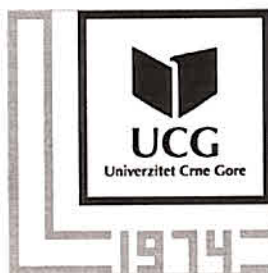


**MEDICINSKI
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb
81000 PODGORICA
CRNA GORA
Tel: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
www.ucg.ac.me/med
infomedf@ucg.ac.me



**FACULTY OF
MEDICINE**

Address: Kruševac bb
81000 PODGORICA
MONTENEGRO
Phone: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
www.ucg.ac.me/med
infomedf@ucg.ac.me

Broj: 1656/15-2
Podgorica, 23.10.2024. godine

**Univerzitet Crne Gore
Centar za doktorske studije
Predsjedniku – Prof. dr Borisu Vukićeviću**

Predmet: Provjera elektronske verzije doktorske disertacije
doktoranda dr med Nemanje Radojevića

Poštovani,

Shodno članu 9 stav 2 Odluke o korišćenju softvera za utvrđivanje plagijata na Univerzitetu Crne Gore broj:03-1193 od 12.04.2018 .godine (Bilten UCG broj:428 od 18.04.2018.godine) dostavljamo Vam elektronsku verziju doktorske disertacije doktoranda dr med Nemanje Radojevića: „Infektivna geneza ateroskleroze“ i naučni rad imenovanog gdje je prvi autor, na kojem je zasnovana doktorska teza, radi provjere originalnosti doktorske disertacije korišćenjem odgovarajućeg softvera za utvrđivanje plagijata.

Molimo Vas da nam u što kraćem roku dostavite izvještaj o provjeri predmetne doktorske disertacije, kako bi mogli nastaviti postupak u skladu sa Pravilima doktorskih studija.

Prilog:

- Elektronska verzija doktorske disertacije (CD)
- Naučni rad dr med Nemanje Radojevića

**MEDICINSKI FAKULTET
DEKAN,**

Prof. dr Miodrag Radunović

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET

Nemanja Radojević

INFEKTIVNA GENEZA
ATEROSKLEROZE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podgorica, 2024.

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF MEDICINE

Nemanja Radojević

INFECTIOUS GENESIS OF
ATHEROSCLEROSIS

DOCTORAL DISSERTATION

Podgorica, 2024.

PODACI O DOKTORANDU

Ime i prezime: Nemanja Radojević

Datum i mjesto rođenja: 09.02.1981. Kotor, Crna Gora

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, 2006. godine

INFORMACIJE O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv studija: Doktorske studije

Naslov teze: Infektivna geneza ateroskleroze

Fakultet na kojem je disertacija odbranjena: Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore

OCJENA I ODBRANA DOKTORSKE DISERTACIJE

Datum prijave doktorske teze: 21.01.2015. godine, br. 68

Datum sjednice Senata Univerziteta na kojoj je prihvaćena teza: 29.01.2015. godine, br. 08-106/1

Komisija za ocjenu podobnosti teze i kandidata:

- Prof.dr Miodrag Šoć, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof.dr Aneta Bošković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Goran Nikolić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore

Mentor: Prof. dr Filip Vukmirović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore

Komisija za ocjenu doktorske disertacije:

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Lektor:

Datum odbrane:

Datum promocije:

INFORMATION ON DOCTORAL STUDENT

Name and surname: Nemanja Radojević

Date and place of birth: 09th February, 1981. Kotor, Montenegro

Name and year of completed programme of study: Faculty of Medicine, University of Montenegro, 2006.

INFORMATION ON DOCTORAL DISSERTATION

Name of programme of study: Doctoral studies

Thesis: Infectious genesis of atherosclerosis

Faculty of dissertation defence: Faculty of Medicine, University of Montenegro

EVALUATION AND DOCTORAL DISSERTATION DEFENCE

Date of doctoral defence application: 21.01.2015. godine, br. 68

Date of the session of the Senate of the University when the thesis was accepted: 29.01.2015. godine, br. 08-106/1

Thesis and Candidate Assessment Committee:

- Prof. dr Miodrag Šoć, Faculty of Medicine, University of Montenegro
- Prof. dr Aneta Bošković, Faculty of Medicine, University of Montenegro
- Prof. dr Goran Nikolić, Faculty of Medicine, University of Montenegro

Mentor: Prof. dr Filip Vukmirović, Faculty of Medicine, University of Montenegro

Doctoral dissertation evaluation committee:

Doctoral dissertation defence committee:

Proofreader:

Date of defence:

Date of promotion:

PREDGOVOR

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu, a ateroskleroza, inflamatorno oboljenje arterijskih krvnih sudova, leži u njihovoj osnovi. Proučavanje uzroka i mehanizma nastanka ateroskleroze otvara nove mogućnosti prevencije kardiovaskularnih bolesti, s obzirom na to da tradicionalno prihvaćeni faktori rizik, poput visokog holesterola, visokog krvnog pritiska i dijabetesa, nisu prisutni kod svih pacijenata. Ovo ukazuje na potrebu razmatranja drugih uzroka ateroskleroze, posebno naglašavajući ulogu upale. Dugotrajna upala, ključni faktor u razvoju ateroskleroze, može biti izazvana infektivnim agensima, poput manje virulentnih mikroorganizama. Ova hronična infekcija često se odvija bez očiglednih znakova upale, za razliku od akutnih bakterijskih ili virusnih infekcija. Nova saznanja naglašavaju inflamatornu komponentu ateroskleroze, a ideja da je ova bolest infektivne geneze postoji još od ranog 20. vijeka. Mikroorganizmi poput *Chlamydia pneumoniae* (CP) mogu imati ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze, izazivajući hroničnu inflamaciju i disfunkciju endotela. Osim toga, genetski faktori, poput gena SP110, mogu uticati na odgovor organizma na infektivne agense i doprinijeti razvoju ateroskleroze.

Iz navedenih razloga, ispitivan je uticaj CP na aterosklerotski proces, posebno karakteristike aterosklerotskih plakova pozitivnih na ovaj infektivni agens, kako bi se bolje razumjela etiologija ove bolesti i otvorile nove mogućnosti u prevenciji i liječenju. Kroz imunohistohemijsko bojenje i analizu morfoloških, celularnih i molekularnih karakteristika plakova, otkrivena je veza između prisustva bakterije i određenih faktora, što može doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama ateroskleroze i potencijalno novim pristupima prevencije i liječenja.

Dobijeni rezultati su pokazali nekoliko značajnih nalaza. Prvo, istraživanje je pokazalo da prisustvo CP u arterijskim plakovima može biti povezano sa specifičnim faktorima rizika i karakteristikama plaka. CP negativni plakovi često su povezani s faktorima rizika poput visokog holesterola, dijabetesa i pozitivne porodične anamneze kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, detaljno su analizirane morfološke, ćelijske i molekularne karakteristike aterosklerotskih plakova. Ovo je uključivalo proučavanje ekspresije kolagena i elastina, infiltraciju imunskih ćelija te prisustvo određenih molekula koji su povezani s upalnim procesima i oštećenjem krvnih sudova. CP negativni plakovi su pokazali pojačanu prisutnost kolagena I, elastina, kontraktilnih glatkih mišićnih ćelija i TNF- α , dok su CP pozitivni plakovi imali višu koncentraciju B limfocita, CD4+

i CD8⁺ T limfocita i sekretornih glatkih mišićnih ćelija. SP110 je bio značajno više izražen u CP negativnim plakovima u svim ispitivanim arterijama.

Konačno, naše istraživanje pruža uvid u dublje razumijevanje veze između prisustva CP u arterijskim plakovima i specifičnih karakteristika plaka, kao i povezanosti s faktorima rizika za kardiovaskularne bolesti. Razlike u sastavu plakova između CP pozitivnih i negativnih ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjem kako bi se razumjeli patološki procesi i upalne reakcije u ovim plakovima. Ovo istraživanje može poslužiti kao temelj za razvoj ciljanih terapija i preventivnih strategija usmjerenih na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti povezanih s infekcijom CP.

IZVOD TEZE

Uvod: Kardiovaskularne bolesti, sa aterosklerozom kao vodećim faktorom, glavni su uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu. Tradicionalni faktori rizika kao što su hiperholesterolemija i hipertenzija ne objašnjavaju sve slučajeve ateroskleroze, pa se javlja potreba za istraživanjem infektivnih uzroka bolesti. Sve je više podataka koji ukazuju na to da hronične infekcije niskopatogenim mikroorganizmima mogu izazvati inflamaciju koja vodi do razvoja ateroskleroze. Nova saznanja o infektivnoj etiologiji ateroskleroze otvaraju mogućnosti za razvoj inovativnih pristupa u prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Ciljevi: Ispitati uticaj bakterije CP na aterosklerotski proces i definisati razlike između plakova koji sadrže ovu bakteriju i onih koji je nemaju. Ciljevi uključuju utvrđivanje prisustva bakterije u arterijskim krvnim sudovima i analiziranje razlika između pozitivnih i negativnih plakova, kao i poređenje klasičnih faktora rizika sa prisustvom bakterije.

Metode: Istraživanje je sprovedeno na uzorcima tkiva krvnih sudova izuzetim tokom sudskomedicinskih obdukcija u Kliničkom centru Crne Gore. Istraživanje je rađeno an 124 ispitanika, od kojih je 63 ispunilo kriterijume za analizu prisustva CP u aterosklerotskim plakovima. Tkivo je fiksirano u 4% formalinu i napravljeni su parafinski kalupi za histološku analizu. Korišćena su antitijela za identifikaciju prisustva CP, kao i za analizu morfoloških, celularnih i molekularnih karakteristika plakova. Statistička analiza podataka uključivala je deskriptivne metode, Studentov t-test, ANOVA, χ^2 test i logističku regresiju.

Rezultati: Prosječna starost u trenutku smrti bila je 58,89 godina, pri čemu su CP negativne osobe bile statistički značajno starije u trenutku umiranja od CP pozitivnih ($p < 0.001$). BMI CP negativnih osoba bio je značajno veći od BMI CP pozitivnih ($p < 0.001$). Analiza faktora rizika pokazala je značajnu prisutnost hiperholesterolemije ($p < 0.001$) i dijabetesa mellitusa ($p = 0.005$) kod CP negativnih osoba. Logistička regresija otkrila je negativnu korelaciju uzrasta ($OR = 0.965$), hiperholesterolemije ($OR = 0.195$), dijabetesa mellitusa ($OR = 0.371$), arterijske hipertenzije ($OR = 0.448$) i BMI ($OR = 0.773$) s CP pozitivnošću plaka. Ispitano je 252 uzorka arterija, gdje nije bilo značajnih razlika u intima-media debljini između CP pozitivnih i negativnih plakova. Međutim, CP negativni plakovi imali su veću ekspresiju kolagena I, elastina i kontraktilnih glatkih mišićnih ćelija ($p < 0.001$), dok su CP pozitivni plakovi pokazali veću ekspresiju kolagena III i

veću koncentraciju B limfocita ($p < 0.001$). SP110 je bio značajno više eksprimiran u CP negativnim plakovima u svim ispitivanim arterijama.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja pokazali su da prisustvo CP u arterijskim plakovima može biti povezano sa određenim faktorima rizika i karakteristikama plaka. Kod CP negativnih plaka češća je pojava faktora rizika kao što su hiperholesterolemija, dijabetes melitus i pozitivna porodična anamneza kardiovaskularnih bolesti. CP negativni plakovi pokazuju veće koncentracije kolagena I i elastina, dok CP pozitivni plakovi sadrže više kolagena III i veću prisutnost makrofaga, T limfocita i kontraktilnih glatkih mišićnih ćelija. Ove razlike u sastavu plaka ukazuju na mogućnost različitih patoloških procesa i upalnih odgovora između CP pozitivnih i negativnih plaka. Ove nalaze treba dalje istražiti zbog nedostatka komparativnih studija o celularnosti inficiranih i neinficiranih plakova različitih stadijuma razvoja.

Ključne riječi: ateroskleroza, *Chlamydia pneumoniae*, infekcija, kardiovaskularne bolesti

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases, with atherosclerosis as the leading factor, are the major cause of morbidity and mortality worldwide. Traditional risk factors such as hypercholesterolemia and hypertension do not explain all cases of atherosclerosis, prompting the need to investigate infectious causes of the disease. There is increasing evidence that chronic infections with low-pathogenic microorganisms can induce inflammation leading to the development of atherosclerosis. New insights into the infectious etiology of atherosclerosis open up possibilities for developing innovative approaches in preventing cardiovascular diseases.

Objectives: The study aims to investigate the impact of CP on the atherosclerotic process and define differences between plaques containing this bacterium and those that do not. Objectives include determining the presence of the bacterium in arterial blood vessels and analyzing differences between positive and negative plaques, as well as comparing risk factors with the presence of the bacterium.

Methods: The research was conducted on tissue samples of blood vessels obtained through forensic autopsies at the Clinical Center of Montenegro. A total of 124 participants were examined, of whom 63 met the criteria for analyzing the presence of CP in atherosclerotic plaques. The tissue was fixed in 4% formalin, and paraffin blocks were made for histological analysis. Antibodies were used to identify the presence of CP, as well as to analyze the morphological, cellular, and molecular characteristics of the plaques. Statistical data analysis included descriptive methods, Student's t-test, ANOVA, χ^2 test, and logistic regression.

Results: The average age at the time of death was 58.89 years, with CP negative subjects being statistically significantly older at the time of death than CP positive ones ($p < 0.001$). The BMI of CP negative subjects was significantly higher than that of CP positive ones ($p < 0.001$). Risk factor analysis showed a significant presence of hypercholesterolemia ($p < 0.001$) and diabetes mellitus ($p = 0.005$) in CP negative subjects. Logistic regression revealed a negative correlation with age (OR = 0.965), hypercholesterolemia (OR = 0.195), diabetes mellitus (OR = 0.371), arterial hypertension (OR = 0.448), and BMI (OR = 0.773) with CP positivity in plaques. A total of 252 artery samples were examined, with no significant differences in intima-media thickness between CP positive and negative plaques. However, CP negative plaques showed higher expression of

collagen I, elastin, and contractile smooth muscle cells ($p < 0.001$), while CP positive plaques exhibited a higher expression of collagen III and higher concentration of B lymphocytes ($p < 0.001$) and TNF- α ($p < 0.001$). SP110 was significantly more expressed in CP negative plaques in all examined arteries.

Conclusion: The results of this study indicate that the presence of CP in arterial plaques may be associated with specific risk factors and plaque characteristics. In CP negative plaques, risk factors such as hypercholesterolemia, diabetes mellitus, and a positive family history of cardiovascular diseases are more common. CP negative plaques exhibit higher concentrations of collagen I and elastin, while CP positive plaques contain more collagen III and show greater presence of macrophages, T lymphocytes, and contractile smooth muscle cells. These differences in plaque composition suggest the possibility of different pathological processes and inflammatory responses between CP positive and negative plaques. Further investigation of these findings is needed due to the lack of comparative studies on the cellularity of infected and uninfected plaques at different stages of development.

Keywords: Atherosclerosis, *Chlamydia pneumoniae*, infection, cardiovascular diseases

SPISAK SKRAĆENICA U TEKSTU

LDL	eng. low density lipoprotein	VLDL	eng. very low density lipoprotein
IDL	eng. intermediate density lipoprotein	PCSK9	eng. proprotein convertase subtilisin-kexin type 9
Apo	apolipoprotein	PDGF	eng. platelet-derived growth factor
AHA	eng. American Heart Association	IFN	interferon
HDL	eng. high density lipoprotein	Th	T-helper
Lp	lipoprotein	ATLO	eng. artery tertiary lymphoid organ
Ig	immunoglobulin	MRP 8-14	eng. myeloid-related protein 8-14
MMP	matriksna metaloproteinaza	IA	eng. injurious agent
IL	interleukin	ST2	eng. suppression of tumorigenicity-2
TNF	eng. tumor-necrosis factor	PAI-1	eng. plasminogen activator inhibitor 1
MCP	eng monocyte-chemoattractant protein	tPA	eng. tissue plasminogen activator
ICAM	eng. intercellular adhesion molecule	TF	eng. tissue factor
VCAM	eng. vascular cell adhesion molecule	CRP	C-reaktivni protein
oxLDL	eng. oxidized LDL	HMG-CoA	hidroksi-metil-glutaril koenzim A
CD	eng. cluster of differentiation	HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
CCL11	eng. C-C motif chemokine 11	CMV	<i>Citomegalovirus</i>
CCR3	eng. C-C chemokine receptor 3	EB	Elementarno tijelo CP
bFGF	eng. basic fibroblastic growth factor	RB	Retikularno tijelo CP
ABC-A1	eng. ATP-binding cassette transporter A1	HSP60	eng. heat shock protein 60
sst1	eng. super-susceptibility to tuberculosis-1	LCAT	eng. lecithin-cholesterol acyltransferase
Ipr1	eng. intracellular pathogen resistance	PCR	eng. polymerase chain reaction
BMDM	eng. bone marrow derived macrophages	Ifi-75	eng. interferon-induced protein-75
Egr1	eng. early growth response 1	VODI	eng. venoocclusive disease with immunodeficiency
CCL5	eng. C-C motif ligand 5	BMI	eng. body mass index
CXCL16	eng. C-X-C motif ligand 16	NF	eng. nuclear factor
TLR	eng. Toll-like receptor	CXCL10	eng. C-X-C motif ligand 10
hsCRP	visoko senzitivni CRP	CP	<i>Chlamydia pneumoniae</i>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Histologija arterijskih krvnih sudova	1
1.2. Patohistološke karakteristike i etiopatogeneza ateroskleroze	3
1.3. Uloga inflamacije u aterosklerozi	10
1.4. Infektivna geneza ateroskleroze	13
1.5. Genetska osnova ateroskleroze	15
2. CILJ	18
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Prisustvo CP u aterosklerotskom plaku	20
3.2. Morfološke karakteristike plaka	20
3.3. Celularne karakteristike plaka	20
3.4. Molekularne karakteristike plaka	21
3.5. Statistička obrada i prikazivanje podataka	21
4. REZULTATI	23
4.1. Starost i ispitivani faktori rizika za kardiovaskularne bolesti	23
4.2. Karakteristike CP pozitivnih i CP negativnih plakova	25
5. DISKUSIJA	41
5.1. Prisustvo CP u plaku: kontaminacija ili patogenetski faktor	41
5.2. Morfološke i celularne karakteristike ispitivanih aterosklerotskih plakova	44
5.3. Molekularne karakteristike ispitivanih aterosklerotskih plakova	49
5.4. Antibiotici i ateroskleroza	52
6. ZAKLJUČAK	53
7. REFERENCE	55
8. BIOGRAFIJA	66

1. UVOD

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu. U osnovi kardiovaskularnih bolesti leži ateroskleroza, inflamatorno oboljenje arterijskih krvnih sudova. S obzirom na činjenicu da ateroskleroza ima kliničke manifestacije koje izuzetno narušavaju zdravlje populacije, proučavanje uzroka i mehanizma nastanka ateroskleroze donosi nove mogućnosti prevencije kardiovaskularnih bolesti. Tradicionalno prihvaćeni faktori rizika za aterosklerozu (u prvom redu hiperholesterolemija i arterijska hipertenzija, a zatim i šećerna bolest, porodična predispozicija, pušenje i gojaznost) odsutni su u oko 50% pacijenata koji imaju ishemijsku bolest srca. Ovaj podatak navodi na razmišljanje o drugim uzrocima ateroskleroze, uglavnom akcentujući inflamatornu komponentu ove bolesti. Hronična inflamacija, koja predstavlja noseći stub ateroskleroze, može biti pokrenuta infektivnim agensom. Smatra se da je u pitanju hronična infekcija nisko-patogenim uzročnicima bolesti, sa vrlo malim ili odsutnim znacima zapaljenja, a ne pojedinačna pojava akutne virusne ili bakterijske infekcije. Ideja da je ateroskleroza bolest infektivne geneze rođena je početkom dvadesetog vijeka. Nakon Drugog svjetskog rata, primat je pružen klasičnim faktorima rizika, usljed razvoja antibiotika koji su znatno redukovali morbiditet i mortalitet od bakterijskih infekcija. Nova saznanja o konceptu infektivne ateroskleroze otvaraju vrata novim mogućnostima primarne i sekundarne prevencije kardiovaskularnih bolesti.

1.1. Histologija arterijskih krvnih sudova

Arterijski krvni sudovi imaju tri sloja: unutrašnji (*tunica intima*), srednji (*tunica media*) i spoljašnji (*tunica adventitia*). Tunica intima se pruža od površine endotela do luminalne margine medije tj. do unutrašnje elastične lamine. Od ćelijskih elemenata, u intimi dominiraju endotelne i glatke mišićne ćelije, kao i makrofagi. Endotel formira sloj ravnih, poligonalnih i izduženih ćelija, na čijoj površini se nalazi glikokaliks, sačinjen od glikozaminoglikana, proteoglikana i glikoproteina. Na membrani endotelne ćelije dominiraju receptori za LDL (eng. low density lipoprotein – lipoprotein niske molekularne gustine), insulin i histamin, kao i proteoglikani za koje se vezuje lipoproteinska lipaza (1). U citoplazmi su najzastupljenije vezikule transcitoze, kao i mikrotubuli, intemedijarni filament i Weibel-Paladeova tjelašca (sadrže faktor VIII antigen i von Willebrandov faktor). Endotelne ćelije su međusobno povezane gap vezama i čvrstim međućelijskim spojevima. Transport lipoproteina i drugih makromolekula kroz endotel regulisan je od strane plazmatske koncentracije supstance,

veličine i naelektrisanja molekula, krvnog pritiska i vaskularnog tonusa. Zdrav endotel je tromborezistentan, usljed prisustva trombomodulina koji vezuje trombin i sljedstveno aktivira proteine C i S, time vršeći inaktivaciju faktora Va (2). Takođe, ne dolazi do adherencije leukocita na endotel očuvanog integriteta, dok ekspresija leukotaksičnih molekula iziskuje njihovu adherenciju, kao što je slučaj prilikom subendotelne akumulacije lipoproteina. Endotel reguliše vaskularni tonus, lučeći vazodilatatorne supstance poput prostaciklina i azot-monoksida (NO), kao i endotelin, koji je potentan vazokonstriktor (3). Glatke mišićne ćelije intime se dijele u dva tipa: kontraktilne (sadrže veliku koncentraciju miofilamenata) i sintetišuće (bogate su granuliranim endoplazmatskim retikulumom). Funkcija glatkih mišićnih ćelija intime sastoji se u adaptaciji na promjene vaskularnog tonusa (putem mogućnosti kontrakcije), sintezi proteina neophodnih za strukturni integritet krvnog suda, kao i uklanjanju LDL, preko specifičnih receptora ili putem fagocitoze (4). Makrofagi intime nalaze se subendotelno i vrše remodelaciju intime uz pomoć fagocitoze i sinteze faktora rasta za endotelne i glatke mišićne ćelije. Takođe, makrofagi imaju tzv. "lešinarske" (eng. scavenger) funkcije, tako što uklanjaju LDL preko receptora i produkuju lipoproteinsku lipazu i apo-E (5). Ekstracelularni matriks ima dva sloja: proteoglikanski (nalazi se bliže lumen krvnog suda i gradi ga mreža vlakana proteoglikana) i mioelastični (nalazi se bliže mediji, obiluje kolagenim i elastičnim vlaknima). Proteoglikani regulišu transport velikih molekula i ćelijski metabolizam, a među njima dominira hondroitin-sulfat. Kolagena vlakna čuvaju integritet krvnog suda, vezujući endotelne ćelije za subendotelno tkivo (6).

Intima reaguje na mehanički stres fiziološkim zadebljavanjem. Ovakva adaptivna zadebljanja javljaju se u krvnim sudovima koji su izloženi visokom krvnom pritisku, posebno na mjestima udara krvne struje – na bifurkacijama i trifurkacijama arterija. Zadebljanje može biti ekscentrično (fokalno, koje zahvata manje od polovine cirkumferencije krvnog suda) i difuzno. Adaptivno zadebljanje ne okludira lumen krvnog suda, ali sadrži veću koncentraciju LDL, endotelnih i glatkih mišićnih ćelija od zdrave intime. U trenutku kada koncentracija lipoproteina u intimi nadvlada homeostazu, na terenu ekscentričnog adaptivnog zadebljanja počinje proces ateroskleroze. Pojava aterosklerotskog plaka nije rezervisana samo za fokuse zadebljanja, ali se na ovim mjestima javlja sa većom učestalošću i bržom progresijom procesa (7). Intima-medija debljina (zajednička debljina intime i medije krvnog suda, izmjerena od luminalne strane intime do granice između medije i adventicije), pretežno istraživana u ehosonografskim studijama karotidne ateroskleroze, je dokazani pokazatelj ateroskleroze i faktor kardiovaskularnog rizika. Vodič AHA (eng. American Heart Association) predlaže

karotidnu intima-medija debljinu kao faktor evaluacije kardiovaskularnog rizika nivoa IIa (istog nivoa kao i kalcijumski skor koronarnih arterija i gležanjskog (eng. ankle-brachial) indeksa), sa posebnom naznakom visokog rizika ukoliko je intima-medija debljina zajedničke karotidne arterije preko 75. percentila (8).

1.2. Patohistološke karakteristike i etiopatogeneza ateroskleroze

Ateroskleroza je bolest velikih i srednjih krvnih sudova, koja se prezentuje u vidu fokalnih, eleviranih lezija na intimi krvnog suda, sa posljedičnom okluzijom lumena. Predilekciona mjesta za pojavu ateroskleroze su upravo mjesta na kojima je najveći mehanički stres i gdje dolazi do adaptivnog ekscentričnog zadebljanja intime arterija, a to su mjesta nastanka grana arterija. Najčešće su pogođeni koronarni, karotidni i cerebralni krvni sudovi, kao i abdominalna aorta. Konstitucionalni faktori rizika za aterosklerozu obuhvataju genetski faktor (smatra se da je u pitanju poligensko nasljeđivanje sklonosti ka aterosklerozi i kardiovaskularnim događajima, kao i mendelsko nasljeđivanje familijarne hiperholesterolemije), starosnu dob (aterosklerotske promjene započinju svoj razvoj u ranom životnom dobu, a do pojave komplikacija plaka i kliničke manifestacije bolesti dolazi najčešće u šestoj deceniji života), kao i pol (u većem riziku su muškarci, dok rizik kod žena raste poslije menopauze). Među ključnim faktorima rizika na koje se može uticati navode se: dislipidemija (povećana koncentracija LDL i snižena koncentracija HDL), zatim šećerna bolest, pušenje i arterijska hipertenzija. Neki od faktora rizika koji favorizuju pojavu ateroskleroze su: hiperhomocisteinemija, povišena koncentracija Lp(a), gojaznost, sedentarni način života, niska porođajna tjelesna masa i nezadovoljavajući socioekonomski status (9).

