

¹ Institut „Vinča”, Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu, P.fax 522, 11001 Beograd, Srbija

² Institut za kardiovaskularne bolesti Dedinje, Beograd, Srbija

³ Klinički centar Zemun, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

BIOMARKERI U KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA

BIOMARKERS OF CARDIOVASCULAR DISEASES

¹ Kristina Savic, ¹Sonja Zafirovic, ¹Ivana Resanovic, ¹Emina Sudar, ²Vera Maravic-Stojkovic, ³Biljana Putnikovic i ¹Esma R. Isenovic

Sažetak

Biomarkeri predstavljaju indikatore normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili farmakoloških odgovora na terapijske intervencije. Interleukin-6 (IL-6, engl. Interleukin-6) je biomarker, čija sinteza može biti aktivirana različitim stimulusima, kao što su: interferon- γ (IFN- γ , engl. Interferon- γ), faktor tumorske nekroze (TNF, engl. Tumor Necrosis Factor) i/ili interleukin-1 (IL-1, engl. Interleukin-1). IL-6 svoje efekte ostvaruje preko IL-6 receptora (IL-6R, engl. IL-6 Receptor). Pokazano je da kod transgenih miševa, kod kojih je indukovana ekspresija IL-6 i IL-6R, dolazi do hipertrofije miokarda. U mehanizmu hipertrofije miokarda bitnu ulogu ima i novootkriveni kardirotrofin-1 (CT-1, engl. Cardiotrophin-1) koji je jedan od članova IL-6 familije. Aktivnost IL-6 vezuje se za razvoj aneurizme abdominalne aorte (AAA, engl. Abdominal Aortic Aneurysm), zapravo, pokazano je da su aneurizme mesta odakle cirkuliše IL-6, a takođe se smatra da je koncentracija IL-6 u pozitivnoj korelaciji sa dijametrim AAA. C-reaktivni protein (CRP, engl. C-Reactive Protein) je jedan od mnogobrojnih biomarkera kardiovaskularnih bolesti. Uloga CRP-a je u nastanku i progresiji kardiovaskularnih bolesti. Lokalna produkcija CRP-a od strane glatkih mišićnih i endotelnih ćelija krvnog suda, u velikoj meri utiče na razvoj procesa ateroskleroze. Važnu ulogu u nastanku ateroskleroze, osim CRP-a, ima i oksidovani lipoprotein male gustine (ox-LDL, engl. Oxidized Low Density Lipoprotein). Oksidaciju LDL-a vrše različiti enzimi. Ox-LDL nakon što prođe u intimu krvnog suda indukuje sakupljanje monocita, tj. monociti se prevode u makrofage koji vezuju ox-LDL. Kada se makrofagi napune ox-LDL-om, dolazi do pokretanja signala ćelijske smrti i stvaraju se forme penušavih ćelija koje čine početni deo aterosklerotičnog plaka.

Nova saznanja o mehanizmu delovanja kao i uloge biomarkera u nastanku kardiovaskularnih bolesti, svakako će pružiti jednu od mogućnosti prevencije nastanka ovih poremećaja, a takođe i adekvatnu terapiju u lečenju kardiovaskularnih

oboljenja, što i jeste jedan od glavnih ciljeva intezivnih istraživanja u oblasti biomarkera.

U ovom preglednom članku, opisana su tri biomarkera kardiovaskularnih bolesti: IL-6, CRP i LDL.

Ključne reči: interleukin-6, C-reaktivni protein, lipoprotein male gustine, hipertrofija miokarda, aneurizma abdominalne aorte, ateroskleroza.

Summary

Biomarkers are indicators of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacologic responses to therapeutic interventions. Interleukin-6 (IL - 6) is a biomarker whose synthesis could be activated by various stimuli, such as interferon- γ (IFN - γ), tumor necrosis factor (TNF) and/or interleukin - 1 (IL - 1). IL - 6 achieves its effects through the IL-6 receptor (IL - 6R). It has been shown that transgenic mice, which have induced expression of IL - 6 and IL - 6R develop myocardial hypertrophy. In myocardial hypertrophy, an important role is played by a newly discovered cardiotrophin-1, a member of the IL - 6 family. The activity of IL - 6 is associated with the development of abdominal aortic aneurysm (AAA); in fact, it has been shown that the concentration of IL - 6 positively correlates with AAA diameters. C-reactive protein (CRP) is one of the biomarkers of cardiovascular diseases. Local production of CRP by the smooth muscular and endothelial cells of the vessel leads to the development of atherosclerosis to a large extent. Oxidized low-density lipoprotein (ox - LDL) also has an important role in the development of atherosclerosis. After penetrating the intima of the vessel, ox - LDL induces monocyte collection, i.e. monocytes are translated into macrophages that bind ox - LDL. Having filled the macrophages with ox - LDL, the signals of cell death are activated, which leads to the creation of foamy cells that make up the initial part of the atherosclerotic plaque.

New knowledge about the mechanism of action and the role of biomarkers in the development of cardiovascular diseases will certainly provide an opportunity to prevent the onset of these disorders, as well as an adequate therapy in the treatment of cardiovascular diseases, which is one of the main goals of intensive research in the field of biomarkers.

Key words: interleukin-6, C-reactive protein, low density lipoprotein, myocardial hypertrophy, abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis.

