

UNIVERZITET U BEOGRADU – MEDICINSKI FAKULTET

Urednici
Đorđe Radak
Vera Maravić-Stojković

IMUNOLOGIJA U GENEZI I TERAPIJI ATEROSKLEROZE

Beograd, 2004.

Urednici

Đorđe Radak, Vera Maravić-Stojković

IMUNOLOGIJA U GENEZI I TERAPIJI ATEROSKLEROZE

Autori

Prof. dr Đorđe Radak, Dr sci. med, vaskularni hirurg

Prof. dr Nebojša M. Lalić, Dr sci. med, endokrinolog

Prof. dr Siniša Dimković, Dr sci. med, kardiolog

Dr Vera Maravić-Stojković, Dr sci. med, imunolog

Dr Jovo Kolar, Dr sci. med, neurolog

Asist. dr Petar Popov, Mr sci. med, vaskularni hirurg

Asist. dr Nenad Ilijevski, Mr sci. med, vaskularni hirurg

Asist. dr Aleksandra Jotić, endokrinolog

Recenzenti

Prof dr Vladimir S. Kostić, dopisni član SANU

Prof. dr Gordana Đorđević-Denić

Doc. dr Aleksandar Nešković

Doc. dr Dragana Vučević

Dr Branko Petrović, Dr sci. med.

Dr Zdravko Milić, Mr sci. med.

Izdavač

DC Grafički centar

Štampa

Planeta print, Beograd

Tiraž

500 primeraka

CIP – Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

616.13–004:612.017(082)

IMUNOLOGIJA u genezi i terapiji
ateroskleroze / [autori Đorđe Radak ... et
al.] ; urednici Đorđe Radak, Vera
Maravić-Stojković. – Beograd : DC Grafički
centar, 2004 (Beograd : Planeta print). –
120 str. : ilustr. ; 24 cm

Tiraž 500. – Bibliografija uz svako poglavlje.

ISBN 86–85073–00–6

1. Радак, Ђорђе

а) Атеросклероза – Имунолошки аспект –
Зборници

COBISS.SR–ID 112595212

PREDGOVOR

Ateroskleroza je bolest sa najvećom prevalencom i istovremeno najviše izučavan patogenetski i klinički entitet, na početku trećeg milenijuma.

*Nesagledivo mnoštvo bazičnih i kliničkih studija aterogeneze dovelo je do viška informacija, što je rezultiralo čestom upotrebom fraze o **multifaktorijskoj etiologiji** ateroskleroze. Fraza o multifaktorijskoj etiologiji ateroskleroze u početku je pružala iluziju tolerantnog prihvatanja različitih činjenica u složeni mozaik. Međutim, mozaik nikako da postane jasan teorijski koncept u koji se uklapaju činjenice, a vizija o bazičnom konceptu patogeneze ateroskleroze postaje previše komplikovana.*

*Teorija o **imuno/inflamatornom iniciranju i modulisanju aterogeneze** pre dvadest godina dočekana je sa fascinacijom. Prikupljeno je mnogo dokaza u korist ove hipoteze, naročito u oblasti:*

- *Inflamatornog odgovora na infekciju u zidu krvnog suda,*
- *Autoimunskih fenomena u aterogenezi,*
- *Genetski determinisanih disfunkcija citokina i ekspresije njihovih receptora u aterogenezi,*
- *"Monocitnog klirens sistema" u metabolizmu lipoproteina na nivou intime,*
- *Protektivnog dejstva autoantitela specifičnih za neoepitop oksidisanog lipoproteina LDL,*
- *Terapijskih mogućnosti kod inflamacije arterijskog zida u sprečavanju aterogeneze.*

Međutim, aterogeneza je toliko složen proces da je uvek teško ustanoviti da li su imuno-inflamatorni fenomeni uzrok ili posledica aterogeneze. Tako smo došli u situaciju da od šume podataka ne vidimo drvo jasnog teorijskog koncepta.

Ova knjiga je naš pokušaj da nam stvari postanu malo jasnije i da, pretpostavimo kuda dalje.

Autori

SADRŽAJ

PREDGOVOR	3
SADRŽAJ	5
Radak Đ, Maravić-Stojković V.	7
1. IMUNOLOŠKI ASPEKTI ATEROSKLEROZE	7
1.1. Imunološka fenomenologija u aterosklerozi	9
1.2. Aterogeneza kao bolest cirkulišućih imunskih kompleksa	12
1.3. Patogena dejstva imunskih kompleksa	15
1.4. Uloga imunskih kompleksa u aterogenezi	16
1.5. Autoimunost i ateroskleroza	21
1.6. Infekcija i ateroskleroza	23
Literatura	27
Maravić-Stojković V, Radak Đ, Dimković S.	31
2. ENDOTEL U ATEROSKLEROZI	31
2.1. Imunološki atak na endotel u aterosklerozi	31
2.2. Imunološke lezije endotela kao „nedužnog posmatrača”	34
2.3. Endotel i NO/NOS	35
2.4. Adhezivne molekule	36
Literatura	40
Radak Đ, Maravić-Stojković V.	43
3. ULOGA NUTRICIJENATA U PATOGENEZI ATEROSKLEROZE	43
3.1. Imunološki aspekt uloge holesterola u patogenezi ateroskleroze	43
3.2. Alergijske reakcije i njihov značaj u aterosklerozi	47
Literatura	49
Maravić-Stojković V, Radak Đ.	53
4. ĆELIJSKE KOMPONENTE PROCESA ATEROSKLEROZE	53
4.1. Mononuklearni fagocitni sistem	53
4.2. Ultrastrukturni aspekti ponašanja mononuklearnih fagocita u toku aterogeneze	55
4.3. „Monocitni klirens sistem” u metabolizmu lipoproteina na nivou intime	56
4.4. „Penušave ćelije” kao znak insuficijencije monocitnog klirens sistema	58
Literatura	59

Radak Đ, Maravić-Stojković V.	63
5. PROLIFERACIJA I MIGRACIJA	63
Literatura	67
Maravić-Stojković V, Radak Đ, Popov P.	69
6. KOLAGEN I EKSTRACELULARNI MATRIKS.....	69
Literatura	74
Radak Đ, Maravić-Stojković V, Kolar J.	75
7. ANGIONEOGENEZA	75
Literatura	79
Radak Đ, Dimković S, Maravić-Stojković V.	81
8. TERAPIJSKI ASPEKTI IMUNOMODULACIJE U ATEROGENEZI I GENSKA TERAPIJA	81
Literatura	88
Lalić N.M, Radak Đ, Jotić A.	95
9. ANTIINFLAMATORNI, IMUNOMODULATORNI I ANTITROMBOGENI EFEKTI TRETMANA HIPOLIPIDEMIJSKIM AGENSIMA U TERAPIJI ATEROSKLEROZE	95
9.1. Razvoj ateroskleroze: kombinacija lipidnih i nelipidnih poremećaja	95
9.2. Terapija hipolipemijskim agensima: značaj pleiotropnih nelipidnih efekata	97
Literatura	99
Radak Đ, Lalić N,M, Ilijevski N.	103
10. ANTIBIMIKROBNA TERAPIJA U PREVENCIJI ATEROGENEZE.....	103
Literatura	115

1. IMUNOLOŠKI ASPEKTI ATEROSKLEROZE

Ateroskleroza je sistemsko, hronično, progresivno, degenerativno-metaboličko, inflamatorno oboljenje arterijskog zida.

Aterogeneza je dinamičan patofiziološki skup **multifaktorijelno** iniciranih **degenerativnih i regenerativnih procesa** u arterijskom zidu koji dovode do:

- povećanja debljine i rigiditeta intimo-medijalnog kompleksa,
- suženja lumena (**stenosis**), i na kraju
- kompletne opstrukcije arterije (**occlusio**) uz distalnu ishemiju^{1,2}.

Ateroskleroza je bolest sa najvećom incidencom i prevalencom, i istovremeno najviše izučavan patogenetski i klinički entitet, na početku trećeg milenijuma. Ateroskleroza u manifestnom stadijumu postoji kod većine ljudi u starijim, ali i srednjim, godinama u savremenoj civilizaciji i može se smatrati normalnom konsekvencom starenja^{1,2}.

Danas je koronarna, karotidna i periferna aterosklerotična bolest glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u industrijski razvijenim zemljama. Nedavno je statistika Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) pokazala da će se taj trend nastaviti i progredirati tokom novog milenijuma, pri čemu će obolevati sve mlađi deo populacije^{1,2}.

Ateroskleroza zahvata velike i srednje arterije kao sistemski hronična bolest distrofijsko-proliferativnog tipa koja progredira sa tipičnim stadijumima u svom razvoju. Ona počinje u ranoj životnoj dobi, kao **stabilan** fibro-lipidni plak, koji ne izaziva simptome, niti znake ishemije. Obično su potrebne dekade da bi se razvio vulnerabilan, ulcerisani plak sa prizidnom trombozom, "**aktivni plak**", odgovoran za kliničku simptomatologiju na bazi

- fokalne ili
- globalne ishemije tkiva.

Ateroskleroza je najčešći uzrok ishemijskog oboljenja srca i mozga^{1,2}. Pucanje plaka, stvaranje fisura na njemu, sa posledičnom prizidnom trombozom ("**nestabilni plak**") uzrokuje akutni koronarni i cerebralni ishemijski sindrom: nestabilna angina pectoris, tranzitorni ishemički atak (TIA), infarkta miokarda i mozga (Stroke)^{3,4}.

Pitanje je zašto aterogeneza, koja uglavnom protiče godinama bez kliničkih simptoma, iznenada iskomplikuje život teškim, pa i fatalnim, simptomima ishemije. Tip plaka (kompozicija) pre nego veličina plaka (ozbiljnost stenoze) predstavlja najvažniju determinantu za razvoj tromba.

- Heterogen lipidima bogat i mek plak je znatno opasniji nego
- čvrst, homogen plak, bogat kolagenom, zbog svoje vulnerabilnosti, sklonosti rupturiranju i visoke trombogenosti nakon disrupcije^{3,4,5}.

Aterogeneza je, verovatno, patološki proces o kome je najviše publikovano u istoriji medicinske literature. O patogenezi ateroskleroze zna se mnogo, ali se, ipak ne može reći da je ona i razjašnjena. Sakupljeno je nepregledno mnoštvo eksperimentalnih, kliničkih, funkcionalnih i ultrastrukturnih podataka, ali još ne postoji njihova celovita i opšteprihvaćena teorijska formulacija.

Protivurečnosti i konflikti između:

- lipometaboličke,
- trombotičke,
- inflamatorne,
- endokrine,
- hemodinamske i ostalih teorija aterogeneze obično se prevazilaze, ili zaobilaze, tumačenjem ateroskleroze kao **multifaktorijsko** uzrokovano procesa.

Fraza o multifaktorijskoj etiologiji ateroskleroze u početku je pružala iluziju tolerantnog prihvatanja različitih činjenica u složeni mozaik. Međutim, mozaik nikako da postane jasan teorijski koncept u koji se uklapaju činjenice, a vizija o bazičnom konceptu patogeneze ateroskleroze postaje previše komplikovana.

Dva teorijska koncepta odavno koncentrišu oko sebe veliki broj radova, ideja i istraživača.

- Rokitsky je još 1844. naslutio značaj trombogeneze; nasuprot tome
- Virchow je 1862. tvrdio da intima izmenjena hroničnim inflamatornim procesom pokreće aterogenezu, koja počinje imbibicijom intime sastavnim delovima plazme, lipidima i fibrinogenom.

Čitav vek kasnije Davies⁶ je citirao ove radove i konstatovao da postoji sve više podataka koji potvrđuju ulogu inflamatorne komponente u aterogenezi. Osnove imunološke teorije ateroskleroze dali su Beaumont JL i Beaumont V⁷, Constantinides⁸, Gerrity⁹, Hammerschmidt i sar¹⁰, Nagornev i sar¹¹.

Imunološka teorija ateroskleroze u skladu je s **konceptom procesa starenja**¹² prema kojoj **timus-zavisni imunski sistem** ima ulogu svojevrstnog “**biološkog časovnika**”. Njegovim iscrpljivanjem slabi moć raspoznavanja sopstvenog i preciznost imunoregulacije, a olakšana je pojava autoimunskih, autoalergijskih i drugih autodeskrutivnih i degenerativnih procesa.

Scebat i sar.¹³ su pokazali da incidenca ateroskleroze spontano raste sa starošću eksperimentalnih životinja, kod kojih su imunohemijski verifikovane visoke koncen-

tracije imunoglobulina (IgG, IgA i IgM) i aktiviranih komponenata komplemента (C1-9), koji se deponuju u endotel i fibrile elastina ateromatozno degenerisane intime.

Aterogeneza i njene komplikacije rezultat su dinamične interakcije između zida krvnog suda i krvne struje, koji podrazumevaju sledeće procese:

1. *inflamaciju* - aktivaciju endotela što dovodi do njegove disfunkcije, povećane propustljivosti, regrutovanja monocita i T-limfocita^{14,15};
2. *rast* - proliferaciju i migraciju glatkomišićnih ćelija (GMĆ), povećanu sintezu matriksa¹⁶;
3. *degeneraciju* - akumulaciju lipida¹⁷;
4. *nekrozu* - smrt ćelija (citotoksični efekat oksidisanih lipida)¹⁸;
5. *kalcifikaciju* – proces akumulacije kalcijuma oko fibrila medije¹⁹;
6. *trombozu* - regrutovanje trombocita i formiranje fibrina²⁰.

Pojam **razvijene ateroskleroze** obuhvata karakteristične intra - i ekstracelularne lipidne depozite, destrukciju arhitektonike arterijskog zida, proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, fibrozu, hijalinizaciju, kapilarizaciju i periarterijsku limfocitnu infiltraciju sa mogućom kalcifikacijom arterijskog zida.

Složenost pojma ateroskleroze mora se imati u vidu kada se razmišlja o njenoj patogenezi. U novije vreme sve se češće pominju imunološki i inflamatorni faktori i infektivni agensi kao mogući uzročnici povreda arterijskog zida, koji su uzrok pokretanja i progresije aterogeneze.

1.1. IMUNOLOŠKA FENOMENOLOGIJA U ATEROSKLEROZI

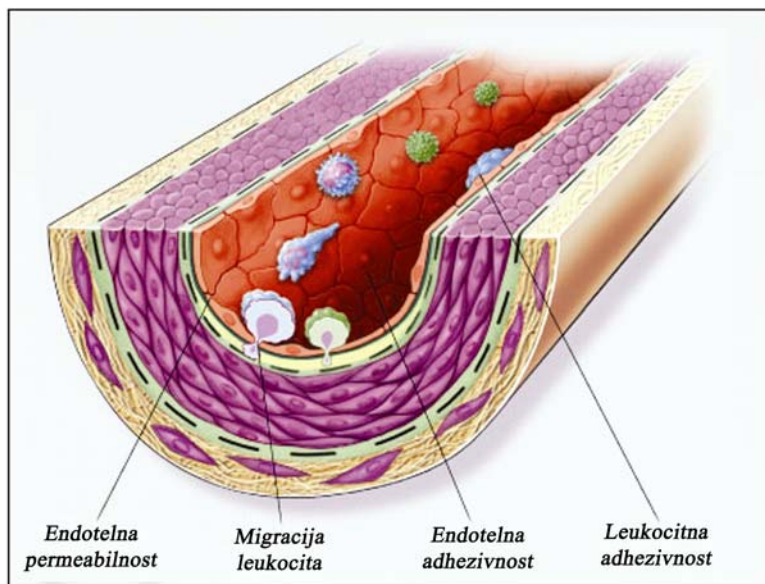
Humoralni i ćelijski imunski odgovor učestvuju u svim stadijumima aterogeneze. Međutim, njihova uloga je bila zanemarivana u klasičnim istraživanjima aterogeneze dugi niz godina. Ako su i bili razmatrani, imunološki fenomeni su bili smatrani događajima od sekundarnog značaja^{22,23}.

Prihvatanjem teze o aktivnom učestvovanju imunskog sistema, nameće se pitanje da li se radi o

- **nespecifičnoj inflamaciji**, kao reakciji na neki oblik hronične iritacije ili je u pitanju
- **specifična inflamacija** kao reakcija na određeni antigen. Novija istraživanja govore o mogućoj ulozi hronične infekcije ili autoimunosti^{24,25,26}.

Ako se svi poznati pokretači aterogeneze podvrgnu strogoj kritici i svedu na najosnovnije faktore, koji se pojavljuju u okviru mnogih teorija, može se reći da nema

ateroskleroze bez povrede arterijskog endotela i ugradnje holesterolom bogatih lipida u intimu i mediju^{25,26} (Slike 1-4).



Slika 1. Povećana kapilarna propustljivost nastaje usled lezije endotelne ćelije. To dovodi do migracije solubilnih medijatora imunosti i proinflamatornih ćelija u sub-endothelni prostor. Endotel postaje adherentan, ćelije iz krvne struje usporavaju kretanje, zaustavljaju se, aktiviraju i prolaze kroz endotelni monolejer.

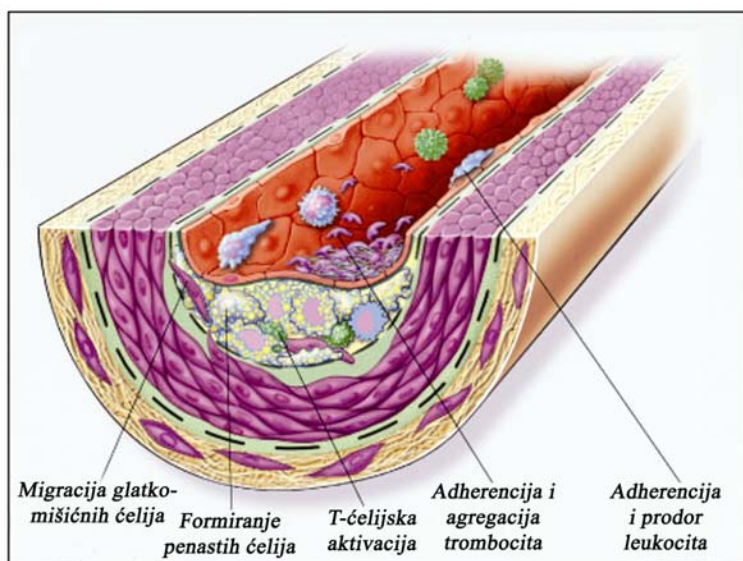
Znanja akumulirana tokom svih ovih decenija vodila su ka formulaciji dva osnovna koncepta:

- “odgovor na povredu” ili iritaciju, i
- teoriju o “modifikovanim lipoproteinima male gustine (LDL)”²².

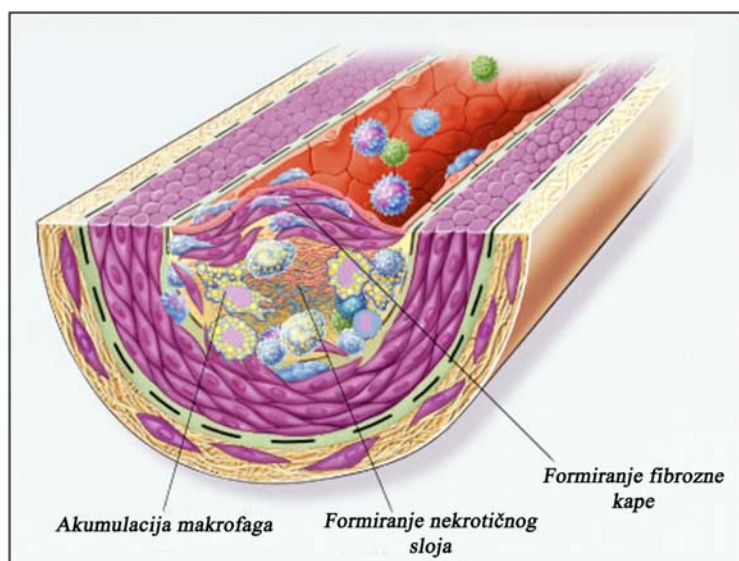
Constantinides⁸ je još 1980. sumarno prikazao brojne radove koji potvrđuju da se imunološkim mehanizmima mogu izazvati i lezija endotelne barijere i hiperlipemija.

Di Perri, Forconi i Auteri²⁶ su ukazali na mogućnost ozleđivanja endotela kao “**nedužnog posmatrača**” (*innocent bystander*) tokom mnogih imunoloških reakcija koje nisu specifične za sam zid krvnog suda (*indirect target*) (Slika 1). Endotel može biti povređen, sa sledećim poremećajem njegove permeabilnosti, kao direktno i specifično ciljano tkivo (*direct target*) imunološkog ataka, koji je pokrenut senzibilizacijom organizma na “vlastito” vaskularno tkivo¹³.

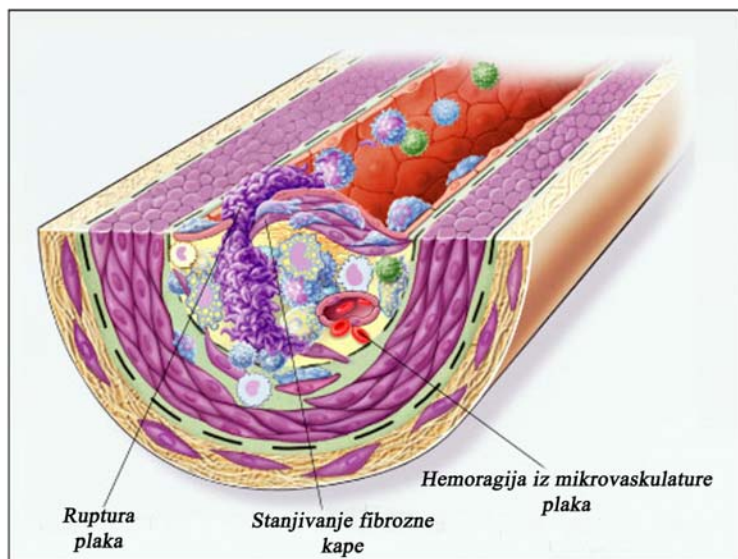
U patogenezi ateroskleroze važnu ulogu imaju **autoimunskim putem izazvane dislipidemije**, odnosno hiperlipidemije, kojih ima više vrsta¹³⁻¹⁷. Hiperlipidemija i hiperholesterolemija predisponiraju aterogenezu.



Slika 2. Glatkomišićne ćelije migriraju iz medije, menjaju svoj genotip i pretvaraju se u „penaste ćelije”. Nakupljanje „penastih ćelija” dovodi do povećanja plaka, aktivacije T-limfocita, monocita i trombocita u intimi.



Slika 3. Na mestu nakupljanja „penastih ćelija” dolazi do akumulacije makrofaga, koji i sami postaju „penaste ćelije”. U centru plaka dolazi do degradacije „penastih ćelija” iz kojih se oslobađaju lipidi. Nastaje nekrotično srce plaka, prekriveno slojem fibroznih ćelija, koje čine fibroznju kapu.



Slika 4. Aktivirani makrofazi oslobađaju metaloproteinaze, što dovodi do istanjivanja fibrozne kape. Na najtanjem mestu dolazi do rupture plaka, krvarenja iz mikrovaskulature plaka i oslobađanja sadržaja u lumen krvnog suda, sa distalnom embolizacijom.

