

Proteomic markers associated with the progression of atherosclerosis in type 2 diabetes

Proteomické markery asociované s progresiou aterosklerózy u diabetikov 2. typu

Demková K, Yaluri A, Tkáč I

IV. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, Slovenská republika

Demkova K, Yaluri A, Tkac I. **Proteomic markers associated with the progression of atherosclerosis in type 2 diabetes.** Cardiology Lett. 2022;31(1):35–47

Abstract. Atherosclerosis and its complications are the main causes of morbidity and mortality in Western countries. Early detection and treatment of atherosclerosis is thus imperative to improve global health. Identification of subjects at increased risk for atherosclerosis and its complications plays a central role in the worldwide efforts to improve prevention, prediction, diagnosis, and prognosis of atherosclerosis and to decrease the related costs. Despite their high predictive value on population level, traditional risk factors fail to fully predict individual risk. With the recent advances in proteomics, many new risk factors with small-to-moderate effects are likely to be identified. Additionally, individualized risk stratification and targeted therapy may become feasible, each individual could potentially be assessed with a panel of tests for proteomic markers, and on the basis of the individual's composite risk profile, preventive and therapeutic steps could then be undertaken. With a multimarker approach, it may also be possible to identify alterations in pathways involved in atherogenesis, rather than focus on individual risk factors. This review article provides a summary of current vascular biomarkers other than the traditional risk factors, with a special focus on the proteomic markers. Tab. 1, Ref. 161, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: biomarkers – proteomic markers – atherosclerosis – type 2 diabetes mellitus

Demková K, Yaluri A, Tkáč I. **Proteomické markery asociované s progresiou aterosklerózy u diabetikov 2. typu.** Cardiology Lett. 2022;31(1):35–47

Abstrakt. Ateroskleróza a jej komplikácie sú hlavnými príčinami morbidity a mortality v krajinách západného sveta. Včasná detekcia a liečba aterosklerózy je preto nevyhnutná na zlepšenie globálneho zdravia. Identifikácia osôb so zvýšeným rizikom aterosklerózy a jej komplikácií zohráva ústrednú úlohu v celosvetovom úsilí o zlepšenie prevencie, predikcie, diagnostiky a prognózy aterosklerózy a o zníženie súvisiacich nákladov. Napriek ich vysokej prediktívnej hodnote na populačnej úrovni tradičné rizikové faktory nedokážu úplne predikovať individuálne riziko. V súvislosti s recentnými pokrokmi v proteomike sa pravdepodobne identifikuje mnoho nových rizikových faktorov s malým až stredným účinkom. Okrem toho sa môže stať uskutočniteľnou personalizovaná stratifikácia rizika a cieľená terapia, každý jednotlivec by mohol byť potenciálne hodnotený súborom testov so zameraním na proteomické markery a na základe rizikového profilu jednotlivca by sa potom mohli prijať profylaktické a terapeutické kroky. Tento prehľadový článok poskytuje súhrn súčasných vaskulárnych biomarkerov iných ako tradičné rizikové faktory aterosklerózy s osobitným zameraním na proteomické markery. Tab. 1, Lit. 161, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: biomarkery – proteomické markery – ateroskleróza – diabetes mellitus 2. typu

Ateroskleróza (AS) je chronické, pomaly progredujúce degeneratívne zápalové ochorenie cievnej steny (1). AS je vo všeobecnosti spôsobená poruchou metabolizmu lipidov, rozvíja sa na intimo-mediálnom rozhraní stredne veľkých a veľkých artérií. Patogenéza AS je veľmi komplexná a v konečnom dôsledku vedie k zhrubnutiu a stuhnutiu artériovej steny a stenóze lúmenu, čo vedie postupom času k oklúzii ciev a vzniku kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych príhod (2). Výskyt a rozvoj AS je výsledkom kombinácie pôsobenia rôznych environmentálnych a genetických faktorov.

V ostatných rokoch štúdie preukázali, že stabilita aterosklerotického plaku má dôležitú úlohu v patogenéze AS (3) a zápalové, koagulačné, imunitné a iné faktory majú dôležitú úlohu v procese transformácie stabilného plaku na vulnérabilný (4). Aterosklerotické plaky sú vo všeobecnosti zložené z lipidového jadra pokrytého fibróznou čiapočkou, ktorá sa primárne skladá z extracelulárnej matrix (ECM) obsahujúcej veľké množstvo kolagénových vlákien, hladkosvalových buniek (SMC), a malého počtu makrofágov. Lipidové jadro sa skladá z makrofágov, SMC a ECM s veľkým počtom novovytvorených ciev.

Aterosklerotické plaky sa rozdeľujú na stabilné a vulnérabilné. Instabilita plaku je charakterizovaná zvýšeným obsahom extracelulárnych lipidov v plaku a nadmerným počtom makrofágov vo fibróznej čiapočke. Pri ruptúre plaku sa zvyšuje počet makrofágov vo fibróznej čiapočke, ktoré uvoľňujú veľké množstvo proteolytických enzýmov a zápalových faktorov.

Proteomické pozadie aterosklerózy a jej komplikácií

V ostatnom čase sa veľká pozornosť sústreďuje na identifikáciu tkanivových markerov aterosklerózy na genomickej, transkriptomickej a proteomickej úrovni (5). Keďže ľudský proteóm nie je statický útvar, zdá sa, že je potrebné odhadnúť počet druhov proteínov a následne zmerať počet kópií každého proteínu v konkrétnom tkanive. Výskumníci odhadujú počet od 10 000 (6) do niekoľkých miliárd (7) rôznych druhov proteínov (8). Výskum založený na proteomike má potenciál ponúknuť pohľad na celú komplexnosť aterosklerózy a môže odhaliť nové biomarkery, ktoré majú schopnosť zlepšiť predikciu nežiaducich príhod (9) (tabuľka 1).

Pri objavovaní biomarkerov predstavuje krvná plazma biologický materiál voľby, pretože v nej možno preukázať stopy všetkých biologických procesov a navyše sa dá ľahko a neinvazívne odobrať. Z týchto dôvodov sa analýza proteínov, ktoré sú vylučované tkanivami do obehu, dostala do popredia záujmu pri objavovaní nových biomarkerov (10, 11).

Prehľad proteomických markerov asociovaných s aterosklerózou

1. Proteomické markery asociované s kostným minerálnym metabolizmom

Fibroblastový rastový faktor (FGF23), proteín exprimovaný najmä osteocytmi a osteoblastmi v kostiach, má významnú úlohu v regulácii kalcium-fosfátového metabolizmu. FGF23 indukuje vznik a rozvoj aterosklerózy prostredníctvom svojho vplyvu na vaskulárnu kalcifikáciu a endotelovú dysfunkciu (12, 13).

Nedávne klinické štúdie poskytli dôkazy, ktoré poukazujú na vzťah medzi zvýšenými hladinami FGF23 v cirkulácii a prítomnosťou kardiovaskulárnych ochorení (KVO) na podklade aterosklerózy (14, 15). Predchádzajúce štúdie odhalili, že sérové hladiny FGF23 súvisia nielen s prítomnosťou subklinickej aterosklerózy, ale aj ischemickej choroby srdca (ICHS) (16 – 18), čo naznačuje účasť FGF23 na vzniku aj progresii aterosklerózy (19). Sérové hladiny FGF23 sú nielen asociované s prítomnosťou ICHS, ale zvyšujú sa aj s kumulatívnym počtom stenotických artérií (18). Okrem toho bola zaznamenaná pozitívna korelácia medzi sérovými hladinami FGF23 a intimo-mediálnou hrúbkou karotídy (IMT) v populácii s diabetom 2. typu (DM2), ale aj bez diabetu (16, 19). Keďže IMT môže slúžiť ako indikátor včasnej aterosklerózy, tieto zistenia poukazujú na možné využitie sérových hladín FGF23 na diagnostiku klinickej aterosklerózy v ranom štádiu (19). Biscetti et al. vo svojej štúdii využívali na diagnostiku periférneho artériového ochorenia (PAO) členkovo-brachiálny index (ABI) a definovali jeho závažnosť podľa Fontaineovej klasifikácie. U 976 talianskych pacientov s DM2 preukázali, že sérové hladiny FGF23 nezávisle a pozitívne korelovali s prítomnosťou a závažnosťou PAO, čo naznačuje, že zvýšené sérové hladiny FGF23 by mohli predstavovať dôležitý rizikový faktor PAO (20).

Osteoglycín (OGN) je glykoproteín asociovaný s kostným metabolizmom, ale je tiež základnou zložkou ECM ciev (21, 22).

