

MARKERI BIOLOGICI DE DIAGNOSTIC ȘI PROGNOSTIC ÎN DISFUNCTIA ENDOTELIALĂ PREMERGĂTOARE ATEROGENEZEI EXPERIMENTALE LA IEPURE

OANA ALINA PUIA, LUMINIȚA PLEȘCA-MANEA

Disciplina de Fiziopatologie, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Rezumat

Obiective. Studiul nostru a încercat să demonstreze modul în care anumiți markeri biologici, atât prooxidanți, cât și antioxidanți, se modifică în disfuncția endotelială premergătoare aterosogenezei experimentale la iepure.

Material și metode. Au fost folosite două loturi a câte 12 iepuri adulți, masculi, din rasa Californian, în vârstă de 4-5 luni și în greutate de 3-4 kg: lotul martor și lotul probă; la cel din urmă s-a indus un proces aterosclerotic, prin expunerea la acizi grași saturați. S-au urmărit interleukina 1 – IL-1 și proteina C reactivă – PCR (markerii procesului inflamator aterosclerotic), lipoperoxizii lipidici – malondialdehida (MDA) legată (markeri ai stresului oxidativ) și adiponectina (hormon polipeptidic cu rol de îmbunătățire a funcției endoteliale – marker antiinflamator).

Rezultate. Rezultatele noastre indică producerea unui stres oxidativ asociat procesului de ateroscleroză, evidențiat prin valori crescute ale MDA asociată cu creșterea PCR și a IL-1, concomitent cu scăderea precoce a adiponectinei, ceea ce va influența negativ funcția endotelială.

Concluzii. Markerii procesului inflamator se modifică semnificativ la animalele expuse unui regim hiperlipemic, disfuncția endotelială fiind evidențiată prin modificarea markerului antiinflamator – adiponectina. Ateroscleroza, care este un proces inflamator cronic generator de stres oxidativ, poate fi evidențiată prin modificarea lipoperoxizilor plasmatici.

Cuvinte cheie: iepure, MDA, PCR, IL-1, adiponectină, disfuncție endotelială, ateroscleroză.

BIOLOGICAL MARKERS FOR THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS IN THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION PRECEDING THE EXPERIMENTAL ATHEROGENESIS IN RABBITS

Abstract

Objectives. Our study aimed at demonstrating how certain biomarkers, both prooxidants and antioxidants, change in the endothelial dysfunction preceding experimental atherogenesis in rabbits.

Material and methods. We used 24 adult male rabbits, Californian breed, aged 4-5 months, weighing 3-4 kilograms each, divided in two groups: control group and test group; in the test group the atherosclerotic process was induced by exposure to saturated fatty acids. The following were determined: IL-1 and C-reactive protein (markers of atherosclerotic inflammation), lipoperoxides – bound malondialdehyde (markers of oxidative stress) and adiponectin (polypeptide hormone with a role in improving endothelial function - inflammation marker).

Results. Our results indicated the presence of oxidative stress associated with atherosclerosis, evidenced by increased MDA, CRP and IL-1 values; and at the same time adiponectin decreases, which would negatively affect the endothelial function.

Conclusions. Markers of inflammation change significantly in animals exposed to a hyperlipemic diet, the endothelial dysfunction being evidenced by the changes in adiponectin, an anti-inflammatory marker. Atherosclerosis, which is a

chronic inflammatory process generating oxidative stress, can be highlighted by the changes in the plasma lipoperoxides.

Keywords: rabbit, MDA, CRP, IL-1, adiponectin, endothelial dysfunction, atherogenesis.

Introducere

Un număr mare de cercetători au utilizat animale de laborator pentru studiul procesului aterosclerotic. Primele studii în care s-au folosit iepuri au fost menționate în 1908 [1]. Astfel, expunerea iepurelui la un regim hipercolesterolemiant s-a dovedit a fi un model experimental sensibil de inducere a leziunilor ateromatoase.