Imunološki procesi dovode do

- nagomilavanja makromolekularnog materijala u intimi, i
- učestvovanju u metabolisanju i uklanjanju lipoproteina iz intime²⁷.

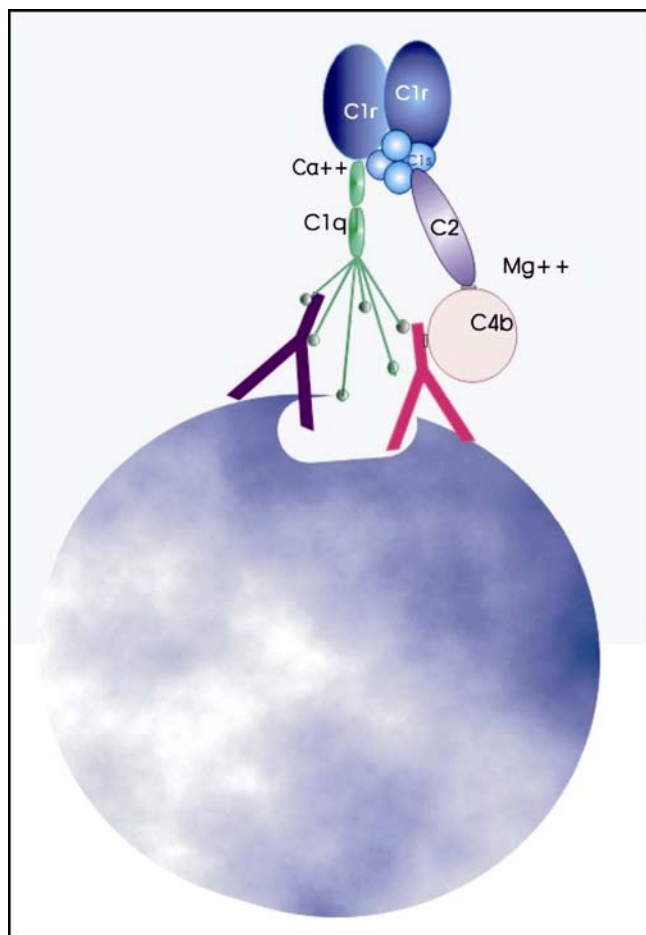
Mononuklearni fagocitni sistem ima ulogu „čistača” intime u fiziološkim uslovima⁹. On sprečava nakupljanje čimbenika iz seruma u intimi i zaustavlja aterogenezu. Iste te ćelije, ali u izmenjenim uslovima, mogu se pojaviti i kao pokretači oštećenja tkiva.

1.2. ATEROGENEZA KAO BOLEST CIRKULIŠUĆIH IMUNSKIH KOMPLEKSA

Prilikom izazivanja eksperimentalne ateroskleroze kod zečeva, pomoću dijeta bogate lipidima i holesterolom, Minick i Murphy²⁹ su ustanovili da je aterosklerotična degeneracija značajnije izražena kod životinja koje su istovremeno intravenski senzibilisane ksenogenim serumskim proteinima, pa čak i onda kada nisu u ishrani primale holesterol. Nađena je **povećana količina rastvorljivih imunskih kompleksa u serumu**

ovih životinja i depoziti imunskih kompleksa na mestu gde se razvila inflamacija sa zadebljanjem intime, a potom ateroskleroza²¹.

Bolest imunskih kompleksa je klasifikovana kao III tip reakcije preosetljivosti prema Coombsu i Gellu. Vaskularno i limfno tkivo su predisponirani da stradaju kao „**nedužni posmatrači**”, jer su uvek izloženi najvećim koncentracijama imunskih kompleksa i njihovih produkata (Slika 5).



Slika 5. Klasičan put aktivacije komplementa preko C1q subjedinice.

Primenom sličnog eksperimentalnog dizajna, Di Perri²⁶ nalazi porast nivoa serumskih gamaglobulina i imunskih kompleksa, ali i porast totalnih lipida u krvi, bez hiperlipidemične dijeta. Ova **neočekivana hiperlipidemija** bila je utoliko veća ukoliko je bila veća potrošnja serumskog komplementa.

Na osnovu ovih i drugih nalaza, grupa istraživača sa Di Perriem na čelu, iznela je **hipotezu o interakcijama sistema komplementa i serumskih lipoproteina** u vezi sa

tivno mesto imunoglobulina čini stereospecifična šupljina²⁹, čije zidove tvore hipervarijabilni delovi varijabilnog segmenta teškog (V_H) i lakog lanca (V_L)³⁰. Kada se između bočnih grupa aminokiselinskih rezidua hipervarijabilnog regiona antitela i reaktivnih grupa antigena uspostave nekovalentne (elektrostatske, vodonične, Van der Walsove i dr.) veze, dolazi do promene konformacije molekule imunoglobulina, čime oni postaju sposobni za reagovanje preko do tada maskiranih delova molekula. Konstantni (Fc) segment imunoglobulina time stiče sklonost za reagovanje s C1q podjedinicom prve komponente komplementa, trećom (C3) i četvrtom (C4) komponentom komplementa³⁰.

Aktivirani molekuli u sastavu imunskih kompleksa deluju i kao opsonini, potpomažući citotropne reakcije i fagocitozu^{30,31}. Štetni efekti imunskih kompleksa zavise od stepena njihove rastvorljivosti i veličine³². Dimenzije primarnih imunskih kompleksa mogu se naknadno povećati reagovanjem sa C1q podjedinicom komplementa ili sa serumskim proteinima, kao što su: albumini, lipoproteini i imunoglobulini^{33,34}.

Degradiranje imunskih kompleksa odvija se u monocitno-makrofagnom sistemu jetre, slezine, pluća i drugih organa. Mononukleari i polimorfonukleari fagocituju imunске komplekse, potom oslobađaju lizosomalne enzime koji razaraju te komplekse, ali pri tome mogu svojim hidrolitičkim delovanjem izazvati lokalna oštećenja tkiva^{9,27}.

1.3. PATOGENA DEJSTVA IMUNSKIH KOMPLEKSA

Rastvorljivi imunski kompleksi često se navode kao „ključ” za objašnjenje velikog broja imunopatoloških pojava.

Povišen nivo imunskih kompleksa u serumu nađen je kod sledećih bolesti:

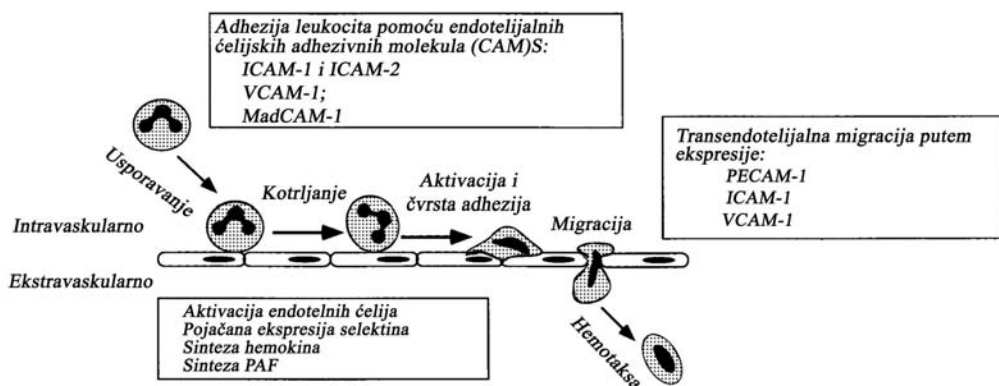
- sistemske bolesti vezivnog tkiva (sistemski lupus eritematodes, periarteritis nodoza, reumatoidni artritis, sklerodermija, sarkoidoza, Behcetov sindrom);
- bolesti srca i krvnih sudova (ateroskleroza, vaskulitisi);
- infektivni procesi (subakutni bakterijski endokarditis, septicemija, sifilis, gonoreja, lepra, herpes zoster, infektivna mononukleoza);
- kod odojčadi hranjene kravljim mlekom;
- bolesti gastrointestinalnog trakta (ciroza jetre, akutni i hronični hepatitis, Chronova bolest, ulcerozni kolitis, celijakija);
- bolesti endokrinih žlezda (dijabetes melitus, autoimunski tireoiditis);
- glomerulske nefropatije, esencijalne krioglobulinemije;
- kod hematoloških oboljenja;
- kod terapijske primene imunoglobulina, insulina, soli zlata, levamisola i
- kod mnogih malignih bolesti^{34,35}.

Imunski kompleksi se pojavljuju u ulozi posrednika, preko kojega se iskazuju brojni patogenetski faktori³⁶.

Isti agensi, zavisno od osobina imunskog odgovora domaćina i karaktera formiranih imunskih kompleksa, **moгу izazvati različita oštećenja** i vv. Istovremeno, različiti antigeni mogu da budu ugrađeni u komplekse srodnih osobina i da pokrenu srodne kliničke manifestacije³⁶.

1.4. ULOGA IMUNSKIH KOMPLEKSA U ATEROGENEZI

Imunofluorescencijom je registrovano nakupljanje imunskih kompleksa duž bazalne membrane oštećenog vaskularnog endotela već trećeg dana od početka serum-ske bolesti kod zeca. Deponovanje imunskih kompleksa praćeno je zadebljanjem endotela, raslojavanjem elastičnih slojeva arterijskog zida, nekrozom intime i leukocitnom infiltracijom intime (Slika 7) i medije³².



Slika 7. Shematski prikaz intravaskularnih činilaca transendotelne migracije imunokompetentnih ćelija. Nakon aktivacije endotelnih ćelija (EC) cirkulišuće ćelije bivaju usporene, dolaze u kontakt sa endotelom po kome se kotrljaju, aktiviraju i čvrsto priljube uz EC. To dovodi do pojačane ekspresije adhezivnih molekula i na jednim i na drugim ćelijama i do migracije ćelija u subendotelni prostor. Put migratornih ćelija kroz ekstravaskularni prostor uslovljen je hemotaktičkim faktorima i njihovim koncentracijskim gradijentom.

Sastav proteina iz humanog aterosklerotičnog tkiva aorte analizirali su Hollander i sar³⁶. Imunoelektroforezom i imunodifuzijom našli su IgG, IgA i aktivirane komponente komplementa u intimi. Pokazali su imunohemijski da su proteini čvrsto vezani za

kolagena i elastična vlakna, zbog čega su pretpostavili da je neki kolagenu-sličan antigen izazvao stvaranje imunskih kompleksa, koji se kasnije vezuju za konstituente intime³⁶.

Beaumont i sar.³⁷ su postavili hipotezu da **holesterol i lipoproteini imaju ulogu antigena** pri indukciji stvaranja imunskih kompleksa. Pretpostavili su da holesterol iz hrane može da deluje kao antigen i da stimuliše stvaranje specifičnih antiholesterolskih antitela i obrazuje imunske komplekse u cirkulaciji. Hrana bogata holesterolom izazivala je hiperlipemiju u zamorčića, a elektroforezom seruma u gelu agaroze je detektovana frakcija koja je karakteristična za imunokompleksne hiperlipoproteinemije autoimunskog tipa³⁸. Posle tromesečne hiperholesterolemijske dijetе zabeleženo je povišanje serumske globulinske zone, pri čemu su nađeni monoklonovi u ovoj zoni, što ukazuje na antigenski efekat holesterola^{38,39}.

Autoimunski kompleksi koji sadrže lipoproteine niske (LDL) i vrlo niske gustine (VLDL) kao antigene i IgG i IgM kao specifična antitela nađeni su u serumu i zidu aorte sa aterosklerotskim lezijama⁴⁰.

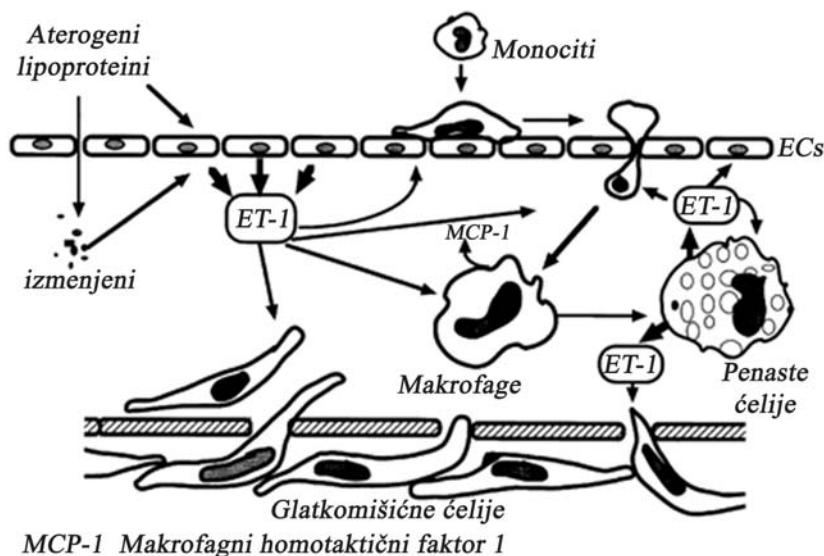
Prisustvo cirkulišućih imunskih kompleksa dokazano je precipitacijom sa polietilenglikolom (PEG) i **kod bolesnika sa infarktomiokarda**. Imunski kompleksi su se pojavljivali petog dana posle infarkta, maksimalne koncentracije su dostizali druge i treće nedelje, a posle šeste nedelje su nestajali iz cirkulacije. Na osnovu sličnih rezultata^{40,41}, nekoliko imuno-kardioloških timova je predložilo praćenje dinamike imunskih kompleksa kao dijagnostičkog i prognostičkog kriterijuma kod bolesnika sa aterosklerozom i koronarnom bolešću.

Imunski kompleksi koji sadrže autoantigenske lipoproteine dokazani su imunohistohemijski u 45 uzoraka aterosklerotične intime, koji su dobijeni biopsijom prilikom hirurških zahvata na otvorenom srcu¹¹. Isti tim hirurga izneo je pretpostavku da nakupljanje imunskih kompleksa, fibrinogena, komponenti komplementa i lipoproteina sa apo-B proteinom u subendotelnim slojevima arterijskog zida može da pokrene talase novih imunoloških reakcija zbog izlaganja krvnoj struji degenerisanih i antigenski „stranih” molekula elastina i kolagena⁴¹. Kasniji radovi su potvrdili veliki značaj **autoantitela koja specifično prepoznaju epitope koji se ispoljavaju na oksidovanim molekulima**⁴²⁻⁴⁵.

Nastajanje reaktivnih aldehida ili oksidisanih fosfolipida tokom lipidne peroksidacije sa (apo)lipoproteinima ili drugim fosfolipidima, deluje kao „okidač” za ekstenzivan humoralni i celularni imunski odgovor (Slika 8) u *in vivo* uslovima⁴². **Titar antitela uperenih protiv „epitopa specifičnih za oksidaciju” korelira sa stepenom progresije ateroskleroze** kod ljudi i na eksperimentalnom modelu. Pri tome, nastajanje antigena nije ograničeno na aterosklerotsku leziju⁴².

Imunizacija zečeva ili miševa sa oksidisanim LDL redukuje progresiju ateroskleroze, što sugerira da se usmeravanjem (modulacijom) humoralnog i celularnog imunskog odgovora može postići koristan terapijski efekat. Eksperimentalne životinje kojima je genetskim inženjeringom uklonjen gen za apolipoprotein E (apoE^{-/-} miševi) pogodne su za proučavanje prirode antigena koji se stvaraju *in vivo*, kao i za proučavanje bioloških efekata izabrane populacije antigena. Tako, prirodno stvorena antitela, izolovana iz ne-imunizovanih aterosklerotičnih apoE^{-/-} miševa („EO”-antitela) omogu-

ćavaju uporedne analize sa klonom EO-antitela imunizovanih životinja. EO-antitela se vezuju za oksidisane fosfolipide, strukture koje prepoznaju makrofazi preko svojih receptora „hvatača” (*scavenger receptors*) i na taj način **inhibiraju makrofagnu ingestiju oksidovanog LDL-a**. Slična antitela u humanoj populaciji sa anti-fosfolipidnim sindromom mogu uticati na trombocite. Kloniranjem gena za varijabilni segment teškog (V_H) i lakog (V_L) lanca imunoglobulina za četiri EO antitela koja specifično prepoznaju oksidovane fosfolipide (selekcionisane nezavisno jedan od drugog), je pokazano da su ta antitela identična sa T-15 antitelima, selekcionisanim evolucijski, koje proizvode B1 limfociti a koja se detektuju u pneumokoknim infekcijama⁴².



Slika 8. Shematski prikaz intravaskularnih činilaca aterogeneze i zbivanja na nivou intime i medije krvnog suda. Modifikovani lipoproteini bivaju uvučeni u citoplazmu makrofaga, poreklom iz krvne struje, ali i glatkomišićnih ćelija, poreklom iz medije. Migraciju ovih ćelija diktira solubilni medijator endotelin (ET)-1, koji potiče iz endotelnih ćelija (EC). Novonastale penaste ćelije oslobađaju makrofagni hemotaktički faktor (MCP)-1, pod čijim uticajem dolazi do migracije novih monocita na mesto lezije.

Antitela koja specifično prepoznaju epitope koji se ispoljavaju na oksidovanim molekulima mogu se koristiti i za kvantifikaciju ateroskleroze. U dijagnostici naročito je korisno jedno takvo Fab antitelo specifično za oksidaciju, klonirano iz biblioteke fagocita, obeleženo sa IK17, zbog toga što prepoznaje isključivo epitope u lipidima bogatom centralnom delu humanog ili animalnog ateroma. Na animalnom murinom modelu pokazano je da *in vivo* ugradnja antitela obeleženih radioaktivnim jodom (^{125}I) korelira sa nekoliko konvencionalno prihvaćenih načina merenja ateroskleroze, ali je senzitivnija u pogledu registrovanja regresije lezije bogate epitopima-specifičnim-za-oksidaciju⁴².

Arteritis u sklopu aterogeneze koja počinje kao posledica delovanja imunskih kompleksa, ima odlike nekrotičnog vaskulitisa⁴⁴ sa masivnim nakupljanjem mono- i polimorfonukleara, koji prodiru kroz ledirani endotel u intimu i mediju i tamo se aktiviraju.

Delovanjem na trombocite, bazofile i polimorfonukleare imunski kompleksi iz cirkulacije zeca izazivaju **sekreciju vazoaktivnih amina** (histamina, 5-hidroksitriptamina i dr.) koji povećavaju permeabilnost endotela i omogućavaju deponovanje imunskih kompleksa, lipoproteina i ostalih makromolekula duž elastične membrane kroz koju se filtriraju u intimu izazivajući dalje lezije³².

Imunski kompleksi mogu da **aktiviraju sistem komplementa**, pri čemu se stvaraju hemotaktički faktori (C3a i C5a fragmenti i C567 kompleksi)⁴⁵. Aktivacijom treće komponente komplementa mogu da se razlože veliki, već deponovani imunski kompleksi, pri čemu nastaju manji, rastvorljivi kompleksi⁴⁶. Sistem komplementa potpomaže uklanjanje imunskih kompleksa iz arterijskog zida, time što se imunski kompleksi vezuju za fragment treće komponente komplementa (C3). Tako nastali molekul može da reaguje sa fagocitima. Fagocitoza ovih kompleksa olakšana je reagovanjem sa C3b receptorima na površini makrofaga⁴⁴.

Fagocitoza imunskih kompleksa zavisi od

- njihove veličine i
- stepena komplementarnosti sa receptorima za konstantni deo imunoglobulina (Fc) ispoljenim na membranama fagocita⁴⁴.

U aterosklerotičnim lezijama nađeni su uvek,

- granularni depoziti imunoglobulina i
- komponenta komplementa, kao i
- visok nivo ekspresije C3b receptora (CR1) i C3bi receptora (CR3) na makrofagama, za razliku od arterija koje nisu izmenjene²³.

Budući da je veoma mali broj B-ćelija unutar aterosklerotske lezije, jasno je da ti imunoglobulini nisu produkovani *in situ*. Najverovatnije je da su glavni antigeni protiv kojih se sekretuju ta antitela **oksidovani LDL** (oxLDL) i lokalni stres-proteini (**heat shock proteins**, HSP)²³.

Imunski kompleksi na površini endotela mogu **aktivirati trombocite** (Slika 9)

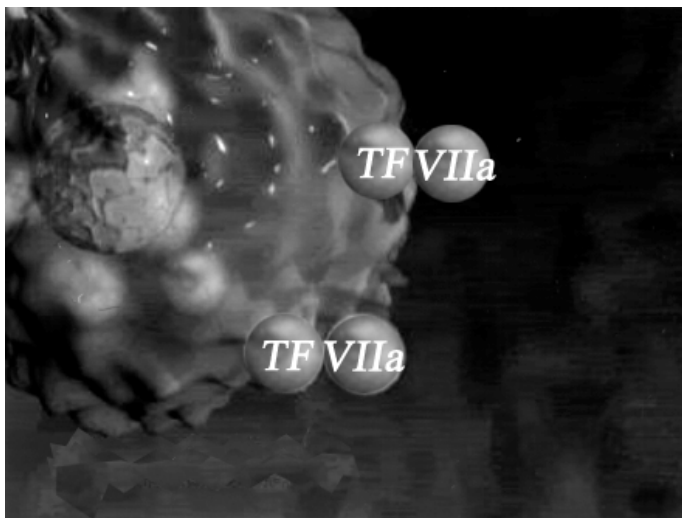
- direktno reagujući sa receptorima na trombocitima, ili
- indirektno, preko aktivirane šeste komponente (C6) komplementa, koja deluje na trombocite⁴⁷.

I obratno, koagulacioni sistem utiče na imunske komplekse. Moguća je inkorporacija Hagemanovog (XII) faktora i VIII faktora koagulacione kaskade u imunske komplekse, pri čemu se menja njihova funkcionalna sposobnost⁴⁷.

Imunski kompleksi se uklanjaju fagocitozom i hidrolitičkim delovanjem lizosomalnih enzima.

Ultrastrukturnim analizama makrofaga Henson⁴³ je zapazio da **fagozomi** koji se formiraju fagocitozom imunskih kompleksa vrlo brzo bivaju spojeni sa lizozomima koji

sadrže kiselu fosfatazu, a kasnije se fuzionišu sa granulama koje sadrže beta-glukuronidazu. Elektronskom mikroskopijom makrofaga nađeno je da u nekim slučajevima membrana fagocitne vakuole ostaje otvorena prema spoljašnjoj sredini i posle spajanja sa lizozomom i njegove degranulacije u vakuolu⁴³. Kroz ovaj otvor, koji se zatvara nešto kasnije, **prosipaju se lizozomalni enzimi**. Osim toga hidrolaze „procure” i prilikom svakog novog otvaranja vakuole kod fagocitoze novih imunskih kompleksa⁴³.



Slika 9. Prikaz aktivacije trombocita na koje deluju ćelijski medijatori, kako poreklom iz aktiviranih endotelних ćelija, tkivni faktor (TF), tako i činioci koagulacione kaskade (faktor VIIa) i drugi.