Uvod

Termin biomarker (biološki marker) uveden je 1989. godine i definisan je kao merljiv i kvantifikovan biološki parametar (npr. koncentracija specifičnog enzima, koncentracija specifičnog hormona, specifičan gen i genotip distribuiran u populaciji, itd.) koji predstavlja pokazatelj stanja fizioloških procesa, a takođe je i pokazatelj rizika za nastanak određene bolesti. Shodno tome, biomarkeri mogu biti klasifikovani kao: a) biomarkeri koji ukazuju na predispoziciju nastanka bolesti; b) skrining biomarker-omogućava skrining za subkliničke bolesti; c) dijagnostički biomarker- omogućavaju dijagnostiku bolesti; d) biomarkeri koji karakterišu ozbiljnost bolesti; e) prognostički biomarkeri- predviđaju tok bolesti, uključujući ponovno oboljevanje, praćenje odgovora na terapiju i efikasnost terapije [1]. 2001. godine, radna grupa Nacionalnog instituta za zdravlje SAD-a (NIH, engl. National Institutes of Health) definisala je sam biomarker kao karakteristiku organizma koja može biti objektivno izmerena, procenjena i predstavljena kao indikator normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili odgovora na terapijske intervencije farmakološkim supstancama [1, 2].

Da bi biomarker bio klinički „koristan”, moraju postojati analitičke metode koje omogućavaju pouzdano merenje biomarkera, kao i da same metode istovremeno budu brze i isplative. Svaki biomarker i njegov test moraju proći detaljnu analizu, dakle izučavaju se uslovi merenja, tip uzorka, rukovanje uzorkom kao i osobine analitičke metode. Tako na primer, nakon eksperimentalnih i epidemioloških podataka, uočena je veza između liganda klastera diferencijacije 40 (CD40L, engl. Cluster of Differentiation 40 Ligand) i ateroskleroze, međutim detaljnije analize su pokazale da samo rukovanje/obrada uzorka, iz kojeg se određuje ovaj biomarker, značajno utiče na biomarker CD40L [3].

Biomarkeri kardiovaskularnih bolesti olakšavaju dijagnostiku i omogućavaju predviđanje toka kardiovaskularnih bolesti, a samim tim poboljšavaju i optimizuju tretman obolelog pacijenta. Na primer, kod osoba sa hroničnim i atipičnim bolom u grudima, biomarkeri dobijeni različitim testovima (npr.

dobutamin stres ehokardiogramom ili ergometar stres testom) mogu da olakšaju identifikovanje angine pektoris kod ovih pacijenata. Biomarkeri mogu ukazati na razliku između dva patološka stanja organizma tako, na primer, kod nekih pacijenata sa akutnim bolom u grudima sumnja se na akutni koronarni sindrom, ali biomarkeri mogu pokazati da se ipak radi o akutnom infarktu miokarda [4].

U ovom preglednom članku opisana su tri biomarkera kardiovaskularnih bolesti: interleukin-6 (IL-6, engl. Interleukin-6), C-reaktivni protein (CRP, engl. C-Reactive Protein) i lipoprotein male gustine (LDL, engl. Low Density Lipoprotein).

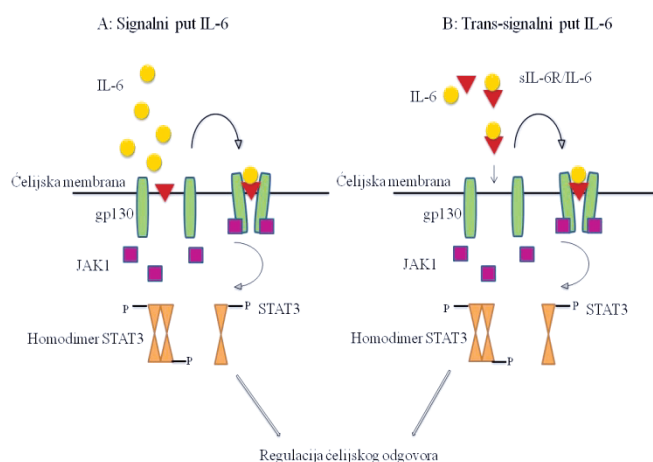
Interleukin-6 (IL-6) kao biomarker kardiovaskularnih bolesti

Interleukini (IL) su signalni molekuli koji su uključeni u komunikaciju između mnogih ćelija, proizvodi su različitih tipova ćelija, a posebno ćelija imunskog sistema. IL-6 je jedan od mnogobrojnih interleukina koji utiče na patofiziološke procese [5]. Sinteza IL-6 može biti aktivirana različitim stimulusima, uključujući interferon- γ (IFN- γ , engl. Interferon- γ), faktor tumorske nekroze (TNF, engl. Tumor Necrosis Factor) i/ili interleukin-1 (IL-1, engl. Interleukin-1). Na stvaranje IL-6, takođe, mogu uticati kako virusi, tako i bakterijski endotoksini. IL-6 se sintetiše kao molekul sa dugim signalnim peptidom od 28 aminokiselina. Nativni molekul IL-6 nema signalni peptid, često je N- i O- glikozilovan, a IL-6 može biti i fosforilisan. Gen za IL-6 lokalizovan je na hromozomu 7 (7p21). Polipeptid IL-6 nakon posttranslacione modifikacije, sastoji se od 184 aminokiselina [6] i sintetišu ga prvenstveno monociti i makrofagi na mestima akutne upale, kao i T-limfociti na mestima hronične upale [7].

Produkcija IL-6 kako od strane monocita, tako i od strane drugih ćelija, zavisi od nekoliko nuklearnih transkripcionih faktora, prvenstveno od nuklearnog faktora kapa B (NF κ B, engl. Nuclear Factor Kappa B), CCAAT/enhenser vezujućeg protein beta (C/EBP β , engl. CCAAT/Enhancer Binding Protein β) i od aktivatorskog proteina-1 (AP-1, engl. Activator Protein) [8]. IL-6 ima mnogobrojne uloge u organizmu, ali njegova centralna uloga je u odbrani domaćina usled svog širokog spektra imune i hematopoetične aktivnosti. IL-6 ima ulogu i u proliferacionim, diferencijacionim i maturacionim procesima, zavisno od tip ćelije u kojoj IL-6 ispoljava svoje dejstvo [9].

