrensburg, Nemačka] <b>PFA-100</b> , (kolagen/ADP) Dade-Behring, Marburg, Nemačka	24-48h pre PCI;  Multiplate i LTA: 297  Multiplate i PFA-100: 111	klopidogrel 500 mg IV i per os 600 mg, a potom aspirin (325 mg) i klopidogrel (75 mg) dnevno, kontinuirano per os	Usklađenost Multiplate i LTA za rezidualnu reaktivnost trombocita: kappa = 0.74 (95% CI 0.64, 0.84); P<0.001  Usklađenost Multiplate i PFA-100 za rezidualnu reaktivnost trombocita: kappa = 0.19; P = NS
Paniccia 2010 (261)	AKS; PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [APACT-4004 aggregometer, LABiTec, Ahrensburg, Nemačka]	24-48h posle PCI;  801 uzorak za utvrđivanje usklađenosti metoda	Aspirin 500 mg IV, a potom 100-325 mg/dan per os, kontinuirano; klopidogrel (300-600 mg IV u bolusu, a potom 75 mg/dan per os, kontinuirano.	Usklađenost između Multiplate i LTA; 102 uzorka pozitivna sa oba testa; 609 uzoraka negativna sa oba testa; 27 uzoraka pozitivna samo sa LTA, a 63 pozitivna samo sa Multiplate; kappa = 0.63 (95% CI 0.56, 0.70); P < 0.0001.  Usklađenost između Multiplate i VerifyNow P2Y12; 132 uzorka pozitivna sa oba testa; 521 uzoraka negativna sa oba testa; 33 pozitivna samo sa Multiplate; 115 uzoraka pozitivna

		<b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA]			samo sa VerifyNow; kappa = 0.52 (95% CI 0.46, 0.58); P < 0.0001.
Ko 2011 (262)	AKS; PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA]	pre izvedene PCI (uzorak iz femoralnog katetera);  222 ispitanika	Aspirin 100 mg/dan i klopidogrel 75 mg/dan $\geq$ 5 dana pre PCI, ili aspirin 250 mg i klopidogrel 300 mg (bolus) 12-24 h pre PCI	Bland-Altman - između VerifyNow PRU i Multiplate = -17.1 (SD = 232.1) sa 95% limita usklađenosti od -472.0 to 437.8
Woo 2010 (263)	AKS; PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 20 $\mu$ M) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP, 10 $\mu$ M) [Chronolog impedantni agregometar Series 590, Probe and Co., Endingen Nemačka] <b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA] <b>VASP</b> [Platelet VASP/P2Y12 kit, BioCytex,	pre izvedene PCI;  66 ispitanika	Aspirin 300 mg klopidogrel 300 mg i cilostazol 200 mg u bolusu $\geq$ 12 h pre PCI	Usklađenost između LTA i VerifyNow, kappa = 0.25  Usklađenost između LTA and Multiplate analizatora, kappa = 0.21  Usklađenost između LTA and PRI VASP eseja, kappa = 0.14