Leziunea endotelială, rezultat al agresiunii diversilor factori de risc pentru ateroscleroză reprezintă pivotul răspunsului particular la agresiune. Leziunea endotelială determină disfuncția endoteliului care se manifestă prin alterarea rolului de barieră înalt selectivă, prin alterarea proprietăților antitrombotice și favorizarea proprietăților procoagulante, prin afectarea sintezei și secreției substanțelor vasoactive, a factorilor de creștere (mitogeni) și a enzimelor lipolitice [2].

Pierderea integrității endoteliului este unul din evenimentele timpurii din aterogeneză. Endoteliul mai permeabil permite pătrunderea în cantitate mare a lipoproteinelor bogate în colesterol, care traversează endoteliul lezat și ajung în spațiul subendotelial. În patogeniza aterosclerozei se discută ipoteza metabolică (rolul depozitelor de lipide din spațiul subendotelial), ipoteza răspunsului la agresiune (leziunea endotelială), ipoteza monoclonală (fiecare leziune este influențată *ab initio* de un mitogen), ipoteza oxidativă (rolul stresului oxidativ și al lipoproteinelor oxidate în aterogeneză). Stresul oxidativ, inflamația, alterarea metabolismului lipidic și imunitatea se interrelaionează complex în aterogeneză [2].

În acest sens, ipoteza pe care încercăm să o demonstrăm este modul cum anumiți markeri biologici, atât prooxidanți, cât și antioxidanți, se modifică în disfuncția endotelială premergătoare aterogenezei experimentale la iepure.

Material și metodă

Pentru realizarea studiului am utilizat 24 de iepuri din rasa Californian, masculi, în vârstă de 4-5 luni, fără nici o patologie cunoscută, cu greutatea cuprinsă între 3 și 4 kg. Animalele au fost menținute în condiții zoo-igienice de vivarium corespunzătoare, standardizate, în cadrul Centrului de medicină experimentală și aptitudini practice din cadrul UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca: la temperatura ambientală de 22 ± 1 °C, hrană standardizată și apă *ad libitum*, cu un ciclu lumină/întuneric de 12 ore, lăsați

timp de o săptămână să se adapteze înainte de începerea experimentului.

Am folosit două loturi a câte 12 iepuri, lotul martor și lotul probă, pe o perioadă de 45 zile, la care s-a indus un proces aterosclerotic. Lotul probă a primit prin gavaj gastric, zilnic, o dietă bogată în colesterol (2% colesterol) [3].

S-a urmărit procesul inflamator aterosclerotic prin intermediul interleukinei 1 (IL-1) și proteinei C reactive (PCR); ca markeri ai stresului oxidativ au fost urmăriti lipoperoxizii lipidici (malondialdehida MDA legată); ca marker antiinflamator a fost urmărită adiponectina, un hormon polipeptidic care are rol de îmbunătățire a funcției endoteliale. IL-1, PCR și adiponectina au fost determinate folosind tehnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

MDA legată a fost determinată utilizând metoda cu acid tiobarbituric [4].

Pentru tehnica ELISA s-au utilizat kit-uri de diagnostic din gama CIV TEST de tip IDDEX standard produse de LABORATORIOS HIPRA – SPANIA.

Analiza statistică a fost efectuată pe eșantioane independente de subiecți.

Pentru fiecare set de valori au fost calculate elemente de statistică descriptivă.

Pentru compararea mediilor în cazul a două eșantioane cu distribuții de probabilitate normale s-a utilizat testul Student pentru variații egale sau pentru variații neegale, variațiile fiind testate cu testul Levene pentru variație. Pentru testarea distribuției normale s-a folosit testul Kolmogorov-Smirnov. În cazul eșantioanelor care nu au avut o distribuție normală, s-a utilizat testul Mann-Whitney (U), pentru compararea pe ranguri pe eșantioane independente.

Pragul de semnificație pentru testele folosite a fost $\alpha = 0,05$.

Datele au fost prezentate utilizând indicatori de centralitate, localizare și distribuție.

Prelucrarea statistică s-a efectuat cu aplicația Excel (din pachetul Microsoft Office 2003), cu programul SPSS v.16 sau online, cu aplicația OpenEpi v.2.3.1 [5]. Reprezentarea grafică a rezultatelor s-a făcut cu aplicația Excel (din pachetul Microsoft Office 2003).

