

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ  
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ**

На седници Наставно-научног већа Фармацеутског факултета, одржаној 09.04.2026. године, именована је Комисија у саставу:

1. Др сц. Неда Милинковић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (ужа научна област: Медицинска биохемија)
2. Др сц. Андреја Димић, доцент, Универзитет у Београду – Медицински факултет (ужа научна област: Васкуларна хирургија)
3. Др сц. Марија Сарић-Матутиновић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (ужа научна област: Медицинска биохемија)

за оцену завршене докторске дисертације под називом „Клинички значај биохемијских параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса код пацијената са болешћу каротидних артерија“ кандидата дипл. фармацеута – медицинског биохемичара Ане Ружановић, запослене на Катедри за медицинску биохемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду. Чланови Комисије су прегледали приложену дисертацију и подносе Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. Приказ садржаја докторске дисертације**

Докторска дисертације дипл. фармацеута – медицинског биохемичара Ане Ружановић под називом „Клинички значај биохемијских параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса код пацијената са болешћу каротидних артерија“ написана је јасним и прецизним стилем на 231 страни, садржи 40 табела, 47 слика и 534 литературна навода. Садржај докторске дисертације изложен је кроз следећа поглавља: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

**Увод** садржи два дела. Први део је посвећен разумевању болести каротидних артерија (БКА), њеној епидемиологији, факторима ризика за њен развој, симптомима и манифестацијама ове болести, клиничким и ултразвучним параметрима од значаја, као и дијагностици, скринингу и терапијским приступима за њено лечење. Други део објашњава потенцијал серумских параметара у овој болести, са посебним освртом на инфламаторне параметре. Даље даје опис појединачних параметара испитиваних у овој студији, уз преглед тренутног знања о њиховој улози у кардиоваскуларним болестима (КБВ), а посебно у СКА.

БКА представља атеросклеротичну стенозу унутрашње каротидне артерије која је у вези са ризиком од настанка симптома, а пре свега можданог удара. Прецизније се означава као стеноза каротидних артерија (СКА) и представља нормалну појаву у вези са старењем васкуларног система, а патолошки значајним се сматра само степен  $\geq 50\%$ . Преваленца СКА је значајна у популацији старијој од 70 година, док у општој популацији није висока. Међутим, тренд пораста ове преваленце се бележи како у светској популацији, тако и на нивоу Републике Србије. Најзначајнији фактори ризика за развој СКА су старост, хипертензија, мушки пол, пушење, дијабетес мелитус (ДМ), хиперлипидемија, хроничне болести бубрега (ХББ) и бела раса, уз додатне неklasичне факторе ризика у вези са савременим начином живота, а примарна и секундарна превенција ове болести подразумевају и мере за смањење утицаја неких од ових фактора.

СКА може да доведе до различитих симптома који најчешће настају услед тромбоемболије дестабилизованог плака, а само ретко услед хипоперфузије изазване значајним степеном стенозе. На ризик од симптома највише утичу тежина стенозе и стабилност плака, док природа и тежина симптома зависе од локализације и величине емболуса. Најзначајнији симптом СКА је акутни мождани удар који има високу инциденцу и у вези је са значајним морбидитетом и морталитетом. Процењује се да је СКА узрочник око 20% свих исхемијских можданих удара. Акутном можданом удару често претходе блажи симптоми СКА, који такође настају као последица церебралне исхемије, али остављају само пролазне последице. Такви су транзиторни исхемијски напад (ТИН), чије последице трају до 24 часа, као и реверзибилни исхемијски неуролошки дефицит (РИНД) чије последице трају дуже од 24 часа, али краће од недељу дана. Додатно, СКА је у вези и са различитим офталмолошким и когнитивним симптомима.

Како је акутни мождани удар често најављен претходном исхемијском епизодом, важан фактор ризика за његов развој у будућности представља и појава недавних симптома СКА. Овај ризик је временски-завистан, тако да се само пацијенти који су доживели симптом у претходних 6 месеци сматрају симптоматским пацијентима. Пацијенти који нису доживели ни један симптом СКА у претходних 6 месеци се сматрају асимптоматским, и ова подела је значајна, како је ризик од развоја можданог удара код ових група пацијената значајно различит, а самим тим се разликује и однос ризика и бенефита од појединих процедура. Осим појаве недавних симптома, најзначајнији фактори ризика од развоја можданог удара у СКА су ултразвучни параметри – степен стенозе каротидне артерије и стабилност/нестабилност каротидног плака. Ова два параметра нису међусобно зависна и одражавају различите аспекте ризика од развоја симптома. Степен стенозе је традиционално више испитиван, и он је инкорпориран у многе водиче добре лекарске праксе. Према њему се пацијенти са СКА деле на оне са умереном стенозом (степен 50-69%) и оне са тешком стенозом (степен  $\geq 70\%$ ) при чему се сматра да је тешка стеноза у вези са вишим ризиком од можданог удара, чак и код асимптоматских пацијената. Стабилност плака се процењује на основу његовог морфолошког изгледа утврђеног ултразвучним методама визуелизације. Нестабилан плак се одликује великим липидним некротичним језгром, тањом фиброзом капом, присуством активне инфламације и појачаном неоваскуларизацијом. Овакав плак је подложен руптури или ерозији, те последичној тромбози и емболизацији. Нестабилност каротидног плака је такође и показатељ нестабилне атеросклерозе на системском нивоу, и савремена истраживања све више упућују на пресудан значај овог фактора.

Дијагностика СКА се заснива на утврђивању значајне стенозе каротидне артерије применом ултразвучних техника визуелизације, а у првој линији дуплекс ултрасонографије (ДУС). Скрининг за асимптоматску стенозу каротидних артерија се не препоручује, услед мале преваленце СКА у општој популацији, као и недостатка доказа да би он допринео превенцији можданог удара. Терапија СКА за циљ има примарну и секундарну превенцију развоја симптома, а пре свега можданог удара, а главни терапијски приступи су фармаколошка терапија и операционе интервенције. Оптимална фармаколошка терапија подразумева употребу ниских доза аспирина или неких других антитромбоцитних лекова уз терапију статинима без обзира на ниво холестерола, затим терапију хипертензије и дијабетеса код пацијената код којих су оне иначе индиковане, као и примену хигијенских мера, а пре свега престанка пушења, и она се сматра корисном за све пацијенте, као самостални терапијски приступ, или након операционе интервенције. Операционе интервенције се укључују пацијентима за које се процењује да због високог ризика оптимална фармаколошка терапија није довољна, и да однос ризика и користи од процедуре то оправдава. Примењују се технике реваскуларизације – каротидна ендартеректомија и каротидна ангиопластика. Важни критеријуми за доношење одлуке о виду терапије јесу присуство недавних симптома и тежина стенозе. При томе се симптоматски пацијенти углавном упућују на операциону интервенцију уз фармаколошку терапију, док се асимптоматски пацијенти чешће лече само фармаколошком терапијом. Ова пракса захтева унапређење кроз примену новијих научних сазнања, са циљем тачнијег предвиђања ризика за појединачне пацијенте.

Потенцијални допринос серумских биомаркера у унапређењу предвиђања ризика од развоја симптома код пацијената са СКА лежи у томе што они могу да одражавају активност

системских фактора који делују дестабилишуће на плакове широм васкулатуре, па тако и каротидни. Овај приступ је комплементаран са одређивањем ултразвучних параметара ризика који оцењују локалне факторе, везане за сам каротидни плак. Из тог разлога, указује се на перспективу у интеграцији ултразвучних и серумских параметара у процени ризика од развоја симптома. Како је инфламација један од пресудних механизма дестабилизације плака и њена појачана активност често претходи акутним догађајима у СКА, посебан потенцијал се види у испитивању инфламаторних параметара, и уз њих пратећих параметара деградације екстраћелијског матрикса и ћелијске адхезије.