IL-6 svoje efekte ostvaruje preko IL-6 receptora (IL-6R, engl. IL-6 Receptor) koji se sastoji iz dve komponente, komponente od 80 kDa koja vezuje ligand, tj. IL-6, i druge komponente od 130 kDa, koja se naziva gp130 i ima ulogu u transdukciji signala. IL-6R je eksprimiran na mnogim ćelijama, među kojima su i endotelne ćelije i na svim ovim ćelijama može da se formira IL-6/IL-6R kompleks [10]. Nakon vezivanja IL-6 za svoj receptor, aktivira se signalni put, prvo se

regrutuje gp130, zatim dolazi do aktiviranja Janus kinaze tipa 1 (JAK1, engl. **Janus Kinase 1**) koja se vezuju za intracelularni deo gp130. JAK1 kinaza svojom aktivnošću (fosforilacijom) aktivira transkripcioni faktor tzv. signalni transdudktor i aktivator transkripcije 3 (STAT3, engl. **Signal Transducer and Activator of Transcription 3**), koji se dimerizuje, transportuje u nukleus i nakon toga pokreće transkripcionu mašineriju (*Slika 1.*). Primarni rezultat ovog transkripcionog programa je aktiviranje rasta, diferencijacije, kao i isključivanje gena koji kodiraju proteine čije je uloga u regulaciji apoptoze ćelije, neki od tih proteina su: anti-apoptotski protoonkogeni Bcl-2 (Bcl-2, engl. **B-Cell Leukemia/Lymphoma 2**) i Bcl-xL (Bcl-xL, engl. **B-Cell Lymphoma-Extra Large**), kao i transkripcioni faktori JunB (JunB, engl. **Jun B** proto-oncogene) i cFos (cFos, engl. **C Fos** proto-oncogene) [11, 12]. Od velikog interesa je trans-signalni put, u kome se IL-6 vezuje za solubilne IL-6R (sIL-6R, engl. **Soluble IL-6 Receptor**). Pri kontaktu slobodnih IL-6 molekula u serumu i sIL-6R, dolazi do uspostavljanja kompleksa i nakon toga ovaj kompleks može aktivirati bilo koju ćeliju koja na svojoj membrani ima gp130 (*Slika 1.*). IL-6 trans-signalni put je najverovatnije odgovoran za većinu bolesti kod kojih je zastupljen proces inflamacije [13].



Slika 1. Shematski prikaz signalnog i trans-signalnog puta interleukina-6 (IL-6). A) Signalni put IL-6. IL-6 vezuje se za ligand vezujuću subjedinicu koja se nalazi na ćelijskoj membrani, nakon čega dolazi do aktiviranja i dimerizacije gp130. Sledi fosforilacija STAT3 i stvaranje aktivnog homodimera STAT3. B) Trans-signalni put IL-6. IL-6 i solubilna ligand vezujuća subjedinica stvaraju kompleks, koji se regrutuje na membranu, i nakon toga se aktivira i dimerizaciju gp130, nakon koje sledi fosforilacija STAT3 i stvaranje aktivnog homodimera STAT3. Rezultat aktiviranja ova puta je regulacija ćelijskog odgovora.

(Preuzeto i modifikovano sa sajta: <http://www.ijbs.com/v08/p1237/ijbsv08p1237g01.jpg>)

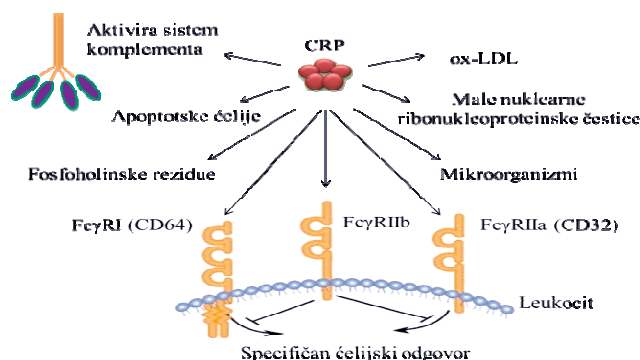
IL-6 i koronarna bolest srca. Biasucci i saradnici su pokazali da se povećan nivo IL-6, zajedno sa drugim citokinima, detektuje kod pacijenata sa nestabilnom anginom pektorisa, zapravo pokazano je da učestvuju, kako u formiranju aterosklerotičnih naslaga u koronarnim arterijama, [14] tako i u aktiviranju metaloproteina za koje se zna da učestvuju u remodeliranju ekstracelularnog matriksa [15]. IL-6 ima proinflamatorna svojstva sa stimulatornim efektom na T- i B-limfocite koji se smatraju važnim faktorom u patogenezi nestabilne angine pektorisa [16]. Pokazano je da se nivo IL-6 povećava u stanjima akutne faze nestabilne angine pektorisa. IL-6 stimuliše ekspresiju adhezivnih molekula na površini endotelnih ćelija, što dovodi do adhezije leukocita, kao što su monociti, a rezultat ovog procesa je rani imunski odgovor. U jednoj od studija uočen je upravo porast ovih adhezivnih molekula kao i nivo IL-6 u serumu pacijenata sa nestabilnom anginom pektorisa [17, 18].

IL-6 i srčana hipertrofija. Pokazano je da transgeni miševi koji su bez ekspresije gena za IL-6 i/ili IL-6R nemaju uočljive abnormalnosti miokarda [19]. Nasuprot njima, neonatalne ćelije srca izolovane iz normalnih miševa, pokazivale su specifičan odgovor na kombinaciju IL-6 i sIL-6R, ove ćelije su se uvećavale, što ukazuje na to da usled povećane aktivacije signalnog puta gp130 dolazi do hipertrofije komora srca. Kod transgenih miševa kod kojih je aktivirana prekomerna ekspresija IL-6 i gp130, takođe se uočava hipertrofija miokarda [19]. Pokazano je da u mehanizmu nastanka hipertrofije miokarda bitnu ulogu ima i novootkriveni molekul kardirotrofin-1 (CT-1, engl. **Cardiotrophin-1**) koji je kloniran kao indukcioni faktor hipertrofije miocita [20]. Sam CT-1 je član IL-6 familije i na različite načine učestvuje u nastanku hipertrofije, uključujući različite poremećaje, od poremećaja u organizaciji sarkomere, pa do uticaja na embrionalnu ekspresiju gena za receptor gp130 za koji se inače vezuje [21].