Considerații etice:

Experimentul este efectuat cu avizul Comisiei de etică a UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, animalele de laborator fiind ținute în condiții optime, cu temperatura constantă, lumină 12:12 și hrană *ad libitum*.

Rezultate

Studiul nostru a arătat că administrarea de acizi grași saturați (untură de porc lichefiată) conduce la creșteri statistice semnificative ale MDA ($p < 0,001$), IL-1 ($p < 0,05$) și PCR ($p < 0,05$). De asemenea, ulterior administrării de acizi grași saturați apar scăderi statistice semnificative ale adiponectinei ($p < 0,001$).

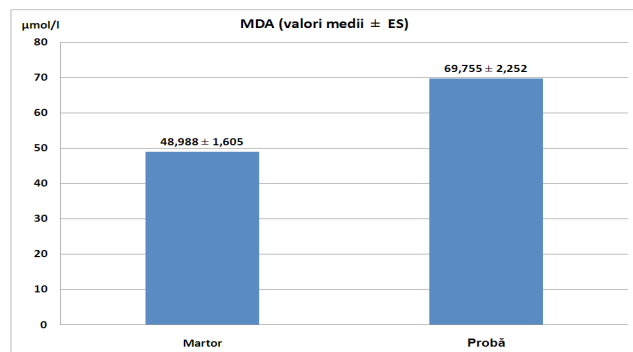


Fig. 1. MDA la loturile studiate (valori medii ± ES).

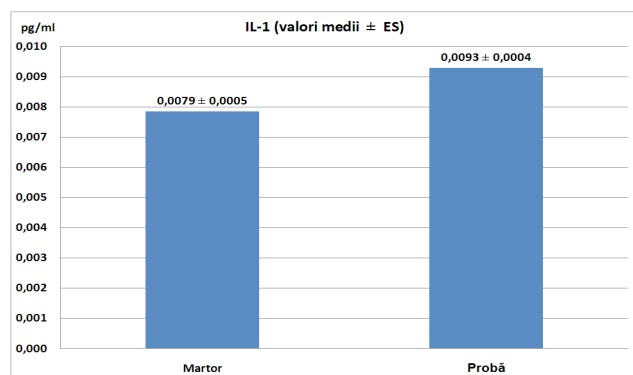


Fig. 2. IL-1 la loturile studiate (valori medii ± ES).

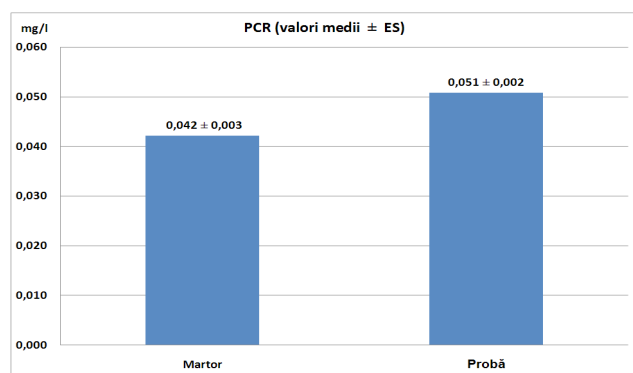


Fig. 3. PCR la loturile studiate (valori medii ± ES).

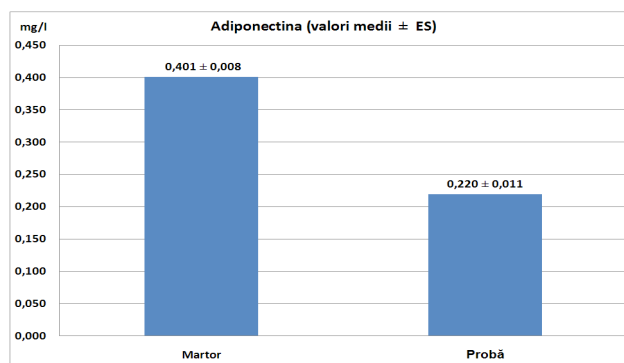


Fig. 4. Adiponectina la loturile studiate (valori medii ± ES).