Pacienti s kardiovaskulárnymi príhodami (MACE, major adverse cardiovascular events – mortalita z rôznych príčin, akútny koronárny syndróm, neplánovaná koronárna revascularizácia, cievna mozgová príhoda) počas prvého roka follow-upu mali vyššie plazmatické hladiny OGN (prípady: 13,7 (8,0 – 18,4) vs. kontroly: 9,6 (7,2 – 13,7) ng/ml; $p = 0,011$) v čase koronarografie v porovnaní s pacientmi bez MACE počas jednoročného follow-upu (23). Po adjustácii na konvenčné kardiovaskulárne rizikové faktory v multivariantnej logistickej regresnej analýze boli vyššie hladiny OGN nezávisle asociované s výskytom MACE v priebehu sledovania (OR 1,53; 95 % CI 1,11 – 2,11; $p = 0,010$) (23). Vyššie cirkulujúce hladiny OGN boli nezávisle prediktory výskytu MACE v priebehu jedného roka po koronarografii (23).

Tabuľka 1 Súhrn proteomických biomarkerov kardiovaskulárnych ochorení

BIOMARKER	POPIS BIOMARKERA	TKANIVO	KLINICKÝ KONTEXT	HLAVNÉ POZOROVANIA	LITERATÚRA
FGF23	Proteín asociovaný s metabolizmom kostí	Sérum	PAO, ICHS	Zvýšené hladiny korelujú s prítomnosťou a závažnosťou PAO a ICHS	Biscetti et al. (20) Hu et al. (18)
OSTEOGLYCÍN	Proteín asociovaný s metabolizmom kostí	Plazma	MACE	Zvýšené hladiny asociované s incidenciou MACE	Cheng et al. (23)
OSTEOPONTÍN	Proteín asociovaný s metabolizmom kostí	Karotický plak, plazma	MACE	Predikcia MACE v oblastiach postihnutých AS	De Kleijn et al. (26)
OSTEOPROTEGERÍN	Proteín asociovaný s metabolizmom kostí	Sérum, plazma	ICHS, IM, CAS, PAO	Zvýšené koncentrácie asociované s ICHS, IM, CAS, PAO	Kadoglou et al. (42) Sandberg et al. (44) Demková et al. (45)
IL-27	Proteín asociovaný so zápalom	Karotický plak, plazma	CAS	Zvýšené hladiny u pacientov s CAS	Gregersen et al. (63)
S100A12	Proteín asociovaný so zápalom	Sérum	PAO, ICHS	Zvýšené hladiny asociované s PAO, amputáciou, mortalitou, ICHS	Malmstedt et al. (76) Ligthart et al. (80)
TNFR1/2	Proteín asociovaný so zápalom	Sérum	KVO	Prediktor incidencie KVO	Carlsson et al. (90)
CRP	Proteín asociovaný so zápalom	Plazma	PAO, ICHS	Zvýšené hladiny asociované s PAO, ICHS	Wildman et al. (101) Rao et al. (107)
SAA	Proteín asociovaný so zápalom	Plazma	PAO, ICHS	Zvýšené hladiny u pacientov s AS koronárnych a periférnych artérií	Delanghe et al. (116)
CD14	Proteín asociovaný s imunitou	Moč	ICHS	Zvýšené hladiny korelujú s prítomnosťou a závažnosťou ICHS	Lee et al. (121)
NGAL/MMP-9	Proteín asociovaný so zápalom, marker poškodenia obličiek	Plazma	AS, MACE	Zvýšená expresia v nestabilných aterosklerotických plakoch, zvýšené hladiny asociované s MACE	Hemdahl et al. (124) Cheng et al. (23)
TROMBOSPONDÍN-1	Proteín asociovaný so zápalom	Plazma	CAS	Signifikantne vyššie u pacientov s AS	Rocchiccioli et al. (132)
VITAMÍN D VIAŽUCI PROTEÍN	Marker akútneho príhodu	Plazma	CAS	Signifikantne vyššie u pacientov s AS	Rocchiccioli et al. (132)
B2M	Proteín asociovaný s imunitou, marker poškodenia obličiek	Sérum	PAO	Zvýšené hladiny pri PAO	Wilson et al. (133)
TRAIL-R2	Proteín asociovaný s apoptózou	Plazma	Mozgová AS	Signifikantne vyššie u pacientov s AS	Pan et al. (139)
KIM-1	Marker poškodenia obličiek	Plazma, moč	KVO	Asociovaný s KVO na podklade AS	Park et al. (143)
MMP-1	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Sérum	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Hu et al. (16)
MMP-2	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Karotický plak	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Müller et al. (153)
MMP-3	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Sérum	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Hu et al. (16)
MMP-8	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Karotický plak	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Müller et al. (153)
MMP-9	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Karotický plak	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Müller et al. (153)
MMP-10	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Karotický plak	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Müller et al. (153)
MMP-12	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Sérum	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Hu et al. (16)
MMP-14	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Karotický plak	CAS	Zvýšená u pacientov s CAS	Müller et al. (153)
TIMP-1	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Plazma	CAS	Zvýšená u pacientov s AS	Lynch et al. (157)
TIMP-2	Proteín asociovaný s degradáciou ECM	Plazma	CAS	Zvýšená u pacientov s AS	Lynch et al. (157)

MACE – kardiovaskulárne príhody (*major adverse cardiovascular events*) (mortalita z rôznych príčin, akútny koronárny syndróm, neplánovaná koronárna revascularizácia, cievná mozgová príhoda), KVO – kardiovaskulárne ochorenie (IM, cievná mozgová príhoda, PAO), IM – infarkt myokardu, PAO – periférne artériové ochorenie, ICHS – ischemická choroba srdca, CAS – karotická ateroskleróza, AS – ateroskleróza, ECM – extracelulárna matrix

Osteopontín (OPN) je sekrečný multifunkčný glykofosfoproteín produkovaný bunkami zapojenými do morfogenézy kostí a jednou z hlavných fyziologických úloh osteopontínu je kontrola biomineralizácie a kalcifikácie (24). Osteopontín pôsobí aj ako fyziologický inhibítor vaskulárnej kalcifikácie (25). Nedávna proteomická štúdia preukázala, že tkanivová expresia osteopontínu v karotických plakoch a jeho plazmatické hladiny sú prediktormi kardiovaskulárnych príhod (26).

Osteoprotegerín (OPG) je sekrečný glykoproteín, ktorý patrí do rodiny receptorov pre tumor nekrotizujúci faktor a zohráva úlohu pri AS (27). OPG je syntetizovaný osteoblastmi (28). Exprimovaný je aj v bunkách, ktoré sa podieľajú na vývoji a progresii aterosklerotického plaku, ako sú hladkosvalové bunky steny tepien (29), endotelové bunky (30) a megakaryocyty (31), a v mnohých ďalších tkanivách.

Dôležitú úlohu má pri regulácii osteoklastickej resorpcie (32). Chráni receptor RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) pred interakciou s ligandom RANK (RANKL) (33). V neprítomnosti OPG sa cytokín RANKL spája s RANK receptorom lokalizovaným na osteoklastoch, čo vedie k osteoklastickej resorpcii (34). RANKL sa považuje za stimulátor kostnej resorpcie prostredníctvom indukcie diferenciácie osteoklastov a aktivácie zreých osteoklastov (35). OPG je antagonistom RANKL, a teda chráni kostné tkanivo pred resorpciou (36). RANK a RANKL sú tiež proteíny patriace do superrodiny TNF (tumor nekrotizujúci faktor) (37). Interakcii medzi RANK a RANKL sa pripisuje destabilizácia plaku a možno predpokladať, že OPG sa ako receptor pre RANKL správa ako protizápalový mediátor (38). OPG je receptorom aj pre TRAIL ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand) (39). TRAIL je tiež proteín a ďalší člen superrodiny TNF. OPG chráni endotelové bunky pred apoptózou a podporuje neovaskularizáciu (37).

Nedávno sa preukázalo, že hladina OPG v sére pozitívne koreluje so závažnosťou aterosklerózy, najmä s progresiou KVO (40, 41). Tieto zistenia ďalej podporujú uvedený záver, že OPG je rizikovým faktorom progresie AS a KVO (39). Okrem toho sú zvýšené koncentrácie OPG asociované so závažnosťou nestabilnej angíny pectoris, PAO a srdcovým zlyhaním, vulnerabilnými karotickými plakmi, symptomatickou stenózou karotid a akútnym infarktom myokardu (42 – 44). V našej predchádzajúcej štúdii, ktorá obsahovala 165 konsekutívnych pacientov s DM2, sme pozorovali signifikantnú koreláciu medzi sérovými hladinami OPG a prítomnosťou aj závažnosťou (vyjadrenou prstovo-brachiálnym indexom, TBI) PAO u pacientov s DM2 ($r = -0,308$; $p < 0,001$). V multivariantej analýze s vekom, pohlavím, indexom telesnej hmotnosti (BMI), HDL cholesterolom (HDL-C) a OPG ako nezávislými premennými bolo zvýšenie sérového OPG jediným biochemickým parametrom, ktorý signifikantne predikoval zníženie TBI ($p = 0,02$), t. j. závažnejšie PAO (45). Naše zistenia sú v súlade so štúdiou Niu et al. (46) zahrňajúcou 712 účastníkov, ktorá preukázala lineárny nárast

priemerných hladín OPG od skupiny so zdravými jedincami bez stenózy až po skupinu s ťažkou stenózou artérií dolných končatín (znižovanie perfúzie dolných končatín).