Apo-B je ključna komponenta hilomikrona, VLDL, IDL i LDL. Budući da je apo-B relativno malog promjera (oko 70 nanometara), normalan endotel je prijemčiv za njegov prolazak. Međutim, veličina kompletnih lipoproteinskih molekula koji u sebi sadrže apo-B sprečava njihovo ekscesivno nakupljanje u zdravom krvnom sudu. U usporedbi sa intimom neoštećenog krvnog suda, intima koja pokriva aterosklerotski plak nije značajno prijemčivija za prolazak apo-B; već se odgovor na pitanje o mehanizmu subintimalne retencije LDL nalazi u ekstracelularnom matriksu rane aterogeneze. Proteoglikani ekstracelularnog matriksa u ranim plakovima svojim negativnim nabojem elektrostatički privlače aminoacil – nastavke apo-B molekula, time promovirajući njihovu retenciju (10). Retenirani molekuli apo-B stimulišu

hemotaksu monocita i infiltraciju T limfocita mehanizmom koji još uvijek nije razjašnjen (11). Aterogeni potencijal apo-B se ogleda i u izgradnji tzv „remnant“ lipoproteina (lipoproteina „ostatka“) čija je koncentracija povišena u metaboličkom sindromu. „Remnant“ lipoproteini sadrže visoku koncentraciju apo-B i po strukturi se razlikuju od LDL, tako što sadrže 40 puta više holesterola. Smatra se da „remnant“ lipoproteini imaju visok aterogeni potencijal (nezavisno od LDL čestica), budući da optimalna terapija inhibitorima HMG-coA reduktaze (statinima) i PCSK9 inhibitorima (savremena hipolipemična terapija koja usporava razgradnju LDL receptora) daje redukciju „remnant“ lipoproteina samo za 4-25%, uz perzistiranje rizika od aterosklerotskih kardiovaskularnih događaja (12).

S druge strane, apo-A predstavlja ključan segment apolipoproteinske komponente HDL, koji ostvaruje anti-aterogeni efekat kroz reverzni transport holesterola iz makrofaga zida krvnog suda u žuč; zatim kroz svoja antiinflamatorna, antikoagulantna, antitrombotska i vazodilatatorna svojstva. Takođe, apo-A sam po sebi ima ateroprotektivno svojstvo (inhibicija transendotelne invazije imunskih ćelija, kao i aktivacije monocita, peroksidacije lipida i lučenja citokina od strane T limfocita) (13). Anti-apo-A IgG antitijela su potvrđena u autoimunim bolestima sa kardiovaskularnim rizikom (sistemski lupus, antifosfolipidni sindrom, reumatoidni artritis), kao i među pacijentima sa akutnim koronarnim sindromom i karotidnom stenozom, bez dokazane autoimune bolesti (14). Dokazano je da prisustvo anti-apo-A IgG dovodi do disfunkcije HDL, kao i do porasta lučenja proinflamatornih citokina poput MMP-9, IL-6, IL-8, TNF- α i MCP-1. Takođe, utvrđeno je da anti-apo-A IgG pozitivnost u prvih 24h nakon infarkta miokarda predstavlja faktor rizika za ponovljeni infarkt miokarda, moždani udar ili srčanu smrt. Uzevši u obzir prezentovane *in vitro* i *in vivo* dokaze, anti-apo-A antitijela se smatraju jednim od ključnih parametara autoimunosti i inflamatorne etiologije ateroskleroze (15).

Savremeni koncept razumijevanja ateroskleroze tumači ovaj proces kao "odgovor na povredu" (eng. response-to-injury) endotela uz hroničnu inflamaciju i remodeliranje zida krvnog suda. Povreda endotela nastaje najčešće usljed mehaničkog dejstva krvne struje, a zapaženo je da postoje aterosklerotske promjene u djelovima arterija sa očuvanim endotelom. Smatra se da je u tim slučajevima okidač procesa ateroskleroze disfunkcija endotela, koji gubi funkciju barijere i dozvoljava prolaz molekula LDL subendotelno. Takođe, disfunkcija endotela rezultira u vazokonstrikciji usljed nedostatka vazodilatatorne aktivnosti NO (16). Histološki i biohemijski, ateroskleroza ima osnovu u inflamaciji, budući da se zapaža visoka koncentracija upalnih ćelija, kao i medijatora zapaljenja. Povreda endotela uzrokuje, uz porast permeabilnosti

LDL u intimu, povećanu ekspresiju adhezivnih molekula (P i E selektin, kao i ICAM-1 i VCAM-1) (17). Smatra se da VCAM-1 igra značajniju ulogu kada je početak procesa u pitanju, za razliku od ICAM-1 koji je rezervisan za uznapredovali stadijum procesa (18). Adhezivni molekuli, kao i oxLDL sam po sebi, privlače zapaljenske ćelije: monocite koji se transformišu u makrofage, kao i mast ćelije i T-limfocite (19).

Monociti prolaze kroz intimu dejstvom MCP-1. Makrofagi uklanjaju LDL putem tzv. "lešinarskih" (eng. scavenger) receptora. Poseban značaj imaju CD36 receptori koji pripadaju grupi B scavenger receptora. Ovi receptori dominantno vezuju oksidovani LDL koji je modifikovan od strane mijeloperoksidaze fagocita, čime se uključuju u inflamatorni proces (20). Fagocitovani lipidi opterećuju makrofage, dajući im izgled tzv. "pjenastih" ćelija (eng. foam cells), do trenutka u kojem te ćelije uđu u proces apoptoze, a lipidi se vrte u ekstracelularni matriks (21).

Većina istraživanja efekata mastocita u aterosklerozi je sprovedena na miševima, čiji krvni sudovi sadrže mastocite uglavnom u adventiciji. Međutim, ljudski aterosklerotski plakovi pokazuju bogatiji mastocitni infiltrat u intimi – stoga se smatra da je pro-aterogeno dejstvo mastocita izraženije u humanom tkivu. Migracija mastocita u aterosklerotski plak je većinski posredovana hemokinom CCL11 (eotaksin) i njegovim receptorom CCR3 na membrani mastocita. Agregacija mastocita se vrši u okolini malih krvnih sudova plaka, a mast ćelije sadrže bFGF koji ima angiogena svojstva (22). Takođe, mastociti aktivno luče pro-inflamatorne medijatore poput metabolita arahidonske kiseline, histamina i faktora aktivacije trombocita (23). Hipotetiše se da mastociti ubrzavaju rast novih krvnih sudova plaka, kao i da ubrzavaju destabilizaciju plaka promovišući hemoragiju unutar plaka (24). Mastociti destabilizuju plak putem specifičnih proteaza (triptaza, himaza), čiji se efekat primarno ogleda u lokalnoj aktivaciji unutar plaka, dok se aktivnost u sistemske cirkulaciji dovodi u pitanje u brojnim studijama (25).

Glatke mišićne ćelije se takođe opterećuju lipidima, usljed down-regulacije transportera ABC-A1, čija je funkcija ukljanjanje LDL iz ćelija i usmjeravanje lipoproteina ka jetri (26). Broj glatkih mišićnih ćelija raste usljed odgovora na faktore rasta i putem migracije iz medije. T limfociti i to pretežno CD4+ tipa luče IFN- γ i TNF- β koji stimulišu rast glatkih mišićnih ćelija i sintezu proteina ekstracelularnog matriksa (27).

Napredovanjem procesa narušava se histoarhitektonika intime, što aktivira signale popravke tkiva putem ekspresije receptora za faktore rasta. Najveću aktivnost ima PDGF, koji

potiče iz trombocita agregiranih na terenu ateroskleroze, a stimuliše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, kao i produkciju kolagena, elastina i mukopolisaharida. Taloženje kalcijuma i lipida na elastinu čini ga podložnijim dejstvu proteaza. Produkti elastolize – elastokini, potenciraju oksidativni stres u plaku, rezultirajući u porastu koncentracije oxLDL i hemotakse monocita (28). Eksperimentalno je dokazano da produkti degradacije elastina imaju angiogenetsku ulogu, što može doprinijeti riziku za hemoragiju unutar plaka i sljedstvene komplikacije (29).

Molekuli kolagena tipa I i III su uveliko zastupljeni u ekstracelularnom matriksu zdravog krvnog suda, a njihova koncentracija počinje da raste na mjestu zadebljanja intime već u odojačkom dobu (30). Normalan odnos kolagena I i III je 8:1 (31). Obije vrste kolagena prepoznate su kao važan faktor u agregaciji trombocita za aterosklerotski plak. U uznapređovalim stadijumima, porast koncentracije kolagena tipa I u odnosu na tip III povezan je sa bržom progresijom plaka (32). Kada su slojevi intime u pitanju, na predilekcionim mjestima za aterosklerozu dominira proteoglikanski sloj u odnosu na muskuloelastični. Takođe, u aterosklerotskim plakovima razvijeniji je proteoglikanski sloj, dok muskuloelastični sloj skoro i da nestaje. Porast broja sintetišućih glatkih mišićnih ćelija u plaku prognozira brz razvoj aterosklerotskog procesa (33).

T limfociti predstavljaju oko 10% svih ćelija u aterosklerotskim plakovima. 70% svih T limfocita u ranim plakovima su CD4⁺ T limfociti, dok je ostatak većinom CD8⁺. S druge strane, smatra se da je skoro polovina svih T limfocita u uznapređovalim plakovima CD8⁺ tipa (34). Većina CD4⁺ T limfocita su Th1 ćelije, zadužene za sekreciju proinflamatornih citokina poput INF- γ i TNF- α . U uznapređovalim plakovima, adventicija krvnog suda predstavlja domaćina za tercijarne limfoidne organe (eng. ATLO), koji su formirani od T i B limfocitima u različitim stadijumima razvoja. Još uvijek nije dokazana funkcija ATLO u uznapređovaloj aterosklerozi, te se i dalje diskutuje da li takav ćelijski infiltrat igra protektivnu ulogu ili je u pitanju reaktivna inflamacija zida krvnog suda (35).

Dokazana je aktivacija B limfocita u aterosklerotskom plaku. Međutim, nije utvrđeno da li B limfociti imaju ateroprotektivnu ili pro-aterogenu funkciju. Anti-aterogena funkcija B limfocita je sugerisana nakon što je utvrđeno da je gubitak velikog broja B limfocita nakon splenektomije praćen napredovanjem ateroskleroze (36). Smatra se da su anti-oxLDL IgG antitijela (pretežno sekretovana od strane B1 limfocita) aterogena, dok je prisustvo anti-oxLDL IgM antitijela (lučenih od strane B2 limfocita) u cirkulaciji povezano sa sniženim rizikom od

kardiovaskularnih oboljenja (37). Međutim, istraživanja na miševima sa deplecijom B limfocita (kreiranom kroz dejstvo CD20-specifičnog monoklalnog antitijela) su pokazala da nedostatak B limfocita prati niži rizik od ateroskleroze, najvjerojatnije kroz redukciju aktivacije patogenih T limfocita i sekrecije INF- γ (38).

Krvni sud se adaptira na remodelaciju tako što dolazi do širenja unutrašnje elastične lamine, čime se pokušava očuvati lumen koji se smanjuje rastom plaka. Smatra se da unutrašnja elastična lamina počinje da se širi u trenutku kada plak okludira 40% lumena krvnog suda (39). Kada debljina zida krvnog suda preraste mogućnost ishrane putem difuzije iz lumena, tada počinje proces neovaskularizacije uz rascjep unutrašnje elastične lamine i prodor kapilarnih pupoljaka u intimu (40). VEGF stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija novih krvnih sudova plaka. Timidin-fosforilaza, angiogenetski faktor ranije identifikovan u malignim bolestima, kao i u reumatoidnom artritisu, psorijazi i peptičkom ulkusu gastroduodenuma, stimuliše migraciju (ali ne i proliferaciju) endotelnih ćelija u područje oko plaka (41). Okidač za lučenje timidin-fosforilaze je hipoksija. Imunohistohemijski je dokazana koekspresija VEGF i timidin-fosforilaze u monocitima, kao i nekrotičnom jezgru i pjenastim ćelijama plaka, stoga se smatra da imunski infiltrat plaka promoviše angiogenezu, ali i da je nekrotično jezgro biološki aktivnije nego što se prethodno smatralo (42).

Daljim nakupljanjem lipoproteina u intimi, inflamatornim odgovorom i degeneracijom intime, proces napreduje do stenoze i okluzije lumena krvnog suda, izazivajući hemodinamske poremećaje koji su klinički manifestni.

Lezije ateroskleroze klasifikovane su u 6 tipova, zavisno od stadijuma u kome se proces nalazi:

1. Tip I predstavlja hemijski i mikroskopski detektabilno prisustvo lipoproteina u intimi, praćeno ćelijskom reakcijom. Viđa se uglavnom kod djece ili kod odraslih osoba bez izražene predispozicije za aterosklerozu. Nađeno je da, u prvih 8 mjeseci života, 45% odojčadi ima pjenaste ćelije u koronarnim arterijama. U tipu I dolazi do pojave pjenastih ćelija koje su raštrkane u subendotelnom sloju intime. Uz pjenaste ćelije, prisutni su i makrofagi bez lipidnih inkluzija, kao i T limfociti i mast ćelije (43). Ova početna ćelijska infiltracija zapažena je kao prvi korak patofiziološke kaskade ateroskleroze prilikom ispitivanja laboratorijskih životinja koje su genetičkim inženjeringom i dijetom sa visokom koncentracijom holesterola podvrgnute velikom riziku od ateroskleroze.

2. Tip II je tzv. "masna pruga" (eng. fatty streak). Histološki, lezija se sastoji od pjenastih ćelija u slojevima, udruženih sa ćelijama glatkog mišića. Lipoproteini se dominantno nalaze u inkluzijama unutar ćelija, dok se u ekstracelularnom matriksu nalaze u tragovima. Najzastupljeniji su kolesterol-estri (77%), kolesterol i fosfolipidi. Raste broj T limfocita i mastocita. "Masna pruga" se najčešće zapaža na ishodištima grana trbušne aorte, usljed transendotelne difuzije LDL, koja je u ovom dijelu vaskularnog korita najizraženija. Makroskopski, lezija je vidljiva kao žuta mrlja ili pruga na intimi arterije. Tip II se dijeli na dva podtipa: tip IIa (brzo progredira u dalje stadijume) i tip IIb (sporo progredira u dalje stadijume). Tip IIa ima veću koncentraciju makrofaga, glatkih mišićnih i pjenastih ćelija, komponenti ekstracelularnog matriksa, kao i lipoproteina od tipa IIb. Najpovršnije su lokalizovani makrofagi, zatim se dublje, u proteoglikanskom sloju nalaze pjenaste ćelije, a najdublje se nalaze ekstracelularne kolekcije lipoproteina (44).

3. Tip III – tzv. preaterom ili tranziciona lezija, koja je morfološki i biohemijski most ka tipu IV tj. ateromu. U ovom stadijumu, lipidi počinju ubrzano da se talože u ekstracelularnom matriksu, dublje od makrofaga i pjenastih ćelija. Lipoproteini se mogu nalaziti slobodni ili su vezani za ćelijsku membranu. Prvobitna teorija o ekstracelularnom nakupljanju lipoproteina navodila je apoptozu pjenastih ćelija kao jedini uzrok ove pojave, dok je u međuvremenu otkriveno da se lipoproteini mogu primarno vezati za proteoglikane, što je mogući patofiziološki mehanizam formiranja ekstracelularnih depozita. OxLDL stimuliše lučenje glikozaminoglikana i time ubrzava taloženje lipoproteina u preateromu (45). Smatra se da dermatan-sulfat, glikozaminoglikan ekstracelularnog matriksa, ima poseban afinitet za vezivanje LDL. Dolazi do razgradnje hondroitin-sulfata, glikozaminoglikana koji reguliše transport materija iz plazme u zid krvnog suda, čime se olakšava difuzija LDL. Takođe, elastaze razgrađuju elastin, čiji raspadni produkti vrše hemotaksu makrofaga. U tipu III fokus se pomjera sa infiltrativnog na destruktivni karakter lezije.

4. Tip IV – aterom (lat. atheroma). Nastaje konfluiranjem ekstracelularnih depozita lipida u tzv. "masnu kašu", tj. lipidnu srž ateroma (eng. lipid core). Oko lipidne srži nalazi se konglomerat pjenastih i glatkih mišićnih ćelija, makrofaga i mast ćelija, kao i sloj proteoglikana ekstracelularnog matriksa. Makrofagi su najzastupljeniji na ivicama ateroma, što ivice čini kritičnim tačkama za razvoj komplikacija, usljed razvijene inflamacije. Pojavljuje se začetak kalcifikacije na organelama glatkih mišićnih ćelija. Oko lipidne kaše se pojavljuju kapilari neoangiogeneze, a najzastupljeniji su na ivicama ateroma i prema lumenu (46).

5. Tip V nastaje iz ateroma bujanjem kolagena i drugih vlakana vezivnog tkiva, sintetisanih od strane glatkih mišićnih ćelija bogatih granuliranim endoplazmatskim retikulumom. Stimulus za povećano stvaranje komponenti ekstracelularnog matriksa potiče od narušene histoarhitektonike intime, kao i usljed mehaničkog stresa koji krvna struja vrši u području ateroma. Novo vezivno tkivo može biti posljedica organizacije hematoma usljed perivaskularne hemoragije kapilara neoangiogeneze (47). Takođe, zapaža se porast u broju T limfocita i makrofaga, što je znak daljeg razvoja inflamacije. Tip V se dijeli u 3 podtipa: Va (fibroaterom, sadrži lipidnu srž i fibrozno tkivo u vidu kape oko lipida), Vb (polje ateroskleroze koje je pretrpjelo distrofičku kalcifikaciju) i Vc (sadrži uglavnom vezivno tkivo uz nisku koncentraciju lipoproteina) (48).

6. Tip VI – nastaje kao komplikacija tipa IV i V. Komplikacije nastaju usljed porasta mehaničkog stresa, budući da lumen krvnog suda biva sve manji kako plak raste, a samim tim i krv poprima turbulentan tok. Takođe, makrofagi i glatke mišićne ćelije luče proteolitičke enzime (glavni predstavnik je MMP-9), koji oštećuju fibroznu kapu. Ovi enzimi formiraju "izlazne puteve" (eng. "exit tracts"), tj. otvore u fibroznoj kapi za koje se spekuliše da su način odbrane od akumulacije lipida u plaku. Može doći do disrupcije površine aterosklerotskog plaka, uz krvarenje unutar plaka ili formiranje kolekcije krvi u vidu hematoma. Oštećen endotel, ogoljena bazalna lamina i proteini ekstracelularnog matriksa, kao i vlakna fibrozne kape, predstavljaju trombogenu osnovu. Dolazi do adherencije i agregacije trombocita uz aktivaciju faktora koagulacije krvi. Trombociti oslobađaju MRP 8-14 koji aktivira kaskadu urođenog imunskog sistema i favorizuje apoptozu endotelnih ćelija (49). Tromboza aterosklerotskog plaka ima brzu progresiju i može u potpunosti okludirati lumen krvnog suda u roku od nekoliko sati ili dana. Ruptura krova plaka najčešće rezultira u trombozi, usljed intenzivne krvne struje, dok ruptura krajeva plaka može imati za posljedicu pretvaranje plaka u korito kojim teče krv, dovodeći do distalne embolizacije arterije lipidnim sadržajem. Zavisno od prirode komplikacije, tip VI se dijeli na podtipove: VIa (fisura ili ulceracija fibrozne kape), VIb (hematom ili hemoragija), VIc (tromboza) i VIabc (sadrži sve elemente prethodnih podtipova). Smatra se da je intenzitet inflamacije u plaku direktno proporcionalan mogućnosti nastanka komplikacija. Hronična inflamacija zida krvnog suda čini endotel trombofilnim, čak i u odsustvu erozije (50).

Postoji i uopštena podjela stadijuma ateroskleroze na rani i uznapredovali stadijum. U rani stadijum ubrajaju se tipovi I i II, koji ne okludiraju lumen arterije, stoga ne produkuju simptome, ne narušavaju histoarhitektoniku intime, a počinju u dječjoj dobi. Sa druge strane,

uznapređovalim stadijumom se smatraju tipovi III, IV, V i VI, koji su klinički manifestni usljed stenoze lumena, razvijaju se u odrasloj dobi, a mikroskopski ih pokazuju gubitak normalne građe intime, uz karakteristike svakog od tipova.

1.3. Uloga inflamacije u aterosklerozi

Upalni ćelijski infiltrat i prisustvo medijatora zapaljenja dokazuju da je ateroskleroza hronična inflamatorna bolest. Smatra se da je ateroskleroza zapravo odgovor na noksu koja oštećuje endotel. Tzv. "injurious agent" (IA) je bilo koja sila, hemijska supstanca ili mikroorganizam koji izaziva leziju endotela i sljedstvenu upalnu reakciju. Hemotaksa monocita i T-limfocita, uz lučenje citokina, započinje inflamatornu kaskadu i remodelaciju oboljelog dijela zida krvnog suda. Nezavisno od porijekla IA, odgovor domaćina nije adekvatan, jer se ateroskleroza progresivno širi, a lumen krvnog suda se sužava. Klinička slika ateroskleroze ne sadrži simptome i znake prisutne kod zapaljenskih oboljenja, već se ateroskleroza prezentuje kroz hemodinamske poremećaje koje izaziva. Ipak, stepen inflamacije u aterosklerotskom plaku utiče na kliničku sliku, budući da je intenzivniji upalni infiltrat povezan sa bržim rastom i većim rizikom od nastanka komplikacija plaka. Dokazan je stimulativni efekat dijete sa visokom koncentracijom holesterola na inflamaciju u aterosklerotskom plaku, uz smanjenje rizika od komplikacija plaka nakon sprovođenja restriktivne dijete (51). Adipociti masnog tkiva proizvode bioaktivne molekule – adipocitokine, među kojima su najznačajniji leptin, adiponektin i rezistin. Takođe, visceralno masno tkivo trbuha luči IL-6, koji portalnim krvotokom odlazi u jetru i stimuliše lučenje reaktanata akutne faze (52).

Inflamatorni odgovor na IA karakteriše narušavanje normalne građe intime, kao i neadekvatna reparacija. Dejstvo upalnih ćelija u plaku je destruktivno, a aterom se može uporediti sa apscesom: izgrađen je od nekrotičnog, amorfog i acelularnog materijala, a okružen je inflamatornim infiltratom ćelija i nastavlja da stimuliše upalnu reakciju. Uz oštećenje endotelних ćelija, IA otežava i regeneraciju endotela usljed slabije migracije EPC (endotelne progenitorske ćelije, eng. endothelial progenitor cells) (53). Reakcija glatkih mišićnih ćelija ima fibroproliferativni karakter, uz produkciju proteina ekstracelularnog matriksa, ali i pokušaj uklanjanja lipida iz srži ateroma. Opisano je pretvaranje glatkih mišićnih ćelija u makrofage, koji zatim fagocituju LDL preko scavenger receptora. Smatra se da IA remeti normalne puteve metabolizma LDL, uz opterećivanje ćelija lipidnim inkluzijama i posljedičnu apoptozu.

Glikozilirani LDL je karakteristika šećerne bolesti, a ova vrsta lipoproteina izaziva intenzivniji oksidativni stres od nativnog LDL-a, što objašnjava brzu progresiju ateroskleroze kod pacijenata koji boluju od šećerne bolesti. Odgovor ćelija na faktore rasta je intenzivniji nego u zdravom krvnom sudu, što rezultira u napredovanju inflamacije i progresiji plaka, koji se širi cirkumferencijalno i longitudinalno. Takođe, zapaljenje se širi kroz slojeve zida krvnog suda, sve do adventicije, koja je otporna na IA usljed prisustva fibroblasta. Fibroblasti ne mogu odreagovati na IA destruktivno, poput makrofaga i T-limfocita, stoga ne dolazi do nekroze adventicije, već do reaktivnog zadebljanja. Zapaljenje u adventiciji direktno korelira sa stepenom okluzije lumena. Hipomagnezijemija izaziva veću ekspresiju VCAM-1 uz pojačanu sekreciju IL-1, a istraživanja na apo-E-knockout miševima su pokazala da dodatak magnezijuma u vodi za piće smanjuje rizik od ateroskleroze (54).

IL-33 je citokin koji pripada superfamiliji IL-1 citokina, a nedavno je opisan njegov značaj u patofiziologiji kardiovaskularnih bolesti. Ovaj citokin djeluje preko ST2 receptora, dok se u plazmi nalazi rastvorena izoforma ovog receptora (sST2) koja vezuje IL-33 i antagonizuje njegove efekte (55). IL-33 u aterosklerotskom plaku preusmjerava inflamatorni odgovor sa reakcije Th1 na reakciju Th2 limfocita, time smanjujući destruktivni karakter inflamacije, uglavnom zbog smanjenog lučenja IFN- γ . Takođe, IL-33 stimuliše lučenje IL-5 iz Th2 limfocita, time stimulišući B limfocite da sintetišu anti-oxLDL antitijela i olakšaju uklanjanje lipida iz aterosklerotskog plaka. Ukupan efekat IL-33 na plak je protektivnog karaktera, budući da redukcija inflamacije smanjuje mogućnost pojave komplikacija plaka (56). IL-33 ispoljava protektivno dejstvo i na miokard, usporavanjem hipertrofije i fibroze srčanog mišića. Takođe, laboratorijska ispitivanja na gojaznim miševima sa dijabetesom pokazala su da IL-33 smanjuje taloženje lipida u adipocitima i poboljšava toleranciju glukoze (57). Plazmatski antagonist IL-33, sST2, istražuje se kao budući prediktor kardiovaskularnog događaja, usljed činjenice da je povišena koncentracija sST2 povezana sa smanjenim protektivnim dejstvom IL-33 na ateroklerotski plak (58).