Discuții

Rezultatele noastre sunt în acord cu datele din literatură care indică producerea unui stres oxidativ asociat procesului de ateroscleroză, evidențiat prin intermediul procesului inflamator (creșterea PCR și a IL-1), concomitent cu scăderea precoce a adiponectinei, marker antiinflamator al procesului aterosclerotic. Afectarea concentrației de adiponectină va influența negativ funcția endotelială.

În ultimii 30 de ani s-au înregistrat progrese considerabile în înțelegerea multor aspecte privind funcția endotelială și alterările ei în condiții patologice; totuși puțini clinicieni iau în considerare sănătatea endoteliului, mai ales deoarece endoteliul nu poate fi explorat convenabil până în prezent, dar și datorită complexității și adaptabilității sale [6].

Disfuncția endotelială este un eveniment cheie în fiziopatologia bolilor cardiovasculare și apare ca un element predictiv independent și puternic al evenimentelor cardiovasculare. De aceea, evaluarea markerilor endoteliali circulanți ar putea fi de ajutor, dar testele asupra modificărilor debitului sanguin regional, ca răspuns la administrarea locală de vasodilatatori endotelio-dependenți este mult mai specifică pentru studiul arterelor de rezistență [7].

Mecanismele etiopatogenetice care stau la baza disfuncției endoteliale sunt variabile, dependente de patologie, de patul vascular studiat, de factorii stimulanți și factori asociați cum ar fi vârsta, sexul, aportul de sare, hipercolesterolemia, hiperglicemia și hiperhomocisteinemia [8].

Disfuncția endotelială influențează relaxarea endotelio-dependență (RED), a mușchiului neted vascular. RED recunoscută ca esențială pentru controlul hemodinamicii în condiții normale și patologice, se bazează pe o complexă rețea de semnalizare în cadrul peretelui vascular. Canalele de calciu voltaj dependente sunt implicate în răspunsurile contractile ale mușchiului neted vascular la diferiți stimuli, astfel că orice hiperpolarizare a mușchiului vascular are un efect antagonic. Factorii hiperpolarizanți derivați din endoteliu acționează pentru a reduce calciul citosolic, dar determină hiperpolarizarea mușchiului

neted vascular prin activarea canalelor de potasiu voltaj dependente, dependente de ATP și de calciu [9].

O explicație alternativă sau complementară poate fi efectul factorului hiperpolarizant derivat din endotelium (EDHF - Endothelium-derived hyperpolarizing factor), care permite propagarea în peretele vascular a hiperpolarizării endoteliale induse de agonist. În unele artere, eicosanoizii și ionii de K pot ei înșiși să inițieze o hiperpolarizare endotelială condusă, sugerând astfel că semnalizarea electrotonică poate reprezenta un mecanism general prin care endoteliumul participă la reglarea tonusului vascular [10]. În artera femurală de la șobolanul adult, în care straturile de mușchi netede și cele endoteliale nu sunt cuplate electric, EDHF lipsește, chiar dacă acetilcolina determină hiperpolarizare în celulele endoteliale [10].

Cu toate acestea, joncțiunile gap sunt puternic implicate în rețeaua de semnalizare care asigură RED și sunt reglate printr-un proces dinamic, cu alterări ale expresiei proteice a conexinelor (Cx) și modificări post-tranlaționale. Peptidele conexin-mimetice sunt acum folosite pentru a diferenția implicarea diverselor tipuri de joncțiuni gap în [11]. NO inhibă transferul intercelular al moleculelor mici prin influența specifică asupra Cx 37, sugerând rolul NO în controlul rețelei de semnalizare care asigură EDRF [12].

Plenz și col. (2004) au arătat rolul conexinei 43 la nivelul joncțiunilor gap de la nivelul celulelor musculare netede. Creșterea formării acestor joncțiuni poate contribui la coordonarea răspunsului celulelor după leziuni secundare, în particular în faza precoce a restenozei [13].

Dezvoltarea procesului aterosclerotic și restenozarea implică modele complexe de interacțiune între disfuncțiile endoteliale, celulele inflamatorii și celulele musculare netede, în care citokinele și factorii de creștere joacă un rol important [14].