OPG môže zohrávať kľúčovú úlohu pri kalcifikácii artériovej steny, a tým prispievať k rozvoju KVO (47). Kalcifikácia artériovej steny môže súvisieť s redukovanou kostnou minerálnou denzitou a zvýšenou incidenciou fraktúr (48, 49). OPG preukázal silnú asociáciu so zvýšeným skóre kalcifikácie koronárnych artérií (50, 51). OPG bol asociovaný so zvýšeným rizikom abnormálnej IMT, karotického plaku a kalcifikácie aorty (52). Hladiny OPG sú zvýšené u pacientov s diabetes mellitus 1. a 2. typu a súvisia so zlou glykemickou kompenzáciou (53, 54). Hladiny OPG sú významne zvýšené aj u osôb s artériovou hypertenziou (55). Liečba inzulinom, glitazónmi a statínmi znižuje hladiny OPG (37).

OPG môže byť potenciálnym biomarkerom kontroly diabetu a jeho komplikácií, AS, vaskulárnej kalcifikácie a mortality (37). Cirkulujúci OPG sa môže merať v plazme (kde je hladina vyššia) aj v sére (kde je nižšia) (37).

Doposiaľ však nebolo objasnené, či zvýšenie sérových hladín OPG pri rôznych kardiovaskulárnych príhodách predstavuje kompenzačný mechanizmus ako prevenciu poškodenia ciev, alebo je za takéto poškodenie zodpovedné (56).

2. Proteomické markery asociované so zápalom a imunitou

Interleukín-27 (IL-27), člen rodiny cytokínov IL-12, je secernovaný ako heterodimér pozostávajúci z Epstein-Barr-indukovaného produktu génu 3 (EBI3) a p28, pričom jeho hlavným bunkovým zdrojom sú antigén prezentujúce bunky, ako sú makrofágy a dendritické bunky (57). IL-27 je dôležitý cytokín pri zápalových ochoreniach, je zapojený do zápalového procesu asociovaného s rozvojom AS (58, 59).

Pri AS sa v plakoch zistila zvýšená expresia p28 a Ebi3 a u pacientov s ICHS sa zaznamenali zvýšené hladiny IL-27 v cirkulácii, ktoré súvisia so závažnosťou ochorenia (60). Preukázali sa aj proaterogénne účinky IL-27 pri aktivácii endotelu a včasnom vývoji plaku (61, 62). Podľa štúdie Gregersena et al. (63) boli plazmatické hladiny IL-27 významne zvýšené u pacientov s karotickou AS ($n = 140$) v porovnaní so zdravými kontrolami ($n = 19$) (medián (interkvartilové rozpätie): 4,77 (1,82 – 11,99) ng/ml oproti 1,17 (0,85 – 1,80) ng/ml, $p < 0,001$). Analýzy qPCR preukázali zvýšené hladiny mRNA IL-27p28 ($p = 0,06$), Ebi3 ($p < 0,001$) a IL-27RA ($p < 0,001$) v karotických plakoch ($n = 159$) v porovnaní s kontrolami ($n = 9$), hoci rozdiel pre IL-27p28 nedosiahol štatistickú signifikanciu. Zvýšená hladina IL-27 sa u pacientov s karotickou AS preukázala systémovo (IL-27) a aj v rámci aterosklerotickej lézie (IL-27 a IL-27R) (63). Aj iné staršie štúdie preukázali zmenu hladín IL-27 pri koronárnej AS (60, 64, 65). Expresia podjednotiek IL-27 Ebi3 a p28 v karotických plakoch bola tiež už dávnejšie popísaná v malom súbore pacientov (66).

Extracelulárny novoidentifikovaný receptor pre proteín viažuci konečné produkty pokročilej glykácie (EN-RAGE),

extracellular newly identified receptor for advanced glycation end-products binding protein) je malý kalcium viažuci proinflatórny proteín, ktorý vylučujú najmä granulocyty a myeloidné bunky. Najznámejšími cieľovými proteínmi pre EN-RAGE sú RAGE (67) a TLR4 (Toll-like Receptor 4) (68). Ligácia EN-RAGE s RAGE alebo TLR4 aktivuje zápalové kaskády a vedie ku vzniku porúch ciev (69). EN-RAGE je pozitívne asociovaný s chronickými zápalovými ochoreniami, ako je subklinická AS a ICHS, a jeho sérové koncentrácie korelujú s aktivitou ochorenia (70, 71). EN-RAGE nie je detekovateľný v hladkosvalových bunkách normálnych ciev, ale možno ho detekovať v hladkosvalových bunkách cievnej stený po poškodení endotelu vodičom a tiež v hladkosvalových bunkách cievnej stený postihnutej aterosklerózou (72, 73).

V štúdií s 380 subjektmi bez predchádzajúcej anamnézy diabetu (74) bol EN-RAGE asociovaný s rýchlosťou pulzovej vlny (PWV, pulse wave velocity) ($r = 0,14$; $p < 0,01$), ako včasným markerom KVO, v jednoduchej regresnej analýze a tiež v multivariátnej regresnej analýze ($p = 0,02$). Basta et al. (75) pozorovali silnú asociáciu medzi vyššími plazmatickými koncentraciami EN-RAGE a zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom. Štúdia Malmstedta et al. (76) so 146 pacientmi s DM2 preukázala, že vyššie plazmatické hladiny EN-RAGE súvisia so zvýšeným rizikom amputácie alebo mortality v priebehu 12-ročného follow-upu [HR 1,29; 95 % CI (1,04, 1,59) a HR 1,79; 95 % CI (1,07, 2,99)] a so zvýšeným rizikom vzniku PAO alebo mortality v priebehu 12-ročného follow-upu (HR 1,22; 95 % CI (1,00, 1,49) a HR 1,56; 95 % CI (1,00, 2,44)) po adjustácii na vek a pohlavie. Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi dôkazmi o zvýšenej expresii EN-RAGE v koronárnych artériách diabetikov (v porovnaní s nediabetikmi) (77) a s tým, že zvýšená plazmatická expresia EN-RAGE bola v prierezových štúdiách spojená s prevalenciou KVO (78) a PAO (79). Aj v štúdií Ligtharta et al. (80) s 839 účastníkmi EN-RAGE preukázal najsilnejšiu asociáciu s ICHS ($p = 2 \times 10^{-3}$). Burke et al. (77) potvrdili silnú expresiu EN-RAGE v hladkosvalových bunkách koronárnych artérií, ktorá bola asociovaná s ruptúrou plaku a náhlou kardiálnou smrťou, čo naznačuje, že EN-RAGE je buď markerom, alebo mediátorom dysfunkcie vaskulárnych SMC.

Receptor pre tumor nekrotizujúci faktor (TNFR, tumor necrosis factor receptor) je trimérický cytokínový receptor, ktorý viaže tumor nekrotizujúci faktor (81). Štúdie preukázali, že TNFR1/2 pôsobia ako imunitné mediátory a regulujú zápalovú kaskádu. TNFR1 je receptor, ktorý sprostredkuje poškodenie buniek, apoptózu a smrť prostredníctvom nukleárneho faktora κB , naopak TNFR2 môže spôsobiť migráciu, proliferáciu a obnovu buniek s cieľom bojovať proti škodlivým účinkom TNFR1 (82, 83). TNFR1 je exprimovaný takmer vo všetkých typoch buniek (okrem erytrocytov), zatiaľ čo TNFR2 sa nachádza predovšetkým v bunkách imunitného systému a v bunkách myokardu (84, 85). Zvýšené hodnoty TNFR1 a TNFR2 sa bežne považujú za známku aktivácie zá-

palového procesu, ktorý vedie k vzniku aterosklerotickej lézie a môže tiež spustiť ruptúru plaku (86, 87). Súvislosť medzi TNFR1 a TNFR2 a výskytom KVO by sa mohla vysvetliť ich aterosklerotickým účinkom alebo tým, že sú markermi systémového zápalu (86, 87). Zápal zohráva dôležitú úlohu pri vzniku aterosklerotickej lézie, ako aj pri ruptúre plaku, ktorá je konečným spúšťačom väčšiny ischemických kardiovaskulárných príhod (88). Čím vyšší je TNFR-1, tým väčšie je riziko závažného ochorenia tepien dolných končatín (89).