Inflamacija u aterosklerotskom plaku favorizuje trombozu, jer endotel i glatke mišićne ćelije reaguju na faktore rasta lučenjem PAI-1. Raste odnos tPA i PAI-1 sa 1:8 (što je normalan nalaz kod zdravih osoba muškog pola) na 1:50 (59). Napredovanjem inflamatornog procesa, ispunjavaju se uslovi za Virhovljevu trijadu etiologije tromboze: okludiran lumen karakteriše porast mehaničkog stresa i turbulencije krvne struje, endotel trpi oštećenje i disfunkciju, a hiperkoagulabilnost nastaje usljed porasta vrijednosti PAI. Nađeno je prisustvo cirkulišućeg tromboplastina (eng. TF) koji se vezuje za makrofage, glatke mišićne ćelije i

endotel, time stimulišući trombozu aterosklerotskog plaka. Upalni ćelijski infiltrat uz oksidovani LDL izaziva pojačano lučenje TF, čime ateroskleroza izaziva hiperkoagulabilnost u cijelom krvotoku, a ne samo u krvnim sudovima pogođenim aterosklerozom (60).

Protektivno dejstvo trombomodulina (smanjenje funkcije trombina i aktivacija proteina C i S) je dokazano eksperimentalnom primjenom rekombinantne forme molekula u miševima sa aterosklerozom – rekombinantni trombomodulin redukuje formiranje neointime i usporava leziju krvnog suda (61). Smatra se da bi aterosklerotsko oštećenje endotela moglo biti detektovano porastom u plazmatskim koncentracijama von Willebrandovog faktora i E-selektina, kao i trombomodulina, kao markera oštećenja endotela (62). Koncentracija plazmatskog von Willebrandovog faktora i E-selektina je takođe povećana u arterijskoj hipertenziji, dok je porast koncentracije rastvorenog trombomodulina prisutan i u hiperholesterolemiji. Povećana koncentracija trombomodulina se javlja među hiperholesterolemičnim pacijentima i bez aterosklerotskih plakova (63), što može biti indikator rane, pre-aterosklerotske lezije endotela. Takođe, smatra se da trombomodulin predstavlja marker mehaničkog oštećenja endotela u područjima aterosklerotskog plaka izloženim poremećaju laminarnog toka krvne struje, kao i u trombozi dubokih vena ili venskih graftova (64).

Makrofagi i glatke mišićne ćelije u aterosklerotskom plaku luče CRP, reagujući na IL-6. CRP je reaktant akutne faze zapaljenja, a smatra se da u aterosklerotskom plaku vrši opsonizaciju lipoproteina i aktivira sistem komplementa. Najveća koncentracija CRP zapažena je u blizini glatkih mišićnih ćelija u mioelastičnom sloju intime, gdje stimuliše lučenje MCP-1 (65). Povišene vrijednosti ovog parametra mogu se koristiti u predviđanju kardiovaskularnih događaja. CRP nema cirkadijalnu varijabilnost i po prirodi je stabilan molekul, što olakšava određivanje njegove vrijednosti. Povišene vrijednosti CRP su nađene u 90% slučajeva akutnog infarkta miokarda kome je prethodila nestabilna angina pectoris, što je dokaz da je CRP takođe marker ishemije tkiva usljed ateroskleroze (66). Visoke vrijednosti CRP uz normalne vrijednosti lipida u krvi takođe mogu ukazivati na aterosklozu, što je još jedan dokaz da ateroskleroza nije bolest prostog odlaganja lipida, već inflamatorno stanje. Na terapiji inhibitorima statinima vrijednosti CRP su snižene do 50%. Ovaj podatak ukazuje na antiinflamatorni efekat statina (67). Buduća istraživanja usmjerena su ne samo na otkrivanje pacijenata koji imaju aterosklozu uz pomoć analiziranja vrijednosti upalnih parametara, već i na otkrivanje pojedinačnih krvnih sudova koji su opterećeni inflamatornim infiltratom ateroskleroze. Razvija se tehnologija infacrvenog ispitivanja termalne heterogenosti, koja

identifikuje tzv. "vruće" plakove, tj. regione intenzivnog zapaljenja i visokog rizika od nastanka komplikacija plaka (68).

Dokazana je aterogena uloga TNF- α , posebno u ranim stadijuma razvoja aterosklerotskog plaka. TNF- α stimuliše transitozu LDL kroz endotelne ćelije i podržava retenciju LDL čestica u zidu krvnog suda. Takođe, u ApoE^{-/-} miševima je dokazana ubrzana ateroskleroza nakon injekcije TNF- α (69). Ortolan i saradnici su pokazali da anti-TNF- α tretman djelimično usporava ateroskleroza među pacijentima sa psorijatičnim artritisom, te donose zaključak da TNF- α u sadejstvu sa drugim upalnim faktorima igra ulogu u ubrzavanju ateroskleroze u sistemskom inflamatornom miljeu kakav predstavlja psorijatični artritis (70).

1.4. Infektivna geneza ateroskleroze

Kada je u pitanju identifikacija IA, faktora koji započinje proces ateroskleroze, velika pažnja posvećuje se mogućim virusnim i bakterijskim uzročnicima. Najvjerovatnije se radi o hroničnoj infekciji nisko-patogenim mikroorganizmima, a moguće je da je u pitanju opterećenost organizma sa više vrsta mikroorganizama odjednom (eng. "pathogen burden", tj. "teret patogena"). Trenutno nema odgovora na pitanje da li infektivni agens samostalno započinje proces ili djeluje zajedno sa drugim uzročnicima. Smatra se da je u pitanju intracelularni patogen koji perzistira u endotelu i stimuliše hroničnu inflamaciju, kao i disfunkciju endotela. Među mikroorganizmima koji se najčešće navode kao mogući uzročnici ateroskleroze nalaze se bakterije (CP, *Helicobacter pylori*, kao i dentalni patogeni: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans*) i virusi (HSV i CMV). Utvrđeno prisustvo mikroorganizama u aterosklerotskom plaku, uz ćelije opterećene lipidima, rezultiralo je u hipotezi da mikroorganizmi stimulišu ekspresiju scavenger receptora, da bi koristili lipide kao izvor energije (71).

CP je obligatno intracelularna Gram-negativna bakterija iz familije *Chlamydiaceae*. Karakteriše je neuobičajen životni ciklus koji se sastoji iz dva oblika života: elementarno tijelo (EB, koje ima infektivni karakter i vrši invaziju u ćelije domaćina) i retikularno tijelo (RB, ono vrši reprodukciju unutar ćelija domaćina). Ukoliko uslovi nisu povoljni, CP prelazi u aberantni oblik, koji se nalazi pritajen u makrofagima i izbjegava imuni sistem domaćina, time opstajući u organizmu (72).

CP je prepoznata kao uzročnik sinuzitisa, laringitisa, faringitisa, bronhitisa i vanbolničke pneumonije (73). Ova bakterija je češće zastupljena u krvnim sudovima pušača, a smatra se da je kod njih veći stepen kolonizacije pluća ovim mikroorganizmom (74). Dokazano je njeno prisustvo u 40 – 50% aterosklerotskih plakova, putem imunohistohemijskog ispitivanja, *in situ* hibridizacije, PCR, elektronske mikroskopije, kao i kulture ćelija. Laboratorijska ispitivanja na životinjama pokazala su da CP izaziva aterosklozu kod LDL-knockout miševa koji su tretirani dijetom sa visokom koncentracijom holesterola. Seroepidemiološka istraživanja pokazala su da prisustvo IgG antitijela na CP tri puta povećava rizik za ishemijsku bolest srca. Prisustvo antitijela na CP nađeno je u oko 50% ispitivanih pacijenata sa aterosklerozom (75). Treba uzeti u obzir da seroepidemiološka istraživanja izjednačavaju prisustvo antitijela sa hroničnom infekcijom, te da ne ispituju prisustvo bakterija u zidu krvnog suda. Nizak titar antitijela praćen je niskom specifičnošću, dok je visok titar praćen niskom senzitivnošću (76). Smatra se da CP prelazi iz makrofaga u endotelne ćelije, izazivajući njihovu disfunkciju i povećavajući permeabilnost za LDL. Istovremeno, lipopolisaharid zida bakterije izaziva smanjenje aktivnosti LCAT, što za posljedicu ima porast nivoa LDL i pad HDL. Prisustvo CP u endotelu izaziva proliferaciju glatkih mišićnih ćelija (putem tzv. abortivne infekcije, koja ne uništava ćelije domaćina), uz lučenje IL-8 i IL-16, kao i ekspresiju ICAM, VCAM i E selektina. (77). CP izaziva oksidativni stres u zidu krvnog suda i izaziva oksidaciju LDL uz pomoć superoksid-anjona. Takođe, bakterija vrši disregulaciju receptora za efluks LDL, time dodatno opterećujući ćelije lipidima i favorizujući pojavu pjenastih ćelija. Istražuju se antioksidantna svojsva inhibitora HMG-coA (statina), resveratola i kurkumina u prevenciji ateroskleroze (78). Još jedan način aktivacije inflamatornog procesa od strane CP vrši se putem stimulacije inflamazoma – kompleksa proteina koji se sastoji od NLRP3 receptora, ASC adaptacionog molekula i kaspaze 1, a predstavlja komponentu urođenog imunog sistema i služi za medijaciju u lučenju interleukina (79). Stimulacija inflamazoma vrši se na nivou regulacije ekspresije gena (80). Predstavljena su različiti efekti CP na inicijaciju i progresiju inflamacije u aterosklerozi, biloda se radi o direktnom djelovanju na upalne ćelije, funkciju endotela i metabolizam lipida, ili uticaju na lučenje medijatora zapaljenja.

Postoji hipoteza o autoimunom efektu CP, koja objašnjava pojavu aterosklerotskih plakova u kojima nije dokazano prisustvo ove bakterije. Moguće je da bakterija ne dospijeva do intime krvnog suda poput trojanskog konja unutar makrofaga, već da inflamaciju stimuliše autoimuni karakter bolesti, usljed molekularne mimikrije HSP60 (faktora virulencije CP) sa

proteinima intime krvnog suda. Heat-shock proteini su lokalizovani intracelularno, a u stanju stresa kao što je infekcija, dolazi do ekspresije HSP na površini ćelije, što aktivira antigen-prezentujuće ćelije i započinje kaskadu imunskog odgovora (81). Hipoteza o molekularnoj mimikriji dobija na značaju uzevši u obzir podatak da humani HSP60 (hHSP60) pokazuje 85% podudarnosti sa HSP60 kod CP (cHSP60) (82).

Pronalazak dentalnih patogena u aterosklerotskim plakovima, kao i njihova rasprostranjenost u opštoj populaciji, stvorile su sumnju da ove bakterije igraju ulogu u etiopatogenezi ovog procesa. Prisustvo *P. gingivalis* u usnoj duplji praćeno je sistemskim odgovorom u vidu povećane koncentracije IL-6 i CRP, što dokazuje prisustvo reakcije organizma. Nema odgovora na pitanje da li dolazi do direktne invazije mikroorganizma u intimu ili je u pitanju sistemsko stanje inflamacije koje započinje ateroskleroza. Eksperimentalno je dokazano da se makrofagi brže pretvaraju u pjenaste ćelije u stanju hiperholesterolemije i infekcije sa *P. gingivalis*, dok mutirana vrsta ove bakterije – DPG3 (genetski modificovana u pravcu nedostatka fimbrija, jednog od faktora virulencije) nema takav učinak. Ovaj podatak budi sumnju da su procesi adherencije i invazije bakterije podstrek za fagocitozu lipoproteina. Istraživanje vršeno na apoE-null miševima (genetski modificovani da budu podložni hiperholesterolemiji) pokazalo je da oralna infekcija sa *P. gingivalis* izaziva ateroskleroza aorte i njenih grana (83).

Kada su u pitanju drugi mikroorganizmi za koje se sumnja da su izazivači ateroskleroze, postoji manje dokaza o njihovoj povezanosti sa ovom bolešću, nego što je to slučaj sa prethodno pomenutim bakterijama. Prisustvo citomegalovirusa u aterosklerotskom plaku je u više istraživanja dokazano uz pomoć PCR, *in situ* hibridizacije i imunohistohemijski, dok nije utvrđena značajna povezanost visokog titra antitijela na CMV sa pojavom ateroskleroze. Ipak, nađena je veća učestalost ateroskleroze kod pacijenata koji imaju visok titar antitijela na CMV i visoke vrijednosti CRP, što navodi na mogućnost provociranja ateroskleroze od strane sistemskog odgovora na virusnu infekciju (84).

1.5. Genetska osnova ateroskleroze

Smatra se da se sklonost ka aterosklerozi nasljeđuje kao kompleksna genetska karakteristika organizma i to poligenskim putem nasljeđivanja. Uz opisano mendelsko nasljeđivanje familijarne hiperholesterolemije, savremena istraživanja usmjerena su na ispitivanje genetske osnove odgovora organizma na infektivni agens. Fokus je premješten sa

ispitivanja velikih gena, koji kodiraju kvalitativne osobine, na male gene koji ispoljavaju svoj efekat u kvantitativnom maniru. Na hromozomu 1 miša nađen je sst1 genski lokus, koji sadrži gene čija ekspresija dovodi do povećane osjetljivosti na tuberkulozu i infekcije drugim intracelularnim patogenim bakterijama. Unutar sst1 lokusa nalazi se grupa gena Ifi-75, čiji je najznačajniji predstavnik gen Ipr1. Među miševima otpornim na infekciju, Ipr1 je pojačano eksprimiran, a do njegove ekspresije ne dolazi u populaciji miševa koji su podložni infekciji (85). Najbliži ljudski homolog ovog gena je gen SP110, koji se nalazi na hromozomu 2, a smatra se da kodira transkripcione kofaktore u sklopu dejstva hormonskih receptora u jedru ćelije. Na ovaj način, Ipr1 i SP110 bi uticali na dejstvo brojnih hormona, između ostalih kortikosteroida, vitamina D i retinoične kiseline, sa posljedicama na životni ciklus imunskih ćelija i na inflamatorni odgovor domaćina (86). Protein SP110, koji kodira istoimeni gen, primijećen je u nuklearnim tijelima (multiproteinskim kompleksima koji vrše regulaciju transkripcije gena, a lokalizovani su u jedru) u akutnim virusnim infekcijama, promijelocitnoj leukemiji, kao i brojnim autoimunim i malignim bolestima (87). Mutacije SP110 su u humanoj patologiji povezane sa venookluzivnom bolešću jetre udruženom sa imunodeficijencijom, tj. VODI (88).

Na osnovu dimorfizma u sst1 lokusu, prepoznate su dvije vrste miševa: C3HeB/FeJ (osjetljivina infekciju) i C57BL/6J (otporni na infekciju) (89). Podložnost infekciji i njenom destruktivnom maniru uzrokovana je neadekvatnim inflamatornim odgovorom domaćina. Dokazano je da miševi koji pripadaju grupi osjetljivih brže razvijaju nekrozu u plućnim tuberkuloznim granulomima (90). Takođe, opisan je uticaj gena u sst1 lokusu na osjetljivost miša na CP. Budući da je u pitanju intracelularni patogen, neki elementi odbrane domaćina su slični onima koji se aktiviraju u tuberkulozi. Smatra se da Ipr1 ima uticaj na maturaciju fagozoma u kojem se nalazi intracelularni patogen, što je ključan korak u eliminaciji ovih bakterija. Specifično, ovaj gen utiče na dejstvo makrofaga porijeklom iz kostne srži (BMDM), koji su aktivirani putem IFN- γ . Dokazano je da se CP čak sporije razmnožava u makrofagima C3HeB/FeJ miševa, ali je neadekvatan imunski odgovor ovih miševa odgovoran za povećanu osjetljivost i destruktivni karakter infekcije. Dolazi do lučenja IL-10, koji ima antiinflamatorni efekat, kao i IL-6, koji ima i anti i proinflamatorno dejstvo, što izaziva disregulaciju upalnog odgovora i favorizuje nekrotični proces (91).

Na osnovu stečenog znanja o aterosklerozi, donosi se zaključak da postoje brojna otvorena pitanja koja se tiču patofiziološkog mehanizma nastanka ove bolesti. Razvoj medicinske misli uslovio je premještanje fokusa istraživanja ateroskleroze sa degenerativnog na inflamatorni karakter ove bolesti. Pojava ateroskleroze u mlađoj populaciji bez tradicionalnih

faktora rizika probudila je sumnju da postoji infektivni agens koji služi kao okidač u procesu ateroskleroze. Smatra se da u etiologiji ateroskleroze značajnu ulogu igraju intracelularni patogeni, koji izazivaju hronični inflamatorni odgovor domaćina. Kao glavni predstavnik ove grupe ističe se CP. Opisano je više patofizioloških mehanizama pomoću kojih CP izaziva i pospješuje nastanak i komplikacije aterosklerotskog plaka. Istraživanjem morfoloških, celularnih i molekularnih karakteristika CP pozitivnih plakova, dodatno bi se proširilo znanje o mehanizmu infektivne geneze ateroskleroze. Istraživanjem morfoloških karakteristika plakova koje su od značaja za rizik od progresije i komplikacija plaka (intima-media debljina, prisustvo kolagena I i III elastina) ispitaće se razlike u ekstracelularnom matriksu između CP pozitivnih i negativnih plakova. Takođe, biće ispitane eventualne razlike u inflamatornom i potpornom ćelijskom infiltratu (makrofagi, mastociti, B limfociti, CD4+ i CD8+ T limfociti, kontraktilne i sekretorne glatke mišićne ćelije), kao i disbalans između protektivnih (apo-A, trombomodulin) i aterogenih (apo-B, timidin-fosforilaza, TNF- α , HSP60) faktora. Činjenica da su intracelularni patogeni široko rasprostranjeni u populaciji, te da među seropozitivnim na CP postoji visok procenat onih koji nemaju ateroskrozu, budi sumnju u eventualno postojanje genetske predispozicije za razvoj infekcije. Detekcijom proizvoda ekspresije SP110 gena stekao bi se uvid u uticaj gena na otpornost domaćina i razvoj ateroskleroze. Moderan pristup istraživanju ateroskleroze i objedinjena saznanja na ovom polju predstavljaju neophodne korake u prevenciji i liječenju kardiovaskularne bolesti.

2. CILJ

Uprkos činjenici da postoje dokazi o prisustvu CP u aterosklerotskom plaku, kao i u patofiziološkom procesu ateroskleroze, još uvijek nije definisano mjesto koje bakterija zauzima u nastanku i razvoju ove bolesti. Opšti cilj ovog istraživanja je definisanje uticaja CP na aterosklerotski proces, uz poseban osvrt na karakteristike aterosklerotskih plakova pozitivnih na ovaj infektivni agens.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Utvrđivanje prisustva ili odsustva CP u aterosklerotskom plaku ispitanika u arterijskim krvnim sudovima (koronarnim arterijama, karotidnim arterijama, trbušnoj aorti i arterijama Willisovog prstena) i detekcija morfoloških, celularnih i molekularnih razlika između CP pozitivnih i negativnih plakova.
2. Poređenje klasičnih faktora rizika (BMI, arterijska hipertenzija, hiperlipoproteinemija, diabetes mellitus, porodična anamneza za kardiovaskularne bolesti, pušenje) sa jedne strane, sa podacima o prisustvu ili odsustvu CP u aterosklerotskom plaku.

Pružajući odgovor na ova pitanja, može se napraviti korak u pravcu novih saznanja o uticaju CP u aterosklerozi, čime se stvara se mogućnost za prepoznavanje populacije koja obolijeva od infektivno generisane ateroskleroze. Opisivanjem karakteristika ovakvog "infektivnog" plaka, podiže se kvantum bazičnih znanja o aterosklerozi, čime se stvara osnova za buduća istraživanja novih mogućnosti u prevenciji i liječenju.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je izvršeno na isječcima tkiva krvnih sudova dobijenim sudskomedicinskim obdukcijama na Odjelenju za sudsku medicinu Kliničkog centra Crne Gore u Podgorici.

Istraživanjem je obuhvaćeno 124 ispitanika, od kojih je 63 uzeto u obzir za tumačenje rezultata, budući da je taj broj ispitanika zadovoljio kriterijume za izjašnjavanje o prisustvu CP u aterosklerotskom plaku (vidi: Prisustvo CP u aterosklerotskom plaku). Svi ispitanici su bili muškog pola, prosječne starosti 59 godina (u rasponu od 32 do 90 godina). Uzrok smrti nije obrađivan u ovoj studiji.

Pomoću postmortalnog intervjua sa porodicom utvrđeno je prisustvo klasičnih faktora rizika za aterosklozu (hiperlipoproteinemija, šećerna bolest, arterijska hipertenzija, pušenje, porodična anamneza za kardiovaskularnu bolest), a BMI je izračunat na osnovu podataka prikupljenih tokom obdukcije.

Uzorci su uzeti iz djelova krvnih sudova u kojima je bio prisutan makroskopski vidljiv aterosklerotski plak i to u stadijumu masne pruge (identifikovan kao područje žućkaste prebojenosti, u nivou ili iznad nivoaa intime). Ispitivani su uzorci koji su pripadali stadijumu II i III ateroskleroze. Krvni sudovi obuhvaćeni istraživanjem su sljedeći: karotidna arterija, koronarne arterije, arterije Willisovog osmougla i trbušna aorta. Nakon uzorkovanja, tkivo je fiksirano u 4% formalinu i formirani su parafinski kalupi. Sprovedeno je rutinsko bojenje hematoksilinom i eozinom, kao i imunohistohemijsko bojenje. Sva antitijela korišćena u studiji su proizvedena od strane Abcam-a (Abcam, Cambridge, United Kingdom), izuzev antitijela upotrijebljenih za utvrđivanje prisustva CP.

Studija je izvedena u dva pravca: uvrđivanje prisustva CP u aterosklerotskom plaku i opis morfoloških, celularnih i molekularnih razlika između CP-pozitivnih i CP-negativnih plakova, kao i ispitivanje genetske predispozicije za osjetljivost na infekciju intracelularnim patogenima.

3.1. Prisustvo CP u aterosklerotskom plaku

Imunohistohemijsko bojenje na CP izvršeno je pomoću dva antitijela: poliklonskog antitijela specifičnog za OMP1 (Medac Inc, Hamburg, Germany, 1:10) i monoklonskog antitijela specifičnog za CP, RR-402 (Washington Research Foundation, Seattle, United States of America, 1:1000). Kao pouzdan pokazatelj prisustva CP u plaku tumačio se pozitivan nalaz oba markera, a negativan nalaz oba markera predstavljao je pouzdan nalaz odsustva CP.

3.2. Morfološke karakteristike plaka

Ispitivano je nekoliko morfoloških karakteristika plaka u pravcu detekcije eventualnih razlika u građi CP-pozitivnih i CP-negativnih plakova. Zajednička debljina intime i medije (intima-medija debljina) izmjerena je uz pomoć softverskog dodatka ZEN (2.3 lite, blue edition) za mikroskop Zeiss Axio Scope A1. Prisustvo i raspored kolagena I i III utvrđeno je uz pomoć poliklonskog antitijela na kolagen I (Anti-Collagen I antibody, 1:250) i kolagen III (Anti-Collagen III antibody, 1:1000). Takođe, plakovi su analizirani na prisustvo i distribuciju elastina, uz pomoć poliklonskog antitijela na elastin (Anti-Elastin antibody 1:50).

3.3. Celularne karakteristike plaka

Među ćelijama čije je prisustvo i raspored analizirano u plaku nalaze se: makrofagi, mastociti, T i B limfociti, kontraktilne i sekretorne glatke mišićne ćelije. Broj makrofaga i njihov raspored ispitivani su uz pomoć poliklonskog antitijela na CD68 glikoprotein (Anti-CD68 antibody, 1:500), dok su mastociti ispitivani pomoću monoklonskog antitijela na triptazu mast ćelija (Anti-Mast Cell Tryptase antibody, 1:10000). Broj i distribucija B limfocita su ispitivani pomoću monoklonskog antitijela na CD20 glikozilirani fosfoprotein (Anti-CD20 antibody, 1:20), dok su T limfociti ispitivani uz pomoć monoklonskog antitijela na CD4 glikoprotein (Anti-CD4 antibody, 1:500) i poliklonskog antitijela na CD8 glikoprotein (Anti-CD8 antibody, 1:200). Plakovi su analizirani na broj glatkih mišićnih ćelija i njihov raspored, i to pomoću poliklonskog antitijela na aktin mišićnih ćelija (Anti-smooth muscle Actin antibody, 1:100) za kontraktilne mišićne ćelije i monoklonskog antitijela na GM130 (cis-Goldži marker) (Anti-GM130 antibody, 1:100) za sekretorne glatke mišićne ćelije.