Prosipanje lizozomalnih hidrolaza je registrovano i kod polimorfonukleara izloženih dejstvu imunskih kompleksa. Naročito mnogo kisele fosfataze nađeno je u ekstracelularnom prostoru oko ovih ćelija⁴⁷. Citoplazmatski enzimi kao što je laktat dehidrogenaza nisu nađeni u okolini ovih fagocita, što govori da su oni sačuvali svoj vijabiletet i da nije bilo citolize.

Henson⁴⁴ je opisao ove mehanizme za otpuštanje lizozomalnih enzima pod uticajem imunskih kompleksa i nazvao ih „**podrigivanje posle gutanja**”. Pretpostavlja se da tako mogu nastati tkivne lezije na mestima deponovanja imunskih kompleksa. Interesantno je da agensi koji podižu nivo unutarćelijskog cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), kao što su teofilin, prostaglandin PgE itd., zaustavljaju otpuštanje kiselih hidrolaza iz fagocita. Pretpostavlja se da je to posledica uticaja na mikrotubularni sistem zadužen za regulisanje intracelularnog saobraćaja lizozoma i vakuola⁴³⁻⁴⁹.

Klinički dokazi o značaju imunskih kompleksa

Povećan serumski nivo **imunskih kompleksa** (IC) specifičnih za *Chlamydia pneumoniae* i CMV nađen je u bolesnika koji su doživeli ishemički cerebralni infarkt. Imunski kompleksi specifični za *C. pneumoniae* i CMV bili su značajnije povišeni u

pacijenata koji su imali teži oblik šloga sa lošijom prognozon, sa većim neurološkim deficitom i većim naknadnim mortalitetom, nakon 30 dana⁴⁸.

1.5. AUTOIMUNOST I ATEROSKLEROZA

Autoimunski koncept nastanka ateroskleroze je zajednički činilac za mnogo-brojne dokaze da imunski sistem čoveka može da postane autoagresivan i učestvuje u patogenezi ateroskleroze.

Autoimunizacija na stres-proteine

Autoimunizacija na stres-proteine, ili proteine toplotnog šoka, engl. *Heat shock proteins*, HSP 60/65, je moguć mehanizam iniciranja ateroskleroze⁴⁹.

Stres-proteine, HSP 60 proizvode arterijske endotelne ćelije u stanju stresa, na poznatim predilekcionim mestima za razvoj aterosklerozne lezije (npr. na mestima račvanja arterija). Visokokonzervirani region HSP 60 epitopa predstavlja metu za različite činioce humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora tokom odbrane od mikroba (virusa, bakterija, parazita)⁴⁹.

Teorijski, svaka bakterijska i virusna infekcija, kao i imunizacija, mogu pokrenuti produkciju antitela usmerenih prema specifičnim epitopima HSP molekula koja bi, **zbog sličnosti između bakterijskih i humanih molekula**, mogla da iniciraju autoimunske patološke procese.

Hronične i subkliničke infekcije su pogotovo opasne zato što izazivaju kontinuiranu stimulaciju sinteze antitela. Endotelne ćelije, makrofazi i glatke mišićne ćelije u ateromatozno izmenjenim krvnim sudovima ispoljavaju HSP molekule na svojoj membrani. Time se stvara mogućnost za unakrsnu reakciju. Inače, HSP molekule obično nisu prikazane na površini zdravih ćelija. Njihovo ispoljavanje dešava se pri različitim oblicima stresa.

Zbog protektivne stečene imunizacije tokom mladog životnog doba (bakterijska i virusna infekcija ili imunizacija) **mi „plaćamo” razvojem ateroskleroze u starosti**. Pogotovo ako je vaskularni endotel izložen uticaju klasičnih faktora rizika (hipertenzija, oxLDL, hiperkoagulabilnost, toksini itd.)⁴⁹.

Ako je vaskularni endotel dugo izložen povišenom krvnom pritisku, to čini endotelne ćelije vulnerabilnim i podložnim za druge stresogene uticaje. Rezultat je istovremena ekspresija HSP 60 i adhezivnih molekula na endotelu, kao što su intercelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1), vaskularni adhezivni molekul-1 (VCAM-1), endotelni-leukocitni adhezivni molekul (ELAM)⁴⁹.

Autoimunost vezana za imunogenost oksidisanog LDL

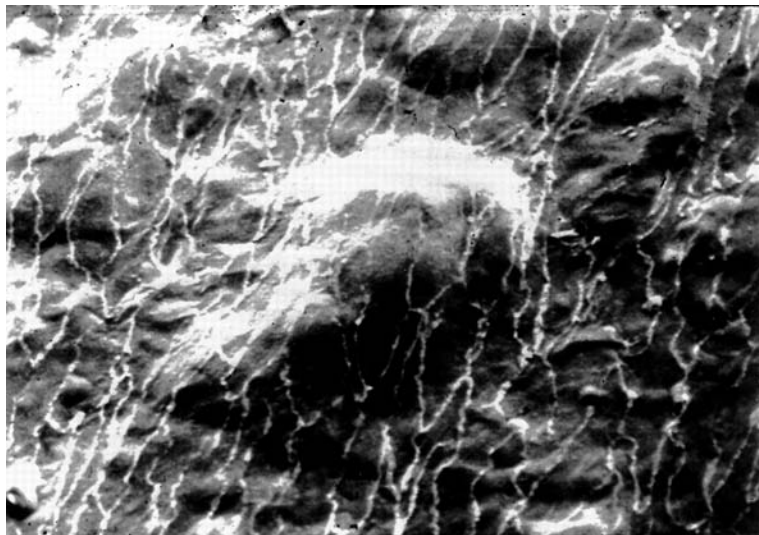
Subendotelno nagomilani lipoproteini niske gustine LDL podležu enzimskoj transformaciji, neoksidovanoj modifikaciji, što rezultira nastankom produkta koji pose-

duju veliku sklonost ka vezivanju za C-reaktivni protein (CRP). Tako se stvaraju uslovi za aktivaciju komplementa. Degradirani LDL istovremeno postaje ligand za receptore-hvatače makrofaga, i na taj način monociti bivaju privučeni na mesto lezije, proždiru lipoproteine i postupno se preobražavaju u penaste ćelije.

Lipoproteini velike gustine (HDL) imaju ključnu protektivnu ulogu, jer oni započinju transport holesterola u obrnutom pravcu, iz penastih ćelija napolje, iz zida ka lumenu krvnog suda. Kada LDL-depoziti pređu kritičnu granicu, prekomerna aktivacija komplementa i makrofaga rezultira stvaranjem uslova za hroničnu inflamaciju (Slika 3)⁵⁰

Oksidisani *low density lipoprotein* (oxLDL), kao i stres proteini (*heat shock proteins*) makromolekuli koji su delovi bakterije *Chlamydia pneumoniae*, u sastavu ateromatoznog plaka mogu da indukuju snažan autoantigeni odgovor lokalnih T limfocita po principima autoimunske reakcije.

Prema tome, ateroskleroza je, specijalan oblik imunopatološkog oboljenja (Slika 10), koje je izazvano aktivacijom arhaičnih komponenata imunskog sistema usmerenih prema „izmenjenom sopstvenom”.



Slika 10. Formiranje fibrolipidnog plaka u prvoj fazi sa očuvanim endotelnim pokrivačem. (SEM)

Ako je aterogeneza auto-imunski pokrenuta znači da bi inhibicijom imunskih reakcija, imunomodulacijom, došlo do zauzdavnja procesa aterogeneze, i obrnuto, prekomernom aktivacijom imunskog sistema se proces rasplamsava.

Stoga je Bhakdi rezultate svoga višegodišnjeg naučnog istraživanja izrekao u jednoj rečenici. Tkivni depoziti LDL su glavni uzročnik ateroskleroze: okolnosti koje promovišu insudaciju lipoproteina (kao hipertenzija, dijabet, homocisteinemija itd.) samo su faktori rizika⁵⁰.

Imunološki, inflamatorni i infektivni procesi deluju i

- na serumski nivo LDL i
- na njegov metabolizam u nivou arteriskog zida.

Redukcija plazmatskog nivoa LDL ne samo da prevenira, nego može da vodi ka regresiji ateroskleroze. Antioksidansi i imunomodulatori bi mogli delovati inhibicijom lokalnih oksidacionih i proinflamatornih procesa, kao antiaterogena sredstva.

1.6. INFEKCIJA I ATEROSKLEROZA

Infekcija-inflamacija koncept može biti:

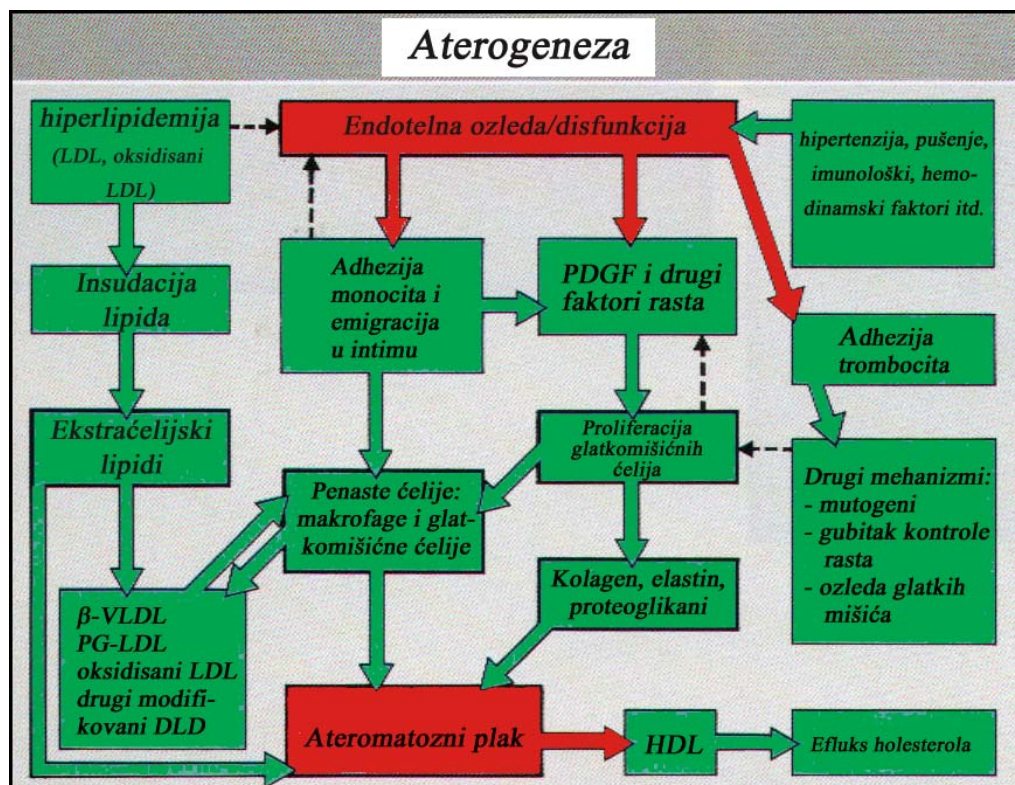
- Inicijator aterogeneze ili uz druge klasične faktore rizika
- Akcelerator aterogeneze.

Aterogeneza se može pokrenuti kao „**kolateralna šteta**” tokom protektivnog, inflamatorno-proliferativnog odgovora arterijskog zida protiv agresije različitih infektivnih agenasa. Ako se iritacija-inflamacija, lezija, održava dugo i ako su prisutni drugi faktori rizika za aterogenezu, ona postaje ekcesivna (Slika 10).

Proaterogeni mehanizmi delovanja infektivnih agenasa mogu biti (Slika 11):

- **Direktna invazija** zida krvnog suda sa inflamatornim odgovorom, lokalnom akumulacijom limfocita i makrofaga, uz produkciju citokina i tkivnih faktora rasta;
- **Lokalno otpuštanje endotoksina** (lipopolisaharidi), koji povećavaju unos holesterol-estara u makrofage, koji postaju penušave ćelije;
- **Molekularna mimikrija mikrobnih stres proteina** *heat shock protein-a* HSP-60, sa humanim HSP, koja indukuje autoimunsku reakciju;
- Indirektni **sistemski efekat udaljene infekcije**, zbog otpuštanja lipopolisaharida, koji lediraju endotel, sistemski povećavaju citokine, aktiviraju inflamatorne markere, deluju prokoagulantno izazivajući trombozu i akutnu ishemiju;
- **Indukcija promena u lipoproteinima preko citokina**, porast nivoa low-density lipoprotein-a (LDL), pad nivoa high-density lipoprotein-a (HDL), što je uvod u aterogenezu.

Nakon više decenija bavljenja aterogenezom, u jednom od svojih poslednjih radova Russell Ross²³ iznosi suštinu procesa aterogeneze, po sopstvenom viđenju. **Ateroskleroza predstavlja protektivni, inflamatorno-proliferativni odgovor usmeren prema različitim agensima, koji mogu da prouzrokuju bolest. Ako se iritacija-lezija održava prekomerno dugo, ona postaje ekcesivna i postaje bolest sama po sebi.**



Slika 11. Shematski prikaz multifaktorijskog procesa aterogeneze.

Hipoteza da **infektivni agensi** i konsekventni **inflamatorni odgovor** mogu dovesti do ateroskleroze vrlo je aktuelna.

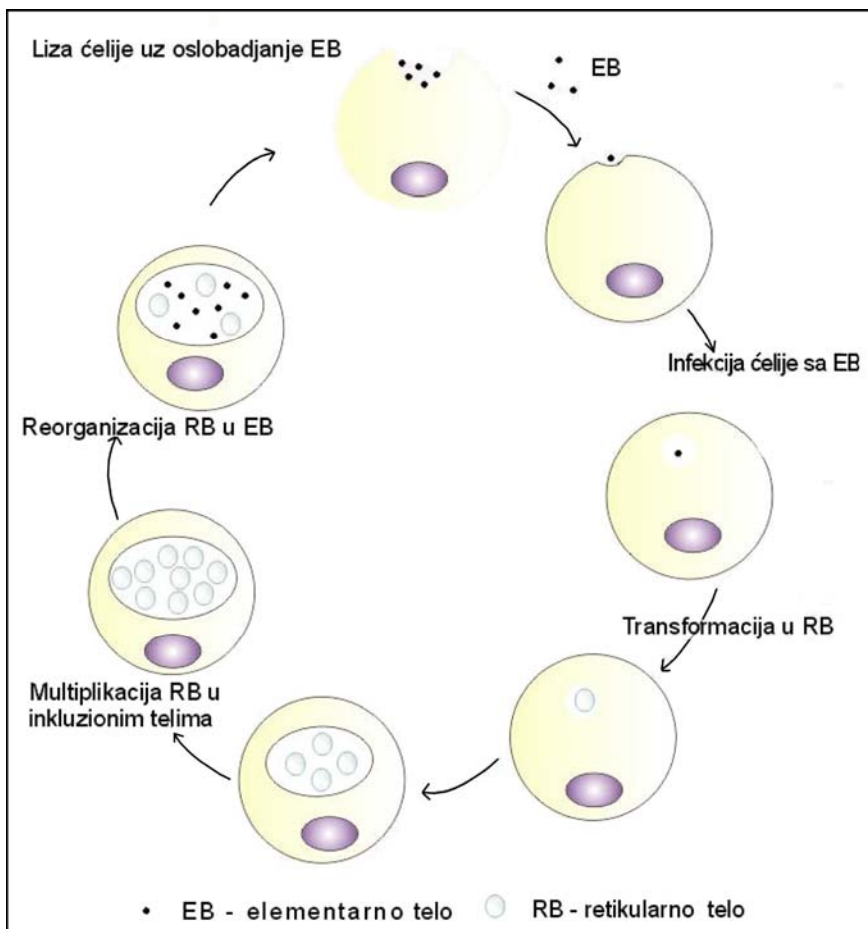
Model ovog pristupa je autoimunski proces koji po principu okidača, izaziva *Chlamydia pneumoniae*²³.

Chlamydia je mala gram-negativna, **intracelularna bakterija** (Slika 12), koja obično izaziva infekcije respiratornog trakta. Rasprostranjena je svuda i može da se umnožava u različitim ćelijama – glatkoćelijskim, endotelnim ćelijama, makrofagama itd. Prisustvo *C. pneumoniae* u aterosklerotskim lezijama prvi put je dokazano 1992. godine⁵¹, a potvrđeno različitim metodama u preko 50 studija publikovanih do sada^{52,53}.

Inficirane endotelne ćelije pokazuju

- znake aktivacije sa oslobađanjem slobodnih radikala⁵⁴⁻⁵⁵,
- pojačanu sekreciju citokina (faktora nekroze tumora – alfa, TNF-α i interleukina-1, IL-1)^{54,55},
- pojačanu sekreciju hemokina (monocitni hemotaktički protein-1, MCP-1 i interleukin-8, IL-8)⁵⁵,

- pojačano ispoljavaju važnih adhezivnih molekula (E-selektin, CD62-E; intercelularni adhezivni molekul-1, ICAM-1, CD54; vaskularni adhezivni molekul-1, VCAM-1, CD106)⁵⁷, posredstvom kojih inficirane ćelije započinju i održavaju proaterogenu inflamaciju.



Slika 12. Razvojni ciklus *Chlamydia pneumoniae*. Zdrava ćelija se okuži intracelularnim parazitom *C. pneumoniae* prodorom elementarnog telašca (EB). Replikacijom se EB transformiše u retikularno telašce (TB), koje se multiplikuje u inkluzionim telima. Metamorfoza nezrelih oblika RB završava se transformacijom u EB, što dovodi do lize ćelije domaćina i širenja infekcije.

Eksperimentalna (*in vitro*) infekcija *Chlamydia pneumoniae* humanih ćelija glatkih mišića izaziva produkciju interleukina-6 (IL-6) i bazičnog faktora rasta fibroblasta (bFGF, engl. *Basic fibroblast growth factor*) dok nema uticaja na produkciju faktora rasta poreklom iz trombocita (PDGF, engl. *Platelet derived growth factor*)⁵⁸.

Seroepidemiološke studije su pokazale povezanost *Chlamydia pneumoniae* i ateroskleroze. Te su studije dobile potvrdu morfološkim-ultrastrukturnim analizama i tehnikama molekularne biologije.

Elektronskom mikroskopijom je **dokazano prisustvo atipičnih patogena** u ateromatoznoj leziji krvnog suda, ali **ne i u zdravim segmentima** krvnog suda. Nažalost, detekcija *C. Pneumoniae* se retko može potvrditi tehnikom kulture ćelija, što naučnu javnost vraća na nivo gde se samo pretpostavlja da je patogen uzročnik ateroskleroze. Ipak, ovi podaci podupiru hipotezu, koja je još uvek kontroverzna, da inflamatorno oboljenje izazvano *C. Pneumoniae* dovodi do razvoja ateroskleroze⁵³.

Inflamacija je glavni faktor u patogenezi ateroskleroze, a *Chlamidia* je od naročitog značaja kao potencijalni stimulus inflamatornog odgovora.

C. pneumoniae indukuje

- produkciju citokina,
- oksidativne procese,
- proteolizu i autoimunske procese preko *heat stres-proteina* (HSP-60).

Na mišijem modelu aterogeneze ona ubrzava aterosklerozu. *Chlamydia* učestvuje u formiranju plaka, ali ne i u trombotičkim događajima⁵².

C. pneumoniae je povezana sa zadebljanjem intime i medije u karotidnim arterijama, kao i patološkim promenama u zidu aneurizme aorte. Osobe koje imaju visok titar IgG antitela uperenih protiv *C. pneumoniae* poseduju trostruko veći rizik od nastajanja abdominalne aneurizme aorte (AAA) od zdravih individua⁵².

Iako 70-80% pacijenata sa koronarnom aterosklerotičnom bolešću i skoro 100% pacijenata sa AAA poseduju bakteriju u aktivnom stanju, za razvoj koronarne aterosklerotične bolesti, potrebno je više od toga. Nekoliko **faktora rizika** utiču na patogenezu infekcije, i to: starost, pol, navika pušenja duvana, fizička inaktivnost, ishrana i stres.

Sa druge strane, *C. pneumoniae* može sama po sebi uticati na **povećanje nivoa C-reaktivnog proteina**, indukciju citokina, porast nivoa plazmatskih triglicerida i povećanje ukupnog holesterola sa redukcijom HDL⁵².

Povećan nivo triglicerida i snižen nivo HDL nađen je tokom drugih sistemskih infekcija izazvanih Gram negativnim bakterijama i virusima⁵³.

C. pneumoniae, kao Gram negativna bakterija sadrži lipopolisaharide na spoljašnjem sloju svoje membrane, zato ona može da se razmnožava u makrofazima, glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama indukujući sintezu faktora nekroze tumora, TNF i interleukina-1, kako i citokina koji utiču na promenu profila serumskih lipoproteina^{56, 57}. Slične osobine ima *Helicobacter pylori*^{58,59}.

Postavlja se pitanje da li *C. pneumoniae*:

- pokreće aterogenezu ili samo
- čini invaziju oštećene intime ateromatozno degenerisane arterije, i u tom slučaju da li je ona nedužni posmatrač – *bystander* ili potencira razvoj hronične aterogeneze.

Naročito je interesantan podatak da antibiotska terapija doprinosi poboljšanju aterogenetskog profila pacijenata. Tetraciklini (**doxycyclin**) i nova generacija makrolidnih antibiotika (**azithromycin**, **roxithromycin**) su uspešni u lečenju pacijenata zaraženih sa *Chlamydia pneumoniae*. Ukidanjem antibiotske terapije dolazi do ponovnog razvoja ateroskleroze i povećanja konsektivnog mortaliteta i morbiditeta⁵².

Da bi se utvrdio stvarni značaj antimikrobne terapije neophodne su **velike randomizirane prospektivne kliničke studije**.

LITERATURA

1. Winsor T and Hyman C: Peripheral vascular disease. Lea and Febinger. Philadelphia, 146-166, 1967.
2. Jukema JW: New insights into atherosclerosis. *Cardologie* 7: 37-40, 2000.
3. Fuster V, Lewis A, Conner A: Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: Insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90: 2126-2146, 1994.
4. Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring-the-cause of acute myocardial infection, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 53: 363-373, 1985.
5. Falk E and Fuster V: Coronary Atherosclerosis: Plaque Disruption and Thrombosis. Sankyo Pharma, 1-11, 2000.
6. Davies DF: Immunological aspects of arteriosclerosis. *Proc Nutr Soc* 32: 293-295, 1976.
7. Beaumont JL and Beaumont V: Immunological aspects of arteriosclerosis. In *Atherosclerosis Reviews*. Ed. by R Paoletti and AN Gotto Jr. Raven Press, New York 3: 133-146, 1978.
8. Constantinides P: Present evidence for the role of immune factors in atherogenesis. In *Immunity and arteriosclerosis*. Proc of the Sero Symp. London 24: 23-29, 1980.
9. Gerrity RG: The role of monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 103(2): 101-200, 1981.
10. Hammerschmidt DE, Greenberg CS, Yamada O and Craddock PR: Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. *J Lab Clin Med* 98(1): 68-77, 1981.
11. Nagornev V and Tararak E: Immune complexes and human heart coronary artery (CA) wall metabolism in atherosclerosis. IX World Congress of Cardiology, Moscow 2, Abstr 845, 1983.
12. Burnet FM: An immunological approach to ageing. *Lancet*, ii. 358-340, 1970.
13. Scebat I, Renais J and Groult N: Etude des lesions aortiques spontanees du lapin. Role possible de mecanismes immuns. *Parci Arterielle* 6(1): 37-45, 1981.
14. Faruqui RM, DiCorieto PE: Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *Br Heart J* 69 Suppl S19-S29, 1993.
15. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM: Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 23: 835-843, 1994.

16. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
17. Small DM: Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insight from lipid physical biochemistry. *Atherosclerosis* 8: 103-129, 1988.
18. Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344: 793-795, 1994.
19. Berliner JA, Navah M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LI, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ: Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91: 2488-2496, 1995.
20. Falk E, Fernandez-Ortiz A: Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 75: 1B-7B, 1995.
21. Fuest G, Szondy E, Szekely J, Nanai I, Geroe S: Studies on the occurrence of circulating immune complexes in vascular diseases. *Artery* 7(5): 352-366, 1978.
22. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q: Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 16(1): 27-33, 1995.
23. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
24. Laman JD, de Smet BJ, Schonenveld A, van Meurs M: CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today* 18: 272-277, 1997.
25. Radak Đ: Eksperimentalna arterioskleroza u svetlu nekih imunoloških parametara. Magistarski rad, Beograd, 1983.
26. Di Perri TS, Forconi A and Auteri A: Experimental evidence for immunological mechanisms in atherosclerosis. In: *Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp. London* 24: 7-21, 1980.
27. Wolynsky H: Lysosomes and atherosclerosis. In: *Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp. London* 24: 189-199, 1978.
28. Minick RC and Murphy GE: Experimental induction of athero-arteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II. Effect of repeatedly injected foreign protein in rabbits fed a lipid rich cholesterol poor diet. *Amer J Pathol* 73: 265-268, 1973.
29. Capra JD and Edmundson AB: The antibody combining site. *Scient Am* 236: 50-59, 1977.
30. Winkelhake JL: Immunoglobulin structure and effector function. *Immunochemistry* 15: 695-714, 1978.
31. Cohrane CG: Mechanisms involved in the deposition of immune complexes in tissue. *J Exp Med* 134(3): 75-89, 1971.
32. Marrack JR and Richards GB: Light scattering studies on the formation of aggregates in mixture of antigen and antibody. *Immunology* 20: 1019-1040, 1971.
33. Živanović LJ: Dokazivanje rastvorljivih imunokompleksa u serumu bolesnika sa glomerulskim nefropatijama. Magistarski rad, Beograd, 1980.
34. Bollinger A, Hollmann B, Schneider E and Fontana A: Trombangitis obliterans: Diagnose und Therapie im Licht neuer immunologischer Befunde. *Schweiz Med Wochenschr* 109(15): 537-543, 1979.
35. Nikolić V: Serumski lipidi i lipoproteini i imunološka reaktivnost. 12 Kongres Saveza fizioloških društava Jugosl, Sarajevo, 1982.
36. Hollander W, Colombo MA, Kirkparick B, Paddock J: Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque with special reference to immunoglobulins, C3-complement

- component, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-microglobulin. *Atherosclerosis* 34(4): 391-405, 1980.
37. Beaumont JL, Baudet MF, Dacht C and Beaumont V: Autoimmune hyperlipemia and autoimmune Xanthomatosis. *Atherosclerosis* V. Ed. by: AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin, pp 334-336, 1979.
 38. Nikolić B, Vitić J, Nikolić V, Živanović LJ: Tip dislipidemije u serumu zamorčica koja je izazvana hranom bogatom holesterolom. *Acta Biol Med Exp Suppl* 1(198) Abstr 92, 1979.
 39. Đorđević G: Prilog proučavanju mehanizma nastanka plućnog emfizema u toku eksperimentalne arterioskleroze. Doktorska disertacija, Beograd, 1978.
 40. Klimov AN, Nagornev VA, Zubzhitsky YN, Denisenko AD: Autoimmune mechanisms in the development of atherosclerosis. In *Atherosclerosis* V. Ed. by AM Gotto, LC Smith, B Allen, Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin 346-350, 1979.
 41. Porr PJ, Dejica D: Determination of antimyocardial antibodies (AMA) and circulating immune complexes (CIC) during the course of various cardiomyopathies. IX World Congress of Cardiology, Moscow 2, Abstr 986, 1983.
 42. Palinski W, Horkko P, Shaw P, Tsimkas S, Silverman G, Witztum JL: Biological significance of autoantibodies to oxidative neoepitopes. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 166 Abstract, 2000.
 43. Henson P: Interaction of cells with immune complexes, adherence, release of constituents and tissue injury. *J Exp Med* 134(3): 114-115, 1971.
 44. Maini RN: Circulating immune complexes: current concept of their pathogenetic role and methods of detection. *Aust NZJ Med* 8 Suppl 1: 68-76, 1978.
 45. Rajnavölgyi E and Fust G: The effect of immune complexes on complement activation and complement dependent complex release. *Immunochimistry* 15: 887-895, 1978.
 46. Klaus GGB: The generation of memory cells. II. Generation of B-memory cells with preformed antigen-antibody complexes. *Immunology* 34: 643-652, 1978.
 47. Weissmann G, Zurier RB, Spieler PJ and Goldstein IM: Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. *J Exp Med* 134(3): 149-165, 1971.
 48. Tarnacka B, Gromadzka G, Czonkowska S. Increased Circulating Immune Complexes in Acute Stroke The Triggering Role of Chlamydia pneumoniae and Cytomegalovirus. *Stroke.*; 33:936., 2002
 49. Wick G: Autoimmunity to heat shock protein 60/65 as an initiating mechanism in the atherosclerosis development. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 166 Abstract, 2000.
 50. Bhakdi S: Immunopathogenesis of atherosclerosis: the Mainz concept. *Ann Med* 30: 503, 1999.
 51. Saikku P: Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 14; 116:273-8, 1992.
 52. Bellosta S: Infections, CHD and atherosclerosis. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 166 Abstract, 2000.
 53. Koehler L, Kuipers JG, Zedler H: Persistent Chlamydial Infections. *Biomedical Progress* 15: 28-34, 2002.
 54. Gallin JJ, Kaye D, O'Leary WM. Serum lipids in infection. *N Engl J Med*; 281:1081-9, 1969.

55. Laurila A, Bloigu A, Näyhä S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Chlamydia pneumoniae antibodies and serum lipids in Finnish men: cross sectional study BMJ;314:1456 (17 May) 1997.
56. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan D, Leatham E, Molineaux N, et al. Association of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. BMJ; 311:711-4, 1995.
57. Murray LJ, O'Reilly L, Ong GML, O'Neill G, Evans A, Bamford KB. Chlamydia pneumoniae antibodies are associated with an atherogenic lipid profile. Heart; 81:239-244, 1999.
58. Murray LJ, Bamford KB, O'Reilly DPJ, et al. Helicobacter pylori infection: relation with cardiovascular risk factors, ischaemic heart disease, and social class. Br Heart J; 74:497-501, 1995
59. Scragg RKR, Fraser A, Metcalf PA. Helicobacter pylori seropositivity and cardiovascular risk factors in a multicultural workforce. J Epidemiol Community Health; 50:578-579, 1996.

2. ENDOTEL U ATEROSKLEROZI

Endotelne ćelije predstavljaju unutrašnji sloj krvnih sudova, koji se nalazi u dodiru sa krvlju i elementima krvi sa jedne strane, odnosno intimom i medijom krvnih sudova sa druge strane.

Endotel čini metabolički aktivnu, visokoselektivnu barijeru između vaskularnog lumena i intime, koja u fiziološkim uslovima inhibira priljublivanje trombocita i stvaranje tromba, a sprečava adheziju i migraciju leukocita u subendotelni prostor.

Do nedavno je fiziologija endotela bila relativno nejasna zbog vulnerabilnosti ćelija. Iako su savremene imunološke tehnike, eksperimentalna istraživanja na ćelijskoj kulturi i ultrastrukturne analize, u velikoj meri razjasnile ulogu endotela, još uvek je ostalo nejasno šta dovodi do disfunkcije endotela i inicijacije aterogeneze na karakterističnim mestima.

Funkcionalni vek endotelних ćelija iznosi verovatno oko 30 godina¹. Funkcionalno istrošene ćelije, stare, zamenjuju se novim (Slika 13). Isti je slučaj sa endotelom koji je oštećen; međutim, novi endotel je manje funkcionalno vredan od prethodnog, iako sa morfološkog stanovišta izgleda normalno.

2.1. IMUNOLOŠKI ATAČ NA ENDOTEL U ATEROSKLEROZI

Incidenca i prevalenca kardiovaskularnih bolesti raste sa starošću. Kardiovaskularna oboljanja su retka kod osoba ispod 30 godina, ali je prosečan životni vek ljudi u današnje vreme duži, a izloženost faktorima rizika raste sa porastom standarda.

U razvijenim zapadnim zemljama preko **60% smrtnih slučajeva** ima za uzrok neku od **komplikacija ateroskleroze**, infarkt srca, infarkt mozga, periferna ishemija, aneurizmatična bolest itd ². Ateroskleroza ne utiče samo na morbiditet i mortalitet, već i na kvalitet života.

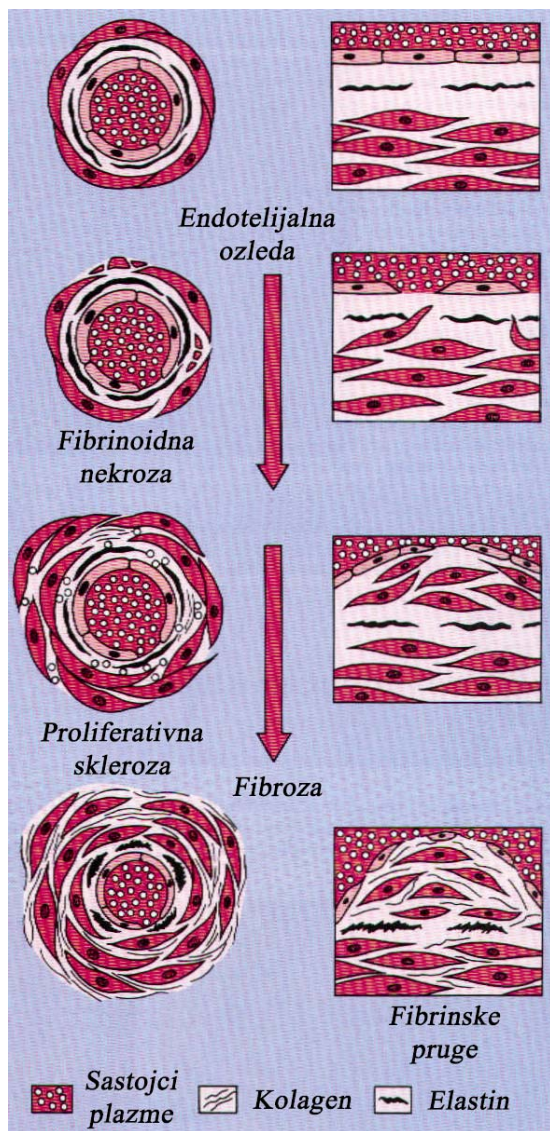


Slika 13. Denudirane endotelne ćelije u početnoj fazi aterogeneze. (SEM)

Na eksperimentalnom animalnom modelu pokazano je da se ubrizgavanjem **anti-miokardijalnih antitela** razvijaju lezije miokarda slične infarktu³. Pod dejstvom ovih antitela došlo je do lezije ćelijskih membrana miocita, fragmentacije mitohondrija i ostalih organela. Metodom indirektno imunofluorescence u humanojoj populaciji je ustanovljeno prisustvo anti-miokardijalnih antitela kod bolesnika sa anginom pectoris, infarktom miokarda i reumatskom groznicom⁴. Scebat i sar.⁵⁻⁷ su 1980. imunizacijom zečeva ekstraktima aorte izazvali generalizovanu aterosklerozu. Ovakvom imunizacijom dokazana je uloga **antiarterijskih antitela**, naročito antielastinskih.

Tipičan primer imunoloških oštećenja arterijskog zida putem specifičnih imunoloških mehanizama je odbacivanje transplantiranog organa (srce, bubreg)⁸. U transplantiranom srcu, u koronarnim arterijama, nađene su bogate ateromatozne ploče. **Post-transplantacioni arteritis** pokreću specifična antitela izazivajući oštećenje intime sa sledstvenom agregacijom trombocita i akumuliranjem lipoproteina.

U toku **procesa starenja** dolazi do **degradacije elastina** (Slika 14), koji postaje antigenski "stran", što može da izazove specifičnu imunološku reakciju⁶. Mnoštvo sličnih antigena u tkivu arterijskog zida, bilo da su solubilni, bilo da se nalaze na ćelijskim membranama, mogu da pokrenu imunološki napad na arterijski zid. Direktnim testom imunoperoksidaze otkriveno je da se IgG i komplement vezuju za endotel i elastične fibrile na mestima degenerisanih fokusa⁷. Normalno tkivo intime ponekad može da veže IgG, ali ne i komplement. Indirektnim testom imunoperoksidaze pokazano je da se gamaglobulini zečeva sa spontanom aterosklerozom vezuju za aortne strukture zdravih, mladih zečeva i to naročito za endotel, miocite, elastične fibrile⁷.



Slika 14. Shematski prikaz odnosa endotela i vezivnog tkiva u arterijskom krvnom sudu tokom razvoja ateroskleroze. Ozleda endotela i prekid u njegovom kontinuitetu dovodi do fibrinoidne nekroze i migracije ćelija glatkih mišića na mesto ozlede. Proliferacija glatkomišićnih ćelija vodi hiperplaziji, proliferativnoj sklerozi i suženju lumena krvnog suda. Povećava se sadržaj kolagena i elastina, što je dobra podloga za odlaganje hijalinih materija i deo je patogeneze aneurizmatске bolesti.

Imunološki atak na vlastite arterije može biti pokrenut i u slučaju da one postanu antigenski „strano tkivo” pod dejstvom raznih medikamenata, aditiva, konzervanasa ili

ostataka pesticida u hrani, koji menjaju njihove antigenske determinante. Kao primer indukovane autoimunosti, u vaskularnoj patologiji, opisan je sulfodimetoksinški artritis⁶.

Princip „molekularne mimikrije” ili sličnosti stranih antigena sa sopstvenim antigenima, što može biti u osnovi razvoja imunskog odgovora na sopstveno, je jedan od mehanizama razvoja autoimunskih bolesti. Izazivanje autoimunog oboljenja adaptivnim transferom imunokompetentnih ćelija sa bolesne životinje na zdravu, je dokaz **autoimunosti**. Ipak, imunopategeneza ateroskleroze je rezultat niza poremećaja, koji uključuju mnoštvo činilaca i faktora rizika, što ne sme zamagliti našu potragu za osnovnim pokretačem i suštinskim mehanizmom aterogeneze.

Lezije endotela imunološkim putem moguće su na bazi **unakrsne reakcije** (*cross reaction*) zbog sličnosti sopstvenih vaskularnih antigenskih determinanti sa stranim antigenima, koji ulaze u organizam⁷. Postoje dokazi da antitela koja nastaju nakon imunizacije eksperimentalnih životinja lipoproteinima *E. coli* (ili peptidoglikanima *Streptococcus A*) unakrsno reaguju sa strukturalnim glikoproteinima aorte zečeva, svinja i ljudi. Tehnikom indirektnog imunoperoksidaznog bojenja pokazano je da se i antitela strukturalnih glikoproteina aorte i antitela specifična za *E. coli* vezuju za iste strukture, za glikoproteinima bogatu okolinu elastičnih fibrila i miocite u mediji^{7,8}.

Opisani imunološki procesi mogu biti modulirani u prisustvu ozloglašanih faktora rizika ateroskleroze. Pušenje, gojaznost i hiperholesterolemija olakšavaju pojavu autoantitela na vaskularne tkivne sastojke i potenciraju imunološki odgovor na različite antigene⁹.

2.2. IMUNOLOŠKE LEZIJE ENDOTELA KAO „NEDUŽNOG POSMATRAČA”

Oštećenja vaskularnog tkiva imunološkim putem moguća su i u slučaju da imunski mehanizmi nisu specifični za zid krvnog suda.

Endotel je predisponiran svojim položajem da bude na udaru imunoloških perturbacija. IgA i IgE su vezani preko specifičnih receptora za površinu cirkulišućih eozinofila, bazofila, trombocita, kao i mastocita i endotelnih ćelija (Slike 1-5). Posle reakcija sa stranim antigenom ove ćelije otpuštaju velike količine **vazoaktivnih amina**, koji utiču na permeabilnost endotelnih membrana (po tipu I reakcije preosetljivosti).

Mehanizam oštećenja endotela vezan je i za patološku ulogu **imunskih kompleksa**. Cirkulišuća antitela klase IgG i IgM nakon vezivanja sa antigenom, formiraju imunske komplekse koji imaju osobinu da se nespecifično talože i fiksiraju u intimi. Pri tome se može oštetiti zid krvnog suda (po tipu III reakcije preosetljivosti) bilo vezivanjem komplementa, bilo privlačenjem fagocita, koji otpuštaju svoje lizozomalne enzime.

2.3. ENDOTEL I NO/NOS

Metaboličko-endokrini procesi u endotelu učestvuju u sintezi i oslobađanju

- azot monoksida (NO),
- prostaciklina,
- endotelina,
- tromboksana,
- sintezi i ekspresiji adhezivnih molekula,
- sintezi hemotaksičnih supstanci (MCP-1),
- faktora rasta (bFGF, PDGF),
- faktora stimulacije kolonija (M-CSF, GM-CSF),
- proteina C,
- tkivnog faktora (TF),
- aktivatora tkivnog plazminogena (t-PA) i
- inhibitora t-PA (PAI-1) itd.

Azot monoksid (NO) je lipofilan, lako prolazi kroz ćelijske membrane, ulazi u vaskularnu glatku muskulaturu i aktivira enzimski sistem guanilatne ciklaze (cGMP). **Aktivirana guanilatna ciklaza** dovodi do fosforilacije intracelularnih proteina, aktivacijom proteinskih kinaza zavisnih od cGMP, dovodeći do **vazorelaksacije**.

NO je veoma reaktivan i nestabilan, lako se oksiduje u druge azotne okside. Ovo onemogućava bilo kakvo udaljeno delovanje NO, osim na mestu produkcije. Vaskularno tkivo nije jedini izvor NO. Poznata je uloga NO kao modulatora funkcije mastocita i medijatora makrofagne citotoksičnosti.

NO deluje kao sekundarni sistem prenosioca. On dovodi do povećanja koncentracije cGMP, što samanjuje intracelularnu koncentraciju Ca^{2+} u ciljnim ćelijama, pri čemu se javlja relaksacija glatke muskulature, inhibicija agregacije trombocita i modulacija neurotransmisije. On inhibira adheziju monocita i trombocita za endotel, inhibira proliferaciju glatkomišićnih ćelija i oksidaciju LDL. U visokim koncentracijama je toksičan, što je vezano za citotoksičnu ulogu makrofaga.

Postoje dva primarna mehanizma vazorelaksacije zavisne od endotela. Jedan je zavistan od cGMP, a drugi je rezultat hiperpolarizacije glatkomišićnih ćelija. Alternativni put relaksacije može održavati vazodilataciju uprkos inhibiciji primarnog mehanizma (bez obzira da li je nastala smanjenom produkcijom NO i/ili povećanim oslobađanjem slobodnih kiseoničkih radikala koji se vezuju za NO).

U sintezi NO učestvuje **enzim NO sintetaza** (NOS). Postoji više formi NOS (izoforme NOS):

- konstitutivna NOS (cNOS) je prisutna u endotelnim ćelijama, dok je

- inducibilna NOS (iNOS) prisutna u makrofagama, leukocitima i vaskularnim glatkomišićnim ćelijama. Ona je odgovorna za citotoksične i biocidne efekte NO; napr. za ekstremnu vazodilataciju u septičkom šoku.

Inducibilna NOS se aktivira bakterijskim lipopolisaharidima i određenim citokinima (INF- γ , TNF- α i IL-1 β). Inducibilna NOS zahteva 8-12 sati za maksimalnu produkciju NO, a količine koje se produkuju jako su velike¹⁰.

NO relaksira glatke mišićne ćelije i izaziva vazodilataciju, a uz to

- inhibira agregaciju trombocita,
- održava netrombogenost površine endotela,
- deluje antiinflamatorno,
- antiproliferativne efekte ostvaruje inhibicijom mitogeneze u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama¹⁰,
- sprečava adheziju leukocita i makrofaga na endotel,
- štiti makrofage od aktivacije u prisustvu lipoproteina male gustine,
- čuva endotel od disfunkcije u hiperholesterolemiji
- sveukupno ima **antiaterosklerotično delovanje**¹⁰.

2.4. ADHEZIVNE MOLEKULE

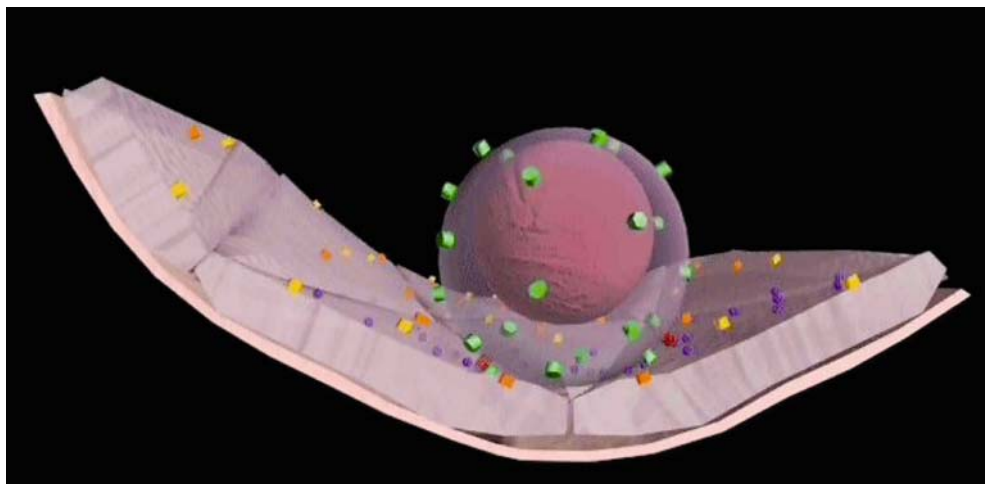
Za kontakt između pojedinih ćelija neophodne su čvrste veze površinskih adhezivnih membranskih molekula.