Carlssonova štúdia identifikovala dôležitú asociáciu medzi koncentraciami cirkulujúcich TNFR1 a TNFR2 a kardiovaskulárnymi príhodami u diabetikov 2. typu. Oba TNFR spoľahlivo predpovedali výskyt kardiovaskulárných príhod nezávisle od veku, pohlavia a prítomnosti chronického ochorenia obličiek ($p < 0,001$ pre TNFR1, $p = 0,004$ pre TNFR2) (90). Okrem toho sa ukázalo, že vyššie koncentrácie TNFR2 sú spojené s ICHS u žien s diabetom (86).

C-reaktívny proteín (CRP) je reaktant akútnej fázy patriaci do rodiny pentraxínov. Produkujú ho takmer výlučne hepatocyty ako odpoveď na stimuláciu interleukínom 6 (91). Medzi hlavné funkcie CRP patrí väzba na rôzne ligandy na poškodených tkanivách s následnou propagáciou oboch – protizápalových aj prozápalových účinkov (92 – 94). CRP zohráva aktívnu úlohu aj v procese AS (95, 96).

Muži a ženy s PAO dolných končatín majú vyššie hladiny CRP ako muži a ženy bez PAO. Observačné štúdie dávajú do súvislosti vyššie hladiny CRP so závažnejším PAO, výraznejším funkčným postihnutím dolných končatín, výraznejším poklesom ABI, výraznejším zhoršením výkonnosti dolných končatín a vyššou mierou kardiovaskulárnej morbidít a mortality (97). Vyššie hladiny CRP sú tiež asociované s horšími výsledkami po revaskularizácii ciev dolných končatín, vrátane restenózy graftu a mortality (97). Hladiny cirkulujúceho CRP môžu byť vyššie u pacientov s PAO s kritickou končatinovou ischémiou v porovnaní s pacientmi s intermitentnými klaudikáciami (98, 99). U osôb s PAO sú vyššie hladiny CRP asociované s pomalšou chôdzou a kratšími vzdialenosťami dosiahnutými v šesťminútovom teste chôdze, dokonca aj po adjustácii na ABI a komorbiditu (100).

V rámci Národného prieskumu zdravia a výživy (National Health and Nutrition Examination Survey), ktorého sa zúčastnilo 4787 mužov a žien, ktorí podstúpili meranie ABI, boli vyššie hladiny CRP asociované s nižšími hodnotami ABI. Po adjustácii na tradičné rizikové faktory KVO mali účastníci v najvyššom kvartile CRP dvojnásobne vyššiu pravdepodobnosť PAO v porovnaní s účastníkmi v najnižšom kvartile (101). V štúdií 387 pacientov s PAO hodnoty ABI postupne klesali v tertiloch so stúpajúcimi hladinami CRP: prvý tertíl ($CRP \leq 1,72$ mg/l) $ABI = 0,70$; druhý tertíl ($CRP > 1,72$ až $\leq 3,56$ mg/l) $ABI = 0,65$; a tretí tertíl ($CRP > 3,56$ mg/l) $ABI = 0,57$ (p trend = 0,001) (102). V štúdií Physician's Health Study sa u 140 mužov, u ktorých sa neskôr vyvinulo PAO, pozorovali vyššie hladiny CRP na začiatku štúdie v porov-

nani s mužmi, u ktorých sa PAO nevyskytlo (1,34 mg/l vs. 0,99 mg/l, $p = 0,04$) (103). V štúdií Women's Health Study boli u 27 935 žien vyššie východiskové hladiny CRP spojené so zvýšeným rizikom vzniku PAO v priebehu 12-ročného sledovania (104).

Hladiny cirkulujúcich zápalových biomarkerov môžu byť vyššie u pacientov s PAO s kritickou končatinovou ischémiou v porovnaní s pacientmi s intermitentnými klaudikáciami. Štúdia Cassara et al. preukázala, že 30 pacientov s kritickou končatinovou ischémiou malo vyššie hladiny CRP v porovnaní so 132 pacientmi s intermitentnými klaudikáciami ($p = 0,001$) a 40 pacientmi bez PAO ($p < 0,001$) (7,17 mg/l pre kritickú končatinovú ischémiu vs. 3,4 mg/l pre intermitentné klaudikácie vs. 1,04 mg/l pre kontroly) (98). Štúdia Owena et al. na 91 pacientoch, ktorí podstúpili revaskularizáciu ciev dolných končatín, preukázala výskyt vyšších hladín zápalových biomarkerov u 50 pacientov s kritickou končatinovou ischémiou v porovnaní s pacientmi bez kritickej končatinovej ischémie (99). Pacienti s východiskovou hladinou CRP $> 5,0$ mg/l mali významne vyššiu mieru mortality, kardiovaskulárnych príhod a príhod súvisiacich s graftom v porovnaní s pacientmi s východiskovou hladinou CRP $< 5,0$ mg/l v priebehu sledovania počas priemerne 342 dní (99). Štúdia 172 konsekutívnych pacientov s PAO, ktorí podstúpili perkutánnu angioplastiku pre PAO v štádiu IIa, IIb alebo III podľa Fontaineho, preukázala, že výraznejšie zvýšenie hladiny CRP počas prvých 48 hodín po angioplastike bolo spojené s vyššou mierou restenózy a nižšou hodnotou ABI s odstupom šiestich mesiacov (105).

Jedinci v hornom kvartile CRP majú dvoj- až trojnásobne vyššie riziko výskytu koronárnej príhody v porovnaní s jedincami v dolnom kvartile (106). O potenciáli plazmatickej hladiny CRP ako prediktora koronárneho rizika sa však stále diskutuje. V štúdií Rao et al. (107) mali jedinci v hornom kvartile hsCRP približne štyrikrát vyššie riziko vzniku recidivujúcej koronárnej príhody v porovnaní s jedincami v dolnom kvartile (OR 3,79; 95 % CI 1,45 – 9,89; $p = 0,006$). Tieto údaje naznačujú, že vysoké hladiny hsCRP poskytujú dodatočnú prediktívnu hodnotu k tradičným rizikovým faktorom pri identifikácii osôb postihnutých ICHS, u ktorých by sa mohla vyvinúť recidivujúca koronárna príhoda (107).

Sérový amyloid A (SAA) je proteín, ktorý patrí medzi proteíny akútnej fázy syntetizujúce sa predovšetkým v pečeni. Množstvo štúdií naznačuje proaterogénne účinky SAA, ako je stimulácia sekrécie prozápalových cytokínov monocytmi, makrofágmi a lymfocytmi a indukcia endotelovej dysfunkcie (108 – 112). Proteomická analýza umožnila identifikovať zvýšené hladiny SAA akútnej fázy (AP SAA) vo všetkých lipoproteínových frakciách, predovšetkým v LDL cholesterole (LDLC) pacientov s aterosklerózou. Vyššie hladiny AP SAA u pacientov naznačujú úlohu LDLC ako nosiča AP SAA do subendotelového priestoru cievnej steny, kde sa potom AP SAA hromadí a môže pôsobiť škodlivo (113).

Okrem toho aj štúdia na myšom modeli *in vivo* demonštrovala, že SAA sa ukladá v aterosklerotických léziách vo všetkých štádiách vývoja a pozitívne koreluje aj s plochou lézie (114). Ukázalo sa tiež, že hladina SAA je zvýšená u pacientov s AS koronárnych a periférnych tepien (115, 116). Ogasawara et al. (117) prezentovali, že SAA asociovaný s LDLC predstavuje marker intravaskulárneho zápalu u pacientov so stabilnou ICHS. Napokon sa preukázal aj silný nezávislý vzťah medzi SAA a budúcimi kardiovaskulárnymi príhodami (118, 119). Výsledok kolektívu Lepedda et al. (113) ďalej podporuje zistenia o proaterogénnom pôsobení AP SAA, jeho hladiny boli v LDLC frakcii pacientov s aterosklerózou zvýšené až štrnásťnásobne. Skúmali vzorky plazmy 79 pacientov podstupujúcich karotickú endarterektómiu a 57 zdravých normolipidemických kontrol. Naznačuje to potenciálnu súvislosť medzi AP SAA a prítomnosťou pokročilých karotických lézií.