Studiul efectuat de alți autori au arătat că reducerea conexinei 43 limitează formarea neointimei după un răspuns acut vascular, scăzând procesul inflamator și reducând migrarea și proliferarea celulelor musculare netede [15].

Același rol al efectului bolilor vasculare care induc stres oxidativ, asupra scăderii conexinei 43, a fost observat și de alți cercetători [16,17,18].

Efectele endoteliale ale conexinei se pot evalua și prin intermediul adiponectinei. Adiponectina este adipokina secretată aproape în exclusivitate de adipocite, cu efect antiaterogenetic, antiinflamator, cardioprotectiv. Reglează mecanismul insulinoresistenței, accelerează metabolismul acizilor grași, reduce expresia moleculelor endoteliale de adeziune (ICAM-1 și VCAM-1), îmbunătățind funcția endotelială [19]. Efectul antiinflamator are drept consecință o scădere a producției de IL-6, un important factor inflamator care, la rândul lui, stimulează secreția hepatică a proteinei C reactive. O concentrație scăzută de adiponectină a fost asociată cu un risc crescut de a

dezvolta insulinoresistența, DZ 2, hipertensiune arterială și boală coronariană [20]. Această asociere a fost extinsă și la o mortalitate crescută după un accident vascular cerebral. Mecanismele par să fie legate de stimularea de adiponectină a secreției endoteliale de oxid nitric (NO, un factor vasodilatator și vasoprotectiv) în condiții de ischemie [12].

Creșterea concentrației de adiponectină a demonstrat în studii pe animale o creștere a insulinosensitivității, o scădere a hipertrofiei cardiace patologice, precum și o reducere a distrucției miocardice determinată de ischemie [22].

Adipozitatea conduce la dezvoltarea unui status inflamator subclinic, creșterea nivelului parametrilor disfuncției endoteliale, insulinoresistență și dislipidemie datorită secreției crescute de leptină, rezistină și acizi grași liberi și a concentrației scăzute de adiponectină.

Inflamația și disfuncția endotelială conduc la modificări aterosclerotice în teritoriul macrocirculației. Markerii ai inflamației de tipul TNF- α și IL-6 se corelează în mod direct cu gradul adipozității și al insulinoresistenței [23].

Deoarece funcția endotelială a devenit un punct central în explicarea mecanismelor patogenetice ale adipozității, insulinoresistenței, diabetului zaharat și aterosclerozei, a apărut necesitatea determinării cât mai exacte a acesteia. Pe de o parte, măsurarea funcției endoteliale ar permite descoperirea precoce a pacienților la risc, iar pe de altă parte ar reduce timpul necesar investigării efectelor diferitelor substanțe asupra acesteia. Dacă se urmăresc de exemplu efectele statinelor asupra grosimii intimă-medie sunt necesare 6 luni pentru a fi văzute rezultatele, pe când efectele asupra funcției endoteliale sunt deja vizibile după 3 zile [23].

Adeziunea leucocitară la celulele endoteliale și migrarea lor în peretele arterial este unul din factorii determinanți în apariția aterosclerozei și este facilitată de molecule de adeziune de tipul ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) sau E-Selectină (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1). Nivele înalte ale concentrației moleculelor de adeziune în plasmă sunt considerate markeri ai disfuncției endoteliale. Expresia moleculelor de adeziune celulară (CAM) este crescută de următoarele substanțe: citokine proinflamatorii (TNF- α , IL-6, CRP), acizi grași liberi, LDL oxidat, radicali liberi de oxigen sau AGE (advanced glycation endproducts) [23].

Numeroase studii efectuate în ultimii ani, atât pe culturi de celule, cât și pe modele animale și umane, au avut ca subiect implicarea adiponectinei în procesele fiziologice și patologice. În urma acestor cercetări s-a evidențiat faptul că, la nivel vascular, adiponectina are efect protector, prin diminuarea fenomenelor inflamatorii asociate cu ateroscleroza, prin reducerea expresiei moleculelor de adezivitate celulară (selectina, vascular adhesion molecule – VCAM1, intercellular adhesion molecule –

ICAM1) și a citokinelor, atât la nivelul endoteliului, cât și în macrofage [24].