Adhezivne molekule mogu se grupisati u nekoliko familija:

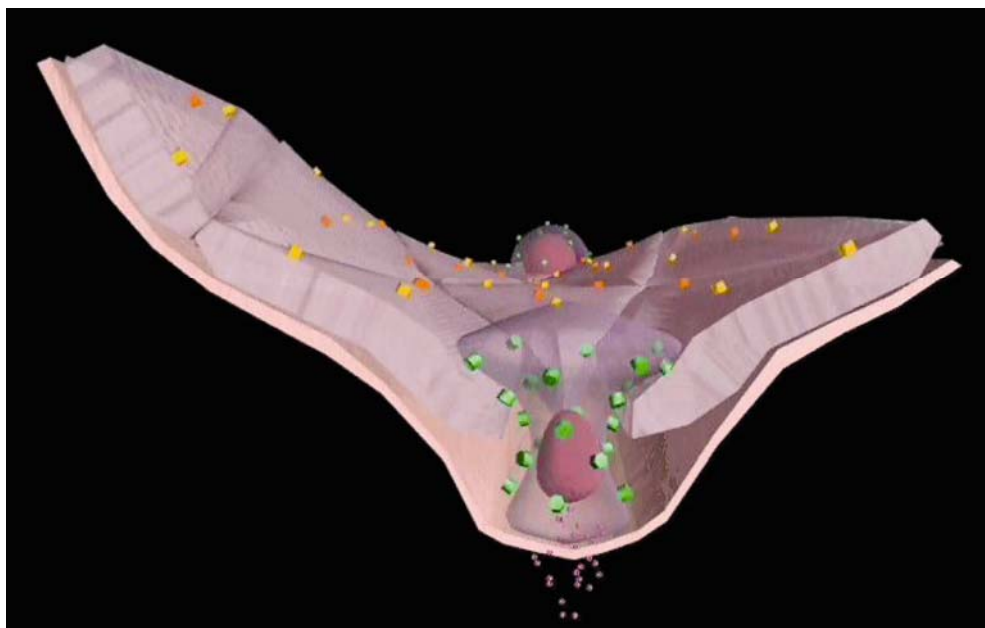
- integrini,
- selektini,
- superfamilija imunoglobulina,
- kadherini,
- adresini i dr.

Limfociti, neutrofili i monociti prelaze u inflamirano tkivo kao odgovor na lokalne stimulse¹¹ (Slike 15-16).

Inflamatorni odgovor predstavlja kaskadu događaja, koja je sekvencionalna akcija diktirana različitim adhezionim molekulima i njihovim receptorima (Slike 7-8).



Slika 15. Migracija leukocita odvija se preko adhezivnih molekula koje ekspimiraju endotelne ćelije (E-selektini, P-selektini, ICAM-1, VCAM-1). Na migratornim ćelijama ekspimiraju se odgovarajući kontrapozicionirani ligandi.(Roitt, 1998)



Slika 16. Reorganizacijom aktina i miozina migratorni leukociti formiraju pseudopod. Oslobađaju kolagenaze i elastazu, čime perforiraju bazalnu membranu. Prolaze u perivaskularni prostor procesom dijapedeze.(Roitt, 1998)

Indukciju inflamatornog odgovora izazivaju **proinflamatorni citokini** (IL-1, IFN- γ , TNF- α i dr.). Smatra se da su **intercelularni adhezivni molekul-1** (ICAM-1) najraniji marker inflamacije, jer se javljaju pre MHC-II-molekula (označenih i kao HLA-DR u ljudi ili Ia u miševa). Ekspresija ovih adhezivnih molekula traje sve dok postoji stimulans od strane proinflamatornih citokina^{11,12}.

Tokom prolaska kroz lumen krvnih sudova, eritrociti potiskuju leukocite sa centralne pozicije lumena prema zidovima čime je omogućen kontakt membrane leukocita i endotela. Do adhezije dolazi samo u stanju povišene aktivacije leukocita ili endotela, a odvija se sukcesivno preko **adhezivnih molekula**. Ekspresija membranskih adhezivnih molekula se menja nakon prelaska ćelija iz stanja mirovanja u stanje aktivacije.

Neutrofili i monociti se kotrljaju preko endotela posredstvom mehanizama koje obezbeđuje familija adhezivnih molekula, nazvana **selektini** (L-, E-, P-selektini). Čvrsto vezivanje i promena oblika neutrofila od sferičnog, koji nije pogodan za prolazak kroz endotel, do ameboidnog uz formiranje pseudopoda (Slika 15), obezbeđuje familija **integrina** (CD11a, b, c/CD18 i dr.)¹¹⁻¹³.

Na drugoj strani, na endotelu se ekspimiraju **kontra-receptori**, ligandi za pomenute adhezivne molekule, **intercelularni adhezivni molekul-1** (ICAM-1) ligand za CD11 a i b/CD18, sialini-Lewis x saharid ligand za P-selektin, itd.¹².

Na neaktiviranim leukocitima integrini se nalaze u mirujućem stanju i ekspimiraju se na bazalnom nivou. Aktivacijom ćelija stimuliše se i ispoljavanje i aktivacioni status ovih glikoproteinskih molekula, kao i sekrecija L-selektina. Sve to rezultira povećanjem membranske adhezivnosti, povećanjem sposobnosti priljubljenja leukocita uz endotelnu ćeliju (Slika 16). Ovaj inicijalni korak vodi ka transendotelnoj migraciji leukocita putem dijapedeze¹³.

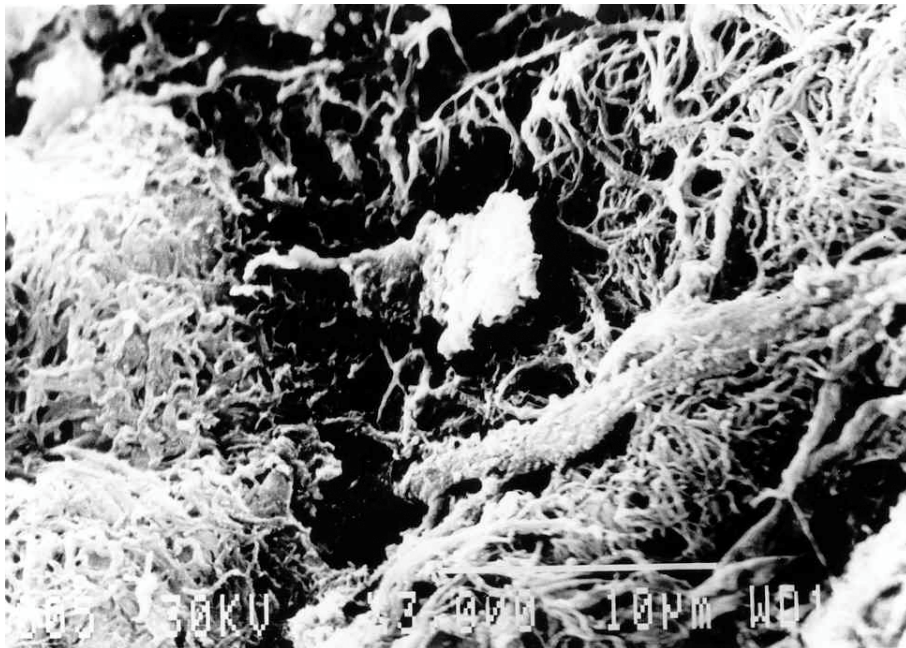
Zarobljavanje leukocita u mikrocirkulaciji ima više implikacija. To može dovesti do smanjenog kapilarnog protoka¹³. Imunološki poremećaji nastaju budući da zarobljeni leukociti ne mogu da ostvare kontakt sa mikroorganizmima.

Nakon formiranja veze sa endotelnim ćelijama, **migratorne ćelije prelaze u viši stepen stanja aktivacije** (naročito neutrofili i monociti), formiraju pseudopode i proizvode slobodne radikale. U zjap između pseudopoda i bazalne membrane izbacuju elastazu, katepsin G i druge litičke enzime, **perforiraju bazalnu membranu**, što omogućava prolazak jedra i citoplazme leukocita u subendotelni prostor. Ovim je omogućena agregacija trombocita za endotel (Slika 17), uz deponovanje fibrina na mestu lezije bazalne membrane¹⁴.

U aterogenezi, endotelne ćelije gube antikoagulantne funkcije i postaju lepljive usled povećane ekspresije adhezivnih molekula. Povećanom produkcijom i sekrecijom faktora rasta i hemotakse, endotelne ćelije omogućavaju nastavak inflamacije. Adhezivni molekuli su odgovorni i za interakciju ćelija sa ekstracelularnim matriksom¹⁴.

Adhezija cirkulišućih ćelija, monocita i limfocita, za endotelne ćelije započinje povećanjem ekspresije **intercelularnog adhezivnog molekula-1** (ICAM-1) i **vaskularnog adhezivnog molekula-1** (VCAM-1) na endotelnim ćelijama. Njihovi ligandi na mononuklearnim ćelijama su **leukocitni funkcionalni antigen** (LFA-1) i **VLA-4 (very late antigen-4)**. Značajnu ulogu u efektorskim funkcijama T limfocita i neutrofila ima i

LFA-1 molekul koga ove ćelije ispoljavaju a čiji je ligand ICAM-1 (Slika 11). Inflamacija koja leži u osnovi procesa ateroskleroze, odvija se na isti način¹⁵.



Slika 17. Trombociti adheriraju na kolagena vlakna na dnu ulceracije karotidnog aterosklerotskog plaka, čime započinje njihova aktivacija. (SEM)

Postavlja se pitanje šta sve dovodi do aktivacije endotela u procesu aterogeneze.

Ekspresiju ovih molekula izazivaju i pojačavaju citokini, kao što su **faktor nekroze tumora-alfa** (TNF- α) i **interleukin-1** (IL-1), koji vode poreklo

- iz cirkulacije, kao deo sistemske inflamatorne reakcije ili
- iz vaskularnog zida, kao deo lokalnog odgovora na inflamaciju.

Pored indukcije ispoljavanja adhezivnih molekula, citokini dovode do promena na endotelnim ćelijama. IL-1 i TNF- α dovode do **prokoagulantnih i fibrinolitičkih** karakteristika endotela.

Citokini, menjajući karakteristike endotela utiču na produkciju azot-monoksida (NO) i prostaciklina i indukuju produkciju novih citokina, čime se njihovo dejstvo **amplifikuje**.

Citokini indukuju sintezu **specifičnih membranskih glikoproteina**, indukuju **preraspodelu citoskeleta** endotelних ćelija i povećavaju sintezu **faktora aktivacije trombocita** (PAF, platelet activation factor). PAF je fosfolipid sa potencijalnim proinflamatornim i trombogenim osobinama. Na njegov specifičan značaj u aterosklerozi ukazuje podatak da su PAF-u slične komponente prisutne u oksidovanom LDL

(oxLDL). Blokadom receptora za PAF potpuno se blokira efekat oxLDL na mononukleare, koji delimično prestaju da sekretuju TNF- α i potpuno interferon-gama (IFN- γ)¹⁶.

Citokini stimulišu endotelne ćelije da sekretuju **interleukin-8** (IL-8), koji je hemoatraktant, snažno privlači i aktivira neutrofile na mesto upalnog procesa. Citokini indukuju produkciju **faktora rasta poreklom iz trombocita** (PDGF, *platelet derived growth factor*), koji stimulise proliferaciju vaskularnih glatkomišićnih ćelija (VMSC). Ulazak leukocita kroz morfološki intaktan endotel uključuje i direktnu migraciju kao odgovor na dejstvo drugih citokina, tzv. **hemokina**, od kojih je najaktivniji **monocitni hemotaktički protein-1** (MCP-1), identifikovan i u ateromatoznoj leziji¹⁷.

Pokazalo se da posle uvođenja dijeta bogate holestrolom brzo dolazi do fokalne ekspresije **vaskularnog adhezivnog molekula-1** (VCAM-1) na predilekcionim mestima u endotelu i progresije aterogeneze^{17,18}. Sastojak modifikovanih lipoproteina, lizofosfatidil holin, započinje prepisivanje gena za VCAM-1 u endotelnim ćelijama¹⁹. **Lipoprotein (a)**, Lp(a), dozno zavisno indukuje pojavu ICAM-1 na endotelnim ćelijama, dok na ekspresiju VCAM-1 i E-selektina ne utiče²⁰. Nativni lipoproteini male gustine (LDL) vezujući se za svoj receptor, povećavaju koncentraciju VCAM-1 i E-selektina na humanim vaskularnim endotelijalnim ćelijama²¹.

Povećan nivo triglicerida i snižen nivo HDL nađen je tokom sistemskih infekcija izazvanih Gram negativnim bakterijama i virusima^{22,23}. *C. pneumoniae*, kao Gram negativna bakterija sadrži lipopolisaharide na spoljašnjem sloju svoje membrane, zato ona može da se razmnožava u makrofazima, glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama indukujući sintezu faktora nekroze tumora i interleukina-1, kako i citokina koji utiču na promenu profila serumskih lipoproteina²⁴. Slične osobine ima *Helicobacter pylori*²⁵. Da li lečenje ovih infekcija može da zaštiti endotel i prevenira aterogenezu u njenim ranim fazama ostaje da se utvrdi u velikim kliničkim studijama.

LITERATURA

1. Walton KW: Immunological aspects of atherogenesis. In: Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp, London 24: 45-56, 1980.
2. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis. In: Immunity and atherosclerosis. Ed by Constantinides P, Pratesi F, Cavallerio CD, Di Perri T. Proc of the Sero Symp. London. 24: 165-170, 1980.
3. Popovich LF: Histochemical and ultrastructural characterisation of initial stages of immune heart damage. IX World Congress of Cardiology, 2, 983 (Abstr) 1982.
4. Porr PJ, Dejica D: Determination of antimyocardial antibodies (AMA) and circulating immune complexes (CIC) during the course of various cardiomyopathies. IX World Congress of Cardiology, Moskva 2, Abstr 986, 1983.
5. Scebat I, Renais Jand Goldstein N: Cross antigenicity between Escherichia coli lipopolysaccharide and aortic glycoproteins. In: Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp. London. 24: 121-131, 1980.

6. Minick RC and Murphy GE: Experimental induction of athero-arteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II. Effect of repeatedly injected foreign protein in rabbits fed a lipid rich cholesterol poor diet. *Amer J Pathol* 73: 265-268, 1973.
7. Scebat I, Renais J and Groult N: Etude des lésions aortiques spontanées du lapin. Role possible de mécanismes immuns. *Parci Arterielle* 6(1): 37-45, 1981.
8. Thomson JG: Atheroma in a transplanted heart. *Lancet*, ii 1297. 1969.
9. Mathews JD: Ischemic heart disease: Possible genetic markers. *Lancet*, ii: 682, 1975.
10. Jukema JW: New insights into atherosclerosis. *Cardiologie* 7: 37-40, 2000.
11. Hogg N and Berlin C: Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 16:327-333, 1995.
12. Lub M, Van Kooyk Y and Figdor CG: Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 16:479-482, 1995.
13. Schmid-Schobein GW, Amdaddi K and Chavez-Chavez: The low state and no-reflow phenomenon in the microcirculation. In *Leukocytes and Endothelial Interactions*. Ed(s). Labs KH, Schmid-Schonbein GW and Schonharting MM, Prous Science, Barcelona/Philadelphia 17-29, 1995.
14. Schumacher A, Arnesen H, Seljeflot I, Sommervold L: Increased levels of soluble markers of endothelial dysfunction in patients with atherosclerotic heart disease. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 189 Abstract, 2000.
15. Tedgui A and Mallat Z: Pro-and anti-inflammatory balance and atherosclerosis. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 166 Abstract, 2000.
16. Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L: Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 17: 963-8, 1997.
17. Libby P: Atheroma more than mush. *Lancet*; 348 Suppl 1: s4-7, 1996.
18. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yong AC: Flow-induced vasodilatation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J cardiol* 78: 1210-4, 1996.
19. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P: An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Atheroscler Thromb* 13: 197-204, 1993.
20. Takami S, Yamashita S, Kiharu S, Ishigami M, Takamura K, Kume N, Kita T: Lipoprotein(a) enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 97:721-8, 1998.
21. Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M: Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured cells. *J Clin Invest* 101: 1064-75, 24, 1998.
22. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
23. Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM: Serum lipids in infection. *N Engl J Med*; 281:1081-9, 1969.
24. Laurila A, Bloigu A, Näyhä S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P: Chlamydia pneumoniae antibodies and serum lipids in Finnish men: cross sectional study *BMJ*; 314:1456 (17 May) 1997.

25. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan D, Leatham E, Molineaux N, et al : Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ*;311:711-4. 1995.

3. ULOGA NUTRICIJE U PATOGENEZI ATEROSKLEROZE

3.1. IMUNOLOŠKI ASPEKT ULOGE HOLESTEROLA U PATOGENEZI ATEROSKLEROZE

Holesterol i hiperholesterolemija su toliko često i pažljivo izučavani u vezi sa aterosklerozom da su Armstrong, Megan i Warner¹ nazvali kolesterol "**biohemijskom zvezdom nauke o aterosklerozi**".

Odavno se zna da dijeta bogata kolesterolom i zasićenim masnim kiselinama izaziva hiperholesterolemiju, hiperlipoproteinemiju i aterogenezu¹⁻³. Sa druge strane, dijeta sastavljena pretežno od polinezasićenih masnih kiselina (bilo esencijalnih ili neesencijalnih) je kod zečeva održavala normalni nivo holesterolemije, bez pokretanja ateromatoze⁴.

Praćenjem sudbine intravenski injiciranog, trcijumom obeleženog holesterola kod hiperholesterolemičnih zečeva, nađeno je povećanje količine esterifikovanog i slobodnog holesterola u intimi⁵. Nakupljanje lipida u intimi vezano je sa povećanjem sadržaja holesterola u lipoproteinima niske gustine (LDL), više nego sa ukupnim nivoom holesterola u serumu. Interesantno je da je pri tome bio snižen nivo holesterola inkorporisanog u lipoproteine visoke gustine (HDL)^{1,5}.

Holesterol se apsorbuje u tankom crevu, u količini koja je proporcionalna sa količinom holesterola koji je unet hranom. Oko 40% unetog holesterola biva apsorbovano, a najveći deo se ugradi u hilomikrone i lipoproteine niske gustine LDL⁶.

Nivo holesterolemije zavisi i od drugih sastojaka ishrane. **Cerealije** i grubi nesvareni sastojci hrane mogu precipitacijom, absorpcijom i adsorpcijom holesterola u lumen intestinalnog trakta da smanje njegovu absorpciju putem **enterohepatičke cirkulacije**, da snize serumske lipoproteine i spreče aterogenezu⁷. Kritchevsky² je 1979. potencirao ulogu gastrointestinalnog sistema u pokretanju hiper-holesterolemije i hipersenzitivnosti na kolesterol jer se u njemu odvija absorpcija, sinteza i ugradnja holesterola u lipoproteine (jetra).

Lipoproteini predstavljaju makromolekulske komplekse lipida (holesterol, trigliceridi, fosfolipidi i masne kiseline) i specifičnih proteina, različito zastupljenih u raznim vrstama lipoproteina. U plazmi je prisutno više lipoproteinskih čestica, od kojih oko

- 55% čini lipoprotein niske gustine (LDL),
- 25% čini lipoprotein visoke gustine (HDL),
- 10% lipoprotein vrlo niske gustine (VLDL),
- 5% čini lipoprotein(a), a
- ostalo su hilomikroni i intermedijerne čestice⁸.

Proteinski delovi lipoproteina se nazivaju apolipoproteini ili apoproteini (apo) i imaju svoj deo odgovornosti u procesu nastanka ateroskleroze⁸.

Proaterogenu ulogu bi mogla da ima i čitava grupa imunološki uslovljenih hiperlipoproteinemija⁹. Sa druge strane, hiperlipoproteinemija i hiperholesterolemija utiču na imunološki i proinflamatorni sistem.¹⁰

Nivo holesterola u serumu je direktno povezan sa procesom aterogeneze. Regulacija nivoa i strukture lipida - *Lipid Lowering Therapy*, lekovima koji omogućavaju snižavanje hiperholesterolemije (**Statini**) otvorio je novo poglavlje u terapiji aterogeneze^{8, 10,11,12}. Lekovi koji snižavaju nivo holesterola u serumu imaju i antiinflamatorno delovanje.¹⁰

Tabela 1. Delovanje terapije koja snižava nivo lipida u serumu na faktore stabilnosti i inflamacije u aterosklerotičnom plaku.

Inhibicija	Stimulacija
Broj makrofaga	Povećanje sadržaja kolagena u intersticijumu
Ekspresija metaloproteaza u matriksu	Maturacija glatkih mišićnih ćelija
Genska ekspresija tkivnih faktora	
Proinflamatorni citokini	
Adhezija leukocita	
Produkcija slobodnih radikala	

Podaci o antigenskoj ulozi holesterola su vrlo kontroverzni. Interesantno je da je klasični put aktivacije humanog sistema komplementa bio spontano aktiviran u prisustvu liposoma koji su u sebi sadržali visoku koncentraciju holesterola, bez prisustva bilo kojeg poznatog antigena ili antitela¹³. Pretpostavlja se da je aktivator komplementa, zapravo bio serumski, termolabilni faktor koji je izdvojen absorpcijom sa imunskim kompleksima¹⁴.

"Antiholesterolska antitela" su nađena jedino metodom fiksacije komplementa¹⁰, pa se pretpostavlja da holesterol ima samo **antikomplementarnu aktivnost**, a da je sinteza antitela na holesterol moguća samo ako se on nalazi u sastavu serumskih lipoproteina¹⁴.

Velike količine **aktiviranih komponenti komplementa** (naročito C5a) su nađene u plazmi bolesnika sa teškom egzulcerirajućom aterosklerozom i sindromom holesterolskih embolizacija¹⁵. Prilikom inkubacije kristalnog holesterola i lipida iz aterosoma sa plazmom došlo je do spontane aktivacije komplementa, agregacije fagocita i oštećenja kultivisanih endotelних ćelija. Aktivni princip iz plazme inkubirane sa holesterolom je bio molekul sa molekularnom težinom i antigenskim svojstvima vrlo bliskim sa C5a fragmentom komplementa¹⁴⁻¹⁶.

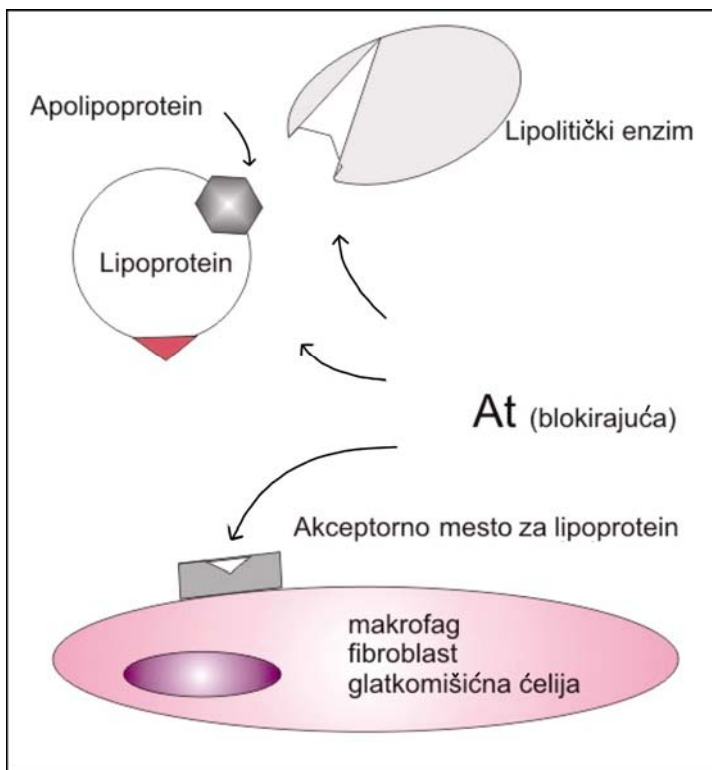
Najveća oštećenja endotelnih ćelija su postignuta uz prisustvo serumskih imunoglobulina i očuvanih komponenti klasičnog puta aktivacije komplementa. Na osnovu ovoga Hammerschmidt i sar.¹⁵ pretpostavljaju da bi imunološki mehanizmi mogli imati ulogu ne samo kao inicijatori aterogeneze, već i kao **sekundarni autodestruktivni mehanizmi** koji se aktiviraju produktima razvijene ateroskleroze, kao što je kristalni holesterol, pri ulceraciji ili hemoragiji u aterosklerotičnoj ploči (Slika 18). U vezi sa ovakvim dejstvima holesterola se podvlači uloga sistema komplementa. Pang i Minta¹⁶ su 1981. uspjeli da spreče aterosklerozu indukovanu visokim dozama vitamina D blokirajući sistem komplementa pomoću zmijskog otrova, faktor (CoF).