		Marseille, Francuska];			
Siller-Matula 2010 (259)	PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>VASP</b> [Platelet VASP/P2Y12 kit, BioCytex, Marseille, Francuska]	odmah nakon PCI i najmanje 5 minuta posle IV aplikacije aspirina; 402 ispitanika	326 bolesnika na kontinuiranoj terapiji klopidogrelom; 90 bolesnika dobilo 600 mg klopidogrela u bolusu 2 dana pre PCI, a kasnije 75 mg/dan. Svi bolesnici 250 mg IV aspirina posle PCI, a kasnije 100 mg/dan.	Usklađenost između Multiplate i VASP: “non-responderi” sa oba testa, 54 (13%); “responderi” sa oba testa, 138 (34%); “non-responderi” sa Multiplate ali “responderi” sa VASP, 7 (2%); “responderi” sa Multiplate ali “non-responderi” sa VASP, 203 (51%) Bland-Altman između VASP i Multiplate = 21; 95% limita usklađenosti od -34 to 78
Sibbing 2008 (257)	PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.4 $\mu$ M) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP 5 $\mu$ mol/L) [PAPA 8 agregometar, Molab, Berlin, Nemačka]	60 bolesnika pre bolusa klopidogrela i 149 (svi) bolesnika posle bolus doze klopidogrela 149 ispitanika, ukupno	Klopidogrel u bolusu 600 mg $\geq$ 2 h pre PCI	Usklađenost između LTA i Multiplate za najniži kvartil inhibicije (n = 60): pozitivni sa oba testa = 7 (12%); negativni sa oba testa = 35 (58%); pozitivni samo sa LTA = 8 (13%); pozitivni samo sa Multiplate = 10 (17%)  Usklađenost između LTA i Multiplate za najniži kvartil inhibicije (n=149): = pozitivni sa oba testa 21 (14%); negativni sa oba testa = 94 (63%); pozitivni samo sa LTA = 17 (11%); pozitivni samo sa Multiplate 17 (11%)
Park 2012 (264)	PCI	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.4 $\mu$ M i ADP-HS 6.4 $\mu$ M ADP + 9.4 nM PGE1) [Multiplate, Dynabyte,	pre PCI 246 ispitanika	Aspirin 100 mg/dan i klopidogrel 75 mg/dan $\geq$ 5 dana pre PCI ili u bolusu 300 mg aspirina i 600 mg klopidogrela	<i>Analitička performansa za visoku reaktivnost trombocita na terapiji klopidogrelom</i>  Analitička performansa LTA maksimalna trombocitna reaktivnost (5 $\mu$ M ADP) AUC = 0.836, 95% CI: 0.777, 0.896;

		<p>Minhen, Nemačka]</p> <p><b>LTA</b> (ADP 5 i 20 <math>\mu</math>M i ADP 5 <math>\mu</math>M + 5 nM PGE1) [AggRAM agregometar, Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX]</p>			<p>P&lt;0.001. Za cut-off of <math>\geq</math>46%, analitička senzitivnost = 70.6% i analitička specifičnost = 89.3%</p> <p>Analitička performansa LTA maksimalna trombocitna reaktivnost (20 <math>\mu</math>M ADP) AUC = 0.846, 95% CI: 0.785, 0.908; P&lt;0.001. Za cut-off of <math>\geq</math>59%, analitička senzitivnost = 75.0% i analitička specifičnost = 88.2%</p> <p><i>Usklađenost metoda za visoku reaktivnost trombocita na terapiji klopidogetrom</i></p> <p>Usklađenost između ADPtest (<math>\geq</math>47 U), and LTA maksim. trombocitna agregabilnost (5 <math>\mu</math>M ADP) <math>\geq</math>46%: kappa = 0.537; P&lt;0.001 i konkordantnost = 80.5%</p> <p>Usklađenost između ADPtest (<math>\geq</math>47 U) and LTA maksim. trombocitna agregabilnost (20 mM ADP) <math>\geq</math>59%: kappa = 0.564; P&lt;0.001 i konkordantnost = 81.7%</p>
Tsantes 2012 (265)	AKS	<p><b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.5 <math>\mu</math>M) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka]</p> <p><b>LTA</b> (ADP 10 <math>\mu</math>M) [Biodata-PAP-4 agregometar, Bio/Data Corporation,</p>	1-24 h posle poslednje doze antitromb. terapije  90 ispitanika	Terapija održavanja klopidogetrom (75 mg/dan >5 dana) uz aspirin 100 mg/dan	<p><i>Bazirano na cut-off vrednostima preporučenim od proizvođača</i></p> <p>Usklađenost između Multiplate i INNOVANCE PFA-100 P2Y: kappa = 0.37; SE = 0.09; P&lt;0.05, konkordantnost = 75.6%</p> <p>Usklađenost između Multiplate i LTA: kappa = 0.30; SE = 0.10; P&lt;0.05, konkordantnost = 85.6%</p>

		<p>Horsham, PA]  <b>PFA-100</b>          (ADP/PGE1          kertridž)          [INNOVANCE          PFA P2Y,          Siemens          Healthcare          Diagnostics          Products GmbH,          Marburg,          Nemačka]</p>			<p><i>Bazirano na cut-off vrednostima povezanim sa rizikom za trombozu (iz literaturnih podataka)</i></p> <p>Usklađenost između Multiplate i INNOVANCE PFA-100 P2Y: kappa = 0.20; SE = 0.06; P&lt;0.05, konkordantnost = 71.1%</p> <p>Usklađenost između Multiplate i LTA: kappa = 0.13; SE = 0.10; P=NS, konkordantnost = 90.0%</p>
--	--	---	--	--	--

AKS - akutni koronarni sindrom; ADP - adenzin difosfat; LTA – svetlosna agregometrija; NS - nesignifikatno; PCI - perkutana koronarna intervencija; PGE1 - prostaglandin E1; VASP - vazodilatator-stimulišući fosfoprotein.