Takođe, pokazano je da je IL-6 u korelaciji sa razvojem aneurizme abdominalne aorte (AAA, engl. **Abdominal Aortic Aneurysm**). Pokazano je da je koncentracija cirkulišućeg IL-6 povišena kod pacijenata sa AAA u poređenju sa kontrolnom grupom [22]. S obzirom da je sama aneurizma izvor cirkulišućeg IL-6, koncentracija IL-6 može imati prognostički značaj jer se smatra da je koncentracija IL-6 u korelaciji sa dijametrom AAA. Takođe, imajući u vidu da ćelije, koje su u sastavu aneurizme, luče IL-6, zaključuje se da veća aneurizma ima veću površinu ćelija koje luče IL-6, a odatle i veću koncentraciju IL-6 u serumu pacijenata.

C- reaktivni protein (CRP) kao biomarker kardiovaskularnih bolesti

CRP je dobio svoje ime po osobini da može da istaloži C-polisaharid iz bakterije *Streptococcus pneumoniae*. CRP je protein akutne faze inflamacije i veoma je senzitivni marker inflamacije i tkivnog oštećenja. S obzirom da je inflamatorni molekul, smatra se da je medijator imunskog odgovora i veoma je sličan antitelima jer prepoznaje i vezuje različite ligande, uključujući monocite, makrofage, a osim toga aktivira sistem komplementa, opsonizuje biološke čestice, i ima mnoge druge uloge [23]. Humani CRP sastoji se od pet identičnih neglikozilovanih polipeptidnih subjedinica, i svaka subjedinica sastoji se od 206 aminokiselina koje su međusobno povezane nekovalentnim vezama i zajedno čine pentamer [24]. CRP subjedinice imaju karakterističan lektinski nabor, sastavljen od dva sloja β ploča, i u ovu strukturu, takođe, ulaze i dva jona kalcijuma, a sa konkavne strane ove subjedinice, gde se nalaze α lanci, vezuju se ligandi [24]. Humani CRP je kalcijum-zavisni ligand vezujući protein sa visokim afinitetom vezivanja kako za fosfatidilholinske ostatke tako i za mnoge biološke molekule, aggregate, oštećene ćelije, male nuklearne ribonukleoproteinske čestice i apoptotske ćelije. Ligandi koji se vezuju za CRP mogu biti glicin, fosfolipidi, razne komponente mikroorganizama, kao i kapsula bakterija, gljivice i mnogi drugi paraziti. U momentu kada CRP prepozna i veže svoj ligand, aktivira sistem komplementa, pri čemu dolazi do razlaganja ćelijske membrane ili razgradnje molekula, pod uticajem C5-C9 kompleksa sistema komplementa [25]. CRP može da se veže za Fc receptore (FcR) specifične za Fc region imunoglobulina G (FcR) koji se nalaze na površini leukocita pri čemu, kada se veže se za Fc γ R tipa I (Fc γ RI; CD64), kao i za Fc γ R tipa IIa (Fc γ R IIa; CD32), ostvaruje stimulatorne efekte u ćeliji. Ukoliko se CRP veže za Fc γ R tipa IIb (Fc γ R IIb) inhibitorski receptor, dovodi do blokiranja stimulatornih signala koji su pokrenuti preko Fc γ RI i Fc γ RIIa [26]. Specifični ligandi koji mogu da se vežu za CRP su oksidovani lipoprotein male gustine (ox-LDL, engl. **O**xidized LDL) i oksidovani lipoprotein veoma male gustine (ox-VLDL, engl. **O**xidized **V**ery **L**ow **D**ensity **L**ipoprotein), međutim, novija istraživanja su pokazala da nativni CRP ne vezuje neoksidovani LDL i VLDL [27].



Slika 2. Ligandi C- reaktivnog proteina (CRP). Ox-LDL, oksidovani lipoprotein male gustine; Fc γ RI i Fc γ RIIa su stimulatorni receptori eksprimirani na površini leukocita. Fc γ RIIb je inhibitorski receptor preko kojeg CRP ostvaruje svoje inhibitorne efekte.

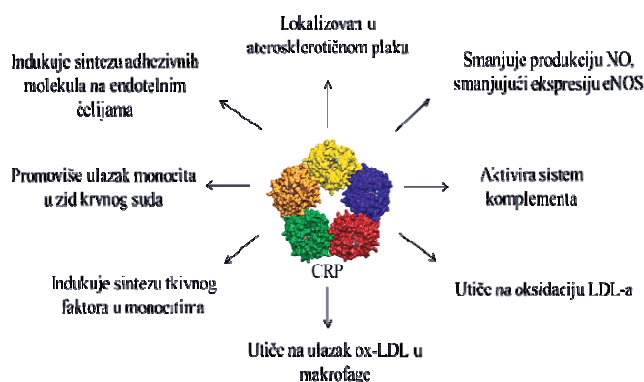
(Preuzeto i modifikovano sa sajta:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661605002809>)