Slika 18. Detritusna masa (limfociti, eritrociti, monociti, trombociti delimično destruirani) na bazi rupturiranog aterosklerotičnog plaka. (SEM)

Zato **imunološku hipotezu aterogeneze ne treba suprotstavljati lipometaboličkoj teoriji** jer bi imunološki faktori mogli delovati preko serumskih lipoproteina (Slika 19). Humani serumski lipoproteini su odlični imunogeni. Njihove antigenske determinante su skoncentrisane u proteinskom delu molekula (apolipoprotein). Ovo je

omogućilo da se elektro-imunodifuzijom, imunofluorescencijom i testom imunopero-
sidaze prikaže vezivanje antigeničnih LDL i VLDL za različite sastojke intime¹⁷.



Slika 19. Potencijalni imunološki mehanizmi nastanka hiperlipoproteinemija.

Autoimunske hiperlipemije su metaboličke bolesti kod kojih je klirens lipoproteina inhibiran cirkulišućim antitelima usmerenim prema:

- vlastitim lipoproteinima,
- lipolitičkim enzimima, ili
- ćelijskim akceptorima za lipide na fagocitima¹⁸.

Beaumont¹⁸ u svom radu iz daleke 1979. kaže: "Razni tipovi antitela mogu reagovati sa raznim antigenima i izazivati različite hiperlipemije".

Antilipoproteinska antitela mogu reagovati sa lipoproteinima i blokirati mesta koja su stereospecifična za lipolitičke enzime. Tako se odigrava »**substrat inhibicija**« koja dovodi do inhibicije katabolizma lipoproteina i porasta njihove serumske koncentracije, što je jedan od uslova za pokretanje aterogeneze¹⁸.

Moguće je da autoimunim putem nastali holesterolom-bogati imunoglobulin-lipoprotein kompleksi penetriraju u intimu. Do sada izučavani imunoglobulin-lipoprotein kompleksi su bili vrlo nestabilni, pa se time objašnjava njihova sklonost da precipitiraju duž bazalne membrane intime¹⁹. Izgleda da ovi kompleksi ne mogu vezati kom-

plement, što se poklapa sa podacima da u toku ovih bolesti nema dramatičnih i trenutnih oštećenja intime, već se zapaža inflamacija intime (u početnoj fazi bolesti)¹⁶. Slična oštećenja su zapažena kod životinja kod kojih je dislipidemija dobijena eksperimentalnom imunizacijom sa lipoproteinima¹⁷.

Autoimunska hiperlipoproteinemija može nastati i stvaranjem **autoantitela koja specifično prepoznaju lipolitičke enzime i/ili njihove aktivatore** (heparin, post heparin lipoprotein lipaza, itd.). Ovakva antienzimski antitela blokiranjem aktivnih mesta ovih enzima dovode do zastoja u normalnom katabolizmu lipida, a time i do hiperlipoproteinemije sa sklonošću za aterogenezu¹⁷.

Autoantitela za albumine, kao akceptore masnih kiselina u lipoproteinima, dovode do autoimunske hiperlipemije²⁰.

Autoantitela mogu da **blokiraju akceptorska mesta za lipoproteine** na površini makrofaga, glatkih mišićnih ćelija i penušavih ćelija. Tako biva zaustavljen unos ovih kompleksnih molekula u ćelije i započinje njihovo nagomilavanje i plazmi¹⁹.

Imunološka specifičnost antilipoproteinskih antitela je vrlo široka. Otkrivena su antitela koja mogu da reaguju istovremeno i sa LDL i HDL, kako humanog, tako i animalnog porekla. Mnogo su specifičnija antilipoproteinska antitela koja su asocirana sa benignim monoklonalnim gamopatijama ili mijelomatozom. Međutim, i jedna i druga antitela podjednako efikasno izazivaju **hiperlipidemije**¹⁸.

Infektivni agensi mogu da indukuju promene u sastavu i nivou serumskih lipoproteina, preko citokina, izazivajući porast nivoa *low-density lipoprotein-a* (LDL), pad nivoa *high-density lipoprotein-a* (HDL), što je uvod u aterogenezu. Lipidni metabolizam se bitno menja u odgovoru na infekciju. Lipoproteini predstavljaju deo odbrambenog mehanizma jer hvataju infektivne partikule i endotoksine. Medijatori su citokini, kao što je TNF- α , interleukin-1, interleukin-6 i interferoni. Citokini mogu da smanje aktivnost lipoprotein lipaze i klirens triglicerida povećavajući nivo *very-low-density lipoprotein-a* (VLDL)^{21,22}.

3.2. ALERGIJSKE REAKCIJE I NJIHOV ZNAČAJ U ATEROSKLEROZI

Imunološki mehanizmi aterogeneze mogu biti pokrenuti **alergijskom senzibilizacijom** na:

- **proteine iz hrane** (deficitarna digestivna proteoliza)
- **mikrobne agense**,
- **proteine duvanskog dima**²¹.

U toku poslednje tri decenije su pomno izučivani odnosi između gastrointestinalne absorpcije hranljivih sastojaka, nivoa lipoproteina u krvi i pojave ateromatozne

degeneracije. Već su postala klasična saopštenja da dijeta bogata zasićenim masnim kiselinama i holesterolom deluje aterogeno²³.

Međutim, sve je više izveštaja o pokretanju aterogeneze **specifičnim imunološkim dejstvom proteina iz hrane**²⁴.

Eksperimentalna ateroskleroza se kod zečeva može izazvati pomoću visoko-proteinske dijeta bez holesterola, ali sa velikom količinom kazeina. Proteini animalnog porekla su moćniji pokretači aterogeneze od biljnih proteina. **Kazein** je davao mnogo opsežnije aterosklerotične lezije od sojinih proteina u dijeti pod istim uslovima. Zapaženo je da životinjski proteini imaju znatno viši **odnos lizina i arginina** od biljnih proteina. Razlike u nivou i spektru serumskih lipoproteina, kod primene animalne i vegetabilne proteinske dijeta, su nestale ako je sojinim proteinima dodavan lizin. Pri tome su se čak u vegetabilnoj grupi pojavile aterosklerotične lezije^{2,25,26}. Interesantno je da je efekat dijeta bogate proteinima mogao biti modifikovan promenom tipa simultano primenjenih ugljenih hidrata u ishrani².

Od nekoliko dijeta sa istom energetsom vrednošću i istom količinom sirovih **sojinih proteina** najveći stepen proaterogenog dejstva pokazuje ona koja sadrži visoko-antigenične frakcije sojinih proteina. Kod životinja na ovoj dijeti nađen je najviši titar **anti-soja antitela** u serumu i makroskopski najizraženije aterosklerotične promene, sa naslagama kalcijuma^{2,27}.

Ova otkrića su pokrenula čitav talas rasprava o upotrebi sojinih proteina u ishrani, a otkriće o postojanju antitela na proteine hrane i njihovoj povezanosti sa aterogenezom je proglašeno za „moguće najveće otkriće u oblasti nutricionizma sedamdesetih godina”²⁸.

Ova gledišta su potkrepljena otkrićem visokog titra antitela na proteine mleka u prahu i kuvanih jaja kod bolesnika sa aterosklerotičnom bolešću i infarktom miokarda²¹. Najveće vrednosti antitela na antigene hrane su zabeležene kod pacijenata koji su umrli od infarkta miokarda u roku od 6 meseci. Zato se sugeriše primena ovih testova u prognostičke svrhe kod bolesnika sa aterosklerozom. Vrlo su česti antigeni **termički obrađeni proteini** (mleko obrađeno toplotom, kuvana jaja), pa je moguće da zagrevanje modifikuje njihove antigenske determinante²⁵.

Obzirom da se arterioskleroza javlja ubikvitarno, njeni pokretači bi morali biti zajednički za veliki deo populacije. Baš to je karakteristika proteina hrane, koji bi kao i holesterol, kod senzibiliziranih jedinki mogli doživotno izazivati produkciju specifičnih antitela, stvaranje imunskih kompleksa i oštećenje vazotela²⁸.

Izgleda da absorpcija putem digestivnog trakta ima, pored ostalog, i važnu ulogu u održavanju antigenske homeostaze u organizmu.

Kod bolesnika sa **ulceroznim kolitisom** nađen je veliki broj onih koji su kao bebe hranjeni na veštački način u prvim mesecima života²⁹. Nivo cirkulirajućih antitela na proteine kravljeg mleka i pšenični gluten je bio znatno viši kod bolesnika sa **celijačnom bolešću i idiopatskom steatorejom**³⁰. Ovo ukazuje na mogućnost da **patološki povećana permeabilnost enteralne barijere** (kao kod akutnih i hroničnih dispepsija, gastritisa i idiosinkrazije na kravlje mleko) može da dovede do specifične alergijske senzibilizacije na proteine iz hrane²⁹.

Novorođenčad mnogih sisara absorbuju nerazložene proteinske molekule **endocitozom enterocita**. Ova pojava se redukuje sa starošću²¹. Skoro sva novorođenčad na veštačkoj ishrani kravljim mlekom su bila senzibilisana. Imunski odgovor je bio utoliko izraženiji ukoliko je kravlje mleko ranije uključeno u ishranu. Osobe koje su, kao bebe, dobijale **kravlje mleko pre napunjenog drugog meseca** života su imale veću inciden-cu ateroskleroze na obdukcionim nalazima³¹.

Stanje tolerancije na sojine proteine je moglo biti uspostavljeno kod novorođenih zečeva perinatalnim izlaganjem antigenu³². Čak se pretpostavlja da male količine ovakvih i sličnih antigena mogu biti prenesene od majke ka potomcima preko placente i/ili majčinim mlekom, te bi se tako pokretala tzv. tolerancija na "niske doze" ovih antigena.

U vezi sa pojavom **hipersenzitivnosti** na određene agense u vezi sa aterogene-zom treba spomenuti i podatke o razvoju **galopirajuće ateroskleroze** kod **sifilisa** i epi-demičnih **salmoneloznih infekcija** u vrlo mladih osoba. Pretpostavlja se da cirkulišući imunski kompleksi u ovom slučaju ne moraju da se vežu za endotel da bi ga oštetili, već je dovoljno da se za endotel fiksira aktivirani, mada kratko živeći, C5b fragment³³. Sam proces inflamacije dovodi do svih promena koje se sreću u različitim stadijumima aterogeneze³⁴.

Cytomegalovirus se vrlo često javlja kao uzročnik infekcija u osoba sa ubrzanim razvojem aterogeneze³⁴. Infekcija sa **herpes, coxacki i polio-virusima** može da izazove aterosklerozu i kod normoholesterolemičnih i kod hiperholesterolemičnih jedinki³⁵. Slični mehanizmi stupaju u akciju prilikom **hroničnih bakterijskih infekcija** i posle ponovljenih i masivnih **vakcinacija**. Naročit proaterogeni značaj imaju infekcije i imunizacije u dečijoj dobi, jer bi se jednom stečena **hipersenzitivnost** mogla dugo održati stalno ponavljajući „uzgredne” lezije vaskularnog tkiva³⁶.

Porast incidence ateroskleroze je u zapadnim zemljama išao zajedno sa opada-njem smrtnosti od dečijih infektivnih bolesti i sistematskom imunizacijom. Moguće je da je ovo masovno preživljavanje infekcija omogućilo da se početna senzibilizacija infektivnim agensom razvije do svojih krajnjih imuno-patoloških konsekvenci^{32,37}.

LITERATURA

1. Armstrong ML, Megan MB and Warner ED: Intimal tickening in normcholesterolemic rhesus monckey fed low supplements of dietary cholesterol. *Circulation Res* 34:447-454, 1974.
2. Kritchevsky D: Nutritional factors in atherosclerosis. In: *Atherosclerosis V* Ed by AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer Verlag, NY, Berlin, pp 351-354, 1979.
3. Mahley RW: Atherogenic hyperlipoproteinemia. The cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. *Med Clin Nord Amer* 66(2):357-402, 1982.
4. Moore JH and Williams DL: The effect of diet on the level of plasma cholesterol and the degree of atheromatous degeneration. *Br J Nutr* 18:253-268, 1964.

5. Adams CWM, Morgan RS and Bayliss OB: No regresion of atheroma over one year in rabbits previously fed a cholesterol-enriched diet. *Atherosclerosis* 18(3):429-444,1976.
6. Connor WE: The effect of nutrition on lipid metabolism. In: *Atherosclerosis, metabolic, morphologic and clinical aspects*. Ed. by: Maining GM and Haust MD. Plenum Press, NY, London, pp 630-637,1977.
7. Moore JH: The effect of the type of roughage in the diet on the plasma cholesterol levels and aortic atherosclerosis in rabbits. *Br J Nutr* 21:207-217,1967.
8. Dinčić D: Lipoprotein(a) u nastanku i razvoju ishemijske bolesti srca. Magistarski rad, Zadužbina Andrejević, Beograd, 1999.
9. Beaumont JL, Baudet MF, Dacht C and Beaumont V: Autoimmune hyperlipemia and autoimmune Xantomatosis. *Atherosclerosis V*. Ed. by: AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin, pp 334-336,1979.
10. Hanson GK, Zhou H, Tornquist, Paulson G. The Role of Adaptive Immunity in Atherosclerosis *Annals of the New York Academy of Sciences* 902:53-64, 2000.
11. Mathews JD and Ferry BJ: Cholesterol and the immune response to influenza antigens. *Lancet*, ii: 1212-1213, 1978.
12. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26,1999.
13. Alving CR, Richards RL and Guirguis AA: Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to lisosomal model membranes. *J Immunol* 118(1):342-347,1977.
14. Sato J and Hara J: Anti-cholesterol activity in antisera against human serum lipoprotein. *Immunochemistry* 9:585-586,1972.
15. Hammerschmidt DE, Greenberg CS, Yamada O and Craddock PR: Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. *J Lab Clin Med* 98(1): 68-77, 1981.
16. Pang AS and Minta JO: Inhibition of vitamin D-2 induced atherosclerosis in rats by depletion of complement with cobra venom factor. *Artery* 7(2):109-122,1981.
17. Walton KW: Immunological aspects of atherogenesis. In: *Immunity and atherosclerosis*. Proc of the Sero Sym, London 24:45-56,1980.
18. Beaumont JL and Beaumont V: Immunological aspects of artherosclerosis. In *Atherosclerosis Review*. Ed. by R Paoletti and AN Gotto Jr. Raven Press, New York 3:133-146, 1978.
19. Traber MG and Kayden HJ: Low density lipoprotein receptors activity in human monocyte-derived macrophages and its relations to atheromatous lesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(9):5466-5470,1981.
20. Nikolić V: Serumski lipidi i lipoproteini i imunološka reaktivnost. 12 Kongres Saveza fiziol. Društava Jugosl., Sarajevo, 1982.
21. Poston RN and Davies DF: Immunity and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. A review: *Atherosclerosis*. 19:353-367,1974.
22. Grunfeld C, Fiengold KR. Regulation of lipid metabolism by cytokines during host defense. *Nutrition*; 12(Suppl):S24-6. 1996
23. Kritchevsky D, Moyer AW, Tesar AC and McLandless RFJ: Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. II. Effect on unsaturation. *Am J Physiol* 185: 279-280, 1956.

24. Davies DF, Johnson AP, Rees BWG and Elwood PC: Food antibodies and miocardial infarction. *Lancet* i: 1012-1013,1974.
25. Meeker DR and Kesten HD: Experimental atherosclerosis and high protein diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 45:543-544,1940.
26. Carroll KK and hamilton RMG: Effects of dietary proteinand carbohydrate on plasma very-low-density lipoproteins. *Cell Immunol* 52(10):223-228,1975.
27. Muir CA, Taylor EE and Mynday KA: An investigation in rabbits of the "immunological" theory of atherogenesis. *Proc Nutr Soc* 36(3): 95a,1977.
28. Constantinides P: Present evidence for the role of immune factors in atherogenesis. In *Immunity and artherosclerosis*. *Proc of the Seroono Symp*. London 24:23-29, 1980.
29. Wright R, Taylor KB, Truelove SC and Aschaffenburg R: Circulating antibodies to cows milk proteins and gluten in new-born. *Brit Med J* 513-515,1962.
30. Taylor KB, Truelove SC and Wright R: Serologic reactions to gluten and cows milk proteins in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 46:99-108,1964.
31. Spencer RP: Intestinal absorption of aminoacids. *Am J Clin Nutr* 22:292-299, 1969.
32. Gallagher PJ, Gibney MJ and Taylor TG: Dietary antigens, immune tolerance and atherosclerosis. *Artery* 8(4):315-322, 1980.
33. Geertinger P: The complement sistem and the initiation of atherosclerosis with special reference to the preventive effect of chronic alccholism. In: *Immunity and atherosclerosis*. *Proc of the Seroono Symp*, London 24:151-164,1980.
34. Joris I and Majno G: Atherosclerosis and inflammation. *Adv Exp Med Biol* 104:227-233, 1978.
35. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM and Minick CR: Virus induced atherosclerosis. *J Exp Med* 148:335-340,1978.
36. Numazaki K, Chiba S. Cytomegalovirus infection and restenosis. *Stroke*, 28:1088-90. 1997.
37. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167-180, 2001.

4. ĆELIJSKE KOMPONENTE PROCESA ATEROSKLEROZE

Imunološki procesi mogu da učestvuju u pokretanju i progresiji aterogeneze,

- nagomilavanjem makromolekula u intimi, ali važni su i u
- odstranjivanju makromolekula (lipoproteina) iz arterijskog zida.

Mononuklearni fagocitni sistem intime odstranjuje makromolekule, naročito lipoproteine i sprečava stvaranje ateromatoznih ploča zadebljale intime kao svojevrsni „čistač (*clearens sistem*)” intime¹.

4.1. MONONUKLEARNI FAGOCITNI SISTEM

Mononuklearni fagocitni sistem učestvuje u odbrani od mikroorganizama, uklanja oštećene ćelije i metaboličke produkte, sarađuje u aferentnom delu imunološkog odgovora, imunološkom nadzoru nad tumorima, stvaranju interferona (IFN), procesima zarastanja rana, regulaciji granulo- i eritropoeze i metabolizmu koštanog tkiva².

Monociti u perifernoj krvi predstavljaju prelazni ćelijski stadijum koji nastaje u kostnoj srži stvaranjem promonocita, iz matičnih ćelija preko monoblasta, i završava prelaskom u specifično tkivo i sazrevanjem makrofaga u tkivu. Monociti se u krvi zadržavaju kratko. Poluvreme njihovog boravka u krvi je oko 8,4 časa. Postepeno se izdvajaju u marginalni odeljak periferne krvi da bi migracijom ušli u tkivo gde će se dalje diferencirati², čime svaki makrofag stiče svoje „lične” osobine u skladu sa lokalnom mikrosredinom, ali ostaje deo mononuklearnog fagocitnog sistema na nivou organizma.

Monociti su ovalne ćelije prečnika 12-15 mikrometara. Oni čine 2-11% leukocita periferne krvi. Jedro im je veliko, bubrežasto, sa hromatinom u vidu „pramenova očesljane kose” pri May-Grunwald-Giemsma bojenju. Citoplazma sadrži granule koje pri

citohemijskom ispitivanju pokazuju visoku aktivnost **kisele fosfataze**³, **nespecifičnih esteraza**⁴, i **butirat esteraza**⁵, dok je aktivnost hloraacera esteraze izrazito slaba⁶.

Promonociti imaju bazofilniju citoplazmu. Hromatin im je vlaknastog izgleda sa prisutnim nukleolusom. U citoplazmi promonocita ima puno sitnih azurofilnih zrna, sa izraženom aktivnošću **nespecifičnih esteraza**⁴.

Elektronskom mikroskopijom su u **promonocitima** otkrivene široke plaže granularanog endoplazmatičnog retikuluma i poliribozomi kao znaci intenzivne **sinteze belančevina (enzima)**, a može se zapaziti i početak formiranja lizozoma sa membranskim omotačem kao kod Goldžijevog sistema.

Elektronskom mikroskopijom **monocita** zapaža se redukovana količina endoplazmatskog retikuluma, a povećava se broj **mitohondrija**, kao znak burnih energetske procesa. Na površini monocita se javljaju brojni mikrovili i mikropinocitozne vakuole. Raste broj **lizozoma** i aktivnost njihovih litičkih enzima (**kisela fosfataza, nespecifične esteraze, katepsin, lizozim, beta-glukuronidaza i aril-sulfataza**)^{2, 7, 15}.

Histiociti su tkivni makrofazi vezivnog tkiva. U plućima se razvijaju alveolarni makrofazi, a u jetri Kupfferove ćelije, dok u limfnim čvorovima i slezini postoje slobodni i fiksirani makrofazi.

Monociti koji uđu u tkiva fiksiraju se za kolagena i retikulinska vlakna i prelaze u „stanje sna”, u kojem ostaju dok ih ne aktivira kontakt sa nekim antigenom, detritusom ili produktima zapaljenjskih reakcija. Prilikom **aktivacije** se povećava broj lizozoma i aktivnost njihovih enzimskih sistema, sa pojavom sposobnosti deobe.

Tabela 1. Prikaz osobina koje makrofazi stiču prilikom **aktivacije**¹⁶

Porast veličine ćelije,
Grananje citoplazmatskih produžetaka,
Aktiviranje heksozo-monofosfatnog šanta glikolize,
Porast aktivnog transporta glikoze i aminokiselina,
Aktivacija membranske adenil ciklaze,
Aktivacija citoplazmatske laktat dehidrogenaze,
Porast količine cikličnog GMP u ćeliji,
Sinteza i otpuštanje lizozomalnih enzima,
Sinteza aktivatora plazminogena i prostaciklina
Porast pinocitoze,
Povećan broj citoplazmatskih granula,
Olakšana fagocitoza čestica obavijenih sa IgG i C3b,
Olakšana razgradnja mikroorganizama i tumorskih ćelija.

4.2. ULTRASTRUKTURNI ASPEKTI PONAŠANJA MONONUKLEARNIH FAGOCITA U TOKU ATEROGENEZE

Elektronskom mikroskopijom su praćene posledice povređivanja endotela i deendotelizacije (Slika 13). Mono- i polimorfonukleari prvi prijanjaju za ogoljenu elastičnu membranu i kolagen. Preko ovih ćelija su, nešto kasnije, trombociti načinili višeslojni pokrivač. Aktivirani makrofazi, potom, prožimaju masu nagomilanih ćelija svojim citoplazmatskim produžetcima¹⁷.