Поједини протеини акутне фазе могу да учествују у нискостепеној хроничној инфламацији у вези са атеросклерозом и доприносе одржавању локалне инфламације у плаку, као и његовој акутној дестабилизацији. Ц-реактивни протеин (енг. *C-reactive protein, CRP*), пентраксин-3 (енг. *Pentraxin-3, PTX-3*) и серум амилоид А (енг. *Serum amyloid A, SAA*) се сви синтетишу и локално под дејством инфламаторних стимулуса (осим што *CRP* и *SAA* синтетише и јетра у акутној фази), и осим својих улога у неспецифичној одбрани, повезани су и са ендотелном дисфункцијом, тромбозом, а *SAA* и са метаболизмом липопротеинских честица. *CRP* је најбоље истражен, али у СКА су резултати оскудни за сва три параметра. Ипак, малобројне студије показују повезаност *CRP* и *PTX-3* са нестабилним плаком, а *SAA* са прогресијом атеросклерозе.

Инфламаторне цитокине секретују јетра и имуне ћелије које на тај начин комуницирају са бројним ткивима. Они се налазе у јасној узрочној вези са развојем и компликацијама атеросклерозе, као узводни сигнал великог броја молекула који учествују у свим фазама овог процеса. Механистичка веза интерлеукина-6 (енг. *Interleukin-6, IL-6*) и интерлеукина-1 $\beta$  (енг. *Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$* ) са развојем можданог удара је доказана, како терапије која супримирају ове цитокине доводе до смањења кардиоваскуларног морбидитета, а и фактор некрозе тумора- $\alpha$  (енг. *Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$* ) има доказану повезаност са развојем можданог удара и његовим исходом. Локална продукција ових цитокина од стране инфламаторних стимулуса их ставља на раскршће инфламације и атерогенезе, али су као биомаркери коронарне и каротидне болести веома оскудно истражени и показују контрадикторне резултате, углавном због проблема са специфичношћу.

Потенцијални биомаркери у вези са СКА могу да буду и циркулишући ензими укључени у оксидативни стрес, инфламаторни одговор, метаболизам липида и ремоделовање састава атеросклеротског плака. Фосфолипаза А2 повезана са аполипопротеином (енг. *Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2*) катализује хидролизу масних киселина са фосфолипида, генеришући атерогене производе. Синтетишу је имуне ћелије и локално ендотел под дејством инфламаторних сигнала, а циркулише везана за аполипопротеин Б-100. Истраживања су показала везу са развојем кардиоваскуларних догађаја, али резултати на популацији СКА су оскудни. Мијелопероксидаза (енг. *Myeloperoxidase, MPO*) катализује неколико различитих оксидативних реакција у којима настају агенси који модификују бројне протеине и липопротеинске честице, остварујући оштећујући ефекат на ендотел и дестабилишући атеросклеротске лезије. Показана је повишена концентрација овог ензима на местима руптуре и ерозије коронарног плака, као и веза са развојем можданог удара и тежином последица. Као маркер ризика у СКА није довољно истражен.

Солубилне форме мембранских рецептора укључених у развој и дестабилизацију атеросклерозе такође показују потенцијал у улози биомаркера. Међутим, у њиховом испитивању треба узети у обзир механизам њиховог ослобађања са мембране, као и факторе који на ово утичу. Лецитину сличан рецептор за оксидовани липопротеин ниске густине-1 (енг. *Lectin-like receptor for oxidised low density lipoprotein-1, LOX-1*) је главни *scavenger* рецептор на васкуларном ендотелу, који је усходно регулисан од стране оксидованих липопротеина ниске густине (енг. *Low density lipoprotein, LDL*) и инфламаторних цитокина, а протеолитички се ослобађа у циркулацију пропорционално са нивоом експримираности. Дакле, он механистички повезује ендотелну депозицију липида са инфламацијом, и истраживања су показала да је користан као предиктор вулнерабилности коронарног плака и последичних догађаја, док у СКА није довољно истражен. Солубилни рецептор за активатор плазминогена сличан урокинази (енг. *soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, suPAR*) је слободна форма рецептора

који представља важну спону између инфламације и дестабилизације плака, а ослобађа се под дејством инфламаторних сигнала. Он се појачано експримира у условима инфламације, а везивањем лиганда доводи до фибринолизе, деградације екстраћелијског матрикса и олакшава ћелијску адхезију. Сматра се маркером хроничне системске инфламације и оштећења органа. Код пацијената са СКА је показано да је у вези са симптомима и нестабилношћу плака, али потребна су додатна истраживања.

Солубилне форме адхезивних молекула одражавају интензитет процеса инфилтрације леукоцита у ендотел, чиме доприносе нестабилности плака. Неке од њих су мерљиве и у нискостепеној хроничној инфламацији, што им даје потенцијал за улогу биомаркера. Извори селектина-П (енг. *selectin-P, sel-P*) су ендотел и тромбоцити, па се његов солубилни облик може сматрати маркером који повезује тромбозу и инфламацију у атеросклерози. Показана је његова веза са акутним кардиоваскуларним догађајима, а код СКА са појавом церебралних микроемболијских сигнала, али истраживања на овој популацији су малобројна. Селектин-Е (енг. *selectin-E, sel-E*) такође постоји у солубилној форми која се ослобађа око 24 часа након експримирања мембранске форме, као механизам њеног уклањања. Солубилни *sel-E* се сматра маркером ендотелне активације у инфламацији, и као такав је показао повезаност са дебљином каротидне интима медије и са присуством СКА, али су резултати у вези са развојем симптома у овој популацији веома оскудни. Васкуларни ћелијски адхезиони молекул-1 (енг. *vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1*) је најприсутнији адхезиони молекул у атеросклеротским лезијама и ниво његовог солубилног облика је повезан са различитим атеросклеротским болестима, и развојем и тежином последица можданог удара, мада су потребна додатна истраживања у СКА.

Матрисне металопротеиназе (енг. *matrix metalloproteinase, MMP*) су кључни ензими за деградацију екстраћелијског матрикса, што доприноси истањивању фиброзне капе и дестабилизацији плака. Они такође разлажу и бројне цитокине и њихове рецепторе, а експримирају се под дејством инфламаторних сигнала, због чега представљају спону између инфламације и деградације екстраћелијског матрикса. Различити представници ове групе су испитивани у атеросклеротским болестима, у СКА је спроведен мали број студија, али су њихови резултати охрабрујући за даље истраживање. Тако је код СКА показана веза *MMP-2* и *MMP-7* са стабилношћу плака и недавним симптомима, *MMP-7* је показао потенцијалну везу и са калцификацијом каротидног плака, а показао је и потенцијал као предиктивни биомаркер у једној проспективној студији. *MMP-9* је најбоље истражена матриксна металопротеиназа у атеросклерози. Код пацијената са СКА показана је његова веза са недавним симптомима, нестабилношћу плака, тежином стенозе, као и предиктивни потенцијал за мождани удар.

Сходно потреби за унапређењем предвиђања ризика код пацијената са СКА, као и потенцијалу наведених параметара за дату сврху, **циљ** овог истраживања био је да се утврди потенцијални клинички значај одређивања параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстрацелуларног матрикса као биомаркера исхода који могу да се користе у испитивању ризика од развоја можданог удара и других симптома СКА.

У поглављу **Материјал и методе** изложени су подаци о испитаницима и описани су начин прикупљања анамнестичких и клиничких података, сакупљање узорака, методе одређивања лабораторијских параметара и коришћени статистички алати. Истраживање је било дизајнирано као опсервациона студија пресека. Укупно је укључено 119 пацијената са симптоматском и асимптоматском СКА, као и две контролне групе – пацијенти са осталим КВБ којих је било 133, и здрави испитаници којих је било 46. Сви испитаници су регрутовани приликом прегледа на Клиници за васкуларну и ендоваскуларну хирургију Универзитетског клиничког центра Србије. Испитаници који су имали каротидну стенозу степена <50% су у зависности од присуства других кардиоваскуларних обољења сврстани у контролну групу са другим КВБ или у групу здравих испитаника. Пацијенти са установљеном каротидном стенозом степена ≥50% сврстани су у групу пацијената са СКА. У оквиру ове групе, пацијенти који су доживели блажи мождани удар, ТИН или РИНД у претходних 6 месеци означени су као симптоматски, док су у супротном сматрани асимптоматским.