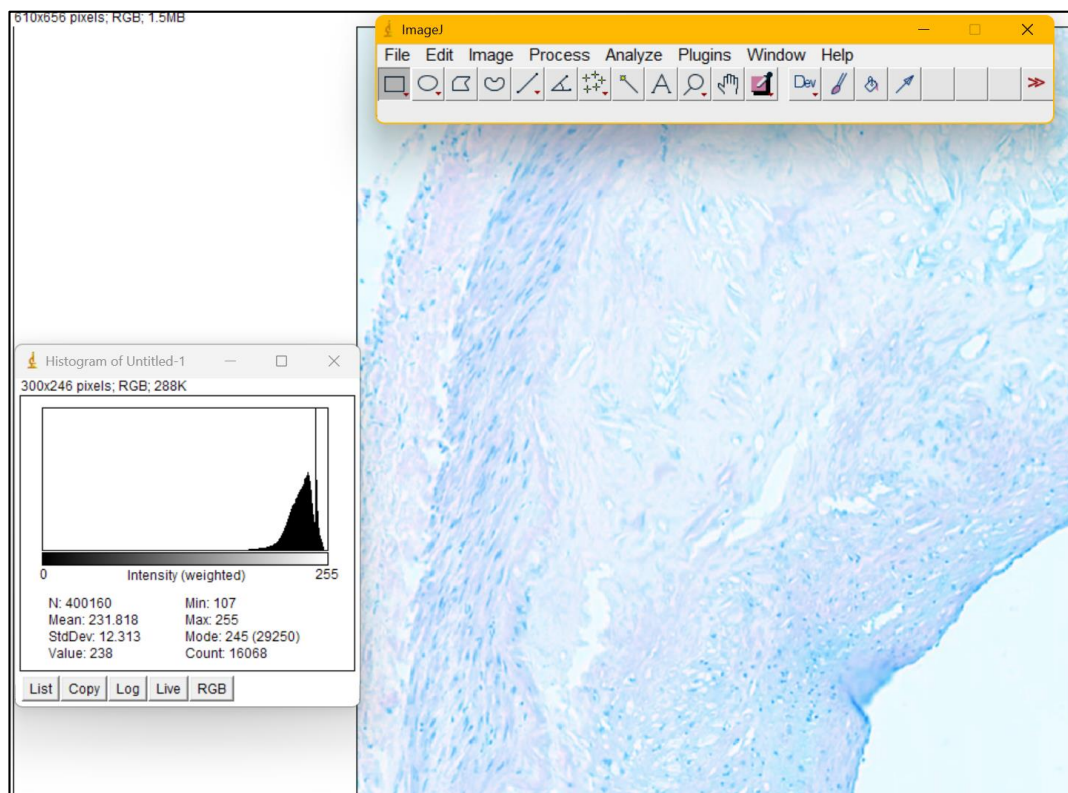
3.4. Molekularne karakteristike plaka

Plakovi su ispitivani na prisustvo više molekula koji imaju ulogu u procesu ateroskleroze. Prisustvo apo-A ispitivano je uz pomoć monoklonskog antitijela na apo-A (Anti-apolipoprotein A antibody, 1:10, dok je prisustvo apo-B ispitivano pomoću poliklonskog antitijela na apo-B (Anti-apolipoprotein B antibody, 1:100). Trombomodulin na površini endotela je ispitivan uz pomoć monoklonskog antitijela na trombomodulin (Anti-Thrombomodulin antibody, 1:200). Timidin-fosforilaza je ispitivana uz pomoć poliklonskog antitijela na N-kraj tog molekula (Anti-Thymidine Phosphorylase antibody – N terminal, 1:50). Prisustvo TNF- α ispitivano je pomoću poliklonskog antitijela na TNF- α (Anti-TNFalpha antibody, 1:100). Prisustvo Sp110 je ispitivano pomoću poliklonskog antitijela na Sp110 (Anti-SP110 antibody, 1:200), dok je prisustvo HSP60 ispitivano uz pomoć poliklonskog antitijela na HSP60 (Anti-Hsp60 antibody, 1:100).

3.5. Statistička obrada i prikazivanje podataka

Za statističku obradu korišćen je IBM Statistics (SPSS) 10. Upotrijebljene su metode deskriptivne statistike, kao i Studentov t-test, ANOVA, χ^2 test i logistička regresija. Podaci su prikazani grafički i tabelarno, uz ilustracije u vidu mikrofotografija. Mikrofotografije koje su analizirane su učinjene uz pomoć digitalnog fotoaparata Zeiss Axiocam 101 Color, rezolucije 5 megapiksela, uz upotrebu bijelog filtera. Sve fotografije su načinjene na istom osvjetljenju. Fotografije su digitalizovane korištenjem softvera ZEN 2.3 lite (blue edition, Carl Zeiss Microscopy, GmbH, 2011) na uvećanju od 40x/0,75, a za obradu imunohistohemijskih snimaka korišten je Plug-in IHC profiler a u okviru softvera ImageJ (slika 1). Analiza je dakle rađena softverskim putem, gdje je sam program definisao stepen imunohistohemijske pozitivnosti.

Slika 1. ImageJ sofer



4. REZULTATI

4.1. Starost i ispitivani faktori rizika za kardiovaskularne bolesti

Prosječna starost u trenutku smrti je iznosila 58,89 godina (u rasponu od 32 do 90 godina, sa standardnom devijacijom od 15,77). Prosječna starost CP pozitivnih osoba u trenutku smrti je iznosila $55,45 \pm 15,41$, dok je prosječna starost CP negativnih osoba u trenutku smrti iznosila $62,67 \pm 15,36$. CP negativne osobe su bile statistički značajno starije ($p < 0.001$), dokazano t -testom. BMI CP pozitivnih osoba je iznosio $27,69 \pm 4,72$, dok je BMI CP negativnih osoba iznosio $32,67 \pm 4,40$. Studentov t – test je pokazao da su CP negativne osobe imale statistički značajno veći BMI ($p < 0.001$).

Analizirana je zastupljenost pojedinačnih klasičnih faktora rizika u grupama različitim po CP pozitivnosti, a zatim je za svaki faktor rizika ponaosob urađen χ^2 test da bi se utvrdila eventualna statistička značajnost u razlici prisutnosti određenih faktora.

Tabela 1. Zastupljenost pojedinačnih klasičnih faktora rizika u grupama različitim po CP pozitivnosti

Faktori rizika		CP -	CP +	p vrijednost χ^2 testa
Hiperholesterolemija	-	13 (43.3%)	23 (69.7%)	< 0.001
	+	17 (56.7%)	10 (30.3%)	
Diabetes mellitus	-	21 (70%)	28 (84.8%)	= 0.005
	+	9 (30%)	5 (15.2%)	
Arterijska hipertenzija	-	15 (50%)	18 (54.5%)	= 0.471
	+	15 (50%)	15 (45.5%)	
Porodična anamneza za KVB*	-	10 (33.3%)	15 (45.5%)	= 0.049
	+	20 (66.7%)	18 (54.5%)	
Pušenje	-	11 (36.7%)	11 (33.3%)	= 0.579
	+	19 (63.3%)	22 (66.7%)	
Ukupno		30 (100%)	33 (100%)	
* KVB = kardiovaskularne bolesti				

χ^2 test je pokazao da je:

1. Hiperholesterolemija bila značajno prisutnija u grupi CP negativnih leševa ($p < 0.001$);
2. *Diabetes mellitus* bio značajno prisutniji u grupi CP negativnih leševa ($p = 0.005$);
3. Pozitivna porodična anamneza za kardiovaskularna oboljenja bila prisutnija u grupi CP negativnih leševa ($p = 0.049$);
4. Nije bilo značajne razlike u incidenci arterijske hipertenzije i pušenja između CP negativnih i CP pozitivnih leševa.

Zatim, sprovedena je logistička regresija kao metod simultanog istraživanja odnosa svih ispitivanih faktora sa CP pozitivnošću (za razliku od prethodne analize u kojoj su faktori rizika ispitivani ponaosob).

Tabela 2. Logistička regresija odnosa klasičnih faktora rizika sa CP pozitivnošću

Ispitivani faktori	Parametri logističke regresije		
	OR*	p vrijednost	95% interval pouzdanosti
Uzrast	0.965	= 0.001	0.944 – 0.986
Hiperholesterolemija	0.195	< 0.001	0.096 – 0.397
<i>Diabetes mellitus</i>	0.371	= 0.013	0.169 – 0.811
Arterijska hipertenzija	0.448	= 0.030	0.217 – 0.925
Pozitivna porodična anamneza za KVB**	0.929	= 0.832	0.471 – 1.832
Pušenje	0.755	= 0.446	0.366 – 1.556
BMI***	0.773	< 0.001	0.718 – 0.832
* OR = odds ratio			
** KVB = kardiovaskularne bolesti			
*** BMI = eng. body mass index (indeks tjelesne mase)			

Ukoliko je OR (eng. odds ratio; „odnos šansi“) kao proizvod logističke regresije manji od 1, taj rezultat predstavlja da je određeni ispitivani faktor negativno povezan sa rezultatom

koji se ispituje. U ovom slučaju, budući da je rezultat bio CP pozitivnost plaka, nađeno je da su uzrast (OR = 0.965), hiperholesterolemija (OR = 0.195), diabetes mellitus (OR = 0.371), arterijska hipertenzija (OR = 0.448) i BMI (OR = 0.773) bili u negativnoj korelaciji sa CP pozitivnošću. Najznačajnija negativna korelacija (tj. najmanji OR) pokazala je hiperholesterolemija (OR = 0.195; $p < 0.001$). Nije nađen značajan odnos između CP pozitivnosti i pozitivne porodične anamneze za kardiovaskularne bolesti, kao ni pušenja.

4.2. Karakteristike CP pozitivnih i CP negativnih plakova

Ukupno je ispitano 252 uzorka arterija (po 63 uzorka koronarnih arterija, karotidnih arterija, aorte, kao i arterija Willisovog kruga). 33 leša je bilo pozitivno na CP; dok je 30 bilo negativno.

4.2.1. Morfološke karakteristike plaka:

Tabela 3. Intima-media debljina

	Min	Ma x	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednos t
Karotidne arterije	7	16	11.86	2.78	12.03 ± 2.95	11.67 ± 2.60	0.608
Willisov krug	4	10	6.83	1.89	6.97 ± 1.90	6.69 ± 1.92	0.577
Aorta	9	19	13.71	3.39	13.30 ± 3.23	14.17 ± 3.55	0.316
Koronarne arterije	4	13	8.27	2.78	8.21 ± 2.70	8.33 ± 2.89	0.864
Ukupno	4	19	10.17	3.89	10.06 ± 3.83	10.28 ± 3.96	0.65
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Nisu primijećene značajne razlike između intima-medija debljine između CP pozitivnih i negativnih plakova.

Tabela 4. Kolagen I

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	<i>C. pneumoniae</i> +	<i>C. pneumoniae</i> -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	10	35	20.70	6.40	19.09 ± 4.59	22.47 ± 7.63	0.036
Willisov krug	15	40	26.41	6.06	23.03 ± 4.63	29.83 ± 5.62	< 0.001
Aorta	10	34	19.61	5.88	18.12 ± 4.43	21.13 ± 6.90	0.048
Koronarne arterije	10	35	20.74	7.23	17.39 ± 5.28	24.43 ± 7.36	< 0.001
Ukupno	10	40	21.87	6.91	19.51 ± 5.22	24.47 ± 7.61	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Primijećena je značajna razlika između CP pozitivnih i negativnih plakova kada je u pitanju ekspresija kolagena I: najizraženija razlika je u arterijama Willisovog kruga i u koronarnim arterijama, sa većom ekspresijom kolagena I u CP negativnim plakovima.

Tabela 5. Kolagen III

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	14	45	29.59	8.91	35.59 ± 6.08	22.63 ± 5.78	< 0.001
Willisov krug	10	35	23.65	7.34	29.09 ± 4.54	17.67 ± 4.69	< 0.001
Aorta	11	35	22.38	6.00	26.10 ± 4.61	18.30 ± 4.54	< 0.001
Koronarne arterije	10	35	22.17	6.68	26.48 ± 5.33	17.43 ± 4.43	< 0.001
Ukupno	10	45	24.48	7.88	29.39 ± 6.47	19.00 ± 5.27	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

CP pozitivni plakovi su imali značajno veću ekspresiju kolagena III u usporedbi sa CP negativnim plakovima. Sve ispitivane arterije su pokazale ovu razliku.

Tabela 7. Elastin

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	12	35	22.15	6.71	19.60 ± 5.94	24.97 ± 6.47	0.001
Willisov krug	15	40	25.41	7.07	23.93 ± 6.26	27.03 ± 7.65	0.083
Aorta	12	35	22.98	5.64	22.33 ± 5.49	23.70 ± 5.82	0.341
Koronarne arterije	12	34	22.40	5.89	20.88 ± 5.67	24.06 ± 5.78	0.031
Ukupno	12	40	23.24	6.45	21.69 ± 6.00	24.94 ± 6.52	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p = 0.017$							

CP negativni plakovi su imali veću ekspresiju elastina (najzastupljenije u karotidnim i koronarnim arterijama, bez značajne razlike u aorti i Willisovom krugu).

4.2.2. Celularne karakteristike plaka:

Tabela 8. Makrofagi (CD68)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	5	16	9.32	2.67	8.93 ± 2.33	9.73 ± 2.98	0.241
Willisov krug	3	8	5.30	1.87	5.58 ± 1.69	5.00 ± 2.03	0.226
Aorta	5	16	10.08	3.36	8.58 ± 2.67	11.73 ± 3.29	< 0.001
Koronarne arterije	5	15	9.57	2.92	8.63 ± 2.77	10.60 ± 2.77	0.007
Ukupno	3	16	8.56	3.34	7.92 ± 2.74	9.27 ± 3.78	0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Prisustvo makrofaga je bilo zapaženije u CP negativnim plakovima (najizraženije u aorti i koronarnim arterijama), bez značajnih razlika između CP pozitivnih i negativnih plakova u karotidnim arterijama i Willisovom krugu.

Tabela 9. Mastociti (triptaza)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	6	19	12.14	4.31	11.37 ± 4.31	13.00 ± 4.23	0.134
Willisov krug	3	15	8.29	3.94	8.78 ± 4.04	7.73 ± 3.82	0.293
Aorta	6	19	11.92	4.22	11.72 ± 4.69	12.13 ± 3.71	0.706
Koronarne arterije	6	19	12.19	4.26	11.90 ± 4.31	12.50 ± 4.26	0.587
Ukupno	3	19	11.13	4.48	10.94 ± 4.48	11.34 ± 4.91	0.468
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Nije bilo značajne razlike između CP pozitivnih i negativnih plakova po pitanju prisustva mastocita.

Tabela 10. B limfociti (CD20)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	11	44	27.73	10.35	26.58 ± 11.99	29.00 ± 8.18	0.357
Willisov krug	5	24	15.23	5.48	14.88 ± 6.27	15.63 ± 4.51	0.589
Aorta	7	35	19.48	7.35	23.45 ± 6.93	15.10 ± 4.97	< 0.001
Koronarne arterije	7	35	19.43	8.09	22.33 ± 8.86	16.23 ± 5.77	0.002
Ukupno	5	44	20.47	9.16	21.81 ± 9.71	18.99 ± 8.32	0.014
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

CP pozitivni plakovi su imali značajno veću koncentraciju B limfocita, izraženo u aorti i koronarnim arterijama, bez značajnih razlika u karotidnim arterijama i Willisovom krugu.

Tabela 11. T limfociti (CD4)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	9	44	24.93	10.61	30.63 ± 10.34	18.67 ± 6.68	< 0.001
Willisov krug	8	35	20.62	8.45	20.69 ± 8.61	20.53 ± 8.41	0.94
Aorta	10	44	24.48	9.49	29.03 ± 10.02	19.47 ± 5.72	< 0.001
Koronarne arterije	9	45	23.25	9.39	26.69 ± 10.81	19.47 ± 5.64	0.002
Ukupno	8	45	23.32	9.61	26.67 ± 10.52	19.53 ± 6.66	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p = 0.052$							

CD4+ T limfociti su bili prisutniji u CP pozitivnim plakovima (izraženo u karotidnim, koronarnim arterijama i aorti), bez razlika u arterijama Willisovog kruga.

Tabela 12. T limfociti (CD8)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	9	44	24.81	10.11	30.12 ± 10.03	18.97 ± 6.35	< 0.001
Willisov krug	8	35	20.73	8.63	19.79 ± 8.63	21.77 ± 8.65	0.368
Aorta	10	44	25.78	9.69	30.30 ± 9.25	20.80 ± 7.56	< 0.001
Koronarne arterije	9	43	25.73	10.34	31.39 ± 9.67	19.50 ± 6.98	< 0.001
Ukupno	8	44	24.27	9.88	27.90 ± 10.44	20.26 ± 7.42	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: <i>p</i> = 0.01							

Isti zaključak je postignut ispitivanjem infiltracije CD8+ T limfocita.

Tabela 13. Kontraktilne GMĆ (aktin)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	8	25	15.01	4.73	13.30 ± 3.94	16.90 ± 4.87	0.002
Willisov krug	5	15	10.27	2.67	9.28 ± 2.74	11.37 ± 2.13	0.001
Aorta	8	25	16.05	4.88	13.51 ± 4.06	18.83 ± 4.19	< 0.001
Koronarne arterije	8	25	16.22	4.76	13.15 ± 4.05	19.38 ± 3.71	< 0.001
Ukupno	8	25	14.39	4.96	12.41 ± 4.03	16.56 ± 4.99	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: <i>p</i> < 0.001							

CP negativni plakovi su pokazali veću zastupljenost kontraktilnih glatkih mišićnih ćelija (zastupljeno u svim arterijama).

Tabela 14. Sekretorne GMC (GM-130)

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	8	25	16.20	4.84	18.88 ± 3.68	13.27 ± 4.26	< 0.001
Willisov krug	8	15	11.41	2.35	11.54 ± 2.05	11.27 ± 2.66	0.641
Aorta	8	25	16.29	4.74	18.85 ± 4.07	13.47 ± 3.77	< 0.001
Koronarne arterije	8	25	16.41	4.66	19.42 ± 3.58	13.10 ± 3.27	< 0.001
Ukupno	8	25	15.08	4.75	17.17 ± 4.71	12.78 ± 3.61	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

S druge strane, sekretorne glatke mišićne ćelije su bile zastupljenije u CP pozitivnim plakovima (u svim arterijama osim u Willisovom krugu).

4.2.3. Molekularne karakteristike plaka:

Nije bilo značajne razlike između CP pozitivnih i negativnih plakova u koncentraciji apolipoproteina A i B, trombomodulina, kao i timidin-fosforilaze.

Tabela 15. Apolipoprotein A

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	10	40	24.57	10.33	22.61 ± 9.97	26.73 ± 10.44	0.114
Willisov krug	6	22	14.32	4.22	13.88 ± 4.11	14.80 ± 4.36	0.392
Aorta	10	40	25.03	9.06	24.24 ± 9.26	25.90 ± 8.92	0.437
Koronarne arterije	10	40	23.52	9.01	23.67 ± 9.64	23.37 ± 8.43	0.896
Ukupno	6	40	21.86	9.52	21.09 ± 9.48	22.70 ± 9.51	0.182
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Tabela 16. Apolipoprotein B

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	10	49	30.44	11.94	30.00 ± 11.67	30.93 ± 12.41	0.76
Willisov krug	10	35	21.33	6.36	20.58 ± 5.21	22.17 ± 7.42	0.325
Aorta	11	55	35.81	12.38	33.93 ± 11.18	37.87 ± 13.47	0.211
Koronarne arterije	10	54	29.42	13.92	27.03 ± 14.56	32.07 ± 12.93	0.153
Ukupno	10	55	29.25	12.57	27.89 ± 12.09	30.76 ± 12.95	0.07
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Tabela 17. Trombomodulin

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	1	7	3.86	2.06	3.81 ± 1.97	3.90 ± 2.19	0.877
Willisov krug	1	7	3.62	1.72	3.27 ± 1.37	4.00 ± 1.98	0.0903
Aorta	1	7	3.95	1.99	4.30 ± 1.94	3.57 ± 2.01	0.145
Koronarne arterije	1	7	4.06	1.86	3.81 ± 1.78	4.33 ± 1.93	0.275
Ukupno	1	7	3.87	1.91	3.80 ± 1.80	3.95 ± 2.02	0.542
ANOVA za poređenje između arterija: $p = 0.605$							

Tabela 18. Timidin-fosforilaza

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	10	18	13.63	2.47	13.33 ± 2.22	13.97 ± 2.72	0.314
Willisov krug	9	15	12.41	1.99	12.79 ± 1.82	12.00 ± 2.12	0.117
Aorta	9	15	12.36	1.74	12.61 ± 1.49	12.10 ± 1.97	0.253
Koronarne arterije	9	15	11.83	1.98	11.91 ± 1.40	11.73 ± 2.49	0.728
Ukupno	9	18	12.56	2.15	12.66 ± 1.82	12.45 ± 2.48	0.443
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

Tabela 18. TNF- α

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	7	25	15.19	5.29	12.48 $\pm$ 4.64	18.17 $\pm$ 4.29	< 0.001
Willisov krug	5	15	9.57	2.87	9.58 $\pm$ 2.72	9.57 $\pm$ 3.07	0.99
Aorta	7	25	15.49	5.07	12.94 $\pm$ 4.23	18.30 $\pm$ 4.43	< 0.001
Koronarne arterije	7	25	15.79	5.54	13.61 $\pm$ 5.02	18.20 $\pm$ 5.13	0.001
Ukupno	5	25	14.01	5.43	12.15 $\pm$ 4.47	16.06 $\pm$ 5.67	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p < 0.001$							

CP negativni plakovi su pokazali veću ekspresiju TNF- α (razlika prisutna u svim arterijama osim u Willisovom krugu).

Tabela 19. SP110

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	0	29	10.65	9.01	3.33 $\pm$ 2.13	18.70 $\pm$ 6.37	< 0.001
Willisov krug	0	25	9.78	7.89	3.21 $\pm$ 1.52	17.00 $\pm$ 5.23	< 0.001
Aorta	0	25	10.51	8.78	2.91 $\pm$ 1.65	18.87 $\pm$ 4.88	< 0.001
Koronarne arterije	0	25	9.44	7.83	2.79 $\pm$ 1.87	16.77 $\pm$ 4.63	< 0.001
Ukupno	0	29	10.09	8.36	3.07 $\pm$ 1.79	17.83 $\pm$ 5.34	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p = 0.826$							

SP110 je bio značajno više eksprimiran u CP negativnim plakovima u svim ispitivanim arterijama.

Tabela 20. HSP60

	Min	Max	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	CP +	CP -	<i>p</i> vrijednost
Karotidne arterije	5	25	14.67	4.99	17.21 ± 3.82	11.87 ± 4.65	< 0.001
Willisov krug	6	24	13.36	4.84	16.33 ± 4.28	10.10 ± 2.96	< 0.001
Aorta	7	24	13.91	4.49	16.72 ± 4.14	10.80 ± 2.28	< 0.001
Koronarne arterije	6	25	14.08	4.60	16.45 ± 4.37	11.47 ± 3.28	< 0.001
Ukupno	5	24	14.00	4.73	16.68 ± 4.12	11.05 ± 3.43	< 0.001
ANOVA za poređenje između arterija: $p = 0.49$							

HSP60 je bio značajno više eksprimiran u CP pozitivnim plakovima u svim ispitivanim arterijama.

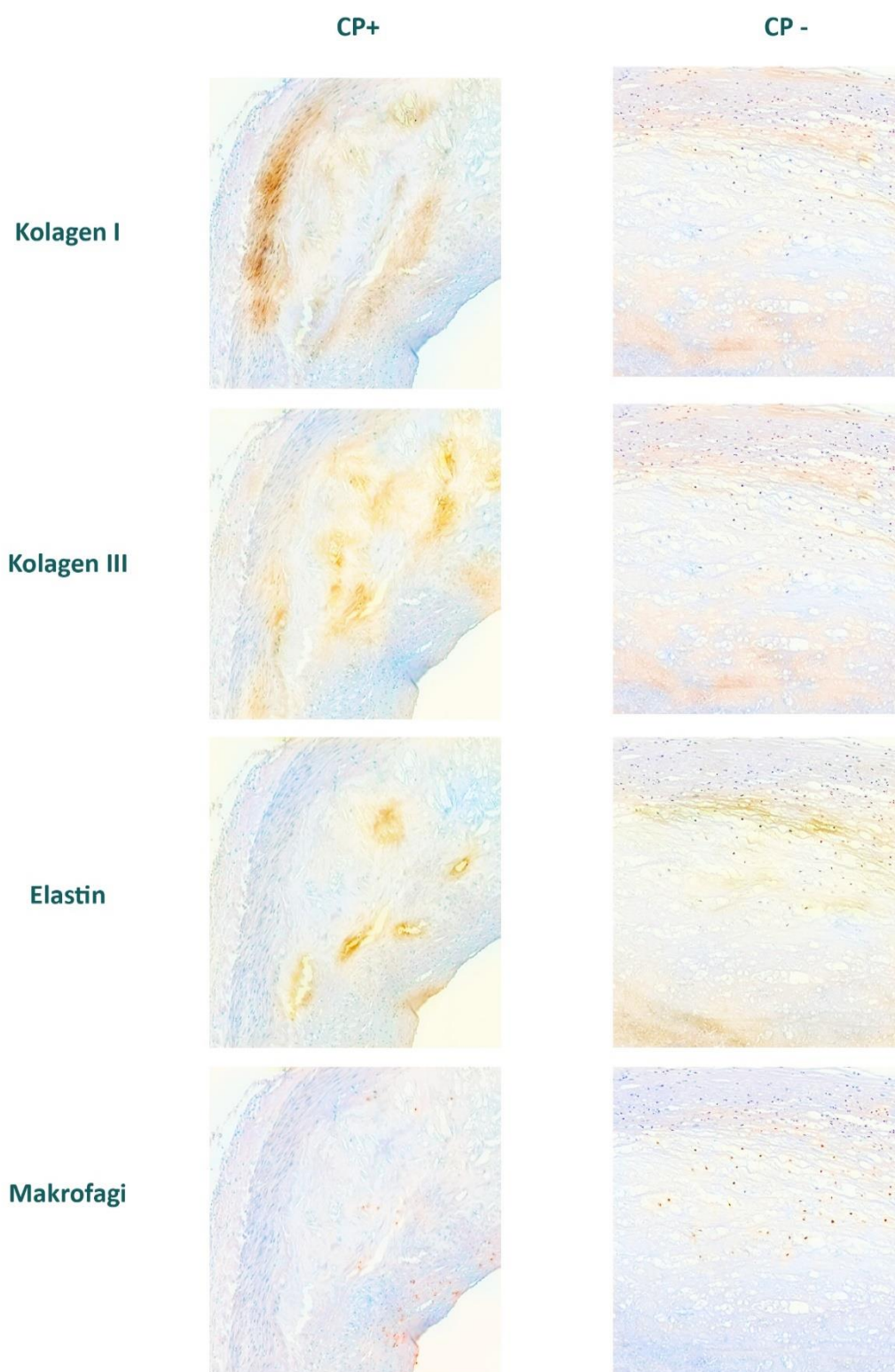
Tabela 21. Sumarno prikazane značajne razlike u odnosu na ispitivani faktor

Faktor	Izraženiji u	Arterije sa značajnom razlikom
Kolagen I	CP-	Sve
Kolagen III	CP+	Sve
Elastin	CP-	Karotide; koronarke
Makrofagi	CP-	Aorta; koronarke
B limfociti	CP+	Aorta; koronarke
CD4+ T limfociti	CP+	Karotide; koronarke; aorta
CD8+ T limfociti	CP+	Karotide; koronarke; aorta
Kontraktilne GMC	CP-	Sve
Sekretorne GMC	CP+	Karotide; koronarke; aorta
TNF- α	CP-	Karotide; koronarke; aorta
SP-110	CP-	Sve
HSP60	CP+	Sve