CD14. Okrem funkcie v signalizácii lipopolysacharidov môže CD14 zohrávať úlohu aj u zápalových ochorení prostredníctvom regulácie imunitného systému ako odpovede na pôsobenie endotoxínu (120).

Pacienti s ICHS ($n = 73$) mali významne vyššie hladiny CD14 v moči v porovnaní so zdravými kontrolami ($n = 35$) ($p < 0,001$) a hladina CD14 v moči pozitívne korelovala so závažnosťou ICHS a počtom postihnutých ciev (121). Zároveň sa podiel CD14+ monocytov významne zvýšil u pacientov s ICHS ($59,7 \pm 3,6$ %) v porovnaní so zdravými kontrolami ($14,9 \pm 2,1$ %) ($p < 0,001$), čo naznačuje, že vysoká hladina CD14 v moči môže byť potenciálne zapojená do patogenézy ICHS (121). Vysoká hladina CD14 v moči alebo zvýšený počet CD14+ monocytov môže byť dôsledkom chronického zápalu u pacientov s ICHS (121).

Neutrofilový s gelatinázou asociovaný lipokalín (NGAL) je proteín exprimovaný v neutrofiloch, srdci, aorte a v nízkych hladinách aj v obličkách (122, 123). Hoci je NGAL dobre známy ako biomarker poškodenia obličiek, ukázalo sa, že NGAL by mohol zohrávať úlohu aj v procese aterosklerózy (124). NGAL je schopný vytvárať stabilný, biologicky aktívny komplex s matrixovou metaloproteinázou 9 (MMP9), čím zabraňuje jej degradácii, a tým predlžuje aktivitu MMP9 (125, 126). MMP9 je proteáza z rodiny matrixových metaloproteináz (MMP), ktorá je schopná degradovať široké spektrum zložiek extracelulárnej matrix a je zodpovedná za vaskulárnu remodeláciu a rozpad fibróznej čiapočky aterosklerotických lézií, čo vedie k vulnerabilite plaku (127).

Existujú dôkazy, že NGAL a jeho komplex NGAL/MMP9 vykazujú zvýšenú expresiu v nestabilných aterosklerotických plakoch (124, 128). Komplex NGAL/MMP9 zohráva úlohu v zápalovej kaskáde vedúcej k nestabilite plaku. Pacienti, u ktorých došlo k MACE (mortalita zo všetkých príčin, akútny koronárny syndróm, neplánovaná koronárna revaskularizácia, cievna mozgová príhoda) v priebehu jednoročného follow-upu, mali už v čase koronarografie vyššie hladiny NGAL (prípady: medián 114 (67 – 167) vs. kontroly: 96 (58 – 133)

ng/ml; $p = 0,038$) v porovnaní s pacientmi bez následného MACE v priebehu follow-upu. Po adjustácii na konvenčné kardiovaskulárne rizikové faktory v multivariátnej logistickej regresnej analýze boli vyššie hladiny NGAL/MMP9 (OR 1,37; 95 % CI 1,01 – 1,85; $p = 0,042$) nezávisle asociované s výskytom MACE v priebehu jednoročného follow-upu (23). Vyššie hladiny komplexu NGAL/MMP9 v cirkulácii nezávisle predikovali výskyt MACE v priebehu jedného roka po koronarografii (23). Hladiny NGAL/MMP9 majú prognostickú hodnotu u pacientov s ICHS (23).

Trombospondín-1 je zástupcom proteínov asociovaných s extracelulárnou matrix, ovplyvňuje maturáciu aterosklerotického plaku (129). **Proteín viažuci vitamín D** je extracelulárny proteín a marker akútnych príhod (130, 131). Merali sa vo vzorkách plazmy kandidátov na karotickú endarterektómiu a zistilo sa, že ich hladiny mali títo pacienti výrazne vyššie v porovnaní s pacientmi bez aterosklerózy. Môžeme ich teda potenciálne využiť ako prediktory hodnotenia rizika aterosklerózy (132).

Vyššie hladiny **beta-2 mikroglobulínu (B2M)**, 12-kDa proteínu u pacientov s PAO v porovnaní s osobami bez PAO boli preukázané v dvoch štúdiách zahŕňajúcich 40 a 237 účastníkov (133).

3. Proteomické markery asociované s apoptózou

TRAIL ligand (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) patrí do superrodiny TNF ligandov. Existuje päť rôznych typov receptorov pre TRAIL. Dva receptory smrti, DR4/TRAIL-R1 a DR5/TRAIL-R2, iniciujú apoptózu, zatiaľ čo ďalšie tri receptory, TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 a OPG, antagonizujú apoptotickú signalizáciu (134, 135).

Receptor smrti 5 (DR5, death receptor 5) spúšťa po naviazaní na TRAIL apoptózu (136). DR5 je exprimovaný v rôznych bunkách, ako sú endotelové bunky, hladkosvalové bunky cievnej steny a niektoré zápalové bunky (lymfocyty, neutrofile, mastocyty), a priamo alebo nepriamo sa podieľa na patogeneze AS (134, 137, 138).

V štúdiu Pana et al. (139), ktorá obsahovala 132 pacientov s aterosklerózou veľkých ciev a 60 kontrol, bola hladina DR5 signifikantne vyššia u pacientov s AS ako u kontrol ($p < 0,001$). Logistická regresná analýza v tejto štúdiu odhalila, že riziko závažnej mozgovej AS sa významne zvýšilo pri vysokých plazmatických hladinách DR5 (OR 3,593; 95 % CI 1,878 – 6,869, $p < 0,001$) a súviselo so závažnosťou mozgovej AS. Okrem toho plazmatická hladina DR5 rástla so zvyšujúcim sa počtom artérií postihnutých AS. Autori dospeli k záveru, že plazmatická hladina DR5 nesúvisí s prognózou, ale môže sa podieľať na progresii AS a vzniku cievnej mozgovej príhody (139). Receptor TRAIL-R2 bol v štúdiu Västanmanland Myocardial Infarction Study, ktorá obsahovala 847 konsektívnych pacientov, tiež nezávislým prediktorom dlhodobej mortality zo všetkých príčin (HR 1,37, 95 % CI 1,12 – 1,67, $p = 0,002$) (140).

4. Proteomické markery asociované s poškodením renálnych buniek

Kidney injury molecule-1 (KIM-1) je transmembránový proteín exprimovaný najmä v bunkách proximálnych tubulov obličiek. Medzi KIM-1 a väčšinou tradičných kardiovaskulárnych rizikových faktorov existuje signifikantný vzťah (141). KIM-1 by teda mohol predstavovať všeobecnejší marker subklinického a/alebo klinického poškodenia tkaniva vyvolaného kardiovaskulárnymi rizikovými faktormi. Toto poškodenie môže viesť k zjavnému KVO (141). V štúdiu 1 251 pacientov, ktorí podstúpili koronárnu a periférnu angiografiu s intervenciou alebo bez nej, bol plazmatický KIM-1 jedným z prediktorov prítomnosti významnej ICHS. Pre účely tejto analýzy bola signifikantná koronárna stenóza charakterizovaná viac ako 70 % luminálnou obštrukciou. Pacienti s významnou koronárnou stenózou mali významne vyššiu hladinu KIM-1 ako pacienti bez významnej stenózy (0,04 mg/ml vs. 0,03 ng/ml ($p < 0,001$)) (142). KIM-1 v moči indexovaný na močový kreatinín bol nezávisle asociovaný s kardiovaskulárnymi príhodami na podklade AS (suponovaný alebo potvrdený infarkt myokardu, suponovaná alebo potvrdená ischemická cievna mozgová príhoda alebo PAO) (aHR na log SD 1,21 (95 % CI, 1,02 – 1,41)) (143). Vyšší KIM-1/Cr bol nezávisle asociovaný s kardiovaskulárnymi príhodami na podklade AS aj po adjustácii na glomerulárnu filtráciu a albumín-kreatinínový pomer (143).

5. Proteomické markery asociované s degradáciou extracelulárnej matrix

Matrixové metaloproteinázy (MMP) sú enzýmy rozkladajúce extracelulárnu matrix, ktoré majú dôležitú úlohu pri remodelácii a oprave ciev (144). MMP sú primárne uvoľňované makrofágmi a majú rôzne funkcie. Medzi degradačné produkty MMP patria kolagén, ECM a proteoglykány (145). Aktivované MMP majú vyššiu afinitu k ECM a môžu spôsobovať degradáciu rôznych zložiek ECM a oslabovať spojivé tkanivo fibrózných čiapečiek, čím zvyšujú nestabilitu plaku (146). Dysregulácia ich aktivity však môže spôsobiť aj patologické zmeny cievnej steny vrátane rastu a destabilizácie aterosklerotických plakov (147).