Анамнестички подаци су прикупљени помоћу упитника који су попуњавали сви испитаници, и они су обухватили демографске податке и податке о пушачком статусу, конзумацији алкохола, присуству дијабетеса мелитуса (ДМ), хроничних болести бубрега (ХББ) и употреби фармаколошке терапије. Прегледом на клиници прикупљени су резултати антропометријских мерења на основу којих је рачунат индекс телесне масе (ИТМ), као и подаци о систолном крвном притиску.

Путем обрасца обавештења за испитанике, сви испитаници су били упућени у протокол и циљ истраживања, што су добровољно прихватили и потврдили потписивањем информисане сагласности. Све активности у оквиру истраживања спровођене су у складу са смерницама добре клиничке и лабораторијске праксе и студија се придржавала Хелсиншке декларације, као и релевантних институционалних и националних прописа. Истраживање је одобрено одлуком Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Београду, као и одлуком Стручног и научног колегијума Клинике за васкуларну и ендоваскуларну хирургију Универзитетског клиничког центра Србије.

Ултразвучно испитивање каротидних артерија спроведено је на Клиници за васкуларну и ендоваскуларну хирургију Универзитетског клиничког центра Србије. Степен стенозе одређен је коришћењем *color flow doppler* ултразвука, при чему су за израчунавање коришћени *NASCET* (*The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*) критеријуми. За испитивање морфолошке грађе каротидног плака био је коришћен *B-mode duplex* ултразвук. Плакови су описани као претежно фиброзни, фибролипидни, фиброкалцификовани, калцификовани, улцерисани, компликовани или мешовити, а затим су на основу овога сврстани у групу стабилних плакова (фиброзни, фиброкалцификовани, калцификовани) или нестабилних плакова (фибролипидни, улцерисани, компликовани, мешовити).

Лабораторијске анализе које су укључивале одређивање специфичних параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстрацелуларног матрикса изведене су у Лабораторији за медицинско-биохемијске анализе Фармацеутског факултета Универзитета у Београду. Коришћене су „сендвич“ имунохемијске методе са ензимском детекцијом (енг. *Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) уз употребу комерцијално доступних китова. Коришћени су китови произвођача *FineTest* за параметре *PTX-3, SAA, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, MPO, LpPLA2, LOX-1, suPAR, sel-E, sel-P, MMP-2, MMP-7 и MMP-9*, док је за *VCAM-1* коришћен кит произвођача *Quantikine (R&D Systems)*. За испирање *ELISA* плоча у међукорацима, коришћен је аутоматски систем за испирање произвођача *Rayto Life and Analytical Sciences*, а апсорбанција добијеног производа је мерена помоћу аутоматског читача микротитарских плоча *Rayto RT-6100*.

Одређивање рутинских лабораторијских параметара изведено је у Одељењу за кардиохирургију Центра за медицинску биохемију Универзитетског клиничког центра Србије. Анализе су извођене рутинским комерцијалним методама помоћу хематолошког анализатора *Advia 2120 (Siemens Healthineers)* и биохемијског аутоматског анализатора *Architect c8000 (Abbott Diagnostics)*.

У поглављу **Резултати** прво је приказана расподела релативних фреквенци вредности анализираних параметара (фибриноген, *CRP, PTX-3, SAA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MPO, LpPLA2, LOX-1, suPAR, sel-E, sel-P, VCAM-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9*) у групи пацијената са СКА и испитана је њена нормалност употребом Колмогоров-Смирнов теста. Затим су вредности параметара упоређене између група пацијената са СКА, пацијената са другим КВБ и здравих испитаника употребом Краскал-Волис теста уз *post-hoc* тестирање помоћу Ман-Витни У теста уз примену Бонферони корекције за вишеструка тестирања. Даље је испитана непараметарска корелација свих параметара међусобно у свакој од три групе испитаника, као и укупно.

У следећем делу поглавља испитане су демографске карактеристике и присуство фактора ризика за КВБ у различитим групама испитаника, као и њихова повезаност са вредностима анализираних параметара. Заступљеност полова у различитим групама испитаника тестирана је  $\chi$ -квадрат тестом за категоричке варијабле, исто као и заступљеност дислипидемије,

хипертензије, пушења, честе употребе алкохола, ДМ и ХББ. Разлике у старости између група тестиране су АНОВА тестом, а разлике у вредностима ИТМ-а помоћу Краскал-Волис теста уз Ман-Витни У тест као *post-hoc*. Даље су употребом Ман-Витни У теста у оквиру групе пацијената са СКА упоређене вредности: фибриногена, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* између: мушкараца и жена, пацијената са дислипидемијом и без, са хипертензијом и без, пушача и непушача, пацијената који умерено и често конзумирају алкохол, пацијената са ДМ и без, као и пацијената са и без ХББ. Додатно је испитана непараметарска Спирманова корелација ових параметара са старашћу и ИТМ пацијената са СКА. Следеће је испитана заступљеност кардиоваскуларних коморбидитета код пацијената са СКА, па је она упоређена  $\chi$ -квадрат тестом између симптоматских и асимптоматских пацијената. При томе је испитана заступљеност коронарне, периферне артеријске оклузивне и анеуризматске болести, као и број истовремено присутних коморбидитета. Даље су употребом Ман-Витни У теста упоређене концентрације испитиваних параметара између пацијената са и без коморбидитета. Даље је анализирана заступљеност употребе статина, антихипертензивне, антиагрегационе и антикоагулационе терапије код симптоматских и асимптоматских пацијената са СКА, код пацијената са другим КВБ и код здравих испитаника. За ово је коришћен  $\chi$ -квадрат тест. Након тога су испитане разлике у вредностима испитиваних параметара код пацијената који су користили и оних који нису користили сваку од ових терапија. Испитивање је било вршено само ту где је број испитаника који користе/не користе терапију допуштао анализу, и коришћени су студентов т-тест и Ман-Витни У тест.

Даље су анализирани асоцијације фибриногена, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* са симптоматским статусом, степеном стенозе и стабилношћу плака, као и међусобне асоцијације ова три аспекта болести.

Коришћењем  $\chi$ -квадрат теста испитана је зависност присуства недавних симптома са тежином стенозе и стабилношћу плака. Затим су употребом студентовог т-теста и Ман Витни У теста упоређене вредности наведених параметара између укупних симптоматских и асимптоматских пацијената. Након тога, ови параметри су упоређени и у односу на врсту симптома – између пацијената који су у претходних шест месеци доживели ТИН/РИНД и оних који су у истом периоду доживели блажи мождани удар. Симптоматски пацијенти који су имали ТИН/РИНД упоређени су и са асимптоматским пацијентима, као и са контролном групом здравих испитаника. Такође, симптоматски пацијенти који су доживели блажи мождани удар су упоређени и са асимптоматским пацијентима, као и са контролном групом. Додатно су вредности истих параметара упоређене у односу на симптоматски статус у подгрупама пацијената подељених према додатном критеријуму. Тако су ова поређења вршена само у подгрупи пацијената са умереном стенозом, затим само у подгрупи пацијената са тешком стенозом, затим само у подгрупи пацијената са стабилним плаком, и на крају само у групи пацијената са нестабилним плаком. Како су се групе асимптоматских и симптоматских пацијената разликовале према употреби антихипертензивне терапије, испитана је и разлика у параметрима у односу на симптоматски и асимптоматски статус само код пацијената који су користили ову терапију. Због малог броја пацијената који је нису користили, у тој групи разлика није испитивана. Коришћена је и униваријантна бинарна логистичка регресија за предвиђање симптоматског статуса као бинарног исхода, у укупној групи пацијената, као и код пацијената на антихипертензивној терапији, за све испитиване параметре појединачно.