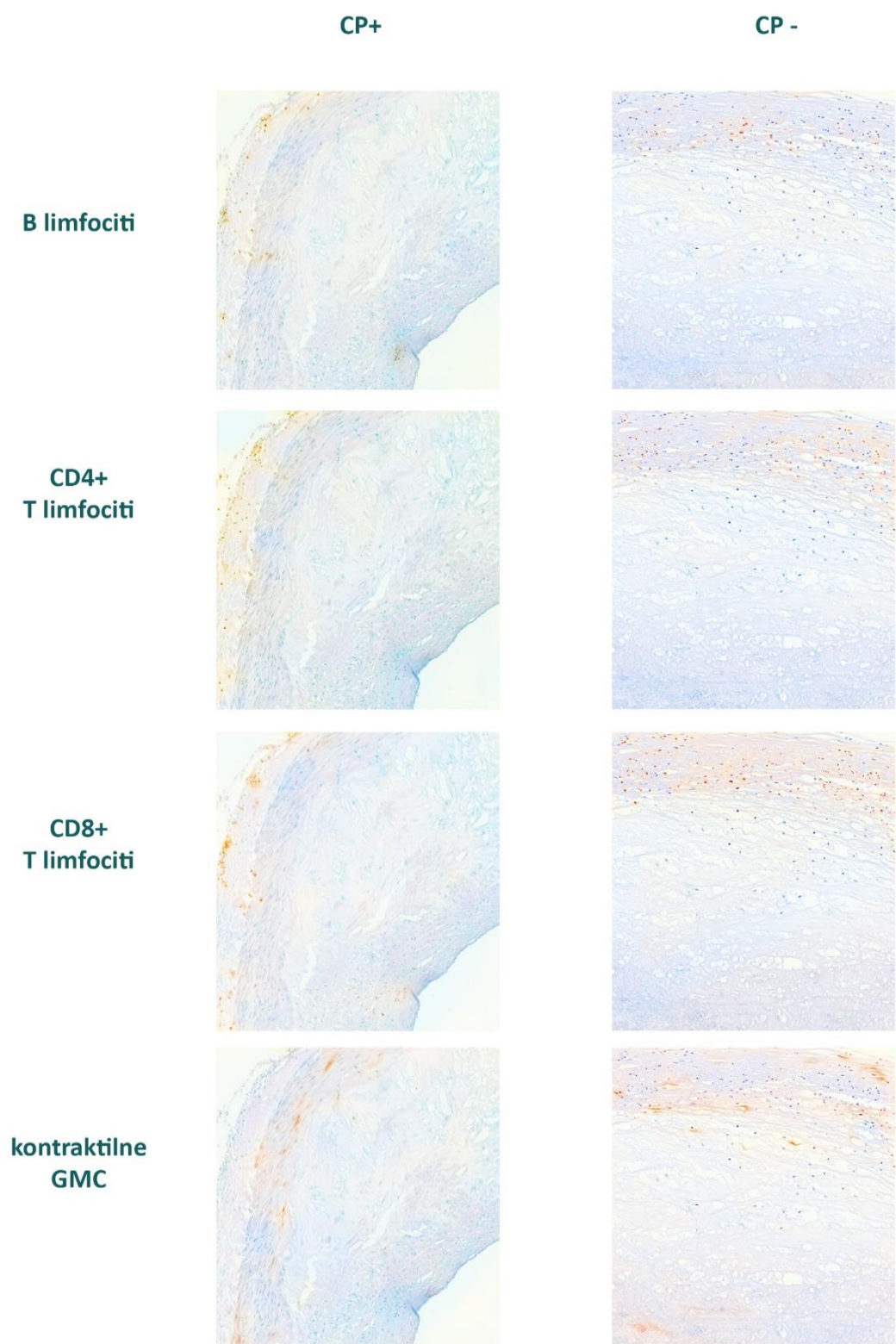
Tabela 22. Sumarno prikazane značajne razlike u odnosu na ispitivane grupe

CP+		CP-	
Morfološke karakteristike			
Kolagen III	Sve ispitivane arterije	Kolagen I	Sve ispitivane arterije
		Elastin	Karotidne i koronarne arterije
Celularne karakteristike			
B limfociti	Aorta; koronarne arterije	Makrofagi	Aorta; koronarne arterije
CD4+ T limfociti	Karotidne i koronarne arterije; aorta		
CD8+ T limfociti	Karotidne i koronarne arterije; aorta		
Sekretorne GMĆ	Karotidne i koronarne arterije; aorta	Kontraktilne GMĆ	Sve ispitivane arterije
Molekularne karakteristike			
HSP60	Sve	SP110	Sve
		TNF- α	Karotidne i koronarne arterije; aorta

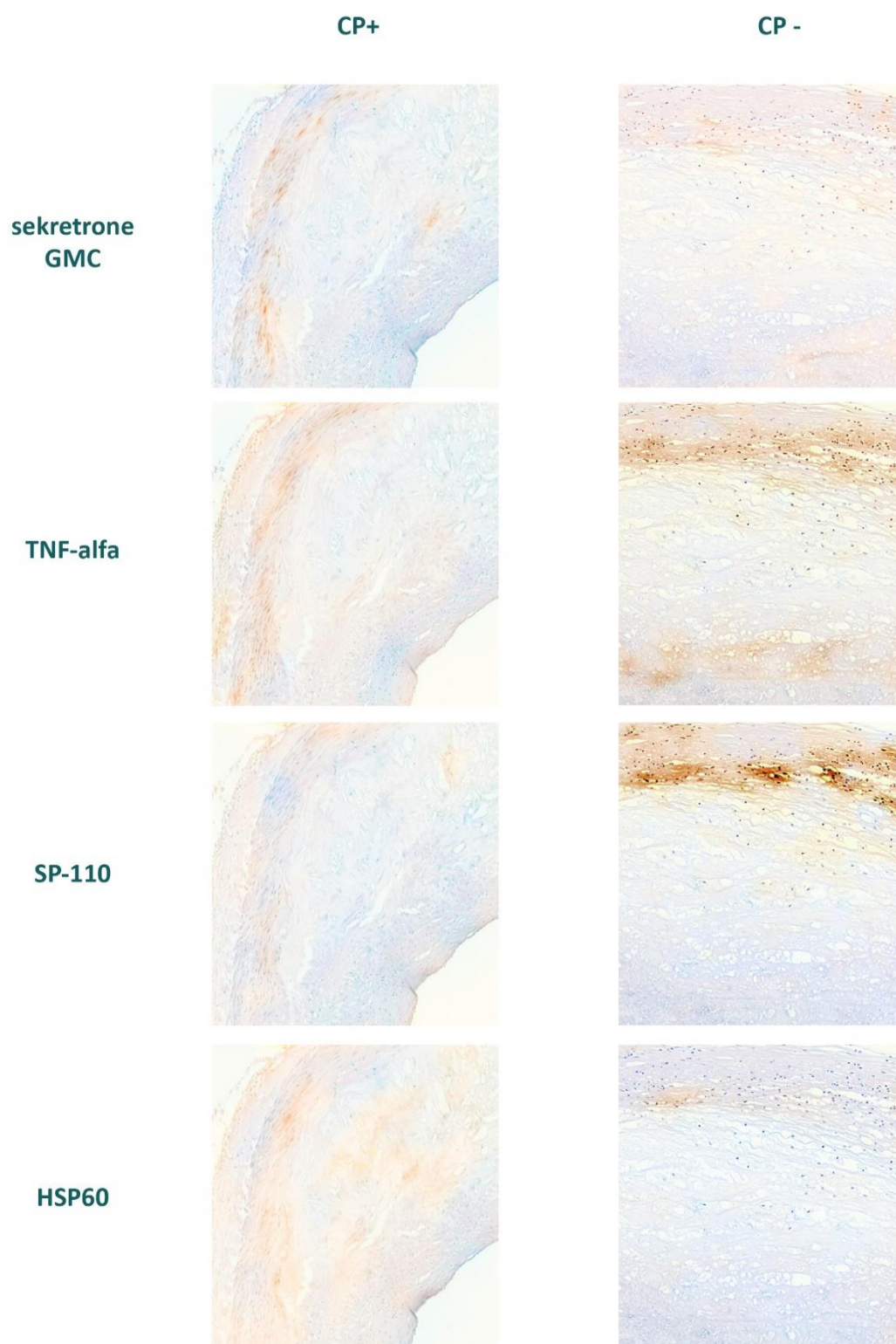
Na slikama 2 – 4 su prikazani su ilustrativni primjeri komparativnih imunohistohemijskih mikrofotografija za CP pozitivne i CP negativne koronarne arterije za ispitivane faktore za koje postoji statistička značajnost razlika u eksresiji.



Slika 2. Primjeri komparativnih imunohistohemijskih mikrofotografija za CP pozitivne i CP negativne koronarne arterije za kolagen I, kolagen III, elastin i makrofage.



Slika 3. Primjeri komparativnih imunohistochemijskih mikrofotografija za CP pozitivne i CP negativne koronarne arterije za B limfocite, CD4 i CD8 limfocite i kontraktilne glatke mišićne ćelije.



Slika 4. Primjeri komparativnih imunohistohemijskih mikrofotografija za CP pozitivne i CP negativne koronarne arterije za sekretrone glatke mišićne ćelije, TNF- α , SP-110 i HSP60.

5. DISKUSIJA

Rezultati ovdje prezentovanog istraživanja su prikazali da su klasični faktori rizika za aterosklerozu bili prisutniji kod osoba sa CP negativnim plakovima. Osobe sa CP negativnim plakovima su bili značajno stariji i sa većim BMI u vrijeme smrti u usporedbi sa CP negativnim. Statistički značajna razlika između CP pozitivnih i negativnih plakova je opisana kada je u pitanju prisustvo hiperholesterolemije, šećerne bolesti i pozitivne porodične anamneze za kardiovaskularna oboljenja, dok nije bilo značajne razlike kada je u pitanju arterijska hipertenzija ili pušenje. Takođe, logistička regresija je pokazala da je hiperholesterolemija imala najizraženiju negativnu korelaciju sa CP pozitivnošću.

5.1. Prisustvo CP u plaku: kontaminacija ili patogenetski faktor

Rezultati koji ukazuju na odsustvo klasičnih faktora rizika za aterosklerozu u ranim CP pozitivnim plakovima sugerišu da bakterijska infekcija može biti patogenetski okidač procesa ateroskleroze u mlađoj populaciji bez značajnog opterećenja faktorima rizika. Izadi i saradnici su dokazali prisustvo DNK CP u plakovima 21.9% pacijenata sa koronarnom aterosklerozom liječenom aorto-koronarnim bajpas graftom. Pozitivan IgG na CP je bio prisutan u 45.7% pacijenata, dok je IgM bio pozitivan u 4.8%; što sugerise da je u pitanju sprega dugoročne, hronične infekcije i uznapredovalog plaka (92). Sessa i saradnici su ispitivali prisustvo DNK CP u aterosklerotskim plakovima, makrofagima i perikarotidnim limfnim čvorovima pacijenata kod kojih je izvršena karotidna endarterektomija zbog stenoze karotidnih arterija veće od 70%. Njihovi rezultati ukazuju da je prisustvo CP u makrofagima bilo zapaženije u grupi pacijenata koji su imali simptomatsku bolest (u usporedbi sa asimptomatskim pacijentima), sa zaključkom da bakterijska infekcija potencijalno doprinosi nestabilnosti plaka sa prethodnom značajnom stenozom krvnog suda (93). Smatra se da bi PCR ispitivanje makrofaga na DNK CP moglo predstavljati značajan dijagnostički korak u procjeni rizika od komplikacija aterosklerotskog plaka (94), prvenstveno zbog dokazanog značaja pozitivnosti makrofaga na CP, kao i zbog lakoće uzimanja makrofaga za analizu (u usporedbi sa histološkom analizom plaka, koja se sprovodi tek nakon intervencija koje su po namjeni terapijske) (95). Pacijenti koji su seropozitivni na CP imaju bržu progresiju subkliničkih, nemanifestnih aterosklerotskih plakova; potvrđeno u studiji Playera i saradnika u kojoj je

kalcifikacija koronarnih arterija na kompjuterizovanoj tomografiji praćena kao pokazatelj stadijuma plaka (96).

Wong i saradnici su 2015. objavili pregled relevantne literature u kom navode da se CP nalazi u 15 – 100% aterosklerotskih plakova. Autori ovog pregleda navode da se bakterija dominantno nalazi u uznapredovalim plakovima, stoga zauzimaju stav da bakterija ne započinje, već potpomaže aterosklerotski proces (97). S druge strane, Assar i saradnici su pokazali da je DNK CP prisutna u 29.4% aterosklerotskih plakova grudne aorte i 5.9% uzoraka unutrašnje grudne arterije (*a. thoracica interna* ili *a. mammaria interna*) koji su uzeti kao kontrolna grupa bez aterosklerotskih plakova. Takođe, njihovi rezultati ukazuju da postoji signifikantna pozitivna korelacija između prisustva CP u uznapredovalom aterosklerotskom plaku i u zdravom krvnom sudu bez ateroskleroze unutar istog organizma, što je oprečno stavovima da je prisustvo bakterija u plaku zapravo kontaminacija zbog oštećenog endotela (98).

U svojoj studiji sprovedenoj na uzorcima karotidnih plakova 33 pacijenta kojima je izvršena karotidna endarterektomija, Chiu je dokazao prisustvo CP u plakovima 63.6% ispitanika. Bakterije su uglavnom bile koncentrisane u blizini rubova plaka, kao i na mjestima formiranog ulkusa ili tromba, što je navelo autora na zaključak da prisustvo i patogenetska aktivnost bakterija mogu biti okidač za nastanak komplikacija plaka (99). Smatra se da je agregacija CP u regionima plaka predisponiranim za pojavu komplikacija udružena sa fokusima infiltracije T limfocita, što sugeriše bakterijsku medijaciju inflamatornog odgovora koji dovodi do rupture plaka (100).

Loehe i saradnici su u istraživanju sprovedenom na uznapredovalim plakovima ateroskleroze naveli prisustvo CP u 66% slučajeva, uglavom u plakovima u aorti. Grupa ispitanika sa aterosklerozom aorte i CP pozitivnim plakovima je dominantno bila starije životne dobi, a nije primijećena razlika u histološkoj uznapredovalosti aterosklerotskog procesa između CP pozitivnih i negativnih plakova. Bazirano na ovim nalazima, autori smatraju da je u pitanju kontaminacija plaka ovom bakterijom, te da CP nema uticaj na etiologiju ateroskleroze (101). Sličan stav zauzimaju Al-Younes i saradnici, koji su opisali visoku seropozitivnost na CP u grupi pacijenata sa simptomatskim koronarnim plakovima (koronarnom bolešću), približno isto kao i u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika. Autori objašnjavaju ovaj rezultat činjenicom da su obje grupe ispitanika bile dominantno u šestoj ili sedmoj deceniji života, te da je seropozitivnost na CP u starijem životnom dobu uzgredan nalaz koji nema uticaj na

aterosklerotski proces (102). Pomenuta studija Loehe i saradnika je sprovedena na 62 pacijenta koji su operisani zbog teške ateroskleroze karotidnih i femoralnih arterija, kao i aorte; slično studiji Al-Younesa i saradnika. Za razliku od takvih uzoraka, plakovi ispitivani u ovdje prezentovanoj studiji su bili u ranim fazama ateroskleroze, sa ciljem da se prikažu specifičnosti primarno inficiranih plakova; time smanjujući mogućnost sekundarne kontaminacije uznapređovalog plaka. Grayston i saradnici insistiraju da istraživanja o infektivnoj genezi ateroskleroze treba premjestiti u rano životno doba, budući da se najraniji oblici plakova formiraju u djetinjstvu i mladosti, u isto vrijeme kad i respiratorne infekcije sa CP (kao jedan od najčešćih perioda javljanja se navodi predškolski i školski period) (103).

El Yazouli i saradnici su na uzorku od 115 pacijenata sa kardiovaskularnim oboljenjima dokazali da je dislipidemija rjeđa u grupi pacijenata sa prisustvom DNK CP u aterosklerotskim plakovima. Statistička analiza u njihovom radu je pokazala da je oko 60% pacijenata imalo infekciju CP kao udružen faktor sa drugim, klasičnim faktorima rizika za kardiovaskularna oboljenja; 25% je pokazalo samostalnu ulogu klasičnih faktora rizika; dok je 12% pokazalo infekciju CP kao jedinstveni faktor rizika za aterosklerozu (104).

Većina studija o histologiji aterosklerotskih plakova je sprovedena na koronarnim ili karotidnim arterijama, stoga se opis prisustva CP u plakovima uglavnom bazira na ovim plakovima ovih krvnih sudova (105). Međutim, postoje studije koje se bave komparacijom bakterijskog infiltrata u različitim arterijama; poput studije Ouchi i saradnika. Autori u svom istraživanju sprovedenom uz pomoć PCR i imunohistohemije navode češće prisustvo CP u koronarnim arterijama (69%) nego u ilijačnim (50%). Svi ispitanici obuhvaćeni ovom studijom su imali pozitivan titar IgG antitijela na CP, nezavisno od zastupljenosti te bakterije u aterosklerotskim plakovima (106). U ovdje prezentovanoj studiji, ukupan uzorak je uglavnom pokazao najslabiju ekspresiju celularnih i molekularnih karakteristika plaka u arterijama Willisovog kruga; te su razlike između CP negativnih i pozitivnih plakova bile najizraženije u karotidnim i koronarnim arterijama, kao i u aorti. Ovaj rezultat predstavlja osnovu za buduća istraživanja infektivne geneze ateroskleroze, sa fokusom na pitanje da li pojedine arterije pokazuju veću osjetljivost na dejstvo infektivnog agensa ili tradicionalno opisanih patogenetskih mehanizama ateroskleroze.

5.2. Morfološke i celularne karakteristike ispitivanih aterosklerotskih plakova

Istraživanje na potomcima ispitanika iz SAPALDIA studije (SAPALDIA: Swiss Study on Air Pollution And Lung and Heart Disease In Adults – Švajcarska studija o zagađenju vazduha, srčanim i plućnim oboljenjima odraslih), uzrasta 8 – 21 godine, pokazalo je da je prisustvo 3 ili više infektivnih bolesti bilo značajno povezano sa porastom karotidne intima-medija debljine u dječaka. Sličan rezultat je postignut ispitujući djevojčice, ali bez statističke značajnosti. Takođe, rezultati studije ukazuju da su infekcije donjeg respiratornog trakta (bronhitis i pneumonija) najčešće povezane sa porastom karotidne intima-medija debljine. Autori ove studije impliciraju da infektivne bolesti značajno doprinose riziku od ateroskleroze čak i u djetinjstvu i adolescenciji, te da su dječaci vjerovatno podložniji ovom efektu zbog opšte vulnerabilnosti prema infekcijama ili povećane osjetljivosti krvnih sudova (107).

Boyle i saradnici su u imunohistohemijskoj studiji plakova koronarnih arterija dokazali da neoangiogeneza pozitivno korelira sa stadijumom razvoja plaka, te da novi krvni sudovi unutar plaka pokazuju veću ekspresiju ICAM-1 nego endotel koji pokriva plak. Autori sugerišu da endotel krvnih sudova u plaku može igrati značajnu ulogu u hemotaksi monocita u uznapređovalim plakovima (42). Legan i saradnici su sprovedi imunohistohemijsku studiju na uzorcima uznapređovalih aterosklerotskih plakova koronarnih arterija 10 pacijenata sa prethodnom ili trenutnom hroničnom infekcijom CP. Njihovi rezultati pokazuju da se ćelijski infiltrat dominantno sastojao od makrofaga i T limfocita (80% uzoraka), dok su B limfociti i plazmociti bili prisutni u 40% slučajeva. Dalje, 70% slučajeva se prezentovalo sa novoformiranim kapilarima u spoljašnjoj zoni intime (uglavnom lokalizovano u regionima najgušćeg monocitnog infiltrata), dok je u 60% slučajeva nađena arteriologeneza (takođe u dubljim slojevima intime), sa čestom hijalinizacijom i inflamatornim promjenama novih krvnih sudova. Autori isključuju mogućnost arterijske hipertenzije kao okidača neoangiogeneze (budući da je krvni pritisak svih pacijenata bio regulisan antihipertenzivnom terapijom), te postavljaju hipotezu da je hronična inflamacija ključni stimulus za rast novih krvnih sudova, uz njihovo posljedično oštećenje posredovano dejstvom CP (108).

Kolagen III je bio u značajno većoj mjeri eksprimiran u CP pozitivnim plakovima, dok su kolagen I i elastin bio zastupljeniji u drugoj grupi plakova. Ranije je napomenuto da je porast koncentracije kolagena I u odnosu na kolagen III u uznapređovalim plakovima povezan sa bržom progresijom plaka. Neophodno je dodatno ispitati da li prisustvo CP u plaku utiče kauzalno na opisane razlike ili je u pitanju incidentalni rezultat. Manja ekspresija elastina u CP

pozitivnim plakovima može sugerisati da je u pitanju veća podložnost elastolizi u inficiranim plakovima, što treba potvrditi eksperimentalnim studijama.

U CP pozitivnim plakovima su bile zastupljenije sekretorne glatke mišićne ćelije, dok su kontraktilne ćelije bile češće u drugoj grupi. Ovaj rezultat ranije nije prezentovan u relevantnoj literaturi, stoga ga treba ispitati kroz veće studije u različitim fazama razvoja aterosklerotskog plaka. Knoebel i saradnici su dokazali da CP ima mogućnost inficiranja glatkih mišićnih ćelija nezavisno od koncentracije holesterola u njima (109). Istraživanje na zečjim glatkim mišićnim ćelijama sprovedeno od strane Chahine i saradnika pokazalo je da oxLDL stimuliše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koju je započela infekcija CP (110). Puolakkainen i saradnici su dokazali da monociti inficirani sa CP facilitiraju infekciju arterijskih glatkih mišićnih ćelija ovom bakterijom, te da je ovaj efekat posebno izražen u ranim fazama infekcije. Autori postavljaju hipotezu da cirkulišući monociti koji prenose CP iz pluća u krvotok, u zidu krvnih sudova podržavaju infektivni proces upravo transferom bakterija u glatke mišićne ćelije (111). Coombes i saradnici su imali sličan rezultat ispitujući odnos humanih endotelnih ćelija iz umbilikalne vene sa glatkim mišićnim ćelijama. Njihov rad prikazuje stimulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija od strane inficiranih endotelnih ćelija humoralnim putem (112). Hirono i saradnici opisuju značaj ekspresije endogenog HSP60 prilikom infekcije sa CP – autori smatraju da je taj korak od presudnog značaja u iskazivanju mitogenog potencijala na glatkim mišićnim ćelijama (113).

Dumrese i saradnici su na kulturi aortnih glatkih mišićnih ćelija dokazali da infekcija CP u tom ćelijskom soju izaziva ćelijsku smrt sa elementima apoptoze i nekroze, što može stimulisati progresiju hronične infekcije oslobađanjem bakterija u zidu krvnog suda (114). Prepoznata je stimulišuća uloga CP na migraciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija kroz zid krvnog suda ka intimi (115).

Humani monociti eksperimentalno inficirani sa CP pokazuju veću prijemčivost za adhezivne molekule poput E-selektina. Povećana koncentracija LDL dodatno stimuliše adhezivnost inficiranih monocita (116). CP olakšava transendotelnu migraciju i subendotelnu akumulaciju makrofaga (117). Takođe, CP stimuliše oksidativni stres (118) i akumulaciju lipida u pjenastim ćelijama tako što sprečava oslobađanje holesterola iz njih; potencirajući lučenje IL-1 β koji vjerovatno kompetitivno inhibira receptor za eliminaciju holesterola iz makrofaga (119). *P. gingivalis* pokazuje sličan obrazac stimulacije opterećenja makrofaga lipidima na genskom nivou, kao i promovisanja LDL oksidacije unutar pjenastih ćelija (120).

Studija na aterosklerotskim plakovima uzorkovanih iz leševa djece stare do 15 godina pokazala je da 80% lezija prisutnih u prvoj godini života sadrži samo ekstracelularne kolekcije lipoproteina, bez pjenastih ćelija. Autori smatraju da je prvi korak u aterosklerozi ekstracelularno taloženje lipida, za razliku od klasičnog tumačenja prisustva pjenastih ćelija kao prvog stadijuma plaka (121). Sary navodi prisustvo dvije vrste masnih pruga kod mladih ljudi, bazirano na istraživanju koje je obuhvatilo koronarne arterije 691 leša do 40 godina starosti. Prema autoru, postoje tzv. „vidljive“ masne pruge, na mjestima gdje nema razvijenog proteoglikanskog sloja, kao ni ekscentričnog zadebljanja intime, sa pjenastim ćelijama koje se nalaze blizu lumena krvnog suda. S druge strane, postoje i tzv. „nevidljive“ masne pruge, koje se nalaze u fokusima ekscentričnog zadebljanja, razvijenog proteoglikanskog sloja, sa pjenastim ćelijama udaljenim od luminalne površine intime (122).

Smatra se da nestabilni plakovi pokazuju najveću koncentraciju CP u makrofagima koji se transformišu u pjenaste ćelije, dok stabilan plak ne mora pokazivati značajnu infiltraciju makrofaga bakterijama (123). Postoji mogućnost da je značajnija infiltracija makrofagima rezervisana za kasnije stadijume inficiranog plaka (praćeno razvojem nestabilnog plaka i komplikacija), što može objasniti rezultate ove studije – nađena koncentracija makrofaga u ranim CP pozitivnim plakovima je bila niža u odnosu na negativne plakove.

Mosorin i saradnici su u CP inficiranim aterosklerotskim plakovima pacijenata kod kojih je izvršena karotidna endarterektomija dokazali obiman infiltrat CD4⁺ T limfocita, bez značajne infiltracije B limfocita i makrofaga. Stoga, autori sugerišu da su T limfociti ključne imunske ćelije u infektivnoj genezi ateroskleroze (124). Sličan rezultat opisuje se u studiji na plakovima osoba starosti 15 – 34 godina (125).