MMP-12 je stromelyzín, ktorý môže podporovať progresiu AS degradáciou zložiek ECM. Nadmerná expresia MMP-12 môže zvýšiť aj expresiu iných MMP, čo naznačuje, že MMP-12 má významnú úlohu v sériovej aktivácii MMP (148). MMP majú dôležitú úlohu v patogeneze AS a ovplyvňujú stabilitu plaku. Podľa štúdie Hu et al. (149), ktorá zahŕňala 200 pacientov s AS karotíd a 60 zdravých kontrol, boli hladiny MMP-1, MMP-3 a MMP-12 u osôb s vulnerabilnými plakmi významne zvýšené v porovnaní s hladinami u osôb bez prítomnosti plakov, respektíve so stabilnými plakmi. Preto je pravdepodobné, že MMP-1, MMP-3 a MMP-12 môžu zvyšovať nestabilitu plakov a podporovať transformáciu zo stabilných plakov na vulnerabilné a urýchľovať tak vznik

a rozvoj karotickej AS (149). Expresia MMP-12 v aterosklerotických plakoch je viac ako 300-násobne vyššia v porovnaní s artériami nezasiahnutými AS (150). Súvisí so znížením hrúbky fibróznej čiapky, ruptúrou plaku a zvýšeným rizikom nežiaducich kardiovaskulárnych príhod po endarterektómii (151, 152). MMP-12 sa spája s väčšími a zraniteľnejšími aterosklerotickými plakmi (148).

Štúdia Müllera et al. (153), ktorá obsahovala 15 pacientov, porovnávala hladiny MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12 a MMP-14 v artériách bez AS, stabilných a vulnerabilných plakoch. Všetky skúmané MMP boli významne zvýšené v oboch typoch plakov v porovnaní s tepnami bez AS. Spomedzi nich bola expresia MMP-1, MMP-9, MMP-12 a MMP-14 významne vyššia vo vulnerabilných plakoch (153). MMP-2 sa podieľa na stabilizácii plaku, kým aktivita MMP-9 sa spája s destabilizáciou a rozpadom plaku (154). Suchova et al. preukázali, že zvýšenú kolagenolýzu v aterosklerotických plakoch sprostredkúva MMP-1 (155). V súbore 159 pacientov bola koncentrácia aktívneho MMP-8 signifikantne zvýšená vo vulnerabilných karotických plakoch (156).

Ukázalo sa, že za destabilizáciu plaku je zodpovedné spektrum MMP a TIMP (tkanivové inhibitory matrixových metaloproteináz) vrátane kolagenáz MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 a TIMP-2 (157). Fitzsimmons et al. (158) tiež preukázali, že hladiny MMP-9 a TIMP-1 v moči boli u pacientov s ICHS vyššie v porovnaní s kontrolami. MMP a TIMP sa v súčasnosti považujú za hlavné proteolytické mediátory v cievnej stene (157).

Zhrnutie

Proteomické technológie majú potenciál identifikovať v plazme nové proteíny, ktoré môžu zlepšiť predikciu kardiovaskulárneho rizika, avšak jestvuje mnoho výziev. V krvi cirkulujú státisíce jedinečných proteínov. Treba objasniť úlohu nových proteomických markerov. V ideálnom prípade by mal nový marker prispieť k presnosti predpovede rizika nad rámec tradičných rizikových faktorov. S pokrokom v proteomike sa v blízkej budúcnosti môže stať uskutočniteľnou personalizovaná stratifikácia rizika a cieľená liečba. Vzhľadom na pokrok v proteomike bude pravdepodobne identifikovaných mnoho rizikových faktorov a každý jednotlivец by mohol byť potenciálne hodnotený pomocou panelu testov zahŕňajúcich proteomické markery (159 – 161).

Táto práca bola podporená grantom VEGA (číslo grantu 1/0183/20).

Literatúra

- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993;362:801-809.
- Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, et al. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*, 2002;7:40-53.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 2003;108:1664-1672.
- Hansson GK and Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 2011;12:204-212.
- Puig O, Yuan J, Stepaniants S, et al. Gene expression signature that classifies human atherosclerotic plaque by relative inflammation status. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011;4:595-604.
- Adkins JN. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002;1:947-955.
- Smith LM and Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. In *Nature Methods*, 2013;10:186-187.
- Ponomarenko EA, Poverennaya EV, Ilgisonis EV, et al. The size of the human proteome: The width and depth. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016;2016:1-6.
- Gerszten RE and Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*, 2008;451:949-952.
- Van Lammeren W, Moll F, Borst GJ, et al. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr Cardiol Rev*, 2011;7:22-27.
- Duran MC, Mas S, Martin-Ventura JL, et al. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics*, 2003;3:973-978.
- Richter B, Haller J, Haffner D, et al. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflugers Arch*, 2016;468:1621-1635.
- Zheng S, Zhang S, Song Y, et al. MicroRNA-297a regulates vascular calcification by targeting fibroblast growth factor 23. *Iran J Basic Med Sci*, 2016;19:1331-1336.
- Shah NH, Dong C, Elkind MS, et al. Fibroblast growth factor 23 is associated with carotid plaque presence and area: the Northern Manhattan Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015;35:2048-2053.
- Lutsey PL, Alonso A, Selvin E, et al. Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure and cardiovascular mortality: the Atherosclerosis risk in Communities study. *J Am Heart Assoc*, 2014;3:e000936.
- Hu X, Ma X, Luo Y, et al. Contribution of fibroblast growth factor 23 to Framingham risk score for identifying subclinical atherosclerosis in Chinese men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017;27:147-153.
- Hu X, Ma X, Luo Y, et al. Elevation in fibroblast growth factor 23 and its value for identifying subclinical atherosclerosis in first-degree relatives of patients with diabetes. *Sci Rep*, 2016;6:24696.
- Hu X, Ma X, Pan X, et al. Fibroblast growth factor 23 is associated with the presence of coronary artery disease and the number of stenotic vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015;42:1152-1157.
- He X, Hu X, Ma X, et al. Elevated serum fibroblast growth factor 23 levels as an indicator of lower extremity atherosclerotic disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 2017;16:1-8.
- Biscetti F, Straface G, Pitocco D, et al. Fibroblast growth factor 23 serum level in type 2 diabetic Italian subjects with peripheral

- arterial disease and critical limb ischemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016;20:4048-4054.
21. Fernández B, Kampmann A, Pipp F, et al. Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Mol Cell Biochem*, 2003;246:3-11.
 22. Shanahan CM, Cary NR, Osbourn JK, et al. Identification of osteoglycin as a component of the vascular matrix. Differential expression by vascular smooth muscle cells during neointima formation and in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997;17:2437-2447.
 23. Cheng JM, Akkerhuis KM, Meilhac O, et al. Circulating Osteoglycin and NGAL/MMP9 complex concentrations predict 1-year major adverse cardiovascular events after coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014;34:1078-1084.
 24. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2007;27:2302-2309.
 25. Lyle AN, Joseph G, Fan AE, et al. Reactive oxygen species regulate osteopontin expression in a murine model of post-ischemic neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012;32:1383-1391.
 26. De Kleijn DPV, Moll FL, Hellings WE, et al. Local atherosclerotic plaques are a source of prognostic biomarkers for adverse cardiovascular events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010;30:612-619.
 27. Biscetti F, Porreca CE, Bertucci F, et al. TNFRSF11B gene polymorphisms increased risk of peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, 2014;51:1025-1032.
 28. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and coronary artery disease in Japanese men. *Atherosclerosis*, 2006;187:215-217.
 29. Schoppet M, Kavurma MM, Hofbauer LC, et al. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011;407:103-107.
 30. Zannettino ACW, Holding CA, Diamond P, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Pallade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of Cellular Physiology*, 2005;204:714-723.
 31. Chollet ME, Brouland JP, Sollier CBD, et al. Evidence of a colocalisation of osteoprotegerin (OPG) with von Willebrand factor (VWF) in platelets and megakaryocytes alpha granules. *Studies from normal and grey platelets. British Journal of Haematology*, 2010;148:805-807.
 32. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001;142:5050-5055.
 33. Hofbauer LC and Heufelder A.E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, 2001;79:243-253.
 34. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997;89:309-319.
 35. Klejna K, Naumnik B, Gasowska K, et al. OPG/RANK/RANKL signaling system and its significance in nephrology. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2009;47:199-206.
 36. Nehring P, Mrozikiewicz-Rakowska B, Sobczyk-Kopciol A, et al. Osteoprotegerin gene rs2073617 and rs3134069 polymorphisms in type 2 diabetes patients and sex – specific rs2073618 polymorphism as a risk factor for diabetic foot. *Pol Arch Med Wewn*, 2013;123:176-182.
 37. Pérez de Ciriza C, Lawrie A, Varo N. Osteoprotegerin in Cardio-metabolic Disorders. *International Journal of Endocrinology*, 2015;2015:1-15.
 38. Shaker OG, El-Shehaby A, Nabih M. Possible role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as markers of plaque instability in coronary artery disease. *Angiology*, 2010;61:756-762.
 39. Guo C, Hu F, Zhang S, et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genetics and Molecular Biology*, 2013;36:177-182.
 40. Van Campenhout A and Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2009;204:321-329.
 41. Tousoulis D, Siasos G, Maniatis K, et al. Serum osteoprotegerin and osteopontin levels are associated with arterial stiffness and the presence and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 2013;167:1924-1928.
 42. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Golemati S, et al. The relationship between serum levels of vascular calcification inhibitors and carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*, 2008;47:55-62.
 43. Song TJ, Kim J, Yang SH, et al. Association of plasma osteoprotegerin levels with stroke severity and functional outcome in acute ischaemic stroke patients. *Biomarkers*, 2012;17:738-744.
 44. Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006;26:857-863.
 45. Demkova K, Kozarova M, Malachovska Z, et al. Osteoprotegerin concentration is associated with the presence and severity of peripheral arterial disease in type 2 diabetes mellitus. *VASA*, 2018;47:131-135.
 46. Niu Y, Zhang W, Yang Z, et al. Association of plasma osteoprotegerin levels with the severity of lower extremity arterial disease in patients with type 2 diabetes. *BMC Cardiovasc Dis*, 2015;15:86.
 47. Nybo M and Rasmussen LM. The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review. *Eur J Endocrinol*, 2008;159:603-608.
 48. Sennerby U, Melhus H, Gedeberg R, et al. Cardiovascular diseases and risk of hip fracture. *JAMA*, 2009;302:1666-1673.
 49. Pennisi P, Signorelli SS, Riccobene S, et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels. *Osteoporos Int*, 2004;15:389-395.
 50. Anand DV, Lahiri A, Lim E, et al. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006;47:1850-1857.
 51. Anand DV, Lim E, Darko D, et al. Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes: role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers. *Journal of the American College of Cardiology*, 2007;50:2218-2225.