Када је анализирана тежина стенозе, прво је испитан утицај демографских и фактора ризика на њене вредности. Тако је она коришћењем Ман-Витни У теста упоређена у односу на пол, дислипидемију, хипертензију, пушачки статус, конзумацију алкохола, ДМ и ХББ, а употребом непараметарске корелације, проверена је њена асоцијација са старашћу и индексом телесне масе. Затим је степен стенозе упоређен између пацијената са стабилним и нестабилним плаком. Након тога, између укупних пацијената са умереном и тешком стенозом, упоређене су вредности фибриногена, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9*. Ове разлике у параметрима у односу на тежину стенозе су

испитане и одвојено у подгрупама асимптоматских и симптоматских пацијената, као и одвојено у подгрупама пацијената са стабилним и нестабилним плаком.

Следеће је испитивана стабилност плака, а у оквиру ове анализе, прво је проверен утицај демографских и фактора ризика на ову особину, коришћењем  $\chi$ -квадрат теста за категоријске варијабле, и Ман-Витни У теста за испитивање разлика у старости и ИТМ код пацијената са стабилним и нестабилним плаком. Након тога, вредности фибриногена, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* су упоређене између пацијената са различитим морфолошким типовима плака, употребом Ман-Витни У теста. Затим су вредности ових параметара упоређене између укупних пацијената са стабилним и оних са нестабилним каротидним плаковима. За ово су коришћени студентов т-тест и Ман-Витни У тест. Исто ово поређење, коришћењем истих тестова, такође је спроведено и одвојено у подгрупама симптоматских и асимптоматских пацијената, као и одвојено у подгрупама пацијената са умереном и тешком стенозом.

Следећи део анализе био је посвећен испитивању дијагностичке тачности датих параметара за детекцију недавних симптома и стабилности плака. Коришћена је анализа *ROC* криве (енг. *receiver operating curve*) за параметре фибриноген, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* прво за разликовање симптоматских од асимптоматских пацијената, а затим и за разликовање пацијената са нестабилним плаком од оних са стабилним. Иста анализа одвојено је спроведена на подгрупама пацијената са умереном стенозом, дакле прво за разликовање симптоматске и асимптоматске умерене стенозе, а затим за разликовање умерене стенозе са нестабилним и стабилним плаком. За све параметре су одабране *cut-off* вредности које су коришћене за трансформацију континуираних вредности параметара у категоријске варијабле које су даље укључене у моделе.

У наредном делу анализе, формулисани су различити модели за предвиђање карактеристика СКА од значаја. Прво су униваријантном логистичком регресионом анализом испитане асоцијације фибриногена, *CRP*, *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* са симптоматским статусом код укупних пацијената, као и одвојено код пацијената са умереном стенозом. Параметри који су у овим анализама показали статистичку значајност, укључивани су у мултиваријантну логистичку анализу. На тај начин су формиран модели за предикцију присуства недавних симптома код укупних пацијената са СКА, као и код оних са умереном стенозом, коришћењем само лабораторијских параметара. Они су названи редом, модел 1А и модел 2А. Даље су на исти начин формиран и модели коришћењем доступних демографских и фактора ризика, односно модели од не-лабораторијских параметара. Они су названи модел 1Б и модел 2Б. Комбиновањем модела А и Б у оба случаја, и уклањањем најслабијих предиктора по потреби, формиран су комбиновани модели од лабораторијских и не-лабораторијских параметара, названи модел 1В и модел 2В. Исто ово, примењено је и за формулацију модела за предвиђање присуства нестабилног плака код пацијената са умереном стенозом и на тај начин су формулисани модели 3А, 3Б и 3В.

Дијагностичка тачност модела 1А, 1Б и 1В је испитана употребом анализе *ROC* криве у којој су коришћене вредности предвиђених вероватнића добијених на основу одговарајућих модела. Површине испод кривих ових модела су упоређене међусобно употребом *de Long* теста за криве које потичу из истог узорка. Исто је примењено и на моделе за предвиђање присуства недавних симптома код пацијената са умереном стенозом, односно моделе 2А, 2Б и 2В, а затим и на моделе за предвиђање присуства нестабилног плака код пацијената са умереном стенозом, односно моделе 3А, 3Б и 3В.

Додатно је улога и допринос лабораторијских и не-лабораторијских параметара комбинованим моделима испитана рачунањем нето унапређења рекласификацијом (енг. *Net reclassification improvement, NRI*), као и интегрисаног унапређења дискриминације (енг. *Integrated discrimination improvement, IDI*), за све три групе модела.

У последњем сегменту поглавља Резултати, испитане су вредности рутинских лабораторијских параметара од значаја. Испитивани су: број леукоцита, неутрофила, лимфоцита, моноцита,

еозинофила, базофила, еритроцита, хемоглобин, хематокрит, средњи волумен еритроцита, просечна количина хемоглобина у еритроциту, просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита, ширина дистрибуције еритроцита, број тромбоцита, средњи волумен тромбоцита, тромбокрит, ширина дистрибуције тромбоцита, глукоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, укупни холестерол, LDL-холестерол, HDL-холестерол, триглицериди, не-HDL-холестерол, однос не-HDL-холестерола и HDL-холестерола, однос LDL-холестерола и HDL-холестерола, атерогени индекс плазме, однос неутрофили/лимфоцити, однос моноцити/лимфоцити, однос тромбоцити/лимфоцити, однос моноцити/HDL-холестерол, однос RDW/тромбоцити.

Прво су вредности ових параметара употребом АНОВА и Краскал-Волис теста уз Ман-Витни У као *post-hoc* упоређене између пацијената са СКА, са другим КВБ и здравих испитаника. Након тога је испитана непараметарска корелација наведених рутинских лабораторијских параметара са специфичним параметрима инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса. Корелације рутинских липидних параметара и њихових индекса са специфичним параметрима инфламације су испитане и одвојено код пацијената који користе статинску терапију и оних који је не користе.

Наведени рутински лабораторијски параметри су испитани и у односу на симптоматски статус. Прво је испитана разлика између симптоматских и асимптоматских пацијената укупно, затим унутар симптоматских пацијената у односу на врсту симптома, као и између пацијената са одређеном врстом симптома и асимптоматских пацијената, и између пацијената са одређеном врстом симптома и здравих испитаника. Симптоматски и асимптоматски пацијенти су према вредностима рутинских параметара упоређени и унутар подгрупа са умереном и тешком стенозом, као и са стабилним и нестабилним плаком.

Вредности ових параметара су упоређене и између укупних пацијената са умереном и тешком стенозом, као и у подгрупама асимптоматских/симптоматских и пацијената са стабилним/нестабилним плаком. Исти параметри су упоређени и у односу на присуство плакова различитог морфолошког типа. Затим су упоређени и између пацијената са стабилним и нестабилним плаком, као и у подгрупама симптоматских/асимптоматских пацијената и пацијената са умереном/тешком стенозом.

## Б. Опис постигнутих резултата

Пацијенти са СКА имали су више вредности фибриногена, *IL-6*, *suPAR*, *sel-P* и *MMP-7*, а ниже вредности *TNF- $\alpha$*  и *sel-E* него здрави испитаници, као и ниже вредности *sel-E* у односу на испитанике са другим КВБ. Показане су многе разлике у значајности и смеру међусобних корелација испитиваних параметара код пацијената са СКА у односу на исте корелације у другим групама испитаника. Пацијенти са СКА и контролна група су били изједначени према старости и полу, а показане су разлике у односу на заступљеност свих фактора ризика. Разлике у факторима ризика између симптоматских и асимптоматских пацијената није било. Показано је да је пол утицао на вредности *sel-E*, а да је старост корелирала са *VCAM-1*, док су *IL-1 $\beta$*  и *MMP-2* негативно корелирали са ИТМ. Пушачи су имали нижи *MPO* и виши *sel-P* од непушача, док су пацијенти који су учесталије конзумирали алкохол имали виши *PTX-3*. *TNF- $\alpha$*  је био нижи код пацијената са ДМ, а *VCAM-1* виши код пацијената са ХББ.