## Prilog 2

Autor, godina, referenca	Evaluirane laboratorijske metode	Vreme uzorkovanja i veličina uzorka	Rezultati
Paniccia 2009 (260)	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [APACT-4004 aggregometer, LABiTec, Ahrensburg, Nemačka] [ <b>PFA-100</b> , (kolagen/ADP) Dade-Behring, Marburg, Nemačka]	24-48h pre PCI;  Multiplate i LTA: 297  Multiplate i PFA-100: 111	Spearman rho između Multiplate i LTA = 0.73; P<0.001  Spearman rho između Multiplate i PFA-100 = -0.40; P<0.001
Paniccia 2010 (261)	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP, 10 $\mu$ mol/L) [APACT-4004 aggregometer, LABiTec, Ahrensburg, Nemačka] <b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA]	24-48h posle PCI;  801 uzorak	Spearman korelacija između Multiplate i LTA = 0.71, P < 0.0001  Spearman korelacija između Multiplate i VerifyNow = 0.62; P< 0.0001
Ko 2011 (262)	<b>Impedantna agregometrija</b> [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA]	pre izvedene PCI (uzorak iz femoralnog katetera);  222 ispitanika	Spearman korelacija između VerifyNow PRU i Multiplate analizatora = 0.390 (P < 0.001)
Gremmel 2010 (266)	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP, 6.4 $\mu$ M) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP 10 $\mu$ M)	230 ispitanika	Spearman korelacija između LTA i Multiplate analizatora = 0.45  Spearman korelacija između VerifyNow and Multiplate analizatora = 0.33

	<p>[LABiTec, Ahrensburg, Nemačka]                  Platelet agglutination assay                  (ADP cartridges)  <b>VerifyNow P2Y12</b>                  (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA  <b>VASP</b>                  [Platelet VASP, Diagnostic Stago (Biocytex), Marseille, Francuska];  <b>Impact-R</b> (ADP 1.36 M)                  [DiaMed, Cressier, Švajcarska]</p>		<p>Spearman korelacija između VASP i Multiplate analizatora = 0.32</p> <p>Spearman korelacija između Multiplate analizatora i Impact-R = -0.26</p>
Siller-Matula 2010 (259)	<p><b>Impedantna agregometrija</b>                  [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka]  <b>VASP</b>                  [Platelet VASP/P2Y12 kit, BioCytex, Marseille, Francuska];</p>	odmah nakon PCI i najmanje 5 minuta posle IV aplikacije aspirina 402 ispitanika	Korelacija između Multiplate analizatora i VASP = 0.34; P<0.001
Gremmel 2009 (267)	<p><b>Impedantna agregometrija</b>                  (ADP, 6.4 µM)                  [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka]  <b>LTA</b>                  (ADP 10 µM)                  [APACT 4S Plus aggregometer, LABiTec, Ahrensburg, Nemačka]  <b>VerifyNow P2Y12</b>                  [Accumetrics, San Diego, CA]  <b>VASP</b>                  [Platelet VASP kit, Diagnostica Stago, BioCytex, Marseille, Francuska]  <b>Impact-R test</b>                  [(ADP 1.36 M) DiaMed, Cressier, Švajcarska]</p>	80 ispitanika	<p>Spearman korelacija između LTA i VerifyNow = 0.61; P&lt;0.001</p> <p>Spearman korelacija između LTA i VASP PRI = 0.52; P&lt;0.001</p> <p>Spearman korelacija između LTA i Multiplate analizatora = 0.35; P=0.001</p> <p>Spearman korelacija između LTA i Impact-R = 0.33; P=0.002</p>
Sibbing 2008 (257)	<p><b>Impedantna agregometrija</b>                  (ADP 6.4 µM)                  [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka]  <b>LTA</b>                  (ADP 5 µmol/L)</p>	60 bolesnika pre bolusa klopidozola i 149 (svi) bolesnika posle bolus doze	<p>Korelacija između LTA (ADP 5 µM) i Multiplate analizatora = 0.71; P&lt;0.0001</p> <p>Korelacija između LTA (ADP 20 µM) i Multiplate analizatora = 0.71;</p>