52. Rozas Moreno P, Reyes García R, García-Martín A, et al. Serum osteoprotegerin: Bone or cardiovascular marker in type 2 diabetes males? *Journal of Endocrinological Investigation*, 2013;36:16–20.
53. Rasmussen LM, Tarnow L, Hansen TK, et al. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *European Journal of Endocrinology*, 2006;154:75–81.
54. O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C, et al. Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2010;26:496–502.
55. Stępień E, Wypasek E, Stopyra K, et al. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clinical Biochemistry*, 2011;44:826–831.
56. Reyes-García R, Rozas-Moreno P, Muñoz-Torres M. Cardiovascular disease and bone metabolism. *Endocrinol Nutr*, 2011;58:353–359.
57. Jankowski M, Kopinski P, Goc A. Interleukin-27: biological properties and clinical application. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010;58:417–425.
58. Hirase T, Hara H, Miyazaki N, et al. Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013;305:420–429.
59. Jin W, Zhao Y, Yan W, et al. Elevated Circulating Interleukin-27 in Patients with Coronary Artery Disease Is Associated with Dendritic Cells, Oxidized Low Density Lipoprotein, and Severity of Coronary Artery Stenosis. *Mediators of Inflamm*, 2012;2012:e506283.
60. Jafarzadeh A, Nemati M, Rezayati MT. Serum levels of interleukin (IL)-27 in patients with ischemic heart disease. *Cytokine*, 2010;56:153–156.
61. Dorosz SA, Ginolhac A, Kahne T, et al. Role of calprotectin as a modulator of the IL27-mediated proinflammatory effect on endothelial cells. *Mediators Inflamm*, 2015;2015:737310.
62. Qiu HN, Liu B, Liu W, et al. Interleukin-27 enhances TNF- α -mediated activation of human coronary artery endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016;411:1–10.
63. Gregersen I, Sandanger Ø, Askevold ET, et al. Interleukin 27 is increased in carotid atherosclerosis and promotes NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 2017;12: e0188387.
64. Lin Y, Huang Y, Lu Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases. *PLoS One*, 2012;7:e52490.
65. Posadas-Sanchez R, Perez-Hernandez N, Rodriguez-Perez JM, et al. Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study. *Oncotarget*, 2017;8:64459–64470.
66. Kempe S, Heinz P, Kokai E, et al. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques. *Am J Pathol*, 2009;175:440–447.
67. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*, 1993;143:1699–1712.
68. Foell D, Wittkowski H, Kessel C, et al. Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013;187:1324–1334.
69. Yang Z, Yan WX, Cai H, et al. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *In J Allergy Clin Immunol*, 2007;119:106–114.
70. Foell D, Kane D, Bresnihan B, et al. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology*, 2003;42:1383–1389.
71. Rammes A, Roth J, Goebeler M, et al. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium binding proteins of the S100 family are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent, pathway. *J Biol Chem*, 1997;272:9496–9502.
72. Zhou Z, Wang K, Penn MS, et al. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*, 2003;107:2238–2243.
73. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, et al. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem*, 2005;280:41521–41529.
74. Di Pino A, Urbano F, Zagami RM, et al. Low endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products levels are associated with inflammation and carotid atherosclerosis in prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016;101:1701–1709.
75. Basta G, Sironi AM, Lazzarini G, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with glycemic control and S100A12 protein. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006;91:4628–4634.
76. Malmstedt J, Kärvestedt L, Swedenborg J, et al. The receptor for advanced glycation end products and risk of peripheral arterial disease, amputation or death in type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Cardiovasc Diabetol*, 2015;14:1–9.
77. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24:1266–1271.
78. Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M, et al. Plasma S100A12 level is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Clin Am Soc Nephrol*, 2011;6:718–723.
79. Shiotsu Y, Mori Y, Hatta T, et al. Plasma S100A12 levels and peripheral arterial disease in end-stage renal disease. *Nephron Extra*, 2011;1:242–250.
80. Ligthart S, Sedaghat S, Ikram MA, et al. EN-RAGE A novel inflammatory marker for incident coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014;34:2695–2699.
81. Ashkenazi A, Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998;281:1305–1308.
82. Macewan DJ. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *Br J Pharmacol*, 2002;135:855–875.
83. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev*, 2011;16:49–69.
84. Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, et al. Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest*, 2000;106:589–597.
85. Luo D, Luo Y, He Y, et al. Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 2006;169:1886–1898.