Показано је да је 50% пацијената са СКА имало присутан барем један додатни кардиоваскуларни коморбидитет. Коморбидитети су били подједнако заступљени међу симптоматским и асимптоматским пацијентима, осим анеуризматске болести која је била чешћа код асимптоматских. Пацијенти са присутним коморбидитетима су имали више вредности *IL-6* и *sel-P*. *MMP-2* је био виши код СКА пацијената са додатно присутном коронарном болешћу, а фибриноген и *TNF- $\alpha$*  код пацијената са додатно присутном периферном артеријском болешћу. Заступљеност употребе терапије је била виша у групама пацијената него у контролној групи, без разлика међу симптоматским и асимптоматским пацијентима. Пацијенти који су користили статине имали су нижи фибриноген и *SAA*, док су пацијенти на антиагрегационој терапији имали виши *LOX-1*.

У вези симптоматског статуса, није показана разлика у односу на степен стенозе, нити стабилност плака. Код укупних симптоматских пацијената, *SAA* је био виши него код укупних асимптоматских. Пацијенти који су у последњих шест месеци доживели ТИН/РИНД имали су виши *SAA* и *MMP-7* од пацијената који су у истом периоду доживели блажи мождани удар. Они су имали и нижи *PTX-3*, као и виши *SAA* и *MMP-7* од асимптоматских пацијената. У односу на здраве испитанике, имали су више вредности фибриногена, *CRP*, *SAA*, *sel-P* и *MMP-7*, а ниже вредности *PTX-3*. Пацијенти који су у претходних шест месеци доживели блажи мождани удар су имали више вредности фибриногена, *suPAR*, *sel-P* и *MMP-7*, а ниже вредности *TNF- $\alpha$*  и *sel-E*.

У групи пацијената са умереном стенозом, симптоматски пацијенти су имали виши *MPO* и нижи *PTX-3* од асимптоматских. У групи пацијената са тешком стенозом, симптоматски пацијенти су имали виши *SAA* и нижи *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  и *MPO*. У оквиру пацијената са стабилним плаком *MMP-2* је био нижи код оних који су имали недавне симптоме, док је у оквиру пацијената са нестабилним плаком показано да је *SAA* био виши, а *MPO* нижи код оних са недавним симптомима, у односу на асимптоматске пацијенте. Када су одвојено испитани само пацијенти који су користили антихипертензивну терапију, симптоматски пацијенти су имали ниже вредности *PTX-3* и *TNF- $\alpha$*  од асимптоматских. Логистичка регресија је потврдила је значајну асоцијацију *SAA* са присуством симптома.

Степен стенозе није био у вези са полом, старашћу, нити присуством фактора ризика, а није показао ни асоцијацију са стабилношћу плака. У укупној групи пацијената, они са тешком стенозом су имали виши *PTX-3* и *LOX-1* од оних са умереном стенозом. Унутар асимптоматске групе, са тешком стенозом су биле асоциране више вредности *TNF- $\alpha$*  и *LOX-1*. Унутар симптоматских пацијената, они са тешком стенозом су имали више вредности *LOX-1* и *sel-E*, а ниже вредности *IL-1 $\beta$*  и *MPO* од оних са умереном стенозом. У групи пацијената са стабилним плаком, *LOX-1* и *suPAR* су били асоцирани са тежом стенозом, док су код пацијената са нестабилним плаком, са тежом стенозом били асоцирани *PTX-3*, *LOX-1* и *sel-E*, а са мање тешком стенозом *MPO*, *sel-P* и *MMP-2*.

Нестабилност плака је била у асоцијацији са мушким полом и пушачким статусом. Код пацијената који су имали изражену калцификацију плака, вредности *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  и *MPO* су биле више, док су вредности *sel-P* биле ниже, у односу на остале типове плака. Код асимптоматских пацијената са нестабилним плаком, *SAA* је био нижи него код асимптоматских пацијената са стабилним плаком. У оквиру симптоматских пацијената, они са нестабилним плаком су имали нижи *MPO* у односу на оне са стабилним. У оквиру пацијената са умереном стенозом, *suPAR* и *sel-P* су били виши, а *sel-E* је био нижи код нестабилног плака, у односу на стабилни. У оквиру пацијената са тешком стенозом *MPO* је био нижи код нестабилног у односу на стабилан плак.

Дијагностички потенцијал за идентификацију симптоматских пацијената међу укупним пацијентима са СКА су показали *CRP* и *SAA*, који су били значајни у *ROC* анализи. За идентификацију симптоматских пацијената међу пацијентима са умереном стенозом, дијагностички потенцијал је показан за *MPO*. Међу пацијентима са умереном стенозо, за идентификацију присуства нестабилног плака били су значајни *sel-P* и *sel-E*, а потенцијал су показали и *suPAR* и *MMP-7*.

За одређивање вероватноће присуства симптома код укупних пацијената, формулисан је модел 1А који је садржао само лабораторијске параметре који су обадва били независни предиктори – *CRP* и *SAA*. Модел 1Б, сачињен само од не-лабораторијских параметара – нестабилности плака и индекса телесне масе, такође је био значајан, али је показао лошије перформансе. Модел 1В, комбинован од претходна два, био је значајан са сва четири предиктора, а независни су били нестабилност плака и *SAA*. *ROC* криве сва три модела су имале значајну дијагностичку тачност, и није било разлике у њиховим површинама испод криве.

За одређивање вероватноће присуства симптома код умерене стенозе, формулисан је модел 2А који је садржао само лабораторијске параметре – *SAA* и *MPO*, при чему је *MPO* био независни предиктор. Модел 2Б, сачињен само од не-лабораторијских параметара – степена стенозе и ХББ, такође је био значајан, али само гранично. Модел 2В, комбинован од претходна два, био је

значајан уз сва четири предиктора, а независан је био само *MPO*. *ROC* криве модела 2А и 2В су имале значајну дијагностичку тачност, и показано је да је модел 2В имао значајно већу површину испод криве од модела 2Б.

За одређивање вероватноће присуства нестабилног плака код умерене стенозе, формулисан је модел 3А који је садржао само лабораторијске параметре који су обадва били независни предиктори – *suPAR* и *sel-P*. Модел 3Б, сачињен само од не-лабораторијских параметара – мушког пола и хиперлипидемије, био је само гранично значајан. Модел 3В, комбинован од претходна два, имао је најбоље перформансе од сва три модела, а независни предиктори били су *suPAR* и *sel-P*. *ROC* криве сва три модела су имале значајну дијагностичку тачност, а показано је да је модел 3В имао значајно већу површину испод криве од модела 3Б.

*NRI* и *IDI* анализа је показала значајан допринос лабораторијских параметара комбинованим моделима, док допринос не-лабораторијских параметара није био значајан.

Код пацијената са СКА утврђене су више вредности леукоцита и тромбоцита, као и ниже вредности индекса атеросклерозе од здравих испитаника. У СКА, утврђена су и одступања од корелација између рутинских лабораторијских параметара и *PTX-3*, *SAA*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *MPO*, *LpPLA2*, *LOX-1*, *suPAR*, *sel-E*, *sel-P*, *VCAM-1*, *MMP-2*, *MMP-7* и *MMP-9* присутних у другим групама испитаника.

Код симптоматских пацијената, укупан, али и *HDL*-холестерол су били нижи него код симптоматских. Такође, пацијенти који су имали блажи мождани удар у последњих шест месеци су имали нижи *HDL*-холестерол од оних који су имали ТИН/РИНД. Они су имали и нижи укупни и *HDL*-холестерол од асимптоматских пацијената, али и нижи однос не-*HDL* и *HDL*-холестерола. Пацијенти који су доживели ТИН/РИНД су имали значајно вишу уреу од асимптоматских пацијената.

Утврђено је да су у оквиру пацијената са нестабилним плаком, креатинин, однос неутрофили/лимфоцити, као и однос тромбоцити/лимфоцити, били виши код симптоматских него код асимптоматских пацијената.

Са тежим степеном стенозе, вредности средњег волумена тромбоцита су биле више. Ово је важило међу укупним пацијентима, али и међу асимптоматским пацијентима. У оквиру пацијената са нестабилним плаком, тежа стеноза је била у вези са вишим средњим волуменом тромбоцита, ширином дистрибуције тромбоцита и мокраћном киселином.