Pristizanje novih makrofaga olakšavaju trombociti preko svojih medijatora, ili direktnim vezivanjem monocita. U slučaju imunološkog oštećenja intime hemotaktički deluju i fragmenti aktivirane C3 i C5 komponente komplementa, kalikrein, aktivatori plazminogena i fibrinopeptidaze¹⁸.

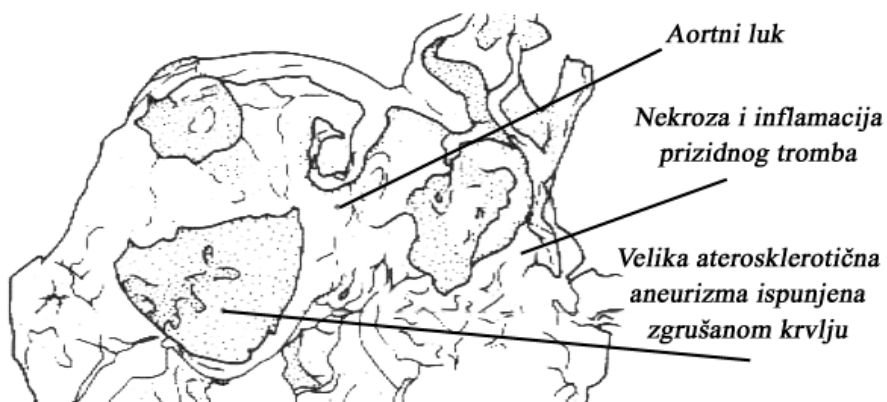
Nagomilani i aktivirani makrofazi u intimi povećavaju aktivnost svojih esteraza, kisele fosfataze i kisele lipaze i povećavaju broj membranskih receptora za konstantni (Fc) deo IgG¹⁹.

Nasuprot staroj Metchnikofovoj hipotezi da samo mrtvi makrofazi otpuštaju svoje lizosomalne hidrolaze, elektronskomikroskopski je dokazano da se dešava da pri spajanju lizozoma sa heterofagocitnim vakuolama spoljašnji deo zida vakuola ostane otvoren u trenutku kada su lizosomalne hidrolaze već „prelivene” u vakuolu²⁰. Hidrolitički enzimi koji procure po principu „podrigivanje posle gutanja” (*regurgitatio after feeding*) mogu da izazovu nekrozu u ateromatozno degenerisanoj intimi.

„**Prolivanje**” lizosomalnih enzima iz aktiviranih makrofaga može se blokirati cikličnim nukleotidima, prostaglandinom PgE1 i teofilinom. Intracelularni nivo cikličnog AMP-a reguliše kretanje lizozoma i njegovo spajanje sa heterofagocitnom vakuolom^{21,22}. Ciklični AMP aktivira protein-kinaze koje deluju na mikrotubularne proteine koji regulišu intracelularni saobraćaj lizozoma i procese njihovih membranskih interakcija²¹.

Monociti, kao dugoživeće ćelije, imaju centralno mesto u razvoju hronične hlamidijalne bolesti. Istraživači su locirali *C. Pneumoniae* u aterosklerotskom plaku u makrofagama, endotelijalnim ćelijama i glatkomišićnim ćelijama. Sumnja se da su monociti odgovorni za diseminaciju patogena sa mesta primarne infekcije u ostale krvne sudove. Na taj način oni iniciraju i održavaju infekciju⁸ (Slika 20.a,b).

Genom (DNA) *C. Pneumoniae* je detektovan u perifernim cirkulišućim monocitima pacijenata sa aterosklerozom¹⁷. Detekcija viabilnih, metabolički aktivnih *C. Pneumoniae* u monocitima načinjena je uz pomoć tehnike reverzne transkriptaze-lančane reakcije umnožavanja (RT-PCR)²⁴. Prisustvo hlamidijalnih agenasa u monocitima je kontinuirani stimulus imunskog sistema^{17,23,25}.



Slika 20. Velika aterosklerotična aneurizma sa znacima nekroze i inflamacije (mikotična aneurizma).

4.3. „MONOCITNI KLIRENS SISTEM” U METABOLIZMU LIPOPROTEINA NA NIVOU INTIME

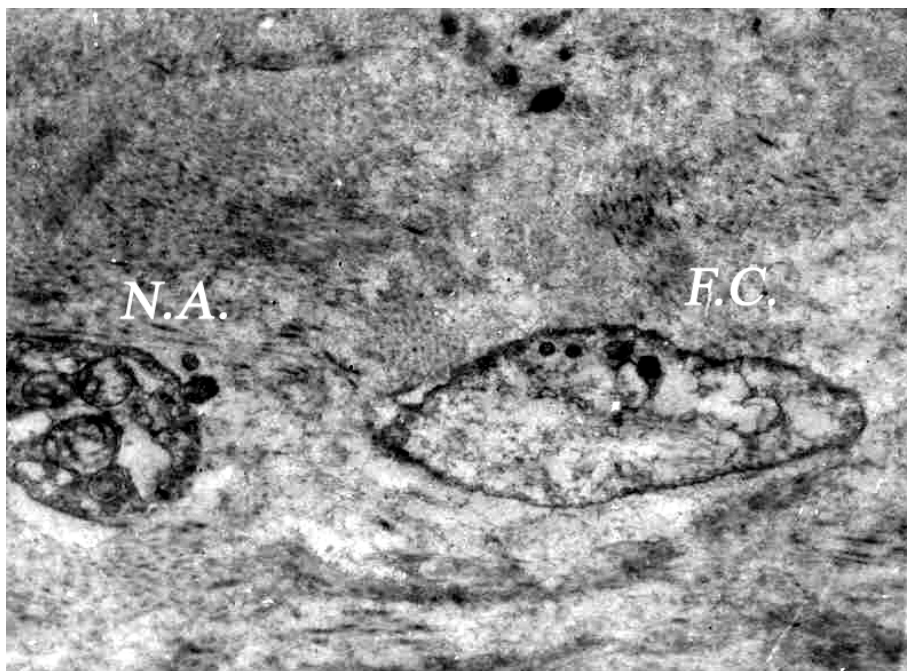
Aterosklerotična destrukcija arterijskog zida dovodi do intra- i ekstracelularnog nagomilavanje lipoproteina.

Interesantna je „metabolička inercija” ateromskih lipida²⁶. Naime, kod zečeva koji su tri meseca bili na hiperholesterolskoj dijeti normalizovan je nivo holesterola u serumu i jetri ubrzo posle vraćanja na normalnu ishranu, dok se lipidi iz ateroma nisu resorbovali ni posle godinu dana, već su se pretvarali u fibrozne aterosklerotične naslage („fibrozne kape”)^{26,27,7-15}. Kada su ateromski lipidi implantirani subkutano, bili su mnogo brže resorbovani od *in situ* ateroma^{26,27}.

Slaba resorpcija ateromskih lipida može biti uzrokovana:

- razdvajanjem holesterola od njegovih lipoproteinskih nosača;
- deficijentnom fagocitozom u ateromatoznoj ploči.

U razvijenoj fazi ateroskleroze sa fibrozom, hijalinizacijom, angioneogenezom (Slika 21) itd. otkriveni su aglomerati monocita koji formiraju palisadne nakupine oko kristala holesterola (slične Langerhansovim ćelijama). Lipidni kristali, izolovani iz subendotelnog sloja aterosklerotične aorte, cepaju ćelijske opne fagocita u kojima se nalaze^{28,29}.



Slika 21. Neoangiogeneza (levo) i „penasta ćelija” (desno).

TEM; NA, neoangiogeneza; FC, penasta ćelija

Sve ovo govori o značaju makrofaga u metabolizmu i uklanjanju lipidnih inkluzija na nivou vaskularne intime.

Gerrity^{30,31} je formulisao teoriju o „**monocitnom klirens sistemu**” kojeg bi sačinjavali cirkulišući monociti koji ulaze u lipidima-preopterećenu intimu, postaju fagociti, nakupljaju lipidne vakuole i postaju penušave ćelije, da bi se na kraju vratili u krvnu

struju. Prema ovoj hipotezi ateroskleroza je posledica insuficijencije lizozomalnog aparata makrofaga i sledstvenog nagomilavanja lipida.

Makrofazi izolovani iz intime imaju receptore za lipoproteine niske gustine (LDL). Praćenjem sudbine radioaktivno obeleženih lipoproteina zapaženo je da reakcijom sa receptorima za LDL dolazi do inhibicije sinteze holesterola mehanizmom povratne sprege^{31,32,25}. Time bi se mogla regulisati homeostaza holesterola na nivou vaskularnog zida²⁵. Inkubacija makrofaga sa normalnim lipoproteinima ne dovodi do povećanja ćelijskog sadržaja holesterola, što znači da za razvoj ateroskleroze, možda nisu toliko bitne promene nivoa serumskih lipoproteina, koliko disbalans metabolizma holesterola u makrofazima. Nastanak makrofaga i penušavih ćelija intime je prikazan na Slici 19.

4.4. „PENUŠAVE ĆELIJE” KAO ZNAK INSUFICIJENCIJE MONOCITNOG KLIRENS SISTEMA

Dugo su vođene rasprave da li su penušave ćelije poreklom od glatkih mišića ćelija medije ili od makrofaga. U svakom slučaju, penušave ćelije pinocitozom unose u sebe lipoproteine i razaraju ih svojim lizozomalnim enzimima (elektronski autohistordiografski podaci)³³.

Obzirom da su u penušavim ćelijama potvrđene peroksidaza pozitivne granule (peroksizomi) koje su, karakteristične za mononukleare, one su zapravo, modifikovani monociti^{31,32}. Isti autori³¹ su zabeležili povratak monocita koji su „postali” penušave ćelije u krvnu struju, gde izlučuju nagomilane i „nesvarene” lipide.

Kultivisanjem penušavih ćelija iz ateromatoznih ploča, omogućeno je njihovo imunološko i citohemijsko ispitivanje. Pokazalo se da fuziformne, lipidima preopterećene i vakuolizirane penušave ćelije u oko 90% slučajeva lako adheriraju za staklo, imaju receptore za Fc deo imunoglobulina G i za treću (C3) komponentu komplekta. Ove ćelije, rado fagocitiraju antitelima obavijene eritrocite i pokazuju citohemijski jasno izraženu aktivnost kisele lipaze, a to su sve osobine mononuklearnih makrofaga, po kojima se razlikuju od glatkih mišićnih ćelija medije^{34,35,9,10}.

Praćena je regresija ateroskleroze, kada se reguliše hiperholesterolemija, koja je izazvana hiperholesterolskom ishranom. Ukoliko je oporavak bio bolji, penušavih ćelija je bilo sve manje, a makrofaga sve više. Ultrahistohemijskim metodama su određivane aktivnosti nespecifičnih estera koje hidrolizuju oleate holesterola. Pokazalo se da **iscrpljivanjem lizozomalnih nespecifičnih estera** prestaje hidroliza holesterolskih estara i počinje njihovo nagomilavanje u makrofagu koji se pretvara u penušavu ćeliju³⁶.

U ateromima su nađene penušave ćelije koje na osnovu lokalizacije, morfologije i citohemije liče na glatke mišićne ćelije. Imunofluorescencom je dokazano da makrofa-

zi iz istih lezija razaraju lipoproteine sa obeleženim apo-B proteinom bez ostatka, dok ćelije slične miocitima nagomilavaju apo-B lipoproteine i postaju penušave ćelije³⁷.

Centrifugiranjem su odvojene penušave ćelije niske i visoke gustine. Penušave ćelije niske gustine su, isto kao i alveolarni makrofazi, imale visok nivo kiselih hidrolaza i katalaze⁷⁻¹⁵. Na membrani su ispoljavale autentične Fc receptore i učestvovala su u antitelima posredovanoj fagocitozi. Ipak, samo jedna trećina ovih ćelija imala je CR3 receptore (CD11b/CD18)^{38,39}. Ćelije visoke gustine su sadržale više lipida i izražene osobine glatkih mišićnih ćelija, kao što su miofibrile^{27,7-15}.

Penušave ćelije mogu nastati i od makrofaga i od glatkih mišićnih ćelija medije (Slika 2-3), ali su najverovatnije, prvi na udaru makrofazi. Kada se njihova lizosomalna mašinerija preoptereti, osobine lipofaga stižu i glatke mišićne ćelije^{40,7-15}.

Vaskularne glatke mišićne ćelije su značajne za proces ateroskleroze. U intimi arterijskog zida se nalaze pojedinačno, dok gusto zbijene čine glavni sastojak vaskularne medije. Funkcionalno se razlikuje više tipova glatkih mišićnih ćelija – od prevashodno kontraktilnih, pa do onih sa dominantno metaboličko-sekretornom funkcijom⁴⁰.

Stvaranjem komponenata ekstracelularnog matriksa glatke mišićne ćelije imaju značajnu ulogu u procesima reparacije oštećenog krvnog suda, slično ulozi fibroblasta u procesima zarastanja rana. Međutim, kada dođe do njihove proliferacije, migracije i poremećaja funkcije, postaju faktor koji aktivno učestvuje u progresiji i destabilizaciji plaka^{40,41}.

Lokalni fibroblasti intime (Slika 19) su, takođe, mogući izvor penušavih ćelija^{41,42}. Fibroblasti su značajni kao ćelije koje se mogu usmeriti ka metabolisanju lipoproteina, a na drugoj strani značajni su za procese remodelovanja arterijskih lezija. Diferencirani fibroblasti arterijske medije sintetišu i izlučuju komponente ekstracelularnog matriksa i faktore rasta, čime učestvuju u ponovnom oblikovanju (remodelovanju) oštećene intime²⁵. Fibroblasti regulišu procese reparacije oštećenog krvnog suda (slično ulozi fibroblasta u zarastanju rana) i time učestvuju u **remodelovanju arterijskih lezija**^{40,25}.

LITERATURA

1. Gerrity RG: The role of monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 103(2):101-200,1981.
2. Douglas SD: Cells involved in immune response. In: Basic and clinical immunology. Ed. by: Fudenberg HH, Los Angel California. Langa Med Publ 96-115,1982.
3. Goldberg AF and Barke T: Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature*, London 195:297-298,1962.
4. Kaplow LS, Dauber H and Lerner E: Assessment of monocytes esterase activity by flow-cytophotometry. *J Histochem Cytochem* 24:353-364,1976.
5. Higgy KE, Burns GF and Hayhoe FGJ: Discrimination od B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand J Haematol* 18:437-442,1977.

6. Hayhoe FGJ and Quaglini D: Haematological cytochemistry. Churchill Livingstone, Edinburg , London, NY,1980.
7. Đorđević-Denić G., Cvetković P., Radak Đ., Pašić M.: A cyiochemical estimate of amount of glycogen in alveolar macrophages in experimental induction of atherosclerosis. *Physiol. Pharmacol. Acta.* 22(3): 124. 1986.
8. Radak Đ., Đorđević-Denić G., Perović M.: Influence of tocopherol on the development of pulmonarz emphzema. *Iug Physiol. Pharmac. Acta.* 22(3): 120-123. 1986.
9. Radak Đ., Đorđević-Denić G., Cvetković P., Perović M., Vuković J.: The effect of vitamin E on the development of pulmonarz emphzema in experimental atherosclerosis. *Iug. Physiol. Pharmacol. Acta.* 22(3): 281-286. 1986.
10. Đorđević-Denić G., Radak Đ., Cvetković P., Perović M.: Cytochemical examination of the amount of lipids in alveolar macrophages during experimental atherosclerosis. *Iug. Physiol.Pharmacol. Acta.* 23(1): 105-106. 1987.
11. Radak Đ., Cvetković P., Đorđević-Denić G., Perović M.: Cytochemical examination of the presence of iron in alveolar macrophages of guinea pigs in experimental atherosclerosis. *Iug. Physiol. Pharmacol. Acta.* 23(1): 103-104. 1987.
12. Rosato E., Radak Đ., Cvetković S., Đukić V.: La trombosi precoce negli impianti tubulari di protesi eterologhe dopo rivascolarizzazione degli segmento aorto-femorale e femoropopliteo. *Minerva Angiologica*, 15 (Suppl. 1), 3: 203-210, 1990.
13. Rosato EG, Radak Đ, Đukić V.: Neoangiogenesis and human amniotic membrane. A clinico-instrumental study in phlebostatic ulcer of the lower extremities, *Angiologia*, Spanish, 44(1): 1-7, 1992.
14. Radak Đ., Đorđević-Denić G., Cvetković P., Perović M., Pašić M.: Cytochemical investigations of the alveolar macrophages. *Srpski Arhiv.* 114(7): 612-629. 1986.
15. Radak Đ., Cvetković P., Đorđević-Denić G.: The lysosomal enzymes of alveolar macrophages in experimental atherosclerosis. *Med. Istraž. Beograd*, 18, Suppl. 1-2: 127-133, 1985.
16. Wing EJ and Remington JS: Delayed hypersensitivity and macrophage function. In: basic and clinical immunology. Ed By: Fudenberg EH. Los Angeles, California. Lange Med Publ 129-144, 1982.
17. Lazzarini-Robertson A: Arterial endothelium in the initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis*. V Ed. by: AM Gotto, IG Smith, B Allen, Springer-Verlag, NY, Heidelberg 103-111, 1979.
18. Musson RA and Henson PM: Humoral and formed elements of blood modulate the response of peripheral blood monocytes. *J Immunol* 122:2026-2027, 1979.
19. Schaffner T, Vesselinovitch D, Wisler RW: Macrophages in experimental and human atheromatous lesion, immunologic identification. *Fed Proc* 38:1076-1079, 1979.
20. Henson P: Interaction of cells with immune complexes, adherence, release of constituents and tissue injury. *J Exp Med* 134(3):114-115,1971.
21. Weissmann G, Dukor P and Zurier RB: Effect of cyclic AMP on release of lysosomal enzymes from phagocytes. *Nature New Biol (London)* 231:131-132, 1971.
22. Goodman DBP, Rasmussen E, Di Bella and Guthrow CE: Cyclic AMP-stimulated phosphorylation of isolated microtubule subunits. *Proc Nat Acad Sci USA* 67:652-653, 1970.
23. Wong YK Dawkins KD, Ward ME. Circulating Chlamydia pneumoniae DNA as a predictor of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 34:1435, 1999.

24. Koehler L, Kuipers JG, Zedler H: Persistent Chlamydial Infections. *Biomedical Progress* 15:28-34,2002.
25. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167-180, 2001.
26. Adams CWM, Morgan RS and Bayliss OB: No regresion of atheroma over one year in rabbits previously fed a cholesterol-enriched diet. *Atherosclerosis* 18(3):429-444,1976.
27. Adams CMW, Knox J and Morgan RS: The resorption rate of atheroma lipids in situ and implanted subcutaneously. *Atherosclerosis* 22(1):79-90,1975.
28. Adams CWM and Bayliss-High OB: monuclear phagocytes in atherosclerosis. *Atherosclerosis* V Ed. by: AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin, pp 130-132,1979.
29. Hata Y, Shigematsu H i Insull WJR: Cholesteril-ester-rich inclusion from human aortic fatty streak and fibrous lesions of atherosclerosos. II. Phisical properties of swelling, resiliency and lyotropy as liquid cristal. *JPN Circ J* 44(1):46-54,1980.
30. Gerrity RG and Naito HK: Lipid clearence from featty streak lesions by foam cell migration. *Artery* 8(3):215-219,1981a.
31. Gerrity RG and Naito HK: Ultrastructural identification of monocyte-derived foam cells in featty streak lesions. *Artery* 8(3):208-214,1981b.
32. Traber MG and Kayden HJ: Low density lipoprotein receptors activity in human monocyte-derived macrophages and its relations to atheromatous lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(9):5466-5470,1981.
33. Popov AV, Vinogradov AG: Elektronno-avtoradiograficheskoe i biokhimicheskoe izuchenie roli penistyykh kletok v metabolisme lipoproteinov nizkoi plotnosti. *Vopr Med Khim* 24(1): 109-113,1978.
34. Schaffner T, Tayler K: Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* 100(1):57-80,1980.
35. Daoud AS, Jarmolych J, Augustyn JM and Fritz KE: Sequential morphologic studies of regression of advanced atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 105(5):233-239,1981.
36. Fritz KE, Daoud AS and Jarmolych: Non-specific esterase activity during regresion of swine aortic artherosclerosis. *Artery* 7(5):352-366,1981.
37. Walton KW: Atherogenetic factors intrinsic to the artery wall. *Atherosclerosis* V Ed. by: AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin, pp 98-101,1979.
38. Fowler SD: Characterization of foam cells in experimental atherosclerosis. *Acta Med Scand (Suppl)* 642:151-158,1981.
39. Fowler SD, Shio H and Haley NJ: Characterization of lipid-loaden aortic cells fromcholesterol fed rabbits. IV. Investigation of macrophage like properties of aortic cell populations. *Laboratory Investigation* 41(4):372-378,1979.
40. Jakob HS and Hammerschmidt DK: Ubiquitous macrophages in cancer, atherosclerosis. *JAMA* 245(16):51-52,1981.
41. Pitas RE and Innerarity TL: Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblast from macrophages in vitro by fluorecence microscopy. *Arteriosclerosis* 1(3):177-185,1982.
42. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26,1999.

5. PROLIFERACIJA I MIGRACIJA

Aktivacija endotela lezijom je, verovatno, primarni događaj u lancu aterogeneze. Stimulusi koji aktiviraju endotel mogu da dolaze iz lumena ili iz zida krvnog suda.

Aktivacija endotela omogućava adheziju monocita i T-limfocita i njihovu migraciju u subendotelni prostor, čime se započinje i održava inflamatorni proces u zidu krvnog suda, uz lokalno nakupljanje trombocita,.

Makrofazi se pojedinačno nalaze u normalnoj intimi, a dvostruko ih je više kod starijih osoba nego kod dece. Njihova fiziološka uloga je **funkcija čistača produkata metabolizma lipida**. Oni preuzimaju nativne i izmenjene lipoproteine, izlučuju apolipoprotein-E (APO-E), lipoproteinsku lipazu, uklanjaju oštećene ćelije i imunske komplekse i učestvuju u uklanjanju prizidnih tromba. Sintetišu i izlučuju faktore rasta i metaloproteinaze matriksa (MMP), čime učestvuju u ponovnom oblikovanju (**remodelovanju**) oštećene intime. Sa druge strane, makrofazi podstiču imunološku reakciju, oslobađajući citokine i faktore rasta i aktiviraju limfocite^{1,2}.

U eksperimentalnom modelu ateroskleroze, indukovane dijetom bogatom holesterolom, monociti su prve ćelije koje se nalaze uz endotel posle čega migriraju u subendotelni prostor, gde gutaju oksidovani holesterol i pretvaraju se u penaste ćelije. Populacija makrofaga u plaku nije homogena.