86. Shai I, Schulze MB, Manson JE, et al. A prospective study of soluble tumor necrosis factor- α receptor II (sTNF-RII) and risk of coronary heart disease among women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2005;28:1376-1382.
87. Safranow K, Dziedziczko V, Rzeuski R, et al. Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens*, 2009;74:386-392.
88. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012;32:2045-2051.
89. Nativel M, Schneider F, Saulnier PJ, et al. Prognostic values of inflammatory and redox status biomarkers on the risk of major lower-extremity artery disease in individuals with type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2018;41:2162-2169.
90. Carlsson AC, Östgren CJ, Nystrom FH, et al. Association of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 with nephropathy, cardiovascular events, and total mortality in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 2016;15:1-8.
91. Taylor AW, Ku NO, Mortensen RF. Regulation of cytokine-induced human C-reactive protein production by transforming growth factor- β . *Journal of Immunology*, 1990;145:2507-2513.
92. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation*, 2003;111:1805-1812.
93. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2004;279:48487-48490.
94. Sun H, Koike T, Ichikawa T, et al. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *American Journal of Pathology*, 2005;167:1139-1148.
95. Blake GJ and Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003;41:37S-42S.
96. Ridker PM, Bassuk SS, Toth PP. C-reactive protein and risk of cardiovascular disease: evidence and clinical application. *Current Atherosclerosis Reports*, 2003;5:341-349.
97. McDermott MM and Lloyd-Jones DM. The role of biomarkers and genetics in peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol*, 2009;54:1228-1237.
98. Cassar K, Bachoo P, Ford I, et al. Markers of coagulation activation, endothelial stimulation and inflammation in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005;29:171-176.
99. Owen CD, Ridker PM, Belkin M, et al. Elevated C-reactive protein levels are associated with postoperative events in patients undergoing lower extremity vein bypass surgery. *J Vasc Surg*, 2007;45:2-9.
100. McDermott MM, Liu K, Ferrucci L, et al. Circulating blood markers and functional impairment in peripheral arterial disease. *Am Geriatr Soc*, 2008;56:1504-1510.
101. Wildman RP, Muntner P, Chen J, et al. Relation of inflammation to peripheral arterial disease in the national health and nutrition examination survey. In *Am J Cardiol*, 2005;96:1579-1583.
102. Vainas T, Stassen F, de Graaf R, et al. C-reactive protein in peripheral arterial disease: relation to severity of the disease and to future cardiovascular events. *Vasc Surg*, 2005;42:243-251.
103. Ridker P, Stampfer M, Rifai N. Novel risk factors for systematic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*, 2001;295:2481-2485.
104. Pradhan AD, Shrivastava S, Cook NR, et al. Symptomatic peripheral arterial disease in women: nontraditional biomarkers of elevated risk. *Circulation*, 2008;117:823-831.
105. Schillinger M, Exner M, Miekusch W, et al. Balloon angioplasty and stent implantation induce a vascular inflammatory reaction. *Endovasc Ther*, 2002;9:59-66.
106. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine*, 1997;336:973-979.
107. Rao VS, Kadarinarasimhiah NB, John S, et al. Usefulness of C-Reactive Protein as a Marker for Prediction of Future Coronary Events in the Asian Indian Population: Indian Atherosclerosis Research Study. *International Journal of Vascular Medicine*, 2010;2010:389235.
108. Dong Z, Wu T, Qin W, et al. Serum amyloid A directly accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular Medicine*, 2011;17:1357-1364.
109. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000;268:405-408.
110. Song C, Hsu K, Yamen E, et al. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis*, 2009;207:374-383.
111. Hua S, Song C, Geczy CL, et al. A role for acute-phase serum amyloid A and high-density lipoprotein in oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Redox Report*, 2009;14:187-196.
112. Witting PK, Song C, Hsu K, et al. The acute-phase protein serum amyloid A includes endothelial dysfunction that is inhibited by high-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011;51:1390-1398.
113. Lepedda AJ, Nieddu G, Zinellu E, et al. Proteomic analysis of plasma-purified VLDL, LDL, and HDL fractions from atherosclerotic patients undergoing carotid endarterectomy: identification of serum amyloid A as a potential marker. *Oxid Med Cell Longev*, 2013;2013:385214.
114. O'Brien KD, McDonald TO, Kunjathoor V, et al. Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005;25:785-790.
115. Erren M, Reinecke H, Junker R, et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19:2355-2363.
116. Delanghe JR, Langlois MR, de Bacquer D, et al. Discriminative value of serum amyloid A and other acute-phase proteins for coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 2002;160:471-476.
117. Ogasawara K, Mashiba S, Wada Y, et al. A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2004;174:349-356.
118. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, et al. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular

- outcome in women: The National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation*, 2004;109:726-732.
119. Lee KWJ, Hill JS, Walley KR, et al. Relative value of multiple plasma biomarkers as risk factors for coronary artery disease and death in an angiography cohort. *Canadian Medical Association Journal*, 2006;174:461-466.
 120. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, et al. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*, 2004;92:419-424.
 121. Lee MY, Huang CH, Kuo CJ, et al. Clinical proteomics identifies urinary CD14 as a potential biomarker for diagnosis of stable coronary artery disease. *PLoS ONE*, 2015;10:e0117169.
 122. Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J*, 1999;31:433-441.
 123. Latouche C, Moghrabi S, Messaoudi S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*, 2012;59:966-972.
 124. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;26:136-142.
 125. Leclercq A, Houard X, Philippe M, et al. Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment. *J Leukoc Biol*, 2007;82:1420-1429.
 126. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*, 2001;276:37258-37265.
 127. Galis ZS and Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 2002;90:251-262.
 128. te Boekhorst BC, Bovens SM, Hellings WE, et al. Molecular MRI of murine atherosclerotic plaque targeting NGAL: a protein associated with unstable human plaque characteristics. *Cardiovasc Res*, 2011;89:680-688.
 129. Smadja DM, D'Audigier C, Bièche I, et al. Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011;31:551-559.
 130. Gasparri C, Curcio A, Torella D, et al. Proteomics reveals high levels of vitamin D binding protein in myocardial infarction. *Front Biosci*, 2010;2:796-804.
 131. Rocchiccioli S, Andreassi MG, Cecchetti A, et al. Correlation between vitamin D binding protein expression and angiographic-proven coronary artery disease. *Coron Artery Dis*, 2012;23:426-431.
 132. Rocchiccioli S, Pelosi G, Rosini S, et al. Secreted proteins from carotid endarterectomy: an untargeted approach to disclose molecular clues of plaque progression. *Journal of Translational Medicine*, 2013;11:260.
 133. Wilson AM, Kimura E, Harada RK, et al. Beta-2 microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease. *Circulation*, 2007;116:1396-1403.
 134. Kavurma MM and Bennett MR. Expression, regulation and function of trail in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol*, 2008;75:1441-1450.
 135. Hao C, Song JH, Vilimanovich U, et al. Modulation of TRAIL signaling complex. *Vitam Horm*, 2004;67:81-99.
 136. Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death-domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997;277:815-818.
 137. Corallini F, Rimondi E, Secchiero P. TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology? *Front Biosci*, 2008;13:135-147.
 138. Martin-Ventura JL, Munoz-Garcia B, Egidio J, et al. Trail and vascular injury. *Front Biosci*, 2007;12:3656-3667.
 139. Pan X, Pang M, Ma A, et al. Association of TRAIL and Its Receptors with Large-Artery Atherosclerotic Stroke. *PLoS One*, 2015;10:e0136414.
 140. Skau E, Henriksen E, Wagner P, et al. GDF-15 and TRAIL-R2 are powerful predictors of long-term mortality in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Prev Cardiol*, 2017;24:1576-1583.
 141. Egli P, Aeschbacher S, Bossard M, et al. Relationships of kidney injury molecule-1 with renal function and cardiovascular risk factors in the general population. *Clin Chim Acta*, 2018;478:13-17.
 142. Ibrahim NE, Januzzi J. Jr., Magaret CA, et al. A clinical and biomarker scoring system to predict the presence of obstructive coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2017;69:1147-1156.
 143. Park M, Hsu CY, Go AS, et al. Urine Kidney Injury Biomarkers and Risks of Cardiovascular Disease Events and All-Cause Death: The CRIC Study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017;12:761-771.
 144. Bäck M, Ketelhuth DE, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010;52:410-428.
 145. Nagase H and Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1999;274:21491-21494.
 146. Verma RP and Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*, 2007;15:2223-2268.
 147. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*, 2012;56:232-244.
 148. Liang J, Liu E, Yu Y, et al. Macrophage elastase (MMP-12) accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*, 2006;113:1993-2001.
 149. Hu W, Wei R, Wang L, et al. Correlations of MMP-1, MMP-3, and MMP-12 with the degree of atherosclerosis, plaque stability and cardiovascular and cerebrovascular events. *Experimental and therapeutic Medicine*, 2018;15:1994-1998.
 150. Traylor M, Mäkelä KM, Kilarski LL, et al. METASTROKE, International Stroke Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Consortium 2 (WTCCC2). A novel MMP12 locus is associated with large artery atherosclerotic stroke using a genome-wide age-at-onset informed approach. *PLoS Genet*, 2014;10:e1004469.
 151. Morgan AR, Rerkasem K, Gallagher PJ, et al. Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. *Stroke*, 2004;35:1310-1315.

152. Scholtes V, Johnson, JI, Jenkins N, et al. Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J Am Heart Assoc*, 2012;1:e001040.
153. Müller A, Krämer SD, Meletta R, et al. Gene expression levels of matrix metalloproteinases in human atherosclerotic plaques and evaluation of radiolabeled inhibitors as imaging agents for plaque vulnerability. *Nuclear Medicine and Biology*, 2014;41:562-569.
154. Higashikata T, Yamagishi M, Higashi T, et al. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis*, 2006;185:165-172.
155. Sukhova GK, Schonbec U., Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*, 1999;99:2503-2509.
156. Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, et al. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation*, 2004;110:337-343.
157. Lynch M, Barallobre-Barreiro J, Jahangiri M, et al. Vascular proteomics in metabolic and cardiovascular diseases. *J Intern Med*, 2016;280:325-338.
158. Fitzsimmons PJ, Forough R, Lawrence ME, et al. Urinary levels of matrix metalloproteinase 9 and 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2007;194:196-203.
159. Schmidt A, Yan SD, Wautier JL, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and Atherosclerosis. *Circ Res*, 1999;84:489-497.
160. Manolio T. Novel risk markers and clinical practice. *N Engl J Med*, 2003;349:1587-1589.
161. Braunwald E. The Simon Dack lecture. Cardiology: the past, the present, and the future. *J Am Coll Cardiol*, 2003;42:2031-2041.