Код пацијената са нестабилним плаком, укупни леукоцити и неутрофили су били виши у односу на пацијенте са стабилним плаком. Такође, *HDL*-холестерол је био нижи, а атерогени индекс плазме виши. Код асимптоматских пацијената, нестабилан плак је био у асоцијацији са вишим триглицеридима и вишим односом моноцити/ *HDL*-холестерол. Код симптоматских пацијената, однос неутрофили/лимфоцити и однос тромбоцити/лимфоцити су били виши у присуству нестабилног плака. Код пацијената са умереном стенозом, присуство нестабилног плака је било у асоцијацији са нижим средњим волуменом и ширином дистрибуције тромбоцита, као и са нижим индексом моноцита и *HDL*-холестерола. Код пацијената са тешком стенозом, укупни леукоцити и неутрофили су били виши у присуству нестабилног плака.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са подацима из литературе**

Поређење вредности испитиваних специфичних параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса између пацијената са СКА и пацијената са другим КВБ, као и здравим испитаницима, анализирано је паралелно уз анализу њихових међусобних корелација у овим групама. Већина уочених разлика су биле у складу са налазима из литературе, а уочених корелација у складу са инфламаторном природом и специфичним улогама параметара. Тако су више вредности *CRP*-а у СКА у односу на здраве испитанике биле показане и у студији *Liu* и сарадника (*Liu et al.*, 2018), више вредности *IL-6* уз ниже вредности

*TNF- $\alpha$*  у мета-анализи *Tylutka* и сарадника (*Tylutka et al.*, 2024), више вредности *suPAR* у студији *Persson* и сарадника (*Persson et al.*, 2014), а више вредности *sel-P* у студији *Hashimoto* и сарадника (*Hashimoto et al.*, 2003). Већина међусобних корелација параметара испитаних у овој студији нису претходно описане у литератури на датој популацији.

Утицај демографских фактора није био значајан за већину испитиваних параметара, уз неколико изузетака. Тако су показане више вредности *sel-E* код жена, што је у супротности са налазима претходних студија (*Ponthieux et al.*, 2004; *Kim et al.*, 1998), али се потенцијално објашњава различитим утицајем *TNF- $\alpha$*  на *sel-E* у односу на пол, примећен у студији (*Hunter et al.*, 2019). Примећено повећање нивоа солубилног *VCAM-1* са старошћу је у складу са претходним налазима (*Richter et al.*, 2003). Фактори ризика такође нису показали утицај на велики број параметара. Пушачи су имали виши *sel-E* што је у складу са налазима *Zinellu* и сарадника (*Zinellu et al.*, 2021), док су ниже вредности *MPO* код пушача објашњене имуносупресивним ефектом дуванског дима на неутрофиле, описаног у студији *Jiang* и сарадника (*Jiang et al.*, 2020). Уочени утицај конзумације алкохола на вредности *PTX-3* подржан је налазима *Perea* и сарадника (*Perea et al.*, 2017). *VCAM-1* је био у вези и са ХББ, у складу са налазима из литературе (*Troncoso et al.*, 2021).

Преваленца других кардиоваскуларних коморбидитета код пацијената са СКА је била 50%, а у њиховом присуству, вредности *IL-6* и *sel-P* су биле више, одражавајући ниво системске атеросклерозе, што је све у сагласности са литературним налазима (*Bay et al.*, 2023). Анализа заступљености терапије је показала да је већина пацијената била униформно и адекватно лечена, у складу са терапијским препорукама, што је уобичајено и у другим истраживањима ове популације (*De Vera et al.*, 2014). Употреба антиагрегационе терапије је била у вези са нижим вредностима *LOX-1* што је такође у складу са литературом (*Mehta et al.*, 2004).

У овој студији, као сурогат маркери ризика од развоја симптома СКА, а пре свега можданог удара, коришћени су добро утврђени индикатори ризика – присуство недавних симптома, тежина стенозе и нестабилност плака. Статистичка анализа није показала међусобну зависност ова три индикатора, потврђујући досадашња знања (*Mann et al.*, 1996; *Zhao et al.*, 2011). Ово је омогућило независно испитивање повезаности серумских параметара са ова три аспекта болести.

Са присуством недавних симптома, у укупној популацији пацијената са СКА, значајну повезаност је показао само *SAA*, што није раније показано у малобројним студијама које су мериле овај параметар у СКА. Он је задржао ову везу са симптоматским статусом посебно код пацијената са тешком стенозом и са нестабилним плаком, а додатно је био и у вези са врстом симптома, при чему је био виши код ТИН/РИНД него код можданог удара. Ове асоцијације нису испитиване у ранијим студијама, и представљају прве овакве налазе. Са друге стране, *MPO* је био нижи након недавних симптома код пацијената са тешком стенозом и нестабилним плаком, подржавајући налазе из литературе о његовом снижењу у циркулацији услед преласка моноцита у унутрашњост лезија након симптома периферне артеријске болести (*Matijevic et al.*, 2011; *Wildgruber et al.*, 2016). Показан је већи број разлика у односу на недавне симптоме када су са симптоматским пацијентима поређени здрави испитаници. У односу на њих, недавно симптоматски су имали виши фибриноген, *CRP*, *TNF- $\alpha$* , *sel-P* и *MMP-7*, у складу са налазима претходних студија (*Peucheva et al.*, 2021; *Zhou et al.*, 2016; *Xue et al.*, 2022; *Bai et al.*, 2023; *Abbas et al.*, 2014). И нижи ниво *sel-E* код симптоматских пацијената у односу на здраве испитанике је подржан претходним резултатима (*De Bleecker et al.*, 1998), док је уочен нижи ниво *suPAR* у овом поређењу био у супротности са налазима *Edsfeldt* и сарадника (*Edsfeldt et al.*, 2014).

Са степеном стенозе најконзистентнију асоцијацију је показао *LOX-1*, што је у складу са резултатима *Scarpengland* и сарадника (*Scarpengland et al.*, 2018). *PTX-3* је био у асоцијацији са тежином стенозе само код нестабилних плакова, што је први пут примећено у овој студији, али што указује на потенцијалну улогу овог параметра у праћењу напредовања стенозе у вези са активном инфламацијом унутар плака. Примећене су и ниже концентрације *sel-P* и *MMP-2* у овом поређењу што је у супротности са појединим налазима (*Hashimoto et al.*, 2003; ), што се

објашњава тиме да они нису добијени на истој подгрупи пацијената. Показана је и веза *sel-E* са тежином стенозе код симптоматских пацијената, што је у складу са налазима претходних студија (Okulla et al., 2002). *MPO* је био виши код умерене него код тешке стенозе у присуству нестабилног плака, што је у оквиру шире слике осталих резултата ове студије у складу са претпоставком о његовој посебној корисности у умереној стенози. Иако не постоје студије које су испитивале исту асоцијацију у овој подгрупи пацијената, многе студије на другим популацијама указују утицај различитих специфичних фактора на везу *MPO* са кардиоваскуларним ризиком (Daugherty et al., 1994; Exner et al., 2006; Kataoka et al., 2014). *TNF- $\alpha$*  је био у асоцијацији са тежином стенозе само код асимптоматских пацијената, а *suPAR* само код пацијената са стабилним плаком. Разлике у овим подгрупама нису претходно испитане за дате параметре.