Prisustvo T i B limfocita je ranije dokazano u zdravom tkivu aorte, a istraživanjem na L-selektin^{-/-} miševima je dokazana uloga tog adhezivnog molekula u infiltraciji zdravog krvnog suda limfocitima. Takođe, istraživanje migracije L-selektin^{-/-} limfocita unutar plakova ApoE^{-/-} miševa je pokazalo da je ovaj ligand uključen u proces migracije limfocita u aterosklerotski plak (126). Kada je u pitanju specifična infiltracija T limfocita, hemokini CCL5, CXCL10 i CXCL16 su identifikovani kao ključni regulatorni faktori (34). CD4⁺ i CD8⁺ T limfociti su prisutni u svim fazama razvoja aterosklerotskog plaka, te se smatra da su T limfociti i dendritične ćelije prve ćelijske linije koje infiltrišu najranije oblike plakova (127). Smatra se da su rani oblici povezani sa transendotelnom migracijom limfocita, dok su uznapredovali stadijumi bogati novim krvnim sudovima (porijeklom od *vasa vasorum*, penetrirajući kroz

istanjenu mediju) koji pokazuju agregaciju T limfocita. Budući da neoangiogeneza uglavnom pogađa rubove lipidnog jezgra, tj. najranjivije segmente plaka; smatra se da T limfociti u kasnijim stadijumima doprinose nestabilnosti plaka (128). Studija na Rag1 (eng. recombination activating gene 1) knockout miševima, genetski dizajniranim da ne proizvode odrasle forme T i B limfocita, potvrdila je ulogu ovih ćelija u početnim fazama ateroskleroze: plakovi ovih miševa su u prvih 4 – 8 nedjelja razvoja ateroskleroze bili za 54% manji u odnosu na plakove LDL-knockout miševa koji su proizvodili limfocite. S druge strane, u uznapredovalom stadijumu ateroskleroze nije bilo razlike između plakova ove dvije vrste miševa, što sugerše da druge inflamatorne ćelije preuzimaju ulogu koju nose limfociti s početka procesa (129).

Niz studija na ApoE^{-/-} knockout miševima sa genetskom predispozicijom za hiperholesterolemiju i aterosklerozu, ukrštenim sa miševima sa raznim genetskim deficitima stečenog imunog sistema, pokazao je ključnu pro-aterogenu funkciju Th1 grupe CD4⁺ T limfocita, kao i anti-aterogenu ulogu regulatornih T ćelija, dok su B limfociti pokazali ravnotežu između pro- i anti-aterogenih dejstava (130). Sprovode se eksperimentalna istraživanja o efektima imunomodulatorne terapije (poput anti-CD20 i anti-oxLDL antitijela, kao i raznih liganda za kostimulatorne molekule membrane T ćelija) na dejstvo T i B limfocita u aterosklerotskom plaku (35).

U nestabilnim plakovima je dokazano da CP – specifični reaktivni T limfociti pripadaju CD4⁺ kategoriji sa aterogenim Th1 profilom sekrecije citokina (131). Takođe, deplecija Th1 ćelijske linije i nedostatak Th1-promovišućih citokina (IL-12 i IL-18) rezultiraju u nižem stepenu ateroskleroze u hiperholesterolemičnim miševima (35). Sorrentino i saradnici su dokazali da su Th1 CD4⁺ T limfociti ključne inflamatorne ćelije u procesu ateroskleroze u ApoE^{-/-} miševima inficiranim sa CP, praćeno sistemskim inflamatornim odgovorom u vidu porasta serumske koncentracije IFN- γ (132). S druge strane, smatra se da CD8⁺ T limfociti imaju ateroprotektivnu ulogu kroz regulaciju germinativnih centara folikula B limfocita (133). Međutim, pojedini autori sugeršu da CD8⁺ T limfociti promovišu razvoj nestabilnih plakova putem ubrzavanja apoptoze makrofaga, glatkih mišićnih ćelija i endotela. Eksperimentalna deplecija CD8⁺ T limfocita u ApoE^{-/-} miševima dovodi do usporavanja progresije plaka kroz redukciju akumulacije lipida i formiranja nekrotičnog jezgra, kao i putem smanjenja sekrecije MCP-1, VCAM-1 i IFN- γ (34). Takođe, Zafiratos i saradnici su dokazali da je ateroskleroza znatno manje izražena u miševima inficiranim sa CP i deplecijom CD8⁺ T limfocita u usporedbi sa inficiranim miševima normalnog limfocitnog statusa, što sugerše da su CD8⁺ T limfociti značajna imunološka karika u CP – izazvanoj aterosklerozi (134).

Higuchi i saradnici su pokazali pozitivnu korelaciju između obimnosti infiltrata CP u aterosklerotskim plakovima koronarnih arterija sa ukupnim brojem CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u plaku. Takođe, dokazana je kolokalizacija CP i B limfocita u adventiciji u blizini plaka. Opisane promjene su bile najznačajnije eksprimirane u tromboziranim plakovima, stoga autori akcentuju proinflamatornu ulogu CP u remodelovanju arterijskog zida i pojavi komplikacija (135).

Wick i saradnici su na uzorcima arterija djece i adolescenata (uzrasta od 8 mjeseci do 16 godina) pokazali da je ćelijski infiltrat krvnog suda na predilekcionim mjestima za aterosklerozu u najranijim fazama života pokazivao najveću koncentraciju T limfocita, zatim makrofaga (bez karakteristika pjenastih ćelija), glatkih mišićnih ćelija, sa vrlo malo mastocita (136). Dokazano je da mastociti u plućnim infekcijama sa CP facilitiraju migraciju imunskih ćelija u alveole; samim tim promovirajući razmnožavanje CP u njima i posljedično olakšavajući diseminaciju bakterija kroz krvotok (137). Smatra se da mastociti u ranim fazama razvoja aterosklerotskog plaka pokazuju generalizovane promovišuće efekte tako što ubrzavaju hemotaksu neutrofila i monocita lučenjem IL-8 (eksperimentalno ilustrovano deficitom hemotakse u plakovima miševa sa deplecijom mastocita). Takođe, mastociti luče heparin koji olakšava preuzimanje LDL od strane makrofaga (138). S druge strane, fokalni efekti mastocita u uznapređovalim plakovima su usmjereni ka neoangiogenezi, hemoragiji unutar plaka i destabilizaciji fibrozne kape proteazama (22). Lagrass i saradnici su pokazali da je hemoragija u plaku izazvana sistemskim stresom u ApoE^{-/-} miševima znatno smanjena ukoliko su miševi bili istovremeno deficitarni u mastocitima, što navodi na zaključak da je destabilizacija plaka izazvana stresom proces koji zavisi od aktivnosti mastocita (139). Smatra se da infiltracija adventicije mastocitima u uznapređovaloj fazi plaka doprinosi spazmu krvnog suda putem neurogene aktivacije i degranulacije mastocita (140).

U ovdje prezentovanom istraživanju zapažena je veća koncentracija CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u CP pozitivnim plakovima, što sugerise bakterijsku medijaciju ćelijskog i humoralnog imuniteta u početnim fazama razvoja plaka. Koncentracija B limfocita je bila takođe zapaženija u CP pozitivnim plakovima. CP pozitivni i negativni plakovi se nisu značajno razlikovali u koncentraciji mastocita. Nedostatak komparativnih studija o celularnosti inficiranih i neinficiranih plakova raznih stadijuma razvoja otežava generalizaciju ovih rezultata, te poziva na dalja istraživanja.

5.3. Molekularne karakteristike ispitivanih aterosklerotskih plakova

U ovdje prezentovanom istraživanju nisu nađene razlike između CP negativnih i pozitivnih plakova kada je u pitanju ekspresija apo-A, apo-B, trombomodulina i timidin-fosforilaze. Neophodno je ispitati široku lepezu pro- i antiinflamatornih medijatora u humanom procesu infektivne ateroskleroze, kako bi se ovdje prezentovani rezultati mogli uporediti sa stanjem u drugim stadijumima plakova, aterosklerozi ženskog pola, kao i drugih infektivnih agenasa. Kao što je ranije rečeno, anti-apo-A je klinički dokazan kao biomarker ateroskleroze i prediktor njenih komplikacija. Vuilleumier i saradnici su kroz istraživanje efekata anti-apo-A antitijela u aterosklerozi pokazali da ovo antitijelo izaziva sterilnu inflamaciju u aterosklerotskom plaku kroz TLR2/CD14 put aktivacije makrofaga, kao i specifičnom hemotaksom neutrofila. Takođe, navodi se i proaritmogeni efekat ovog antitijela putem aldosteron-zavisnih kalcijumskih kanala. Međutim, iako autori potenciraju sterilnost ovog oblika inflamacije, u svom radu napominju da infekcija može biti okidač lučenja auto-antitijela putem molekularne mimikrije; samim tim uvažavajući mogući potpomažući efekat CP u ovom štetnom dejstvu anti-apo-A (15). Dokazano je da CP ubrzava aterosklozu u ApoB100only/LDLR^{-/-} miševima genetski modifikovanim za defekt receptora selektivnog za Apo-B (time stvarajući profil dislipidemije koji je najsličniji humanoj dislipidemiji) (141). U istraživanju sprovedenom na 31 pacijentu sa nestabilnom anginom pectoris, nije nađena značajna razlika u serumskoj koncentraciji trombomodulina, tPA, PAI-1 i CRP između serološki CP pozitivnih i negativnih pacijenata (utvrđeno prisustvom specifičnih IgG antitijela) (142).

Iako je eksperimentalno dokazan uticaj TNF- α na infektivni proces ateroskleroze (miševi sa genskim defektom TNF- α inficirani sa CP imaju značajno manju incidencu ateroskleroze (143), u ovdje iznesenim rezultatima ekspresija TNF- α je bila zapaženija u CP negativnim plakovima. Postoji mogućnost da rani oblici plaka ne pokazuju izražen efekat bakterijske infekcije na porast ovog inflamatornog markera. Janczak i saradnici su analizirali uznapredovale, stenoizantne karotidne plakove 100 pacijenata, opisujući prisustvo DNK CP u 68% plakova, a inficirani plakovi su imali visoku ekspresiju bFGF i TNF- α (144). S druge strane, meta-analiza Filarda i saradnika iz 2015. godine je pokazala da pacijenti sa aterosklerozom imaju povišene sistemske vrijednosti hsCRP, fibrinogena, IL-6, TNF- α i IFN- γ ; dok su pacijenti seropozitivni na CP imali povišene vrijednosti hsCRP, fibrinogena i IL-6, bez značajnog uticaja seropozitivnosti na vrijednosti drugih markera (145). Oksaharju i

saradnici su dokazali da infekcija kulture humanih mastocita sa CP rezultira u ranom porastu sekrecije IL-8 i MCP-1, dok je porast sekrecije TNF- α primijećen kasnije u razvoju infektivnog procesa (146).

Predmetna studija je pokazala očekivan rezultat u vidu značajno veće koncentracije HSP60 u inficiranim u odnosu na neinficirane plakove. Seropozitivnost za cHSP60 je senzitivna i specifičan marker akutnog koronarnog sindroma, nezavisno od anti-CP IgG titra, nivoa visoko senzitivnog CRP ili troponina T (82). Dokazana hronična infekcija sa CP i anti-hHSP60 pozitivnost su prediktivni faktori za kardiovaskularni događaj, posebno ukoliko su udruženi sa visokim vrijednostima CRP (147). Faktori rizika za aterosklerozu koji djeluju stresogeno na endotel (hipertenzija, pušenje, oxLDL, slobodni radikali itd.) favorizuju oslobađanje hHSP60 u citosol i ekspresiju na površini endotela, time olakšavajući autoimunu reakciju pokrenutu od strane cHSP60 (148).

Dokazano je CP ispoljava mitogeni potencijal na glatke mišićne ćelije dominantno kroz efekat cHSP60 (149) i povećanjem ekspresije transkripcionih faktora Egr1 (150) i NF- κ B (151). Eksperimentalno je dokazano CP inaktivirana formalinom ne može ući u ćelije, kao i da ne dolazi do kontakta cHSP60 sa ćelijama domaćina (zbog intracelularne lokalizacije tog proteina unutar bakterije). Takođe, u takvom eksperimentalnom modelu, ne dolazi do porasta ekspresije E selektina, ICAM-1 i VCAM-1 na endotelu domaćina. Ovim je dokazano da membranski antigeni CP ne igraju ulogu u ekspresiji ovih adhezivnih molekula, već da je u pitanju uloga cHSP60 (152). Koi i saradnici su na uzorcima karotidnih aterosklerotskih plakova dokazali kolokalizaciju cHSP60 i hHSP60 u plakovima; kao i njihovo zajedničko dejstvo u promovisanju lučenja TNF- α i MMP od strane makrofaga (153). cHSP60 takođe stimuliše specifičnu proliferaciju T limfocita (124), kao i B limfocita, sa posljedičnim porastom sekrecije IL-10 i IL-6 (125). Dokazano je da T limfociti u ranim, asimptomatskim plakovima pokazuju autoreaktivnost na hHSP60 (154). Konflach i saradnici su višestrukom linearnom regresijom dokazali da je koncentracija hHSP60 – specifičnih T limfocita značajno povezana sa intima-medija debljinom u populaciji muškaraca starih 17 – 18 godina, dok nije postojala značajna povezanost u populaciji muškaraca starih 50 – 69 godina; što sugeriše da je T ćelijska aktivacija od strane hHSP60 značajnije povezana sa ranom nego sa uznapredovalom aterosklerozom (155).

Egzogeni unos cHSP60 eksperimentalno izaziva endotelnu disfunkciju u zečevima na visoko holesterolskoj ishrani (156). Hiperholesterolemični zečevi kod kojih je izvršen

egzogeni unos cHSP60 su brže razvili masnu prugu, a infiltracija makrofaga je takođe bila izraženija u razvijenijim plakovima; što sugerije da ovaj faktor virulencije podržava i rane i kasne faze razvoja ateroskleroze (78).

Oralna administracija imuno-stimulišućih doza HSP60 u ApoE^{-/-} miševima dovodi do redukcije aterosklerotskog plaka, dok subkutana administracija ima suprotan efekat (157). Takođe, Zhong i saradnici su opisali da intranazalna aplikacija malih doza HSP60 dovodi do redukcije plaka u korijenu aorte od značajnih 33.6% (158). Ovi rezultati mogu biti od koristi u procesu razvoja eventualne „vaccine protiv ateroskleroze“ bazirane na HSP60.

Kuroda i saradnici su na uzorcima karotidnih plakova dobijenih endarterektomijom dokazali da se najznačajnija kolokalizacija cHSP60 i antigena CP odigrava unutar makrofaga u plaku; sa zaključkom da je izmjena funkcije makrofaga značajan korak u ispoljavanju aterogenog efekta cHSP60 (123). Knoflach i saradnici potenciraju značaj T limfocita, kroz rezultate koji ukazuju da je reaktivnost protiv HSP60 prisutnija u T limfocitima unutar razvijenog plaka u usporedbi sa T limfocitima u cirkulišućoj krvi. Njihov zaključak je da HSP60 – specifični T limfociti cirkulišu u krvi, a zatim dolazi do njihove akumulacije u uznapređovalom plaku (159). Smatra se da bi ispitivanje plazmatske koncentracije HSP60 – specifičnih T limfocita u budućnosti moglo predstavljati metod skrininga za ranu aterosklerozu (136). Takođe, u istraživanju Bodolay i saradnika na pacijentima sa mješovitom sistemskom bolešću vezivnog tkiva, dokazano je da su antitijela protiv HSP60 zastupljenija u podgrupi pacijenata koji su imali kardiovaskularne komorbiditete (160).

Zapažena je značajno veća ekspresija SP110 u CP negativnim plakovima, što sugerije protektivnu ulogu ovog faktora. SP110, humani analog gena *Ipr1*, može predstavljati konstitucionalni odbrambeni faktor protiv CP, samim tim i protiv infektivne ateroskleroze. Leu i saradnici su na mišjem modelu infekcije *M. tuberculosis* dokazali protektivnu ulogu SP110/*Ipr1* u intracelularnim infekcijama kroz moduliranje aktivnosti NF-κB u vidu promocije anti-apoptotskih mehanizama i nishodne regulacije lučenja TNF-α. Inficirani miševi koji su pokazali aktivnost SP110/*Ipr1* su imali manje razvijene plućne lezije i bolje preživljavanje (161). Niža ekspresija TNF-α u CP pozitivnim plakovima se potencijalno može pripisati aktivnosti SP110, tj. pokušaju suzbijanja inflamatornog odgovora na prisustvo bakterije u zidu krvnog suda. Kako ne postoje humane studije koje ispituju ekspresiju SP110 u aterosklerozi, kao ni efekat ovog faktora na CP, te se u tom domenu ova studija može smatrati pionirskom ☺. Neophodno je sprovesti dodatna genetička i molekularna ispitivanja sa ciljem razjašnjenja

njegove uloge u infektivnom procesu ateroskleroze, kao i ispitivanjem njegovog potencijala u prevenciji i terapiji ateroskleroze.

5.4. Antibiotici i ateroskleroza

Logično medicinsko pitanje koje se samo nameće je uticaj antibiotika na razvoj ateroskleroze. Postoje brojne publikacije na ovu temu, ali rezultati istih daju oprečne rezultate, kako u razvoju same ateroskleroze, tako i u razvoju komplikacija. Početna ispitivanja uticaja antibiotika kod pacijenata s akutnim infarktom srčanog mišića pokazala su ohrabrujuće rezultate, upravo u smislu eradikacije CP (162), te s tim u vezi, npr. kratkotrajna terapija aیتromicinom i roksیتromicinom u pojedinim studijama su pokazala pozitivan uticaj na incidenciju kardiovaskularnih događaja kao direktne komplikacije ateroskleroze, a u pojedinim su efekti izostali (163, 164). Velike randomizirane studije nisu bile afirmativne, ali je mogući razlog ležao u pogrešnom odabru antibiotika ili kratkoročnoj primjeni antibiotika tek nakon nekog kardiovaskularnog događaja (164). Trenutni *guidelines*-i ne preporučuju terapiju antibioticima u smislu sekundarne prevencije nakon infarkta srčanog mišića, a kao moguće objašnjenje je dato da je primjena istih praktično propustila odgovarajući momenat kada su trebali biti korišćeni u smislu primarne prevencije, decenijama prije kardiovaskularnog događaja kao što je infarkt srca (165).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja, može se zaključiti da je prisustvo CP u aterosklerotskim plakovima evidentno povezano sa aterosklerotskim procesom, pružajući novi uvid u patogenezu ove kompleksne bolesti.

Analizom uzoraka plakova iz različitih arterijskih krvnih sudova potvrđeno je prisustvo CP, što naglašava njegovu ulogu u formiranju plakova u različitim regijama tijela. Nadalje, utvrđeno je da CP pozitivni plakovi imaju specifične karakteristike u strukturi i ekspresiji molekula, što ukazuje na moguće mehanizme njihovog uticaja na razvoj ateroskleroze.

Dodatno, razlike u demografskim i kliničkim karakteristikama između CP pozitivnih i negativnih osoba sugeriraju kompleksnu interakciju između prisustva CP i faktora rizika kao što su starost, indeks tjelesne mase, hipertenzija, dijabetes mellitus i hiperholesterolemija. Ovi nalazi pružaju podatke o potencijalnim biomarkerima ili terapijskim ciljevima koji bi mogli biti korisni u prevenciji i liječenju ateroskleroze kod pacijenata.

Konačno, istraživanje o uticaju prisustva CP na ekspresiju određenih molekula u plakovima ukazuje na kompleksnu imunološku interakciju između bakterije i domaćina. Ova saznanja mogu poslužiti kao osnova za razvoj ciljanih terapija usmjerenih na smanjenje aterosklerotskog rizika kod pacijenata inficiranih CP.

U cjelini, rezultati ove disertacije doprinose boljem razumijevanju uloge CP u patogenezi ateroskleroze i pružaju potencijalne smjernice za daljnje istraživanje i terapijski pristup ovom ozbiljnom zdravstvenom problemu.

Iako je primjena antibiotika u prevenciji ateroskleroze još uvijek kontraverzno pitanje, za očekivati je da buduće bazične studije na temu uticaja različitih infektivnih agenasa na razvoj ateroskleroze, dovedu i do jasnije slike o opravdanosti pravovremene primjene antibiotika u prevenciji značajnog broja aterosklerotskih oboljenja krvnih sudova.

Dakle:

1. Dokazano je prisustvo CP u aterosklerotskim plakovima u različitim arterijskim krvnim sudovima, što ukazuje na značajnu povezanost između prisustva ove bakterije i aterosklerotskog procesa.

2. CP negativne osobe su u prosjeku bile značajno starije od CP pozitivnih osoba u trenutku smrti.
3. CP negativne osobe su imale značajno veći indeks tjelesne mase (BMI) u poređenju sa CP pozitivnim osobama.
4. Hipertenzija, dijabetes mellitus i hiperholesterolemija su bili značajno prisutniji u grupi CP negativnih, dok nije postojala značajna razlika u incidenci pušenja između CP pozitivnih i negativnih osoba.
5. Utvrđene su jasne razlike između CP pozitivnih i CP negativnih plakova, uključujući razlike u strukturi i ekspresiji molekula, kao i prisustvu različitih tipova ćelija, što govori u prilog različite etopatogeneze ateroskleroze kod ove dvije grupe osoba.
6. CP negativni plakovi su imali značajno veću ekspresiju kolagena I, dok su CP pozitivni plakovi imali veću ekspresiju kolagena III.
7. CP negativni plakovi su imali značajno veću ekspresiju elastina u poređenju sa CP pozitivnim plakovima.
8. CP pozitivni plakovi su imali veću koncentraciju B limfocita, CD4+ i CD8+ T limfocita, kao i sekretornih glatkih mišićnih ćelija, dok CP negativni plakovi imali više makrofaga i kontraktilnih glatkih mišićnih ćelija.
9. Prisustvo CP ne utiče značajno na nivoe apolipoproteina A i B, trombomodulina i timidin-fosforilaze, ali utiče na ekspresiju TNF- α , SP110 i HSP60.

7. REFERENCE

1. Singh I. Textbook of human histology. New Delhi, St. Louis: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2011.
2. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996;47(1):315-31.
3. Kinlay S, Creager MA, Fukumoto M, Hikita H, Fang JC, Selwyn AP, et al. Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. *Hypertension.* 2001;38(5):1049-53.
4. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull Jr W, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1992;12(1):120-34.
5. Zeller I, Srivastava S. Macrophage functions in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;115(12):e83-e5.
6. Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(3):173-82.
7. Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res.* 2008;79(1):14-23.
8. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino Sr RB. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2011;365(3):213-21.
9. Kavey R-EW, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation.* 2003;107(11):1562-6.
10. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(5):473-83.
11. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116(16):1832-44.
12. Hassing HC, Mooij H, Guo S, Monia BP, Chen K, Kulik W, et al. Inhibition of hepatic sulfatase-2 In Vivo: A novel strategy to correct diabetic dyslipidemia. *Hepatology.* 2012;55(6):1746-53.
13. Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of high-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med.* 2012;4(4):251-68.
14. Vuilleumier N, Montecucco F, Spinella G, Pagano S, Bertolotto M, Pane B, et al. Serum levels of anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies and myeloperoxidase as predictors of major adverse cardiovascular events after carotid endarterectomy. *Thromb Haemost.* 2013;109(04):706-15.
15. Vuilleumier N, Montecucco F, Hartley O. Autoantibodies to apolipoprotein A-1 as a biomarker of cardiovascular autoimmunity. *World J Cardiol.* 2014;6(5):314-26.

16. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2004;17:35-44.
17. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, et al. Direct demonstration of P-selectin–and VCAM-1–dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E–deficient mice. *Circ Res*. 1999;84(11):1237-44.
18. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107(10):1255-62.
19. Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381-478.
20. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108(6):785-91.
21. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Elsevier Health Sciences; 2017.
22. Bot I, Shi G-P, Kovanen PT. Mast cells as effectors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):265-71.
23. Kelley JL, Chi DS, Abou-Auda W, Smith JK, Krishnaswamy G. The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease. *Mol Med Today*. 2000;6(8):304-8.
24. Spinas E, Kritas S, Saggini A, Mobili A, Caraffa A, Antinolfi P, et al. Role of mast cells in atherosclerosis: a classical inflammatory disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(4):517-21.
25. Kervinen H, Kaartinen M, Mäkynen H, Palosuo T, Mänttari M, Kovanen PT. Serum tryptase levels in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2005;104(2):138-43.
26. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(5):812-9.
27. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
28. Maurice P, Blaise S, Gayral S, Debelle L, Laffargue M, Hornebeck W, et al. Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(6):211-21.
29. Robinet A, Fahem A, Cauchard J-H, Huet E, Vincent L, Lorimier S, et al. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci*. 2005;118(2):343-56.
30. Duprez DA, Gross MD, Sanchez OA, Kizer JR, Ix JH, Lima J, et al. Collagen turnover markers in relation to future cardiovascular and noncardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Clin Chem*. 2017;63(7):1237-47.
31. Kong CH, Lin XY, Woo CC, Wong HC, Lee CN, Richards AM, et al. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;16(1):11-5.
32. Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(4):494-502.

33. Rao RN, Falls DG, Gerrity RG, Sethuraman SN, Thiruvaiyaru DS. Intimal thickness and layering, and smooth muscle cell phenotypes in aorta of youth. *Pathobiology*. 2000;68(1):18-28.
34. Li J, Ley K. Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):40-9.
35. Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive response of T and B cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):668-78.
36. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109(6):745-53.
37. Hedrick CC. Lymphocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):253-7.
38. Mallat Z. New emerging roles for B cells in atherosclerosis. *Vasc Pharmacol*. 2012;5(56):338.
39. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(3):297-303.
40. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110(14):2032-8.
41. Sengupta S, Sellers LA, Matheson HB, Fan TPD. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis in vivo and in vitro: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2003;139(2):219-31.
42. Boyle JJ, Wilson B, Bicknell R, Harrower S, Weissberg PL, Fan TP. Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis. *J Pathol*. 2000;192(2):234-42.
43. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull Jr W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89(5):2462-78.
44. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 1989;9(6):895-907.
45. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):1159-65.
46. Cross S. Underwood's pathology. 6th ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
47. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177-8.
48. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.
49. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Atherothrombosis LTNo. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129-38.