	[PAPA 8 agregometar, Molab, Berlin, Nemačka]	klopidogrela	P<0.0001
Gremmel 2011 (268)	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.4 μM) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP 10 μM) <b>VerifyNow P2Y12</b> (ADP kertridž), Accumetrics, San Diego, CA <b>VASP</b> [Platelet VASP kit, Diagnostica Stago, BioCytex, Marseille, Francuska] <b>Impact-R test</b> [(ADP 1.36 M) DiaMed, Cressier, Švajcarska]	288 ispitanika	Spearman korelacija između LTA i Multiplate = 0.45  Spearman korelacija između VASP i Multiplate = 0.33  Spearman korelacija između Multiplate i Impact-R= -0.20  Svi rezultati su bili statistički značajni
Park 2012 (264)	<b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.4 μM i ADP-HS 6.4 μM ADP + 9.4 nM PGE1) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka] <b>LTA</b> (ADP 5 i 20 μM i ADP 5 μM + 5 nM PGE1) [AggRAM agregometar, Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX]	Pre PCI 246 ispitanika	Pearson korelacija između LTA maksimalne agregacije trombocita (ADP 5μM) i ADP testa = 0.678; P<0.01  Pearson korelacija između LTA maksimalne agregacije trombocita (ADP 5μM) i ADPtest HS = 0.632; P<0.01  Pearson korelacija između LTA i finalne agregacije trombocita (ADP 5 μM) i ADPtest = 0.710; P<0.01  Pearson korelacija između LTA i finalne agregacije trombocita (ADP 5 μM) i ADPtest HS = 0.691; P<0.01  Pearson korelacija između LTA maksimalne agregacije trombocita (ADP 5μM + PGE1) i ADPtest = 0.697; P<0.01  Pearson korelacija između LTA maksimalne agregacije trombocita

			<p>(ADP 5 <math>\mu</math>M + PGE1) i ADPtest HS = 0.662; P&lt;0.01</p> <p>Pearson korelacija između LTA i finalne agregacije trombocita (ADP 5 <math>\mu</math>M + PGE1) i ADPtest = 0.688; P&lt;0.01</p> <p>Pearson korelacija između LTA i finalne agregacije trombocita (ADP 5 <math>\mu</math>M + PGE1) i ADPtest HS = 0.693; P&lt;0.01</p> <p>Pearson korelacija između LTA maksimalne agregacije trombocita (ADP 20 <math>\mu</math>M) i ADPtest = 0.663; P&lt;0.01</p>
<p>Tsantes 2012 (265)</p>	<p><b>Impedantna agregometrija</b> (ADP 6.5 <math>\mu</math>M) [Multiplate, Dynabyte, Minhen, Nemačka]</p> <p><b>LTA</b> (ADP 10 <math>\mu</math>M) [Biodata-PAP-4 agregometar, Bio/Data Corporation, Horsham, PA]</p> <p><b>PFA-100</b> (ADP/PGE1 kertridž) [INNOVANCE PFA P2Y, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Nemačka]</p>	<p>1-24 h posle poslednje doze antitrombotične terapije</p> <p>90 ispitanika</p>	<p>Spearman korelacija između INNOVANCE PFA-100 P2Y i LTA maksimalne agregacije = -0.51; P&lt;0.001</p> <p>Spearman korelacija između INNOVANCE PFA-100 P2Y i LTA agregacije (6 min) = -0.55; P&lt;0.001</p> <p>Spearman korelacija između INNOVANCE PFA-100 P2Y i Multiplate analizatora AUC = -0.47; P&lt;0.001</p> <p>Spearman korelacija između INNOVANCE PFA-100 P2Y i VASP PRI = -0.41; P = 0.003</p>

ADP - adenzin difosfat; LTA – svetlosna agregometrija; NS - nesignifikatno; PCI - perkutana koronarna intervencija; PGE1 - prostaglandin E1; VASP - vazodilatator-stimulišući fosfoprotein.

### Prilog 3

Originalni izveštaj sa Multiplate analizatora, Dynabyte, Minhen, Nemačka