Калцификација каротидног плака је била у асоцијацији са вишим вредностима *TNF- $\alpha$*  и *IL-1 $\beta$* , у складу са њиховом улогом у овом процесу (Shen et al., 2021; Aghagolzadeh et al., 2016). Такође је била асоцирана и са вишим вредностима *MPO*, о чему нема налаза у каротидној болести, мада је студија Duzguncinar и сарадника (Duzguncinar et al., 2008) показала асоцијацију *MPO* са калцификацијом каротидног плака. Код пацијената са умереном стенозом, показана је асоцијација *suPAR* са нестабилношћу плака, на шта су указивале и претходне студије (Edsfeldt et al., 2012; Svensson et al., 2008). Више вредности *sel-P* у вези са нестабилним плаковима у умереној стенози је у складу са тиме што је био нижи код калцификованих плакова, и вероватно одражава активацију тромбоцита у вези са нестабилношћу лезија широм васкулатуре (Hashimoto et al., 2003). Са друге стране, *sel-E* је код ових пацијената био нижи у присуству нестабилног плака, што је у супротности са литературним налазима (Dutta et al., 2016; Dong et al., 1998) и вероватно одражава утицај различитих непознатих фактора на његову концентрацију. Неочекиван је био и налаз ниже концентрације *MPO* у вези са нестабилним плаковима код тешке стенозе, како је претходно показано да је он у вези са дестабилизацијом плака (Naruko et al., 2002; Daugherty et al., 1994). У овој студији, могуће објашњење овога је његова показана веза са калцификацијом плака која је патолошки, али стабилизујући процес. Код асимптоматских пацијената, *SAA* је био виши у присуству стабилног плака у односу на нестабилни. Како је он био виши код симптоматских пацијената у односу на асимптоматске пацијенте, може се претпоставити да је његов ниво у асоцијацији са наглом дестабилизацијом плака, или догађајима након руптуре, док нема улогу у постепеној дестабилизацији плакова која остаје асимптоматска дуже времена. Ова тема није довољно истражена и захтева даље расветљавање. Код недавно симптоматских пацијената, *MPO* је био виши у присуству стабилног плака, потенцијално у вези са калцификацијом плака након руптуре, или у вези са ерозијом плака која је имплицирана у једној ранијој студији (Ferrante et al., 2010).

Испитивање дијагностичке тачности показало је ограничену вредност појединачних параметара, као што је и очекивано у мултифакторским болестима попут атеросклерозе. Ова анализа је коришћена за одабир *cut-off* вредности које су се даље користиле у логистичкој регресији. За препознавање симптоматских пацијената у укупној групи, значајни су били *CRP* и *SAA* који су имали површину испод *ROC* криве (*AUC*) од 0,6-0,7. За њих су одабране *cut-off* вредности од 2,9 *mg/L* за *CRP* и 8,1  $\mu\text{g/L}$  за *SAA*, у складу са нискостепеном природом инфламације. За препознавање симптоматских пацијената у умереној стенози, значајни су били *MPO* који је имао *AUC* од 0,8. За њега су одабране *cut-off* вредности од 11,3 *ng/mL*, које су биле ниже од оних које се у литератури повезују са кардиоваскуларним ризиком (Wong et al., 2009). За препознавање нестабилног плака у умереној стенози, значајни су били *sel-P* и *sel-E* који су имали *AUC* од 0,7-0,8. За њих су одабране *cut-off* вредности од 17,6 *ng/mL* за *sel-E*; 14,2 *ng/mL* за *sel-P*, које су биле ниже од оних које се у литератури повезују са кардиоваскуларним ризиком (Shindo et al., 2014; Blann et al., 1997).

Формулисани су модели за предвиђање присуства недавних симптома у укупној групи пацијената: Модел 1А од лабораторијских параметара (*CRP* и *SAA*), модел 1Б од не-лабораторијских параметара (стабилност плака и индекс телесне масе) и комбиновани модел од лабораторијских и не-лабораторијских параметара, модел 1В (*CRP*, *SAA*, стабилност плака и индекс телесне масе). Њихово поређење није показало да се међусобно значајно разликују, али је кроз анализу нето унапређења рекласификацијом (*NRI*) и интегрисаног унапређења

дискриминације (*IDI*) показано да су лабораторијски параметри значајно унапредили комбиновани модел, док не-лабораторијски параметри нису имали никакав допринос.

Формулисани су модели за предвиђање присуства недавних симптома у умереној стенози: Модел 2А од лабораторијских параметара (*SAA* и *MPO*), модел 2Б од не-лабораторијских параметара (степен стенозе и ХББ) и комбиновани модел од лабораторијских и не-лабораторијских параметара, модел 2В (*SAA*, *MPO*, степен стенозе и ХББ). Њихово поређење је показало да је модел 2В имао бољу дијагностичку тачност од модела 2Б, а кроз анализу *NRI* и *IDI* је показано да су лабораторијски параметри значајно унапредили комбиновани модел, док не-лабораторијски параметри нису имали никакав допринос.

Формулисани су модели за предвиђање присуства нестабилног плака у умереној стенози: Модел 3А од лабораторијских параметара (*suPAR* и *sel-P*), модел 3Б од не-лабораторијских параметара (пол и хиперлипидемија) и комбиновани модел од лабораторијских и не-лабораторијских параметара, модел 3В (*suPAR*, *sel-P*, пол и хиперлипидемија). Њихово поређење је показало да је модел 3В имао бољу дијагностичку тачност од модела 3Б, а кроз анализу *NRI* и *IDI* је показано да су лабораторијски параметри значајно унапредили комбиновани модел, док не-лабораторијски параметри нису имали никакав допринос.

Формулација и анализа наведених модела била је ограничена укрштеним дизајном студије и малим бројем података, због чега је употребљена само за оцену потенцијала испитиваних лабораторијских параметара у односу на не-лабораторијске параметре. Ово је омогућило доношење генералних закључака да је комбиновање параметара кориснији приступ од употребе појединачних параметара, у складу са литературним сазнањима (*Jiao et al., 2020*), као и да испитивани инфламаторни параметри имају значајан потенцијал на овом пољу. Додатно је примећено да је предвиђање ризика на основу ових параметара потенцијално најкорисније у умереној стенози.

Уочене више вредности појединих леукоцита и тромбоцита биле су очекиване и у складу са природом атеросклерозе (*Aronova et al., 2023; Oikonomou et al., 2020*). Од леукоцита су најзначајније корелације са испитиваним специфичним инфламаторним параметрима имали неутрофили и лимфоцити. Већина корелација су биле у складу са познатим налазима (*Webb et al., 2021; Getz et al., 2016; Cross et al., 2008; Cook-Mills et al., 2002*), док су поједине показале одступање од очекиваних резултата – корелација лимфоцита са *PTX-3* и лимфоцита са *MMP-9*, што је објашњено утицајем патолошких фактора присутних у СКА. Тромбоцити и њихови параметри су показали очекиване корелације попут оне између средњег волумена тромбоцита и *VCAM-1*, корелације ширине дистрибуције тромбоцита и *LpPLA-2*, односа индекса тромбоцити/лимфоцити и *TNF- $\alpha$*  (*Giannini et al., 2011; Najjar et al., 2020*). Еритроцити и њихови индекси, као и липидни и метаболички параметри су показали неколико очекиваних корелација и ограничену повезаност са СКА.

Леукоцитни параметри су били у вези са стабилношћу плака, а од њих су најзначајнији били неутрофили и различити индекси који укључују вредности неутрофила, лимфоцита и моноцита: однос неутрофили/тромбоцити, тромбоцити/лимфоцити и моноцити/*HDL*-холестерол. Ови налази су у сагласности са претходним студијама (*Li et al., 2018; Liu et al., 2020; Ionita et al., 2010; Wigren et al., 2012; Ruan et al., 2022; Karacop et al., 2020; Idil et al., 2017*). Додатно су *NLR* и *PLR* били повезани и са симптоматским статусом, како је претходно показано у студији *Pereira-Neves* и сарадника (*Pereira-Neves et al., 2021*). Од тромбоцитних параметара најзначајнији су били они везани за њихову величину, *MPV* и *PDW*, који су били у асоцијацији и са тежином стенозе и са стабилношћу плака. Ово није примећено у претходним студијама (*Mayer et al., 2014; Oz et al., 2016*), али може да се објасни улогом активности тромбоцита у прогресији атеросклерозе (*Mayer et al., 2014; Coenen et al., 2021*). Од липидних параметара најзначајнији је био *HDL*-холестерол који је показао повезаност са симптоматским статусом и са стабилношћу плака, док су и укупни холестерол и триглицериди такође били повезани са стабилношћу плака. Слични резултати показани су и у претходним студијама (*Wannamethee et al., 2020; Sacco et al., 2001; Gomaraschi et al., 2016; Yeh et al., 2013; Amarenco et al., 2008; Mathiesen et al., 2001; Asakura et al., 2022; Toth et al 2021*).