Efectele favorabile ale adiponectinei asociate cu efectele antiinflamatoare, antiapoptotice, inhibarea fibrozei interstițiale fac din acest hormon o moleculă terapeutică promițătoare [25].

Concentrațiile plasmatice scăzute de adiponectină reflectă un stadiu avansat de ateroscleroză. La pacienții cu infarct miocardic, acest nivel poate fi neutralizat de creșterea adiponectinei declanșată de inflamația sistemică, care de multe ori se asociază cu infarctul miocardic [22].

IL-1 și TNF acționează pentru a media efectele inflamatorii locale și sistemice, și anume: local, produc chemotaxia neutrofilelor, eliberarea de granule, amplifică metabolismul oxidativ; la distanță, țintele celulare sunt celulele endoteliale, hepatocitele, fibroblaștii [26].

Pentru descrierea mecanismelor de modulare a acestor funcții sunt vizate în principal cele 3 interleukine de tip 1 care se pot lega de 2 tipuri de receptori: citokinele IL-1 α , IL-1 β și IL-1RA (agonist al receptorului pentru IL-1 din familia receptorilor de tip IL-1/Toll-like receptor) și receptorii tip 1 pentru IL-1(IL-1R1 și IL-1R2) [27].

Citokina IL-1 este considerată cel mai important inductor al producției hepatice a reactanților de fază acută. Titrurile interleukinelor determinate în diverse lichide biologice pot fi utilizate în diagnosticarea unor afecțiuni imune și în monitorizarea tratamentelor doar în corelație cu date clinice și paraclinice complementare [26,27].

CRP reprezintă unul din cei mai sensibili reactanți de fază acută. Nivelurile sale plasmatice cresc dramatic (de 100 ori sau mai mult) după traumatisme severe, infecții bacteriene, inflamații, intervenții chirurgicale sau în cursul unor proliferări tumorale. Numeroase studii epidemiologice au confirmat faptul ca pacienții cu niveluri plasmatice bazale crescute de CRP prezintă un risc crescut de boală coronariană și infarct miocardic. Studiile prospective desfășurate în țările europene și SUA au furnizat rezultate concordante în ceea ce privește valoarea predictivă a determinărilor CRP asupra riscului cardiovascular atât la bărbați, cât și la femei. Astfel, CRP este un factor de risc indirect pentru boala coronariană, iar nivelurile crescute pot reflecta severitatea răspunsului inflamator în vasele aterosclerotice [28,29].

Deși există dovezi certe privind rolul inflamației în boala coronariană nu a fost stabilit până acum mecanismul precis al relației dintre nivelurile plasmatice CRP și riscul cardiovascular. O problemă rămasă încă nerezolvată este aceea dacă creșterea nivelului CRP reprezintă cauza sau consecința bolii (probabil amândouă). Este posibil ca răspunsul inflamator asociat cu leziunile ateromatoase să declanșeze producția de citokine într-o cantitate suficientă pentru a induce o creștere măsurabilă a CRP în plasmă. La rândul său CRP, datorită efectelor proinflamatorii, poate determina creșterea vulnerabilității plăcii ateromatoase sau poate avea alte acțiuni care agravează boala [30].

Concluzii

1. Markerii procesului inflamator, CRP și IL-1, au crescut semnificativ la animalele expuse unui regim hiperlipemic.

2. Disfuncția endotelială a fost evidențiată prin reducerea adiponectinei, efect urmărit în studiile recente prin intermediul conexinei-43.

3. Creșterea lipoperoxizilor plasmatice, indicatori de stres oxidativ, confirmă existența procesului inflamator cronic asociat aterosclerozei.