U poslednjih nekoliko godina mnogobrojne studije ukazuju da je CRP važan biomarker kardiovaskularnih bolesti [28, 29]. Pokazana je uloga CRP-a u nastanku i progresiji kardiovaskularnih bolesti [30]. Studije primarne prevencije ukazuju da CRP ima vrlo važan prognostički značaj nastanka kardiovaskularnih poremećaja [31]. Osobe sa visokim nivoom izmerenog CRP-a, imaju dvostruko veći rizik od infarkta u poređenju sa pojedincima kod kojih povećanje CRP nije zapaženo, i dvostruko veći rizik od cerebrovaskularnog moždanog udara, bez obzira što kod takvih osoba nisu ustanovljeni drugi faktori rizika za nastanak kardiovaskularnih poremećaja [32]. Nedavno je pokazano da merenje CRP-a zajedno sa merenjem LDL-a ima znatno bolji prognostički značaj u nastanku kardiovaskularnih bolesti, nego merenje novoa samog LDL-a [33]. Studije sekundarne prevencije, pokazuju da osobe koje su imale infarkt miokarda imaju i povećan nivo CRP-a, dok osobe koje nisu pretrpele nikakav kardiovaskularni poremećaj imaju znatno niži nivo CRP-a [34]. Trenutno je važeće mišljenje da vaskularna inflamacija predstavlja ključ u nastanku ateroskleroze, pri čemu je upravo nivo izmerenog CRP-a marker tog inflamatornog procesa [35]. CRP se sintetiše kako u jetri, tako i u drugim tkivima, kao što su neuroni, bubrezi, respiratorni trakt, ali postoji sve više dokaza da CRP luče, kako glatke mišićne, tako i endotelne ćelije krvnih sudova. Lokalna produkcija CRP-a od strane glatkih mišićnih i endotelnih ćelija može u velikoj meri da doprinese razvoju kardiovaskularnih komplikacija, kao što je to ateroskleroza [36].

Ateroskleroza je multifaktorijalna bolest [37] koja se prvenstveno manifestuje disfunkcijom endotela koji počinje da luči veliku količinu citokina, na prvom

mestu IL-6, koji potom pokreće produkciju CRP-a i fibrinogena u jetri [38]. Disfunkcija endotela nastaje usled aktivacije sistema komplementa, što za rezultat ima nastanak inflamacionog procesa [39]. CRP indukuje sintezu adhezivnih molekula na samom endotelu, tj. intercelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1, engl. InterCellular Adhesion Molecule-1), E-selektin i vaskularni adhezivni molekul-1 (VCAM-1, engl. Vascular Cell Adhesion Molecule-1) koji su specifični za privlačenje monocita [40]. Pokazano je da postoji povezanost između mehanizma aktivacije trombocita i konformacione promene nativnog pentamernog CRP-a [41]. Pretpostavlja se da se cirkulišući trombociti vezuju za oštećen endotel, a nakon toga pentamerna forma CRP-a preko svog fosfatidilholin vezujućeg mesta vezuje se za fosfatidilholine na trombocitima, pri čemu CRP prelazi u monomernu formu i u monomernoj formi CRP više nije u mogućnosti da opsonizuje ox-LDL, što dovodi do nesmetanog razvoja procesa ateroskleroze. Predpostavlja se da monomerne forme CRP-a iniciraju ekspresiju integrina i adhezivnih molekula na površini endotelnih ćelija i na taj način svojim delovanjem omogućavaju vezivanje aktiviranih monocita [42]. Nakon prodiranja monocita do intime oni se diferenciraju u poseban tip makrofaga koji vrše ingestiju ox-LDL što dovodi do njihovog raspadanja i do formiranja penušavih ćelija (engl. foam cell) [43, 44]. Pored toga što utiče na ingestiju ox-LDL čestica, CRP ima i ulogu u sprečavanju ulaska azot-monoksida (NO), kao vazodilatatora, u endotel, tako što utiče na regulaciju endotelne NO sintaze (eNOS, engl. Endothelial Nitric Oxide Synthase) [45].



Slika 3. Mehanizmi u kojima učestvuje C- reaktivni protein (CRP). NO azot- monoksid, eNOS endotelna NO sintaza;; LDL lipoprotein male gustine; ox-LDL oksidovani LDL.

(Pruzeto i modifikovano sa sajtova: <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S014628060400074X-gr2.jpg> i <http://web.expasy.org/spotlight/images/splt030.jpg>)

Takođe, visok nivo CRP-a može da dovede do povećanja krvnog pritiska, tako što deluje na endotelne ćelije, što za posledicu ima vazokonstrikciju i lučenje endotelina-1.

Lipoprotein male gustine (LDL) kao biomarker kardiovaskularnih bolesti

LDL su heterogene čestice koje su klasifikovane u više različitih podklasa koje se međusobno razlikuju po veličini, gustini, fizičko-hemijskom sastavu, metabolizmu i oksidativnoj osetljivosti, kao i faktoru rizika za nastanak ateroskleroze [46]. LDL čestice se mogu podeliti u [47]. LDL čestice su građene od holesterola i lipida okruženih apolipoproteinom B-100 (Apo B-100). Uloga LDL je da transportuje lipide kroz krvotok do perifernih tkiva gde se pomoću LDL receptora, koji se nalaze na membrani ćelija, endocitozom ubacuju u citoplazmu i na taj način snabdevaju holesterolom periferne ćelije koje nemaju sposobnost da same sintetišu holesterol [48]. Pokazano je da oksidativni stres i oksidacija LDL igraju važnu ulogu u nastanku procesa ateroskleroze [49]. Sama oksidacija LDL je složen proces tokom kojeg i lipidi i proteini koji ga čine, prolaze kroz oksidativne promene pri čemu nastaju veoma složene strukture, kao što je lizofosfatidilholin (LPC, engl. Lysophosphatidylcholine) [50]. Po dolasku u kontakt LDL čestica sa proteoglikanima na površini ćelija, LDL čestice postaju veoma osetljive i podložne procesima oksidacije kao i drugim hemijskim modifikacijama. Oksidativnu modifikaciju LDL-a mogu izazvati različiti oksidansi, različitim mehanizmima. LDL može biti izložen uticaju oksidansa poreklom iz ćelija u subendotelnom prostoru arterija ili može biti oksidovan neenzimski od strane metalnih jona prisutnih u proteinima, heminima i drugim katalizatorima [51]. Ox-LDL nakon što prodre u intimu krvnog suda indukuje sakupljanje monocita, tako što stimuliše sintezu monocit hemotaktičnog proteina-1 (MHP-1, engl. Monocyte Chemoattractant Protein-1), koji je eksprimiran u endotelnim ćelijama. Sam endotel, takođe, sintetiše kako VCAM-1, ICAM-1 tako kao i P-selektin, adhezivne molekule koji posreduju u interakciji endotela i monocita [52]. Sama uloga VCAM-1 u formiranju aterosklerotičnih lezija pokazana je i eksperimentalno kod genetski modifikovanih miševa, kod kojih VCAM-1 nije ekspreimiran kao ni formiranja plakova i lezija koje su karakteristične za aterosklozu [53]. Takođe, pokazano je i učešće MHP-1 u formiranju aterosklerotičnih plakova. Kod miševa mutanata, kod kojih je „ugašena“ ekspresija gena za MHP-1 uočeno je kašnjenje ili odsustvo formiranja aterosklerotičnih lezija [54]. Nakon što monociti prodru u zid arterija dolazi do sinteze monocit/makgorofagnog faktora stimulacije kolonije (M-CSF, engl. Macrophage Colony-Stimulating Factor) koji omogućava konverziju