50. Kaperonis E, Liapis C, Kakisis J, Dimitroulis D, Papavassiliou V. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31(4):386-93.
51. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol*. 2000;86(8):3-8.
52. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010;74(2):213-20.
53. Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Seo DM, Velazquez OC. Atherosclerosis, inflammation, genetics, and stem cells: 2012 update. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(3):201-10.
54. Maier JA, Malpuech-Brugère C, Zimowska W, Rayssiguier Y, Mazur A. Low magnesium promotes endothelial cell dysfunction: implications for atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1689(1):13-21.
55. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-90.
56. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008;205(2):339-46.
57. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8(1):22.
58. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway—a new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2011;131(2):179-86.
59. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008;54(1):24-38.
60. Cimmino G, D'Amico C, Vaccaro V, D'Anna M, Golino P. The missing link between atherosclerosis, inflammation and thrombosis: is it tissue factor? *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2011;9(4):517-23.
61. Wei H-J, Li Y-H, Shi G-Y, Liu S-L, Chang P-C, Kuo C-H, et al. Thrombomodulin domains attenuate atherosclerosis by inhibiting thrombin-induced endothelial cell activation. *Cardiovasc Res*. 2011;92(2):317-27.
62. Lip G, Blann AD. Plasma thrombomodulin in atherosclerosis and its risk factors. *Am J Med*. 1997;102(4):423-5.
63. Constans J, Blann A, Renard M, Guérin V, Conri C. Soluble thrombomodulin in hypercholesterolaemic patients. *The Lancet*. 2000;355(9198):145.
64. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(12):H1585-H97.
65. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(9):1386-92.
66. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
67. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):456S-60S.
68. Frink RJ. Inflammatory atherosclerosis: characteristics of the injurious agent. Heart Research Foundation, Sacramento, CA; 2002.

69. Canault M, Peiretti F, Poggi M, Müller C, Kopp F, Bonardo B, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF- α . *J Pathol*. 2008;214(5):574-83.
70. Ortolan A, Ramonda R, Lorenzin M, Pesavento R, Spinazzè A, Felicetti M, et al. Subclinical atherosclerosis evolution during 5 years of anti-TNF- α treatment in psoriatic arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2021;39(1):158-61.
71. Renko J. Bacterial DNA signatures in arterial inflammation. University of Tampere, Finland; 2008.
72. Haranaga S, Yamaguchi H, Friedman H, Izumi S-i, Yamamoto Y. Chlamydia pneumoniae infects and multiplies in lymphocytes in vitro. *Infect Immun*. 2001;69(12):7753-9.
73. Fazio G, Giovino M, Gullotti A, Bacarella D, Novo G, Novo S. Atherosclerosis, inflammation and Chlamydia pneumoniae. *World J Cardiol*. 2009;1(1):31-40.
74. Dabiri H, Rezadehbashi M, Badami N, Aghanouri R, Ahmadi H, Khoramizadeh MR, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of patients in Tehran, Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(3):195-7.
75. Epstein SE. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res*. 2002;90(1):2-4.
76. Joshi R, Khandelwal B, Joshi D, Gupta OP. Chlamydophila pneumoniae infection and cardiovascular disease. *N Am J Med Sci*. 2013;5(3):169.
77. Honarmand H. Atherosclerosis induced by Chlamydophila pneumoniae: a controversial theory. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2013;2013: 941392.
78. Di Pietro M, Filardo S, De Santis F, Sessa R. Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):15105-20.
79. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.
80. Eitel J, Meixenberger K, van Laak C, Orlovski C, Hocke A, Schmeck B, et al. Rac1 regulates the NLRP3 inflammasome which mediates IL-1 β production in Chlamydophila pneumoniae infected human mononuclear cells. *PloS one*. 2012;7(1):e30379.
81. Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*. 1999;100(4):e20-e8.
82. Pedicino D, Giglio AF, Galiffa VA, Cialdella P, Trotta F, Graziani F, et al. Infections, immunity and atherosclerosis: pathogenic mechanisms and unsolved questions. *Int J Cardiol*. 2013;166(3):572-83.
83. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(8):1405-11.
84. de Boer OJ, van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerosis, inflammation, and infection. *J Pathol*. 2000;190(3):237-43.
85. Kramnik I, Dietrich WF, Demant P, Bloom BR. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8560-5.

86. Pan H, Yan B-S, Rojas M, Shebzukhov YV, Zhou H, Kobzik L, et al. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature*. 2005;434(7034):767-72.
87. Bloch DB, Nakajima A, Gulick T, Chiche J-D, Orth D, de la Monte SM, et al. Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):6138-46.
88. Wang T, Ong P, Roscioli T, Cliffe ST, Church JA. Hepatic veno-occlusive disease with immunodeficiency (VODI): first reported case in the US and identification of a unique mutation in Sp110. *Clin Immunol*. 2012;145(2):102-7.
89. Boyartchuk V, Rojas M, Yan B-S, Jobe O, Hurt N, Dorfman DM, et al. The host resistance locus sst1 controls innate immunity to *Listeria monocytogenes* infection in immunodeficient mice. *J Immunol*. 2004;173(8):5112-20.
90. Pichugin AV, Yan B-S, Sloutsky A, Kobzik L, Kramnik I. Dominant role of the sst1 locus in pathogenesis of necrotizing lung granulomas during chronic tuberculosis infection and reactivation in genetically resistant hosts. *Am J Pathol*. 2009;174(6):2190-201.
91. He X, Berland R, Mekasha S, Christensen TG, Alroy J, Kramnik I, et al. The sst1 resistance locus regulates evasion of type I interferon signaling by *Chlamydia pneumoniae* as a disease tolerance mechanism. *PLoS pathogens*. 2013;9(8):e1003569.
92. Izadi M, Fazel M, Akrami M, Saadat SH, Pishgoo B, Nasserli MH, et al. *Chlamydia pneumoniae* in the atherosclerotic plaques of coronary artery disease patients. *Acta Med Iran*. 2013; 51(12):864-70.
93. Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino I, Benedetti-Valentini F, Perna R, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg*. 2003;37(5):1027-31.
94. El Yazouli L, Criscuolo A, Hejazi H, Bouazza M, Elmdaghri N, Aroussi Alami A, et al. Molecular characterisation of *Chlamydia pneumoniae* associated to atherosclerosis. *Pathog Dis*. 2017;75(4):ftx039.
95. Sessa R, Pietro MD, Schiavoni G, Galdiero M, Cipriani P, Romano S, et al. *Chlamydia pneumoniae* in asymptomatic carotid atherosclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006;19(1):111-8.
96. Player MS, Mainous III AG, Everett CJ, Diaz VA, Knoll ME, Wright RU. *Chlamydia pneumoniae* and progression of subclinical atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol*. 2014;21(5):559-65.
97. Wong Y, Gallagher P, Ward M. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Heart*. 1999;81(3):232-8.
98. Assar O, Nejatizadeh A, Dehghan F, Kargar M, Zolghadri N. Association of *Chlamydia pneumoniae* infection with atherosclerotic plaque formation. *Glob J Health Sci*. 2016;8(4):260-7.
99. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*. 1999;138(5):S534-S6.
100. Pigarevskii P, Mal'tseva S, Snegova V, Davydova N, Guseva V. *Chlamydia pneumoniae* and immunoinflammatory reactions in an unstable atherosclerotic plaque in humans. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(2):278-81.

101. Loehe F, Bittmann I, Weilbach C, Lauterjung L, Schildberg F-W, Heiss MM. Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of patients undergoing vascular surgery. *Ann Vasc Surg*. 2002;16(4):467-73.
102. Al-Younes HM, Abeeleh MAA, Jaber BM. Lack of strong association of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis in a Jordanian population. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(05):457-64.
103. Grayston JT, Belland RJ, Byrne GI, Kuo CC, Schachter J, Stamm WE, et al. Infection with Chlamydia pneumoniae as a cause of coronary heart disease: the hypothesis is still untested. *Pathog Dis*. 2015;73(1):1-9.
104. Yazouli LE, Hejaji H, Elmdaghri N, Alami AA, Dakka N, Radouani F. Investigation of Chlamydia pneumoniae infection in Moroccan patients suffering from cardiovascular diseases. *J Infect Public Health*. 2018;11(2):246-9.
105. Cao J, Mao Y, Dong B, Guan W, Shi J, Wang S. Detection of specific Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus antigens in human carotid atherosclerotic plaque in a Chinese population. *Oncotarget*. 2017;8(33):55435.
106. Ouchi K, Fujii B, Kanamoto Y, Karita M, Shirai M, Nakazawa T. Chlamydia pneumoniae in coronary and iliac arteries of Japanese patients with atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Med Microbiol*. 1998;47(10):907-13.
107. Dratva J, Caviezel S, Schaffner E, Bettschart R, Kuenzli N, Schindler C, et al. Infectious diseases are associated with carotid intima media thickness in adolescence. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):609-15.
108. Legan M, Vraspir-Porenta O, Kese D, Zorc-Pleskovic R, Zorc M. Histopathologic signs for the inflammatory role of Chlamydia pneumoniae in the high-grade atherosclerotic coronary artery wall. *Angiology*. 2004;55(5):525-31.
109. Knoebel E, Vijayagopal P, Figueroa 2nd J, Martin DH. In vitro infection of smooth muscle cells by Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun*. 1997;65(2):503-6.
110. Chahine MN, Deniset J, Dibrov E, Hirono S, Blackwood DP, Austria JA, Pierce GN. Oxidized LDL promotes the mitogenic actions of Chlamydia pneumoniae in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011;92(3):476-83.
111. Puolakkainen M, Campbell LA, Lin T-M, Richards T, Patton DL, Kuo C-C. Cell-to-cell contact of human monocytes with infected arterial smooth-muscle cells enhances growth of Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis*. 2003;187(3):435-40.
112. Coombes BK, Mahony JB. Chlamydia pneumoniae infection of human endothelial cells induces proliferation of smooth muscle cells via an endothelial cell-derived soluble factor (s). *Infect Immun*. 1999;67(6):2909-15.
113. Hirono S, Dibrov E, Hurtado C, Kostenuk A, Ducas R, Pierce GN. Chlamydia pneumoniae stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res*. 2003;93(8):710-6.
114. Dumrese C, Maurus CF, Gygi D, Schneider MK, Walch M, Groscurth P, et al. Chlamydia pneumoniae induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiol*. 2005;5:2.
115. Zhang J, Wang H, Zhang L, Zhang T, Wang B, Li X, et al. Chlamydia pneumoniae infection induces vascular smooth muscle cell migration via Rac1 activation. *J Med Microbiol*. 2014;63(2):155-61.

116. Evani SJ, Ramasubramanian AK. Biophysical regulation of Chlamydia pneumoniae-infected monocyte recruitment to atherosclerotic foci. *Sci Rep*. 2016;6(1):19058.
117. Liu J, Miao G, Wang B, Zheng N, Ma L, Chen X, et al. Chlamydia pneumoniae infection promotes monocyte transendothelial migration by increasing vascular endothelial cell permeability via the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(2):742-8.
118. Di Pietro M, Filardo S, Falasca F, Turriziani O, Sessa R. Infectious agents in atherosclerotic cardiovascular diseases through oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2459.
119. Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Porritt RA, Crother TR, Shimada K, Tarling EJ, et al. Chlamydia pneumoniae hijacks a host autoregulatory IL-1 β loop to drive foam cell formation and accelerate atherosclerosis. *Cell Metab*. 2018;28(3):432-48. e4.
120. Shaik-Dasthagirisahab YB, Mekasha S, He X, Gibson III FC, Ingalls RR. Signaling events in pathogen-induced macrophage foam cell formation. *Pathog Dis*. 2016;74(6):ftw074.
121. Torzewski M, Navarro B, Cheng F, Canisius A, Schmidt T, Bhakdi S, et al. Investigation of Sudan IV staining areas in aortas of infants and children: possible prelesional stages of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):159-67.
122. Stary H. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J*. 1990;11(suppl_E):3-19.
123. Kuroda S, Kobayashi T, Ishii N, Ikeda J, Shinohe Y, Houkin K, et al. Role of Chlamydia pneumoniae-infected macrophages in atherosclerosis developments of the carotid artery. *Neuropathology*. 2003;23(1):1-8.
124. Mosorin M, Surcel H-M, Laurila A, Lehtinen M, Karttunen R, Juvonen J, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(4):1061-7.
125. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, Wick MC, Wick G. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):960-8.
126. Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med*. 2006;203(5):1273-82.
127. Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(5):327-34.
128. de Boer OJ, Becker AE, van der Wal AC. T lymphocytes in atherogenesis—functional aspects and antigenic repertoire. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):78-86.
129. Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;108(2):251-9.
130. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134(1):33-46.
131. de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, Ossewaarde JM, Teeling P, Becker AE. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to Chlamydia pneumoniae. *Cardiovasc Res*. 2000;48(3):402-8.

132. Sorrentino R, Yilmaz A, Schubert K, Crother TR, Pinto A, Shimada K, et al. A single infection with *Chlamydia pneumoniae* is sufficient to exacerbate atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Cell Immunol.* 2015;294(1):25-32.
133. Clement M, Guedj K, Andreato F, Morvan M, Bey L, Khallou-Laschet J, et al. Control of the T follicular helper–germinal center B-cell axis by CD8⁺ regulatory T cells limits atherosclerosis and tertiary lymphoid organ development. *Circulation.* 2015;131(6):560-570.
134. Zafiratos MT, Manam S, Henderson KK, Ramsey KH, Murthy AK. CD8⁺ T cells mediate *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis in mice. *Pathog Dis.* 2015;73(7):ftv052.
135. Higuchi MdL, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SAP, Castelli JB, Gutierrez PS, et al. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81(1):12-22.
136. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:361-403.
137. Chiba N, Shimada K, Chen S, Jones HD, Alsabeh R, Slepkin AV, et al. Mast cells play an important role in *chlamydia pneumoniae* lung infection by facilitating immune cell recruitment into the airway. *J Immunol.* 2015;194(8):3840-51.
138. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, et al. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PloS one.* 2011;6(1):e14525.
139. Lagrèauw HM, Wezel A, van der Velden D, Kuiper J, Bot I. Stress-induced mast cell activation contributes to atherosclerotic plaque destabilization. *Sci Rep.* 2019;9(1):2134.
140. Hu CL, Xiang JZ, Hu FF, Huang CX. Adventitial inflammation: a possible pathogenic link to the instability of atherosclerotic plaque. *Med Hypotheses.* 2007;68(6):1262-4.
141. Lantos I, Endr sz V, Virok DP, Szab  A, Lu X, Mosolyg  T, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection exacerbates atherosclerosis in ApoB100only/LDLR^{−/−} mouse strain. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8325915.
142. Gr bczewska Z, Nartowicz E, Kubica J, Ro c D. Endothelial function parameters in patients with unstable angina and infection with *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Intern Med.* 2006;17(5):339-42.
143. Zafiratos MT, Cottrell JT, Manam S, Henderson KK, Ramsey KH, Murthy AK. Tumor necrosis factor receptor superfamily members 1a and 1b contribute to exacerbation of atherosclerosis by *Chlamydia pneumoniae* in mice. *Microbes Infect.* 2019;21(2):104-8.
144. Janczak D, Ziolkowski P, Szyde ko T, Dorobisz T, Janczak D, Dorobisz K, et al. The presence of some cytokines and *Chlamydia pneumoniae* in the atherosclerotic carotid plaque in patients with carotid artery stenosis. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015;69:227-32.
145. Filardo S, Di Pietro M, Farcomeni A, Schiavoni G, Sessa R. *Chlamydia pneumoniae*-mediated inflammation in atherosclerosis: a meta-analysis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:378658.
146. Oksaharju A, Lappalainen J, Tuomainen AM, Pussinen PJ, Puolakkainen M, Kovanen PT, et al. Pro-atherogenic lung and oral pathogens induce an inflammatory response in human and mouse mast cells. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):103-13.

147. Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, Virkkunen H, Mänttari M, Palosuo T, et al. Synergistic effect of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection, autoimmunity, and inflammation on coronary risk. *Circulation*. 2003;107(20):2566-70.
148. Wick G, Jakic B, Buszko M, Wick MC, Grundtman C. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(9):516-29.
149. Deniset JF, Hedley TE, Hlaváčková M, Chahine MN, Dibrov E, O'Hara K, et al. Heat shock protein 60 involvement in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal*. 2018;47:44-51.
150. Kern JM, Maass V, Maass M. *Chlamydia pneumoniae*-induced pathological signaling in the vasculature. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;55(2):131-9.
151. Rupp J, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, Seitzer U, Brandt E, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3447-52.
152. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999;103(4):571-7.
153. Bachmaier K, Neu N, de La Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. *Chlamydia* infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science*. 1999;283(5406):1335-9.
154. Wick C. Tolerization against atherosclerosis using heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(2):201-11.
155. Knoflach M, Kiechl S, Mayrl B, Kind M, Gaston J, Van der Zee R, et al. T-cell reactivity against HSP60 relates to early but not advanced atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):333-8.
156. Mussa FF, Chai H, Wang X, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease: an update. *J Vasc Surg*. 2006;43(6):1301-7.
157. Hu Y, Chen Z, Jiang L, Chen F, Jin R, Cheng L. Effects of oral and subcutaneous administration of HSP60 on myeloid-derived suppressor cells and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;498(4):701-6.
158. Zhong Y, Tang H, Wang X, Zeng Q, Liu Y, Zhao X, et al. Intranasal immunization with heat shock protein 60 induces CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺ and type 1 regulatory T cells and inhibits early atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(3):452-68.
159. Knoflach M, Bernhard D, Wick G. Anti-HSP60 Immunity Is Already Associated with Atherosclerosis Early in Life. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051(1):323-31.
160. Bodolay E, Prohászka Z, Paragh G, Csipő I, Nagy G, Laczik R, et al. Increased levels of anti-heat-shock protein 60 (anti-Hsp60) indicate endothelial dysfunction, atherosclerosis and cardiovascular diseases in patients with mixed connective tissue disease. *Immunol Res*. 2014;60:50-9.
161. Leu J-S, Chen M-L, Chang S-Y, Yu S-L, Lin C-W, Wang H, et al. SP110b controls host immunity and susceptibility to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(3):369-82.
162. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(6):1217-25.

163. Vainas T, Stassen FR, Schurink GW, Tordoir JH, Welten RJ, van den Akker LH, Kurvers HA, Bruggeman CA, Kitslaar PJ. Secondary prevention of atherosclerosis through chlamydia pneumoniae eradication (SPACE Trial): a randomised clinical trial in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(4):403-11.
164. Muhlestein JB. Antibiotic treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(6):605-14.
165. Sethi NJ, Safi S, Korang SK, Hróbjartsson A, Skoog M, Gluud C, Jakobsen JC. Antibiotics for secondary prevention of coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Feb 23;2(2):CD003610.

8. BIOGRAFIJA

Dr Nemanja Radojević je specijalista iz oblasti sudske medicine s bogatim obrazovnim i profesionalnim iskustvom. Rođen je 9. februara 1981. godine u Kotoru, gdje je završio Medicinski fakultet sa prosječnom ocjenom 9,59/10,00, diplomiravši kao prvi student u generaciji. Specijalizaciju iz sudske medicine završio je 2011. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, dok je magistrirao 2012. godine na temu "Mathematical model in post-mortem estimation of brain oedema using morphometric parameters".

Od 2011. godine radi kao specijalista sudske medicine u Centru za sudsku medicinu Kliničkog centra Crne Gore u Podgorici, gdje takođe obavlja poslove stalnog sudskog vještaka. Dugi niz godina je bio angažovan kao asistent na predmetu Sudska medicina na Medicinskom fakultetu u Podgorici. U periodu od 2015. do 2016. godine obavljao je funkciju direktora Centra za nauku Kliničkog centra Crne Gore, gdje je koordinisao kontinuiranu medicinsku edukaciju za cjelokupni zdravstveni sistem Crne Gore. Od 2020. do 2021. godine bio je pomoćnik direktora Kliničkog centra Crne Gore za kontrolu kvaliteta i unapređenje zdravstvene zaštite.

Dr Radojević je imao priliku da sarađuje sa vodećim institucijama u svijetu, uključujući Harvard University, gdje je proveo godinu dana kao Takemi Fellow na T.H. Chan School of Public Health gdje je radio na projektu "Predictors of Domestic Violence: Establishing Domestic Violence Risk Identification Tool".

Objavio je 65 naučnih radova od čega je njih 55 u vodećim naučnim časopisima sa SCI i SCIE liste, uključujući i više peer-review recenzija, kao i više od 30 radova prezentovanih na domaćim i međunarodnim kongresima. Njegovi indeksi citiranosti su: 808 citata, h-index 15, i10 index 23. Dr Radojević je takođe kaautor nekoliko udžbenika i autora više poglavlja u udžbenicima. Njegovo istraživanje se fokusira na različite aspekte sudske medicine, uključujući patologiju, toksikologiju, medicinsku statistiku i epidemiologiju, ali i druge oblasti medicine. Učestvovao je u nekoliko značajnih međunarodnih projekata, od kojih su neki bili fokusirani na istraživanje, dok su drugi imali praktičnu primenu u oblasti sudskomedicinske prakse, a bili su podržani od strane Ministarstva nauke Crne Gore i Italije, Medicinskog fakulteta u Gracu, Američkog nacionalnog instituta za zdravlje, Icaan Medical School sa Mount Sinai bolnice iz Njujorka, Univerziteta Harvard iz Bostona, te Crnogorske akademije nauka i umjetnosti.

ORIGINAL PAPER

HSP60, SP110 AND TNF- α EXPRESSION IN *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*-POSITIVE VERSUS *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*-NEGATIVE ATHEROSCLEROTIC PLAQUESNEMANJA RADOJEVIC^{1,2}, BATRIC VUKCEVIC^{1,2}, ANDREA JOVOVIC², FILIP VUKMIROVIC^{1,2}¹Clinical Centre of Montenegro, Montenegro²Faculty of Medicine, University of Montenegro, Montenegro

Traditionally recognized risk factors for atherosclerosis are not presented in 50% of patients with ischemic heart disease. Chronic inflammation with low pathogenic agents with slightly, or no signs of inflammation is the mainstay of atherosclerosis and could be triggered by an infectious agent, most commonly by *Chlamydia pneumoniae*.

Immunostaining of 33 *Chlamydia pneumoniae*-positive and 30 *Chlamydia pneumoniae*-negative quadruple arterial sets were examined for protective Sp110, and atherogenic HSP60 markers, as well as for TNF- α which is inflammatory marker affected by both of them.

The *Chlamydia pneumoniae*-negative deceased subjects were statistically significantly older and their BMI was significantly lower. The results showed that age, hypercholesterolemia, diabetes, arterial hypertension and BMI were negatively correlated with *Chlamydia pneumoniae*-positivity, while no significant relationship was found between *Chlamydia pneumoniae*-positivity and a positive family history of cardiovascular diseases, as well as smoking. Significantly higher presence of Sp110 in *Chlamydia pneumoniae*-negative group versus significantly higher presence of HSP60 in *Chlamydia pneumoniae*-positive group. *Chlamydia pneumoniae*-negative plaques showed higher TNF- α expression; difference is present for all arteries examined except the Willis circle.

This study may provide a model for further understanding the mechanisms of *Chlamydia pneumoniae* atherogenesis and evaluating chlamydial intervention strategies for preventing the advancement of atherosclerotic lesions enhanced by bacterial infections.

Key words: atherosclerosis, *Chlamydia pneumoniae*, cardiovascular disease, SP110, HSP60, TNF- α .

Introduction

Inflammatory cells and the appearance of mediators are proof of the chronic inflammatory character of atherosclerosis. Atherosclerosis is actually a response to a noxa that damages the endothelium. The so-called "injurious agent" is any chemical sub-

stance or microorganism that causes an endothelial lesion and consequently an inflammatory reaction.

Monocyte and T lymphocyte chemotaxis with cytokine secretion initiates an inflammatory cascade and remodelling of the diseased part of a blood vessel's wall. Regardless of the origin of the agent, the host response is not sufficient because atherosclerosis pro-

gressively spreads and the lumen of the blood vessel narrows [1].

When it comes to the infectious genesis of atherosclerosis, a large amount of attention has been dedicated to bacterial and viral agents. The determined presence of microorganisms in atherosclerotic plaque and lipid-laden cells has resulted in the hypothesis that microorganisms stimulate scavenger receptor expression to use lipids as a source of energy [2].

Chlamydia pneumoniae (CP) is an obligatory intracellular, gram-negative bacterium from the Chlamydiaceae family, recognized as a cause of sinusitis, laryngitis, pharyngitis, bronchitis and out-of-hospital pneumonia. CP is often present in the blood vessels of smokers and it is believed that they also have a higher rate of lung colonization with this microorganism [3]. The presence of CP has been proved in 40% to 50% of atherosclerotic plaques by immunohistochemical tests, PCR tests, electron microscopy, as well as with cell cultures [4]. Laboratory tests on animals have shown that CP causes atherosclerosis in LDL receptor knockout mice that have been fed on a diet with a high concentration of cholesterol. The presence of antibodies against CP was found in about 50% of the examined patients with atherosclerosis [4]. It is thought that CP passes from macrophages to endothelial cells, causing them to dysfunction and increasing permeability for LDL. At the same time, the lipopolysaccharide of the bacterial wall causes a reduction in LCAT activity, the consequence of which is an increase in levels of LDL and a decrease in levels of HDL.

The presence of CP in endothelial cells causes the proliferation of smooth muscle cells and the secretion of IL-8 and IL-16, and the expression of ICAM, VCAM and E selectin [5].

The occurrence of atherosclerosis in a younger population without traditional factors of risk has awakened the suspicion that there is an infectious agent that serves as a trigger in the atherosclerotic process. Examination for SP110 and HSP60 can be of some importance in the molecular examination of atherosclerotic plaques.

The bacterium performs dysregulation of LDL receptors and this additionally burdens the cells with lipids and favours the appearance of foam cells [6]. It is possible that the bacteria do not enter the intima of a blood vessel's wall like a "Trojan horse" inside the macrophage, but that inflammation has been stimulated by the autoimmune nature of the disease caused by molecular mimicry of HSP60 (virulence factor of CP) with proteins of the intima of the blood vessel. Heat shock proteins (HSP), normally localized intracellularly, become expressed on the cell surface in stressful conditions, such as an infection, and consequently activate antigen-presenting cells and start a cascade of the immune response [7]. The molecular

mimicry hypothesis has gained in importance given the fact that human HSP60 (hHSP60) shows an 85% compatibility with chlamydial HSP60 (cHSP60) [11]. In addition to a number of the other effects of HSP60, Koi *et al.* have demonstrated cHSP60 and hHSP60 in plaques on carotid atherosclerotic plaque samples, as well as their joint action in promoting TNF- α secretion.