Bibliografie

1. Ignatowski AI. Influence of animal food on the organism of rabbits. St. Petersburg Izvest Imp Voyenno – Med Akad, 1908, 16:154-176.
2. Comes L. Ateroscleroza. În Dejica D. (sub red.). Stresul oxidativ în bolile interne, Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000, 258-280.
3. Sasani M, Yazgan B, Celebi I et al. Hypercholesterolemia increases vasospasm resulting from basilar artery subarachnoid hemorrhage in rabbits which is attenuated by Vitamin E. Surg Neurol Int., 2011, Mar 14;2:29.
4. Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. Clin Chem 1991;37(7):1273-1275.
5. ***, OpenEpi 2.3.1 – Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, <http://www.openepi.com>
6. Hwa C, Sebastian A, Aird WC. Endothelial biomedicine: its status as an interdisciplinary field, its progress as a basic science, and its translational bench-to-bedside gap. Endothelium, 2005, 12(3):139-151.
7. Ioannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function - a focus on resistance arteries. Fundam Clin Pharmacol, 2006, 20(3):311-320
8. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. Am J Physiol, 2006, 291(3):H985-1002.
9. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. Microcirculation, 2005, 12(1):113-127.
10. Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? Br J Pharmacol, 2004, 141(6):881-903.
11. Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH, Griffith TM. Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. Br J Pharmacol, 2005, 144(1):108-114.
12. Kameritsch P, Khandoga N, Nagel W et al. Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules. J Cell Physiol, 2005, 203(1):233-242.
13. Plenz G, Ko YS, Yeh HI et al. Upregulation of connexin43 gap junctions between neointimal smooth muscle cells. Eur J Cell Biol., 2004, 83(10):521-530.
14. Chadjichristos CE, Derouette JP, Kwak BR. Connexins in atherosclerosis. Adv Cardiol, 2006, 42:255-267.
15. Chadjichristos CE, Matter CM, Roth I et al. Reduced connexin43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice. Circulation, 2006, 113(24):2835-2543.
16. Ramachandran S, Xie LH, John SA et al. A novel role for

connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS One*, 2007, 2(1):e712.

17. Johnstone SR, Ross J, Rizzo MJ. et al. Oxidized phospholipid species promote in vivo differential cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Pathol*, 2009, 175(2):916-924.

18. Scheckenbach KE, Crespin S, Kwak BR, Chanson M, Connexin channel-dependent signaling pathways in inflammation. *J Vasc Res*. 2011;48(2):91-103.

19. Hatano Y, Matsumoto M, Ishikawa S, Kajii E. Plasma Adiponectin Level and Myocardial Infarction: the JMS Cohort Study, *J Epidemiol*, 2009,19(2):49-55.

20. Shibata R, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin and Cardiovascular Disease, *Circ J*, 2009, 73: 608-614.

21. Yang WS, Lee WJ. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 3815-3819.

22. Hui X, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin and Cardiovascular Health: an Update. *Br J Pharmacol*. 2011 Apr 1. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01395.x. [Epub ahead of print]

23. Știrban A, Negrean M, Petrulic S. Disfuncția endotelială – legătura dintre insulinoresistență, diabet zaharat și ateroscleroză.

http://www.drdiv.de/mediapool/58/581832/data/Text_1_Diabet_ED_rumaenisch.pdf

24. Yanni A.E. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals*, 2004, 38:246-256.

25. Mitrea N, Margina D, Grădinaru D et al. Biochimie – Potențialul terapeutic al biomoleculelor adipocitare. *Rev. Farmacist*, 2006, 21:101.

26. McPetersen RA, Pincus MR. Immunology and immunopathology. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods- Saunders Elsevier 21st-Ed 2007*, 863.

27. Rich RR, Fleisher TA. Cytokines and cytokines receptors. In *Clinical Immunology, Principles and Practice – Mosby Elsevier 3rd-Ed 2008*, 143-165.

28. Dati F, Metzmann E. Acute Phase Proteins. In *Proteins Laboratory Testing and Clinical Use, Media Print Taunusdruck GmbH, Frankfurt am Main, 2005*, 301-305.

29. Fischbach F. Overview of Immunodiagnostic Studies. In *A Manual of Laboratory and Diagnostics Tests. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 2009*, 642-643.

30. McPherson RA, Pincus MR. Evaluation of Cardiac Injury and Function. In *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 2007*, 224-225.