monocita u makrofage. M-CSF omogućava ekspresiju receptora na novonastalim makrofagima, a takođe potpomaže proizvodnju inflamatornih molekula, IFN- γ , TNF- β [55]. Nakon ulaska u endotel i oksidacije, novonastali ox-LDL bivaju prepoznati od strane makrofaga, koji vezuju ox-LDL preko svojih receptora hvatača tipa 1 (SR-A1, engl. Scavenger Receptors type 1), preko antigena CD36 i preko makrofagnog antigena CD68 [49]. U proces nastanka ateroskleroze uključuju se i T-limfociti kao i dendritske ćelije, koje mogu interagovati sa VCAM-1 i tako ući u endote gde odgovaraju na signale inflamatornih procesa, kao što su IFN- γ , TNF- β , a kao rezultat odgovora je aktivacija makrofaga, endotelnih ćelija i stalno održavanje inflamatornog procesa [52].

Oksidaciju LDL-a vrše enzimi lipooksigenaze i mijeloperoksidaze u prisustvu jona metala bakra i gvožđa. Minimalno oksidovani LDL ima mali afinitet vezivanja za svoje receptore i zadržava se u u krvi i može da se detektuje u serumu, dok intenzivno oksidovan LDL ima veliki afinitet vezivanja za receptore [56]. Oksidacijom lipida LDL-a stvara se nekoliko manje ili više stabilnih produkata, uključujući LPC, koji je proizvod esterifikacije holesterola, a takođe nastaju i aldehidni proizvodi peroksidacije lipida [57]. Pokazano je da LPC povećava produkciju superoksidnog anjona O_2^- u endotelnim i u glatkim mišićnim ćelijama vaskulature [58]. Smatra se da je LPC jak stimulator nikotinamid adenin dinukleotid fosfatne [NAD(P)H, engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate] oksidaze što ukazuje da je LPC jedan od proizvoda oksidacije LDL-a koja izaziva oksidativni stres [59]. Pokazano je da aorta hiperholesterolemičnih zečeva proizvodi mnogo više O_2^- nego aorte kontrolnih grupa zečeva koje nisu hranjene holesterolom [60]. Takođe, jedna studija pokazala je da tretiranjem endotelnih ćelija sa ox-LDLom, dolazi do smanjene fosforilacije treoninskih ostataka u signalnom putu eNOS, što izaziva produkciju O_2^- [61]. U generisanju O_2^- učestvuju i lektinu slični receptori (LOX-1, engl. Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1) za koje je ox-LDL ligand [62]. Ox-LDL utiče, na ćelije kardiovaskularnog sistema, preko LOX-1 receptora, produkujući asimetrični dimetil L-arginina (ADMA, engl. Asymmetric Dimethylarginine), koji je endogeni inhibitor eNOS-a i faktor kardiovaskularnog rizika [50, 63]. Ox-LDL može akutno povećati ekspresiju ADMA, aktiviranjem ekspresije N- metiltransferaza koje sintetišu ADMA [50, 64]. ADMA u endotelnim ćelijama izaziva oksidativni stres, dok u makrofazima učestvuje u povećanju ekspresije LOX-1 receptora što ponovo ima za posledicu nastanak oksidativnog stresa [65, 66].

Zaključak

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju jedan od najvećih uzroka smrtnosti, kako kod nas, tako i u svetu. Nedostatak jasno definisanih kriterijuma za dijagnostiku i procenu rizika za nastanak ovih bolesti, dodatno doprinosi stopi smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. Poslednjih decenija istraživanja su fokusirana na identifikovanje biomarkera koji će ukazivati na rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i koji će takođe omogućiti ranu i tačnu dijagnostiku. Biomarkeri, IL-6, CRP i ox-LDL, kao predstavnici inflamatornog i oksidativnog procesa, mogu ukazivati na mogući razvoj kardiovaskularnih bolesti. Veoma je važno detaljno poznavanje uloge IL-6, CRP i ox-LDL, u nastanku kardiovaskularnih bolesti kako bi se unapredila prevencije nastanka kardiovaskularnih bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan projektom broj 173033 (dr Esma R. Isenović) finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

1. Atkinson, A.J., W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, D. F. Hoth, J. A. Oates, C. C. Peck, R. T. Schooley, B. A. Spilker, J. Woodcock and S. L. Zeger, *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69** (3): p. 89-95.
2. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. Circulation, 2006. **113** (19): p. 2335-62.
3. Santilli, F., S. Basili, P. Ferroni, and G. Davi, *CD40/CD40L system and vascular disease*. Intern Emerg Med, 2007. **2** (4): p. 256-68.
4. Morrow, D.A., J.A. de Lemos, M.S. Sabatine, and E.M. Antman, *The search for a biomarker of cardiac ischemia*: Clin Chem. 2003 Apr;49 (4):537-9.
5. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response*. Biochem J, 1990. **265** (3): p. 621-36.
6. Savino, R., A. Lahm, M. Giorgio, A. Cabibbo, A. Tramontano, and G. Ciliberto, *Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor-binding site: implications for its three-dimensional structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90** (9): p. 4067-71.
7. Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga, *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 1995. **86** (4): p. 1243-54.
8. Dendorfer, U., P. Oettgen, and T.A. Libermann, *Multiple regulatory elements in the*

- interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide.* Mol Cell Biol, 1994. **14** (7): p. 4443-54.
9. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation.* Arthritis Res Ther, 2006. **8** (2): p. 28.
 10. Hirano, T., *Interleukin 6 and its receptor: ten years later.* Int Rev Immunol, 1998. **16** (3-4): p. 249-84.
 11. Lindeman, J.H., H. Abdul-Hussien, A.F. Schaapherder, J.H. Van Bockel, J.H. Von der Thusen, D.L. Roelen, and R. Kleemann, *Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm.* Clin Sci, 2008. **114** (11): p. 687-97.
 12. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130.* Cell, 1990. **63** (6): p. 1149-57.
 13. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein, *Soluble cytokine receptors are present in normal human urine.* J Exp Med, 1989. **170** (4): p. 1409-14.
 14. Biasucci, L.M., G. Liuzzo, G. Fantuzzi, G. Caligiuri, A.G. Rebuzzi, F. Ginnetti, C.A. Dinarello, and A. Maseri, *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events.* Circulation, 1999. **99** (16): p. 2079-84.
 15. Rajavashisth, T.B., J.K. Liao, Z.S. Galis, S. Tripathi, U. Laufs, J. Tripathi, N.N. Chai, X.P. Xu, S. Jovinge, P.K. Shah, and P. Libby, *Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase.* J Biol Chem, 1999. **274** (17): p. 11924-9.
 16. Le, J.M., G. Fredrickson, L.F. Reis, T. Diamantstein, T. Hirano, T. Kishimoto, and J. Vilcek, *Interleukin 2-dependent and interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85** (22): p. 8643-7.
 17. Doo, Y.C., S.J. Han, J.H. Lee, G.Y. Cho, K.S. Hong, K.R. Han, N.H. Lee, D.J. Oh, K.H. Ryu, C.Y. Rhim, K.H. Lee, and Y. Lee, *Associations among oxidized low-density lipoprotein antibody, C-reactive protein, interleukin-6, and circulating cell adhesion molecules in patients with unstable angina pectoris.* Am J Cardiol, 2004. **93** (5): p. 554-8.
 18. Braun, M., P. Pietsch, S.B. Felix, and G. Baumann, *Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27** (12): p. 2571-9.
 19. Hirota, H., K. Yoshida, T. Kishimoto, and T. Taga, *Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92** (11): p. 4862-6.
 20. Railson, J.E., Z. Liao, B.K. Brar, J.C. Buddle, D. Pennica, A. Stephanou, and D.S. Latchman, *Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathways in cardiac myocytes.* Cytokine, 2002. **17** (5): p. 243-53.
 21. Wollert, K.C. and K.R. Chien, *Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development.* J Mol Med, 1997. **75** (7): p. 492-501.
 22. Brady, A.R., S.G. Thompson, F.G. Fowkes, R.M. Greenhalgh, and J.T. Powell, *Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance.* Circulation, 2004. **110** (1): p. 16-21.
 23. Blake, G.J., N. Rifai, J.E. Buring, and P.M. Ridker, *Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events.* Circulation, 2003. **108** (24): p. 2993-9.
 24. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function.* Mol Immunol, 2001. **38** (2-3): p. 189-97.
 25. Wolbink, G.J., M.C. Brouwer, S. Buysmann, I.J. ten Berge, and C.E. Hack, *CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes.* J Immunol, 1996. **157** (1): p. 473-9.
 26. Lu, J., K.D. Marjon, L.L. Marnell, R. Wang, C. Mold, T.W. Du Clos, and P. Sun, *Recognition and functional activation of the human IgA receptor (FcalphaRI) by C-reactive protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** (12): p. 4974-9.
 27. Shih, H.H., S. Zhang, W. Cao, A. Hahn, J. Wang, J.E. Paulsen, and D.C. Harnish, *CRP is a novel ligand for the oxidized LDL receptor LOX-1.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296** (5): p. 27.
 28. Young, D., S. Camhi, T. Wu, J. Hagberg, and M. Stefanick, *Relationships among changes in C-reactive protein and cardiovascular disease risk factors with lifestyle interventions.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **24**: p. 24.