Unlike HSP60, SP110 has a protective role in atherosclerosis. SP110, a human analogue of the Ipr1 gene, may be a constitutional defence factor against CP, and therefore against infectious atherosclerosis [12]. Namely, it is believed that predisposition to atherosclerosis is inherited as a complex of genetic characteristics of the organism by polygenic inheritance. The sst1 gene locus was found on chromosome 1 of a mouse, which contains genes whose expression leads to increased susceptibility to tuberculosis and infection with other intracellular pathogenic bacteria. Within the sst1 locus is a group of Ifi-75 genes, whose most important representative is the Ipr1 gene. Ipr1 is overexpressed in mice resistant to infection, and its expression does not occur in the population of mice susceptible to infection [13]. The closest human homologue of this gene is the SP110 gene, which is located on chromosome 2, and is thought to encode transcription cofactors as part of the action of hormone receptors in the cell nucleus. In this way, Ipr1 and SP110 would affect the action of numerous hormones, including corticosteroids, vitamin D and retinoic acid, with consequences for the life cycle of immune cells and the inflammatory response of the host [14]. The SP110 protein, which encodes the gene of the same name, has been observed in nuclear bodies (multiprotein complexes that regulate gene transcription and are localized in the nucleus) in acute viral infections and numerous autoimmune and malignant diseases [15]. Leu *et al.* demonstrated the protective role of SP110/Ipr1 in intracellular infections in a mouse model of *M. tuberculosis* infection by modulating NF- κ B activity in the form of promotion of anti-apoptotic mechanisms and down-regulation of TNF- α secretion. Thus, in contrast to HSP60, SP110 has a protective role in the processes of atherosclerosis and, in addition, they have the opposite effect on the expression of TNF- α , namely HSP60, by increasing the concentration of it, and vice versa with SP110.

The aim of the study is to hypothesize the correlation of CP-positive and CP-negative atherosclerotic plaques with the presence of HSP60 and SP110 expression in plaques, as well as TNF- α as a connected inflammatory marker.

Material and methods

The research was performed on fragments of blood vessel tissue obtained by forensic autopsies

at the Department of Pathology and Forensic Medicine of the Clinical Centre of Montenegro. All the deceased subjects had a cardiovascular-related cause of death.

The study included 124 sets of samples, of which 63 sets were considered for interpretation, as this number of subjects met the criteria for declaring the presence or absence of CP in plaques. The subjects were divided into two groups on the basis of criteria for the presence (33 subjects) or absence (30 subjects) of CP. A total of 252 artery samples were examined (63 quadruple sets of samples consisted of coronary artery, carotid artery, Willis' circle artery and abdominal aorta samples).

The presence of classical risk factors for atherosclerosis (hyperlipoproteinemia, diabetes, arterial hypertension, smoking, a family history of cardiovascular disease) was determined by a post-mortem interview with the family and by consulting medical records. The BMI was calculated at autopsy.

Samples were taken from the part of the blood vessel where atherosclerotic plaque was visible macroscopically at the site of the fatty stripe stage (identified as an area of yellowish discolouration at or above the level of the intima). Every set of samples consisted of the carotid artery, coronary artery, Willis' circle artery, and abdominal aorta. After sampling, the tissue was fixed in 4% formalin and paraffin moulds were formed. Routine haematoxylin and eosin staining, as well as immunohistochemical staining, were performed.

For the purpose of deparaffinization and rehydration, tissue sections were immersed in xylene for 3 min twice, followed by 3 min immersion in 1:1 solution of xylene and 100% ethanol and 3 min immersion in ethanol solutions of decreasing concentrations (100% twice, 95%, 70% and 50%, respectively), after which they were rinsed under running cold tap water. Antigen retrieval was performed by treating the sections with 10mM citrate buffer in the microwave for 10 minutes twice, after which they were rinsed with deionized water. Endogenous peroxidase was blocked using 3% H₂O₂ solution for 10 minutes at room temperature. The sections were then incubated with primary antibodies using the protocols instructed by the manufacturer.

The following primary antibodies were used: OMP1 (Polyclonal, Medac Inc, Hamburg, Germany, 1:10), CP-RR-402 (Monoclonal, Washington Research Foundation, Seattle, US, 1:1000), SP110 (Polyclonal Rabbit Anti-SP110, Abcam, Cambridge, UK, 1:200), HSP60 (Polyclonal Rabbit Anti-HSP60, Abcam, Cambridge, UK, 1:100) and TNF- α (Polyclonal Rabbit Anti-TNF- α , Abcam, Cambridge, UK, 1:100).

Standard LSAB+ (streptavidin-biotin-peroxidase) technique was used for immunohistochemical iden-

tification of the antigens, with 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogenic substrate. Each incubation was followed by rinsing the sections in Tris Buffered Saline (0.05M, 7.6 pH) and contrasting with hematoxylin.

Assessing of CP presence in plaques was performed by two immunobodies: OMP1 (Polyclonal, Medac Inc, Hamburg, Germany, 1:10) and CP-RR-402 (Monoclonal, Washington Research Foundation, Seattle, US, 1:1000). A positive result for both markers was interpreted as a reliable indicator of the presence of CP in the plaque, and a negative finding for both markers was a reliable finding of the absence of CP.

Statistical analyses were performed using IBM Statistics (SPSS) 10, as well as methods of descriptive statistics, χ^2 -test, ANOVA test and logistic regression. For microphotografies we used digital Zeiss Axiocam 105 Color (5 megapixel resolution camera) with white filter on Zeiss Axio Scope.A1 microscope. Digitalisation of slides was done by ZEN 2.3 lite software (blue edition, Carl Zeiss Microscopy, GmbH, 2011), using magnification 40 $\times$ /0.75. Immunohistochemical slides were analysed by Plug-in IHC profiler on ImageJ software. Three randomly selected cross-sections were analysed, and mean values were set as results for each sample.

Results

The mean age at the time of death was 59 years (ranging from 32 to 90 years, with a standard deviation of 15.77). The mean age of the CP-positive deceased subjects was 55.45 ± 15.41 , while the mean age of CP-negative deceased subjects was 62.67 ± 15.36 . The CP-negative deceased subjects were statistically significantly older ($p < 0.001$, t-test). The BMI of CP-positive deceased subjects was 27.69 ± 4.72 , while the BMI of CP-negative subjects was 32.67 ± 4.40 , which is significantly higher ($p < 0.001$, t-test).

The presence of classical risk factors was analysed using a χ^2 -test. Hypercholesterolemia, diabetes and a positive family history of cardiovascular diseases were significantly frequent in CP-negative samples. There was no significant difference in the incidence of arterial hypertension and smoking between the groups (Table I).

Logistical regression was performed as a method of simultaneous investigation of the relationship of all the examined factors with CP-positivity (unlike the previous analysis in which the risk factors were examined separately) (Table II). For an odds ratio (OR), as a product of logistical regression, less than 1, the result shows that a particular test factor is negatively related to the test result. The results showed that age, hypercholesterolemia, diabetes, arterial hypertension and BMI were negatively correlated with

Table I. Classic risk factors between the groups

RISK FACTORS		CP-NEGATIVE	CP-POSITIVE	P-VALUE
Hypercholesterolemia	–	13 (43.3%)	23 (69.7%)	< 0.001
	+	17 (56.7%)	10 (30.3%)	
Diabetes mellitus	–	21 (70%)	28 (84.8%)	0.005
	+	9 (30%)	5 (15.2%)	
Arterial hypertension	–	15 (50%)	18 (54.5%)	0.471
	+	15 (50%)	15 (45.5%)	
Family history of cardiovascular disease	–	10 (33.3%)	15 (45.5%)	0.049
	+	20 (66.7%)	18 (54.5%)	
Smoking	–	11 (36.7%)	11 (33.3%)	0.579
	+	19 (63.3%)	22 (66.7%)	
In total		30 (100%)	33 (100%)	

Table II. Logistic regression of the relationship of classical risk factors with CP-positivity

FACTORS EXAMINED	LOGISTIC REGRESSION PARAMETERS		
	ODDS RATIO	P-VALUE	95% CI
Age	0.965	0.001	0.944-0.986
Hypercholesterolemia	0.195	< 0.001	0.096-0.397
Diabetes mellitus	0.371	0.013	0.169-0.811
Arterial hypertension	0.448	0.030	0.217-0.925
Positive family history for cardiovascular disease	0.929	0.832	0.471-1.832
Smoking	0.755	0.446	0.366-1.556
BMI	0.773	< 0.001	0.718-0.832

Table III. TNF- α expression in CP-positive vs. CP-negative samples

	MIN	MAX	MEAN VALUE	STANDARD DEVIATION	CP-POSITIVE	CP-NEGATIVE	P-VALUE
Carotid artery	7	25	15.19	5.29	12.48 $\pm$ 4.64	18.17 $\pm$ 4.29	< 0.001
Willis circle	5	15	9.57	2.87	9.58 $\pm$ 2.72	9.57 $\pm$ 3.07	0.99
Aorta	7	25	15.49	5.07	12.94 $\pm$ 4.23	18.30 $\pm$ 4.43	< 0.001
Coronary artery	7	25	15.79	5.54	13.61 $\pm$ 5.02	18.20 $\pm$ 5.13	0.001
In total	5	25	14.01	5.43	12.15 $\pm$ 4.47	16.06 $\pm$ 5.67	< 0.001

ANOVA for comparison between arteries: $p < 0.001$

CP-positivity. The most significant negative correlation (the lowest OR) was shown by hypercholesterolemia. No significant relationship was found between CP-positivity and a positive family history of cardiovascular diseases, as well as smoking.

Immunotesting for SP110 showed that this marker is significantly more expressed in CP-negative plaques in all the examined arteries (Table III). The HSP60 marker was significantly more expressed in CP-positive plaques in all the examined arteries (Table IV). CP-negative plaques showed a higher TNF- α expression. The difference is present in all arteries except the Willis' circle (Table V).

Discussion

The results of the presented study showed that classical risk factors for atherosclerosis were more present in deceased subjects with CP-negative plaques, suggesting that CP may have been the cause of their atherosclerosis. The subjects with CP-negative plaques were significantly older and had a higher BMI at the time of death compared with CP-negative subjects. A significant difference between the CP-positive and CP-negative groups was found for the presence of hypercholesterolemia, diabetes, and a positive family history of cardiovascular disease,

Table IV. HSP60 expression in CP-positive vs. CP-negative samples

	MIN	MAX	MEAN VALUE	STANDARD DEVIATION	CP-POSITIVE	CP-NEGATIVE	P-VALUE
Carotid artery	5	25	14.67	4.99	17.21 ± 3.82	11.87 ± 4.65	< 0.001
Willis circle	6	24	13.36	4.84	16.33 ± 4.28	10.10 ± 2.96	< 0.001
Aorta	7	24	13.91	4.49	16.72 ± 4.14	10.80 ± 2.28	< 0.001
Coronary artery	6	25	14.08	4.60	16.45 ± 4.37	11.47 ± 3.28	< 0.001
In total	5	24	14.00	4.73	16.68 ± 4.12	11.05 ± 3.43	< 0.001

ANOVA for comparison between arteries: $p = 0.49$ **Table V.** TNF- α expression in CP-positive vs. CP-negative samples

	MIN	MAX	MEAN VALUE	STANDARD DEVIATION	CP-POSITIVE	CP-NEGATIVE	P-VALUE
Carotid artery	7	25	15.19	5.29	12.48 ± 4.64	18.17 ± 4.29	< 0.001
Willis circle	5	15	9.57	2.87	9.58 ± 2.72	9.57 ± 3.07	0.99
Aorta	7	25	15.49	5.07	12.94 ± 4.23	18.30 ± 4.43	< 0.001
Coronary artery	7	25	15.79	5.54	13.61 ± 5.02	18.20 ± 5.13	0.001
In total	5	25	14.01	5.43	12.15 ± 4.47	16.06 ± 5.67	< 0.001

ANOVA for comparison between arteries: $p < 0.001$

while there was no significant difference for arterial hypertension or smoking. Also, logistical regression showed that hypercholesterolemia had the most pronounced negative correlation with CP-positivity. The results indicate that the absence of classical risk factors for atherosclerosis in early CP-positive plaques suggest that bacterial infection may be a pathogenic trigger of the atherosclerosis process in the younger population without a significant load of risk factors. Izadi et al. demonstrated the presence of CP DNA in the plaques of 21.9% of patients with coronary atherosclerosis treated with an aorto-coronary bypass graft. Positive IgG on CP was present in 45.7% of patients, while IgM was positive in 4.8%; which suggests that it is a combination of long-term chronic infection and advanced plaque [16]. Sessa *et al.* examined the presence of CP DNA in atherosclerotic plaques, macrophages, and pericarotid lymph nodes in patients who had undergone carotid endarterectomy and found their presence to be higher than 70%. Their results indicate that the presence of CP in macrophages was more noticeable in the group of patients who had symptomatic disease, compared to asymptomatic patients, and they conclude that bacterial infection potentially contributes to plaque instability with previous significant blood vessel stenosis [16]. It is thought that PCR testing of macrophages on CP DNA could represent a significant diagnostic step in assessing the risk of atherosclerotic plaque complications [17], primarily because of the proven importance of macrophage positivity for CP and the ease of taking macrophages for analysis compared to histological analysis of plaque, which is carried out only after interventions that are intended for therapeutic

purposes [18]. Patients who are seropositive for CP have a faster progression of subclinical, non-manifest atherosclerotic plaques, confirmed by Player *et al.* in which coronary artery calcification was monitored on CT as an indicator of the plaque stage [19]. Wong *et al.* published a review of the relevant literature stating that CP is found in 15-100% of atherosclerotic plaques. The authors of this review found that the bacterium is predominantly found in advanced plaques, so they take the position that the bacterium does not start, but rather supports, the atherosclerotic process [20]. On the other hand, Assar et al. showed that CP DNA was present in 29.4% of thoracic aortic atherosclerotic plaques and in 5.9% of internal thoracic artery samples taken as a control group without atherosclerotic plaques. Also, their results indicate that there is a significant positive correlation between the presence of CP in advanced atherosclerotic plaque and in a healthy blood vessel without atherosclerosis within the same organism, which contradicts the view that the presence of bacteria in plaque is actually contamination due to a damaged endothelium [21]. El Yazouli *et al.* demonstrated in a sample of 115 patients with cardiovascular disease that dyslipidaemia was less common in the group of patients with the presence of CP DNA in their atherosclerotic plaques. Statistical analysis in their study showed that about 60% of patients had CP infection as an associated factor with other, classical risk factors for cardiovascular disease; 25% showed an independent role of classical risk factors; while 12% showed CP infection as a unique risk factor for atherosclerosis [22].

Our study showed a significantly higher expression of HSP60 in those infected, compared to the uninfected

ed plaques. Seropositivity for cHSP60 (c-chlamydial) is a sensitive and specific marker of acute coronary syndrome, independent of anti-CP IgG titre, levels of highly sensitive CRP or troponin T (7). Proven chronic infection with CP and anti-hHSP60 positivity are predictive factors for a cardiovascular event, especially if associated with high CRP [23] values. Risk factors for atherosclerosis (hypertension, smoking, oxLDL, free radicals, etc.) which act as a stress factor to the endothelium, favouring the release of hHSP60 in the cytosol and expression on the endothelial surface, thus helping with an autoimmune reaction initiated by cHSP60 [24]. It is Proven that mitogenic potential exerted on CP exerts mitogenic potential in the smooth muscle cells whose dominant effect through cHSP60 [24] and by increasing the expression of transcription factors EGR1 [24] and NF- κ B [25]. It has been experimentally proven that formalin-inactivated CP cannot enter cells and that cHSP60 does not come into contact with host cells due to the intracellular localization of this protein within the bacterium. Also, in such an experimental model, there is no increase in the expression of E selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on the host endothelium. This proves that the membrane antigens of CP do not play a role in the expression of these adhesive molecules, but that it is the role of cHSP60 [26]. Koi *et al.* demonstrated the co-localization of cHSP60 and hHSP60 in plaques on carotid atherosclerotic plaque samples, as well as their joint action in promoting the secretion of TNF- α and MMP by macrophages [27]. cHSP60 also stimulates the specific proliferation of T lymphocytes [28], as well as B lymphocytes, with a consequent increase in the secretion of IL-10 and IL-6 [29]. T lymphocytes in early, asymptomatic plaques have been shown to exhibit autoreactivity to hHSP60 [11]. Konflach *et al.* demonstrated by multiple linear regression that the concentration of hHSP60-specific T lymphocytes was significantly associated with intima-media thickness in the male population aged 17-18 years, while there was no significant association in the male population aged 50-69 years, which suggests that T-cell activation by hHSP60 is more significantly associated with wounds than with advanced atherosclerosis [30]. Exogenous intake of cHSP60 experimentally causes endothelial dysfunction in rabbits on a high cholesterol diet [31]. Hypercholesterolemic rabbits, in which exogenous intake of cHSP60 was performed, developed a fat stripe more rapidly, and macrophage infiltration was also more pronounced in more developed plaques, which suggests that this virulence factor supports both the early and late stages of atherosclerosis [32]. Oral administration of immunosuppressive doses of HSP60 in ApoE to mice leads to a reduction of atherosclerotic plaque, while subcutaneous administration has the opposite effect [33]. Also, Zhong *et al.*

described that intranasal application of small doses of HSP60 leads to a significant 33.6% reduction in plaque in the aortic root [34]. These results may be useful in the process of developing a possible "atherosclerosis vaccine" based on HSP60. Kuroda *et al.* demonstrated on carotid plaque samples obtained by endarterectomy that the most significant co-localization of cHSP60 and the CP antigen occurs within plaque macrophages; they conclude that altering macrophage function is a significant step in exhibiting the atherogenic effect of cHSP60 [35]. Knoflach *et al.* emphasize the importance of T lymphocytes, through results that indicate that reactivity against HSP60 is more present in T lymphocytes within developed plaque compared to T lymphocytes in circulating blood. Their conclusion is that HSP60-specific T lymphocytes circulate in the blood, and then their accumulation in advanced plaque occurs [36]. It is thought that testing the plasma concentration of HSP60-specific T lymphocytes in the future could be a screening method for early atherosclerosis [37]. Also, in a study by Bodolay *et al.* on patients with mixed systemic connective tissue disease, antibodies to HSP60 were shown to be more prevalent in a subgroup of patients who had cardiovascular comorbidities [38].

Significantly higher expression of SP110 in CP-negative plaques was observed, suggesting a protective role of this factor. SP110, a human analogue of the Ipr1 gene, may be a constituent protective factor against CP and against infectious atherosclerosis. Leo *et al.* demonstrated a protective role of SP110/Ipr1 in intracellular infections in a mouse model of *M. tuberculosis* infection by modulating NF- κ B activity in the form of promotion of anti-apoptotic mechanisms and down-regulation of TNF- α secretion. Infected mice that showed SP110/Ipr1 activity had developed lung lesions and better survival [12]. The lower expression of TNF- α in CP-positive plaques can potentially be attributed to SP110 activity, more precisely and it is attempted to suppress the inflammatory response to the presence of bacteria in the blood vessel wall. There are no human studies examining the expression of SP110 in atherosclerosis, nor the effect of this factor on CP, and in this domain this study can be considered pioneering. It is necessary to conduct additional genetic and molecular research in order to clarify its role in the infectious process of atherosclerosis, as well as to examine its potential in the prevention and treatment of atherosclerosis.

Although the influence of TNF- α in the infectious process of atherosclerosis is experimentally verified, mice with a genetic defect of TNF- α infected with CP had a significantly lower incidence of atherosclerosis [39]. Results show that the expression of TNF- α was more noticeable in CP-negative plaques. There is a possibility that early forms of plaque do not

show a pronounced effect of bacterial infection on the growth of this inflammatory marker. Janczak *et al.* analysed advanced, stenotic carotid plaques in 100 patients, detecting the presence of CP DNA in 68% of plaques, and infected plaques had a high expression of bFGF and TNF- α [40]. On the other hand, a meta-analysis by Filard *et al.* showed that patients with atherosclerosis had elevated systemic values of hsCRP, fibrinogen, IL-6, TNF- α and IFN- γ , while patients seropositive for CP had elevated hsCRP, fibrinogen, and IL-6 values, with no significant effect of seropositivity on the values of other biochemical inflammatory markers [41]. Oxahar *et al.* showed that infection of a human mast cell culture with CP results in an early increase in IL-8 and MCP-1 secretion, while an increase in TNF- α secretion was observed later in the development of the infection process [42].

Finally, our study showed most of the classical risk factors for atherosclerosis do not correlate with CP-positivity, pointing out very possible infective genesis of atherosclerosis. Protective SP110 and potentially linked TNF- α are significantly less expressed in CP-positive plaques, contrary to HSP60.

The authors declare no conflict of interest.

References

- Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 2000; 86 (8B): 3J-8J.
- Renko J. Bacterial DNA signatures in arterial inflammation [academic dissertation], University of Tampere, 2008.
- Dabiri H, Rezadehbashi M, Badami N, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of patients in Tehran, Iran. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 195-197.
- Epstein SE. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res* 2002; 90: 2-4.
- Honarmand H. Atherosclerosis Induced by Chlamydia pneumoniae: A Controversial Theory. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2013; 2013: 941392.
- Di Pietro M, Filardo S, De Santis F, Sessa R. Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 15105-15120.
- Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation* 1999; 100: e20-8.
- Pothineni NVK, Subramany S, Kuriakose K, et al. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur Heart J* 2017; 38: 3195-3201.
- Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1405-1411.
- Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2019; 29: 468-472.
- Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, et al. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999; 283: 1335-1339.
- Leu JS, Chen ML, Chang SY, et al. SP110b Controls Host Immunity and Susceptibility to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 369-382.
- Kramnik I, Dietrich WF, Demant P, Bloom BR. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8560-8565.
- Pan H, Yan BS, Rojas M, et al. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* 2005; 434: 767-772.
- Bloch DB, Nakajima A, Gulick T, et al. Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6138-6146.
- Izadi M, Fazel M, Akrami M, et al. Chlamydia pneumoniae in the atherosclerotic plaques of coronary artery disease patients. *Acta Med Iran* 2013; 51: 864-870.
- Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, et al. Chlamydia pneumoniae DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg* 2003; 37: 1027-1031.
- Frutos MC, Monetti MS, Mosmann J, et al. Molecular characterization of Chlamydia pneumoniae in animals and humans from Argentina: Genetic characterization of Chlamydia pneumoniae. *Infect Genet Evol* 2016; 44: 43-45.
- Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, et al. Chlamydia pneumoniae in asymptomatic carotid atherosclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 111-118.
- Player MS, Mainous AG 3rd, Everett CJ, Diaz VA, et al. Chlamydia pneumoniae and progression of subclinical atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol* 2014; 21: 559-565.
- Wong YK, Gallagher PJ, Ward ME. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Heart* 1999; 81: 232-238.
- Assar O, Nejatizadeh A, Dehghan F, et al. Association of Chlamydia pneumoniae Infection With Atherosclerotic Plaque Formation. *Glob J Health Sci* 2015; 8 (4): 260-267.
- Yazouli LE, Hejazi H, Elmdaghri N, et al. Investigation of Chlamydia pneumoniae infection in Moroccan patients suffering from cardiovascular diseases. *J Infect Public Health* 2018; 11: 246-249.
- Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1547-1559.
- Deniset JF, Hedley TE, Hlaváčková M, et al. Heat shock protein 60 involvement in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal* 2018; 47: 44-51.
- Kern JM, Maass V, Maass M. Chlamydia pneumoniae-induced pathological signaling in the vasculature. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55: 131-139.
- Rupp J, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, et al. Chlamydia pneumoniae infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3447-3452.
- Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999; 103: 571-577.
- Mosorin M, Surcel HM, Laurila A, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1061-1067.
- Wick C. Tolerization against atherosclerosis using heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* 2016; 21: 201-211.
- Knoflach M, Kiechl S, Mayrl B, et al. T-cell reactivity against HSP60 relates to early but not advanced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 195: 333-338.
- Mussa FF, Chai H, Wang X, et al. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. *J Vasc Surg* 2006; 43: 1301-1307.
- Hu Y, Chen Z, Jiang L, Chen F, Jin R, Cheng L. Effects of oral and subcutaneous administration of HSP60 on myeloid-de-

- rived suppressor cells and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498 (4): 701-706.
34. Bahamondez-Canas TF, Cui Z. Intranasal immunization with dry powder vaccines. *Eur J Pharm Biopharm* 2018; 122: 167-175.
 35. Kuroda S, Kobayashi T, Ishii N, et al. Role of Chlamydia pneumoniae-infected macrophages in atherosclerosis developments of the carotid artery. *Neuropathology* 2003; 23: 1-8.
 36. Knoflach M, Bernhard D, Wick G. Anti-HSP60 immunity is already associated with atherosclerosis early in life. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 323-331.
 37. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 361-403.
 38. Bodolay E, Prohászka Z, Paragh G, et al. Increased levels of anti-heat-shock protein 60 (anti-Hsp60) indicate endothelial dysfunction, atherosclerosis and cardiovascular diseases in patients with mixed connective tissue disease. *Immunol Res* 2014; 60: 50-59.
 39. Zafiratos MT, Cottrell JT, Manam S, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily members 1a and 1b contribute to exacerbation of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in mice. *Microbes Infect* 2019; 21: 104-108.
 40. Janczak D, Ziolkowski P, Szydelko T, et al. The presence of some cytokines and Chlamydia pneumoniae in the atherosclerotic carotid plaque in patients with carotid artery stenosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015; 69: 227-232.
 41. Filardo S, Di Pietro M, Farcomeni A, et al. Chlamydia pneumoniae-Mediated Inflammation in Atherosclerosis: A Meta-Analysis. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 378658.
 42. Oksaharju A, Lappalainen J, Tuomainen AM, et al. Pro-atherogenic lung and oral pathogens induce an inflammatory response in human and mouse mast cells. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 103-113.

Address for correspondence

Andrea Jovovic
 Faculty of Medicine
 University of Montenegro
 81000 Podgorica, Montenegro
 Tel. +38267814560
 e-mail: jovovicandrea33@gmail.com