## Г. Објављени и саопштени резултати

### Радови који чине део докторске дисертације са SCI листе

1. **Ruzanovic A**, Saric-Matutinovic M, Milinkovic N, Jovicic S, Dimic A, Matejevic D, Kostic O, Koncar I, Ignjatovic S. Significance of myeloperoxidase, pentraxin-3 and soluble urokinase plasminogen activator receptor determination in patients with moderate carotid artery stenosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2024;84(7-8):486-92. doi:10.1080/00365513.2024.2422404  
Тип рада: Article (originalan naučno-istraživački rad)  
Импакт фактор: 1,300 (2023)  
Ранг часописа 148/189 у категорији Medicine, Research & Experimental
2. **Ruzanovic A**, Saric-Matutinovic M, Milinkovic N, Jovicic S, Dimic A, Matejevic D, Kostic O, Gakovic B, Koncar I, Ignjatovic S. Association of matrix metalloproteinases and adhesive molecules with important aspects of carotid artery stenosis. *J Med Biochem.* 2024;43:1-8. doi:10.5937/jomb051391  
Тип рада: Article (originalan naučno-istraživački rad)  
Импакт фактор: 2,000 (2023)  
Ранг часописа 249/313 у категорији Biochemistry & Molecular Biology

### Остали радови који чине део докторске дисертације

1. **Ruzanovic A**, Milinkovic N, Jovicic S, Saric-Matutinovic M, Matejevic D, Kostic O, Ignjatovic S, Koncar I. Soluble selectins E and P as potential biomarkers for carotid artery disease. *EuroMedLab Roma, Rome, Italy, Clin Chem Lab Med* 2023; 61, Special Suppl, pp S87 – S222  
(Тип рада: abstract, IF: нема, ISSN: нема)
2. Jovičić S, **Ruzanović A**, Milinković N, Sarić-Matutinović Marija, Dimić A, Roganović A, Kostić O, Matejević D, Gaković B, Končar I, Ignjatović S. Tumor Necrosis Factor-Alpha, Selectin-E and Matrix Metalloproteinase-7 as Potential Biomarkers for Carotid Artery Disease. XXX Meeting of the Balkan Clinical Laboratory Federation, Herceg Novi, Montenegro, Montenegrin Association of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (MACC) 2023; 30 ( 1):78  
(Тип рада: abstract, IF: нема, ISSN: нема)

## Д. Закључак

Утврђено је да су испитивани параметри у СКА имали вредности сличне онима код других КВБ пацијената, док су разлике биле присутне у односу на здраве испитанике за параметре *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *suPAR*, *sel-P*, *sel-E* и *MMP-7*. Показана су и значајна одступања од очекиваних међусобних корелација испитиваних параметара код СКА која указују на значајан утицај присутних патолошких фактора на њихове вредности.

Показано је да утицај демографских фактора на вредности испитиваних параметара већински није био значајан, као ни присуство фактора ризика и утицај терапије. Вредности *IL-6*, *sel-P* и *MMP-2* су одражавали системску заступљеност атеросклерозе, како су били виши код пацијената са додатним атеросклеротским болестима поред СКА.

Асоцијација испитиваних параметара са ризиком од развоја симптома у СКА била је јача у здравој популацији него међу асимптоматским пацијентима са СКА. Најзначајнију асоцијацију са симптоматским статусом у оквиру пацијената са СКА показали су *SAA* и *MPO*. Осим међу укупним пацијентима, *SAA* је био значајно асоциран са симптомима у тешкој стенози и присуству нестабилног каротидног плака.

Уочено је да су испитивани параметри, а посебно *PTX-3*, најјачу повезаност са степеном стенозе имали у присуству нестабилног плака, што указује да они одражавају промену у степену стенозе у вези са интензивнијом инфламаторном активношћу каква постоји унутар нестабилних плакова. *LOX-1* је најконзистентније асоциран са тежином стенозе, независно од симптоматског статуса и стабилности плака. Код пацијената са умереном стенозом, *MPO* је показао комплексну и потенцијално веома значајну повезаност.

Параметри *suPAR*, *sel-P* и *sel-E* су били повезани са присуством нестабилног плака посебно код умерене стенозе, што је налаз од посебног значаја с обзиром да је у овој популацији неопходно дефинисати додатне показатеље будућег ризика. Указана је и могућност повезаности *MPO* са процесима васкуларне калцификације и ерозије плака.

Појединачна дијагностичка тачност испитиваних параметара за симптоматски статус и нестабилност плака била је веома ограничена, а у оквиру ње су се истакли *SAA*, *CRP* и *MPO*, за симптоматски статус, као и *sel-P*, *sel-E*, *suPAR* и *MMP-7* за нестабилност плака. Веза са нестабилношћу плака била је значајна само у умереној стенози.

Формулисани су модели за предвиђање симптоматског статуса међу укупним пацијентима са СКА, одвојено у умереној стенози, као и модел за предвиђање присуства нестабилног плака у умереној стенози. Због пресечног дизајна студије и ограниченог броја података, предиктивни значај ових модела није био анализиран, већ су они служили да из додатног аспекта прикажу повезаност испитиваних параметара са значајним карактеристикама болести, и да оцене њихов потенцијал у односу на друге доступне не-лабораторијске параметре. Резултати анализе ових модела указали су на велики потенцијал испитиваних параметара у односу на рутински доступне ултразвучне параметре, и факторе ризика.

За детекцију присуства недавних симптома код укупних пацијената са СКА, значајни предиктори су били *SAA* и *CRP*, од којих је *SAA* био независан предиктор и у комбинованом моделу. За детекцију присуства недавних симптома код пацијената са умереном стенозом, значајни предиктори су били *SAA* и *MPO*, од којих је *MPO* био независан предиктор и у комбинованом моделу. За детекцију присуства нестабилног плака код пацијената са умереном стенозом, значајни предиктори су били *suPAR* и *sel-P*, који су оба два били и независни предиктори у комбинованом моделу.

Уочено је да су вредности рутинских лабораторијских параметара код пацијената са СКА већински биле у оквиру референтних. У односу на здраве испитанике, вредности укупних леукоцита, неутрофила, моноцита и тромбоцита, а ниже вредности укупног и *HDL*-холестерола су биле више. Корелације рутинских лабораторијских са испитиваним специфичним параметрима инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса су биле очекиване у односу на њихове улоге, а највише корелација је било са леукоцитним популацијама и њиховим индексима.

Од рутинских лабораторијских параметара, везу са симптоматским статусом су показали *HDL*-холестерол, однос неутрофили/лимфоцити и однос тромбоцити/лимфоцити. Са тежином стенозе били су асоцирани средњи волумен и ширина дистрибуције тромбоцита. Са нестабилношћу плака били су повезани неутрофили, однос моноцити/*HDL*-холестерол, однос неутрофили/лимфоцити, однос тромбоцити/лимфоцити, средњи волумен и ширина дистрибуције тромбоцита, укупни холестерол, *HDL*-холестерол и триглицериди. додавање ових параметара у одговарајуће претходно испитане моделе није пружио додатни допринос. Укључивање рутинских лабораторијских параметара у формулисане моделе није показало значајан допринос.

На основу изложеног, може се закључити да је кандидат у свим истраживању оправдао постављене циљеве истраживања, стога предлажемо Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације под насловом „Клинички значај биохемијских параметара инфламације, ћелијске адхезије и деградације екстраћелијског матрикса код пацијената са болешћу каротидних артерија“ и омогући кандидату да приступи јавној одбрани исте.

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

1. Др сц. Неда Милинковић, доцент,  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет  
(ужа научна област: Медицинска биохемија)

*Неда Милинковић*

2. Др сц. Андреја Димић, доцент,  
Универзитет у Београду – Медицински факултет  
(ужа научна област: Васкуларна хирургија)

*Андреја Димић*

3. Др сц. Марија Сарић-Матутиновић, научни сарадник,  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет  
(ужа научна област: Медицинска биохемија)

*Марија Сарић*