29. Out, D., R.J. Hall, D.A. Granger, G.G. Page, and S.J. Woods, *Assessing salivary C-reactive protein: longitudinal associations with systemic inflammation and cardiovascular disease risk in women exposed to intimate partner violence*. *Brain Behav Immun*, 2012. **26** (4): p. 543-51.
30. Ridker, P.M., *Connecting the role of C-reactive protein and statins in cardiovascular disease*. *Clin Cardiol*, 2003. **26** (4 Suppl 3): p. III39-44.
31. Rietzschel, E. and M. De Buyzere, *High-sensitive C-reactive protein: universal prognostic and causative biomarker in heart disease?* *Biomark Med*, 2012. **6** (1): p. 19-34.
32. Tracy, R.P., R.N. Lemaitre, B.M. Psaty, D.G. Ives, R.W. Evans, M. Cushman, E.N. Meilahn, and L.H. Kuller, *Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17** (6): p. 1121-7.
33. de Beer, F.C., A.K. Soutar, M.L. Baltz, I.M. Trayner, A. Feinstein, and M.B. Pepys, *Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein*. *J Exp Med*, 1982. **156** (1): p. 230-42.
34. Ridker, P.M., N. Rifai, M.A. Pfeffer, F.M. Sacks, L.A. Moye, S. Goldman, G.C. Flaker, and E. Braunwald, *Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. *Circulation*, 1998. **98** (9): p. 839-44.
35. Legein, B., L. Temmerman, E.A. Biessen, and E. Lutgens, *Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **21**: p. 21.
36. Yeh, E.T., H.V. Anderson, V. Pasceri, and J.T. Willerson, *C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications*. *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):974-5.
37. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. *Am Heart J*, 1999. **138** (5 Pt 2): p. S419-20.
38. Cesari, M., B.W. Penninx, A.B. Newman, S.B. Kritchevsky, B.J. Nicklas, K. Sutton-Tyrrell, S.M. Rubin, J. Ding, E.M. Simonsick, T.B. Harris, and M. Pahor, *Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study*. *Circulation*, 2003. **108** (19): p. 2317-22.
39. Manolov, D.E., W. Koenig, V. Hombach, and J. Torzewski, *C-reactive protein and atherosclerosis. Is there a causal link?* *Histol Histopathol*, 2003. **18** (4): p. 1189-93.
40. Pasceri, V., J.S. Cheng, J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs*. *Circulation*, 2001. **103** (21): p. 2531-4.
41. Eisenhardt, S.U., J. Habersberger, A. Murphy, Y.C. Chen, K.J. Woollard, N. Bassler, H. Qian, C. von Zur Muhlen, C.E. Hagemeyer, I. Ahrens, J. Chin-Dusting, A. Bobik, and K. Peter, *Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques*. *Circ Res*, 2009. **105** (2): p. 128-37.
42. Eisenhardt, S.U., J. Habersberger, and K. Peter, *Monomeric C-reactive protein generation on activated platelets: the missing link between inflammation and atherothrombotic risk*. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. **19** (7): p. 232-7.
43. Chang, M.K., C.J. Binder, M. Torzewski, and J.L. Witztum, *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99** (20): p. 13043-8.
44. Zwaka, T.P., V. Hombach, and J. Torzewski, *C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis*. *Circulation*, 2001. **103** (9): p. 1194-7.
45. Mineo, C. and P.W. Shaul, *Regulation of eNOS in caveolae*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **729**: p. 51-62.
46. Deckelbaum, R.J. and N.F. Galeano, *Small dense low density lipoprotein: formation and potential mechanisms for atherogenicity*. *Isr J Med Sci*, 1996. **32** (6): p. 464-8.
47. Berneis, K., D.M. Shames, P.J. Blanche, M. La Belle, M. Rizzo, and R.M. Krauss, *Plasma clearance of human low-density lipoprotein in human apolipoprotein B transgenic mice is related to particle diameter*. *Metabolism*, 2004. **53** (4): p. 483-7.
48. Segrest, J.P., M.K. Jones, H. De Loof, and N. Dashti, *Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins*. *J Lipid Res*, 2001. **42** (9): p. 1346-67.
49. Kita, T., [*Hyperlipidemia and atherosclerosis*]. *Nihon Rinsho*, 2002. **60** (5): p. 851-9.
50. Jia, S.J., D.J. Jiang, C.P. Hu, X.H. Zhang, H.W. Deng, and Y.J. Li, *Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase*

- pathway in endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 2006. **44** (3): p. 143-8.
51. Jeney, V., E. Komodi, E. Nagy, A. Zarjou, G.M. Vercellotti, J.W. Eaton, G. Balla, and J. Balla, *Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S)*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **46** (5): p. 616-23.
52. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32** (9): p. 2045-51.
53. Nakashima, Y., E.W. Raines, A.S. Plump, J.L. Breslow, and R. Ross, *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18** (5): p. 842-51.
54. Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins, *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Mol Cell*, 1998. **2** (2): p. 275-81.
55. Barthwal, M.K., J.J. Anzinger, Q. Xu, T. Bohnacker, M.P. Wymann, and H.S. Kruth, *Fluid-Phase Pinocytosis of Native Low Density Lipoprotein Promotes Murine M-CSF Differentiated Macrophage Foam Cell Formation*. *PLoS One*, 2013. **8** (3): p. 11.
56. Galle, J., T. Hansen-Hagge, C. Wanner, and S. Seibold, *Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells*. *Atherosclerosis*, 2006. **185** (2): p. 219-26.
57. Schmitz, G. and K. Ruebsaamen, *Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine*. *Atherosclerosis*, 2010. **208** (1): p. 10-8.
58. Ohara, Y., T.E. Peterson, B. Zheng, J.F. Kuo, and D.G. Harrison, *Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14** (6): p. 1007-13.
59. Heinloth, A., K. Heermeier, U. Raff, C. Wanner, and J. Galle, *Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11** (10): p. 1819-25.
60. Ohara, Y., T.E. Peterson, H.S. Sayegh, R.R. Subramanian, J.N. Wilcox, and D.G. Harrison, *Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production*. *Circulation*, 1995. **92** (4): p. 898-903.
61. Chen, C.A., L.J. Druhan, S. Varadharaj, Y.R. Chen, and J.L. Zweier, *Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme*. *J Biol Chem*, 2008. **283** (40): p. 27038-47.
62. Cominacini, L., A. Fratta Pasini, U. Garbin, A. Pastorino, A. Rigoni, C. Nava, A. Davoli, V. Lo Cascio, and T. Sawamura, *The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41** (3): p. 499-507.
63. Xu, S., S. Ogura, J. Chen, P.J. Little, J. Moss, and P. Liu, *LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **3**: p. 3.
64. Scalera, F., J. Borlak, B. Beckmann, J. Martens-Lobenhoffer, T. Thum, M. Tager, and S.M. Bode-Boger, *Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24** (10): p. 1816-22.
65. Smirnova, I.V., M. Kajstura, T. Sawamura, and M.S. Goligorsky, *Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287** (2): p. 11.
66. Smirnova, I.V., T. Sawamura, and M.S. Goligorsky, *Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287** (1): p. 9.