- U fibroznoj kapi dominiraju makrofazi koji ispoljavaju MHC molekul II klase ali ne i CD36 molekul važan u prepoznavanju apoptotičnih ćelija (Slika 22) i oksidovanih lipoproteina.
- Makrofagi u blizini ateroma ispoljavaju CD36 molekul ali ne i molekule II klase MHC i pokazuju morfologiju penastih ćelija^{1,2}.

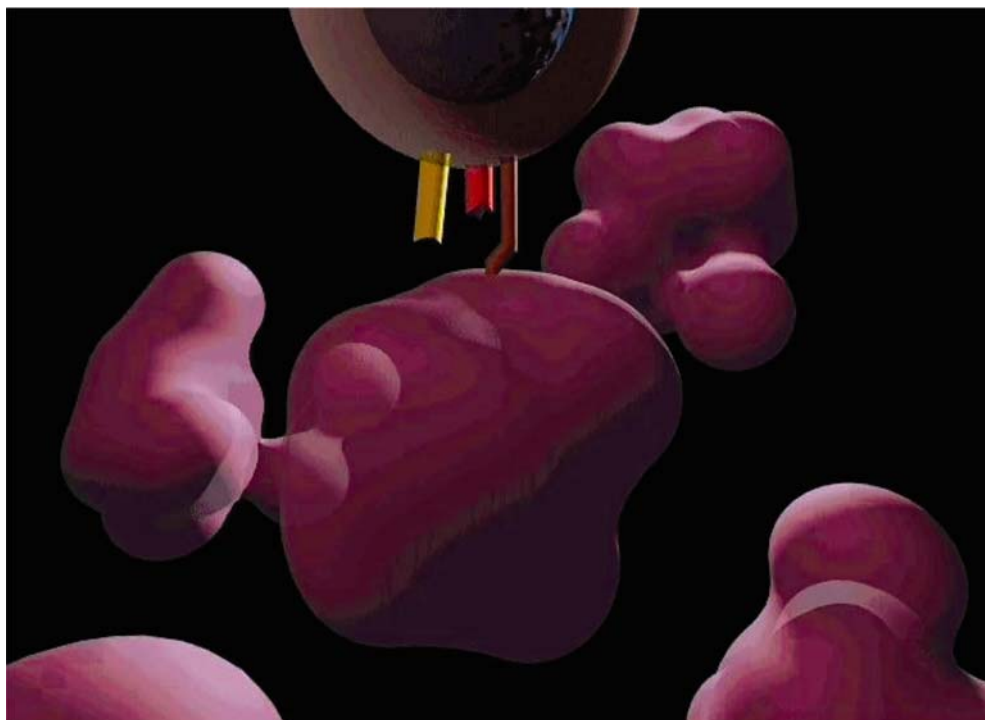
Spektar receptora koje nose sve ove ćelije je širok, ali ni za jedan se ne može tvrditi da je specifičan isključivo za ćelije monocitno/makrofagne linije^{1,2}.

Humani monociti/makrofazi poseduju manozil-fukozil receptore koji se vezuju za manozne i fukozne šećere na površini zida bakterija i gljivica, ali i karbohidrata ekstracelularnog matriksa. Ove ćelije takođe poseduju i CD14, receptor za proteine koji se vezuje za lipopolisaharide (LPS). Prisutna su i tri različita Fc receptora za IgG : FcγRI (CD 64) visokog afiniteta za humani IgG, FcγRII (CD32) srednjeg afiniteta, dok su FcγRIII (CD 16) slabog afiniteta za IgG. Ovi receptori najverovatnije imaju ulogu u

fagocitozi, opsonizaciji i započinjanu citotoksičnog ubijanja ciljne ćelije. Receptor za komplement CR1 (C3b receptor, CD35) ima važnu ulogu u borbi protiv mikroorganizama. Receptor za komplement CR3 (C3bi, CD11b, Mac-1) prisutan je samo na aktiviranim ćelijama i verovatno učestvuje u reakcijama adhezije makrofaga. Istu ulogu imaju i receptori označeni sa LFA-1 (CD11a) i p150,95 (CD11c), koji se iz intracitoplazmat-skih vezikula ekspimiraju na makrofazima odmah nakon njihove aktivacije. Antigeni MHC-II su prisutni na nekim monocitima/makrofazima i igraju važnu ulogu u prezentaciji antigena T ćelijama. Isto tako, neke ćelije ove skupine ispoljavaju receptor za Fc fragment IgE (FcεRII, CD23), receptor slabog afiniteta. Druge molekule koje se mogu identifikovati na monocitima/makrofazima su CD13, CD15, CD68 i VLA-4 (CD29/CD49d)¹.

Makrofagi mogu da se razvijaju u dva pravca.

- Prvi, indukovano citokinima ili lipopolisaharidnim bakterijama vodi makrofage u **aktivaciju** i podstiče njihove aktivnosti u preradi i prezentaciji antigena, dok
- Drugi karakteriše preuzimanje i **katabolizam lipoproteina** i sekrecija lipaze^{1,2}.

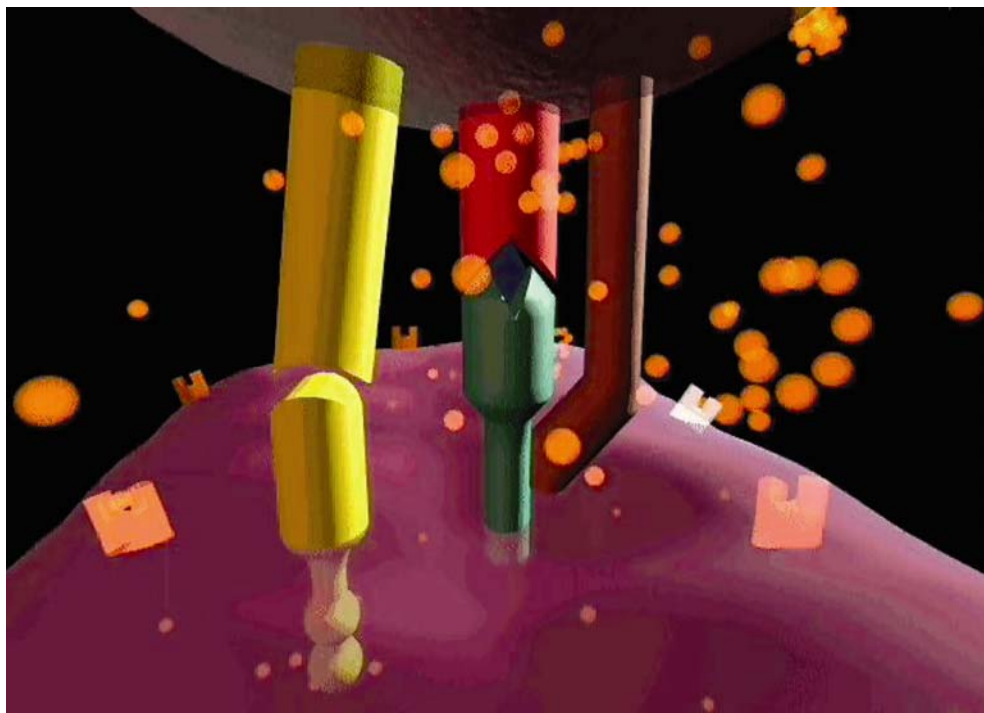


Slika 22. Apoptoza – programirana ćelijska smrt i nastajanje ćelijskog debris. (Roitt, 1998.)

Jedna od važnijih funkcija makrofaga je produkcija i lučenje holesterola. Istovremeno intraćelijski sadržaj holesterola utiče na proliferaciju limfocita. U kokultivaciji sa makrofazima limfociti uvećavaju sadržaj holesterola dvostruko i smanjeno proliferišu na uobičajene stimuluse. Međutim, u inflamaciji makrofazi dramatično smanjuju ovu sposobnost, čime mogu uticati na tok inflamatornog procesa i razvoj lezije^{1,2}.

Lipidima bogate penaste ćelije su najvećim delom poreklom od makrofaga koji akumuliraju holesterol, najviše preuzimanjem oxLDL preko specifičnih receptora. Nastanak penastih ćelija determinišu lokalna sekrecija citokina i dostupnost modifikovanih lipoproteina, koje makrofazi fagocitiraju preko receptora hvatača. Ovo ukazuje na značaj lokalne inflamatorne reakcije u arterijskom zidu, pri čemu se stvaraju **slobodni kiseonički radikali**,

- koji modifikuju lipoproteine, sa jedne strane i
- utiču na sekreciju citokina, sa druge strane.



Slika 23. U reakcijama ćelijske citotoksičnosti CD8⁺ T-limfocit oslobađa perforin i tako ubija ciljnu ćeliju (virusom zaraženu ili tumorsku ćeliju), koja eksprimira MHC-I molekul i odgovarajuće kostimulatorne/adhezivne molekule. (Roitt, 1998)

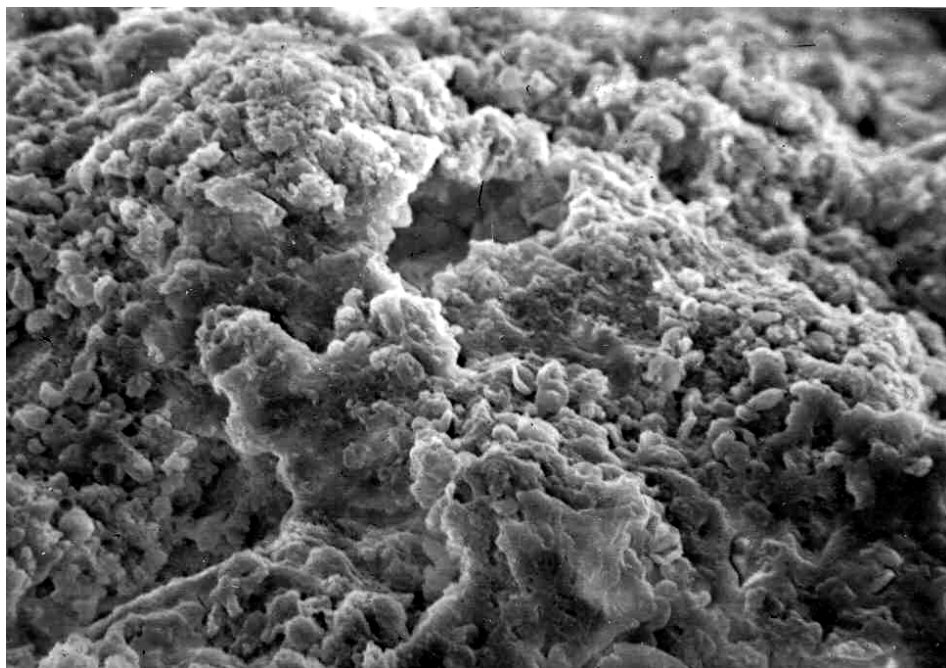
Neke penaste ćelije izlaze iz zida krvnog suda, iznoseći iz ateroma strani materijal, u formi akumulisanih lipoproteina i njihovih derivata. Drugi bivaju preopterećeni, slabo migratorni i bivaju zarobljeni u zidu krvnog suda. Kao reakcija na nagomilavanje lipida, **makrofagi produkuju apolipoprotein-E (apo-E)**. On **vezuje lipoproteine veli-**

ke gustine (HDL) čime se olakšava njegov katabolizam. Unutar lezije umiruće penaste ćelije oslobađaju svoj sadržaj stvarajući tako lipidima bogat centar ateroma, visokotrombogene prirode, koji se zove **nekrotično jezgro**².

Limfociti u ateromu pobuđuju veliko interesovanje s obzirom da su oni pokazatelji antigenom pokrenute, **specifične inflamatorne reakcije**².

Limfociti B čine neznatan broj (oko 1%) populacije limfocita u ateromu; praktično **T-limfociti** čine celokupnu populaciju limfocita prisutnih u ateromu. Limfociti T prisutni su i u intimi zdravih krvnih sudova. Pri nastanku ateroma, T-limfociti su prve ćelije koje migriraju u leziju i čak prethode pojavi monocita. U jednoj studiji navodi se da 60% ispitanika ima u fazi formiranja masnih traka predominaciju T-limfocita u odnosu na makrofage³. Dok u ranim i nezrelim lezijama dominiraju CD8+ T-limfociti (Slika 23), dotle u potpuno razvijenim plakovima preovladavaju CD4+ T-limfociti (70%)¹⁻³.

Proliferacija i migracija regulisani su solubilnim medijatorima.



Slika 24. Prizidni tromb na bazi heterogenog karotidnog aterosklerotičnog plaka. (SEM)

Faktori rasta nastaju u interakciji oštećenih ćelija endotela i adherisanih ćelija iz krvi. Posle oštećenja intime dolazi do **proliferacije glatkih mišićnih ćelija intime i medije**, kao i njihove migracije iz medije u intimu. Ovi procesi su pod uticajem **faktora rasta**: PDGF i **baznog faktora rasta fibroblasta** (bFGF – basic fibroblast growth factor). Istovremeno prisutne glatko mišićne ćelije sekretornog fenotipa ispoljavaju i do 20 puta više receptora za bFGF, što još više doprinosi njihovoj proliferaciji⁴. Ovom procesu doprinosi i **interleukin-1** (IL-1) oslobođen iz makrofaga i trombocita,

kao i **heparin-vezujući epitelni faktor rasta** (HB-EGF – heparin binding epithelial growth factor)⁵.

Pod dejstvom raznih stimulusa na membrani vaskularnih glatkomišićnih ćelija pojavljuju se i receptori hvatači, koji preuzimaju lipide i tako se ove ćelije pretvaraju u penaste ćelije.

Aktivisani limfociti-T iz plaka sekretuju **limfokine**, što potvrđuje prisustvo aktivnog imunskog odgovora u samom plaku, a doprinosi njegovom razvoju i destabilizaciji. Limfociti-T produkuju i **faktore rasta** (HB-PGF i bFGF) koji utiču na proliferaciju glatkomišićnih ćelija, kao i da olakšavaju produkciju tkivnog faktora i prokoagulantnu aktivnost makrofaga⁵⁻⁷.

Kombinacija prisutnih solubilnih komponenti u nastaloj mikrosredini uslovljava celularnu interakciju, što dalje određuje sudbinu progresije i **vulnerabilnost aterosklerotične lezije** (Slika 24), odnosno **progresiju neointime**, koja se pojavljuje nakon interventnih procedura i rekonstruktivnih zahvata na arterijama⁵⁻⁷.

LITERATURA

1. Maravić-Stojković V: Značaj imunohistohemijskog ispitivanja ćelija i ekstracelularnog matriksa endomiokardnih biopsija za dijagnostiku miokarditisa. Doktorska disertacija, Beograd, 1998.
2. Libby P: Atheroma: more than mush. *Lancet* 348, Suppl 1: s4-7, 1996.
3. Xu QB, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G: Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopathol* 56:344-359, 1990.
4. Dinčić D: Molekulski pristup u savremenom shvatanju nastanka i razvoja procesa arterioskleroze. *Vojnosanitetski Pregl* 54(1):55-60, 1997.
5. Abramowitch R, Neeman M, Reich R, Stein I, Keshet E, Abraham I: Intercellular communication between vascular smooth muscle and endothelial cells mediated by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett* 425:441-447, 1998.
6. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
7. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167-180, 2001.

6. KOLAGEN I EKSTRACELULARNI MATRIKS

Ekstracelularni matriks (ECM), nije imunološki i inflamatorno inertan, već sadrži proteine od naročitog značaja za

- limfocitnu migraciju,
- pozicioniranje makrofaga i limfocita i
- ispoljavanje sinergističkih efekata na aktivaciju/diferencijaciju limfocita, i
- oslobađanje citokina¹.

ECM sadrži kolagen, fibronektin, laminin, vimentin, dok se dezmin smatra sastojkom intermediarnih filamenata citoskeleta.

Integrini su membranski proteini ćelija uključeni u međućelijske kontakte i kontakte ćelija sa proteinima ECM². Najznačajniji ligandi integrina među proteinima ECM su kolagen, laminin, fibronektin i vitronektin. Osnovni izvor fibronektina su fibrociti, ali postoje podaci da u sintezi učestvoju i makrofazi ED1+ fenotipa ED 1, kod miša. Guste naslage fibronektina su mesto preferencijalne lokalizacije mononuklearnih ćelija na mestima aktivnog odbacivanja transplantata, kod eksperimentalnih životinja¹.

Uloga inflamatornih makrofaga u hroničnim zapaljenjima kao i u kasnoj fazi akutnog zapaljenja znatno bolje je razjašnjena nego njihova uloga u veoma ranoj fazi inflamacije. Oni potiču iz kostne srži kao promonociti, ulaze u cirkulaciju kao monociti i posle kratkog vremena ulaze u inflamirano tkivo ameboidnim kretanjem kroz zidove krvnog suda. Njihov ulazak u inflamirano tkivo podstaknut je hemotaktičkim faktorima, od kojih je najveći broj poreklom od komplementa. Monociti klize preko selektina i liganada za integrine ispoljenih na endotelnim ćelijama, krećući se kao gusenica buldožera preko njih. Brzina kojom se monociti, a verovatno i granulociti, kreću kroz krvnu struju je oko 14 μm u minuti³.

Hronične zapaljenske procese odlukuje činjenica da se na mestu lezije nakuplja sve manji broj granulocita, a da se broj monocita održava, zato što granulociti žive kratko i brzo se preusmeravaju od mesta lezije, dok monociti teže da se zadrže na mestu oštećenja.

Kada se jednom nađu izvan krvnih sudova inflamatorni monociti se brzo menjaju u makrofage. Ta transformacija je rezultat stimulacije, koja može biti uzrokovana tkivnom ozledom, imunološkim mehanizmima ili je prosto nastala usled napuštanja cirkulacije. Stimulacija se ogleda u povećanju volumena ćelije i povećanju broja organela u njoj. U organelama se povećava sadržaj enzima, a dolazi i do povećavanja jedra. Te promene razvijaju se u periodu od oko dva dana, nakon čega se makrofag nalazi u stadijumu visoke fagocitne aktivnosti, sa značajno povećanim brojem Fc receptora na površini svoje membrane. Značajna karakteristika tih makrofaga je njihova povećana sposobnost deobe, čime se razlikuju od monocita iz cirkulacije i od fiziološki rezidentnih populacija makrofaga. Povećava se i broj CR3 receptora na plazmalnoj membrani makrofaga^{3,4}.

Na mestima hroničnog zapaljenja populacija makrofaga se održava usled

- njihove proliferacije i
- smanjene migracije, što je u oba slučaja posledica dejstva hemotaktičkih faktora mikrosredine³⁻⁵.

Hemotaktičke faktore produkuju ćelije uključene u inflamaciju i to na lokalnom nivou. Hemotaktički faktori potiču od samih makrofaga (engl. *macrophage-derived growth factor*), ali i od fibroblasta prisutnih u okolnom tkivu. Posebno važnu ulogu imaju hemotaktički faktori poreklom iz aktiviranih T-limfocita:

hemotaktički faktor za makrofage,
makrofagni aktivacioni faktor (MFA),
limfokini koji sprečavaju makrofage da migriraju (MIF),
limfokini koji deluju proliferativno na makrofage i dr.

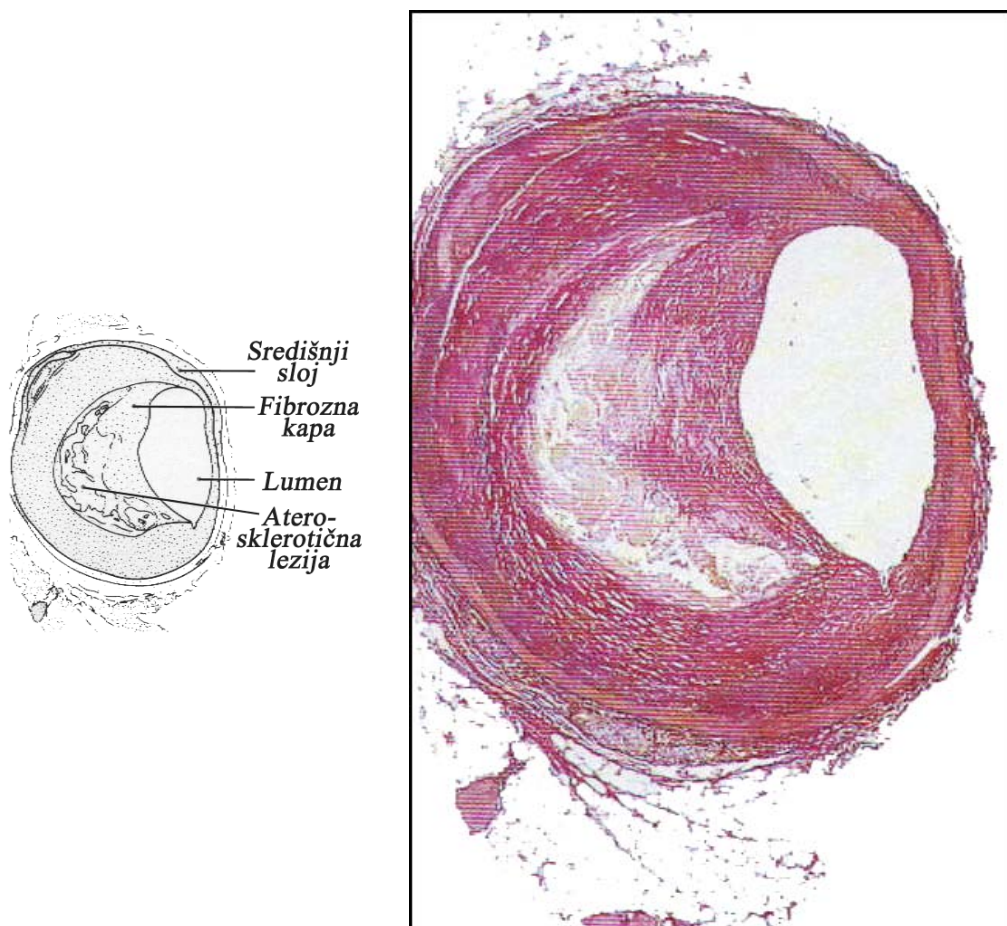
Verovatno da kod neimunološki posredovanih ozleda izvor hemotaktičnih faktora čine sami makrofazi, a kod ćelijski posredovane hipersenzibilnosti taj izvor čine T-ćelije.

Sa druge strane, širok je spektar ćelijskih produkata koje luče makrofazi (npr. IL-6, interleukin-1, TNF α/β , IFN γ itd.). Oni utiču i na druge ćelije uključene u inflamatorni proces, među kojima su i fibroblasti^{4,5}.

Stimulacija fibroblasta odvija se preko aktiviranih makrofaga, koji luče supstancu koja podstiče deobu fibroblasta i time utiče na produkciju **povećanih količina kolagena i proteoglikana** (polisaharida konjugovanih sa proteinima) ekstracelularnog matriksa. Ta činjenica je od velike važnosti u patogenezi fibrozirajućih oboljenja^{4,5,6}.

U plaku (Slika 25.a,b) su prisutni, osim prinflamatornih citokina i snažnih aktivatora proliferacije i **inhibitori rasta**, prvenstveno IFN- γ i transformišući faktor rasta-beta (TGF- β). Snažan inhibitor proliferacije ćelija je IFN- γ , koji istovremeno značajno smanjuje sintezu kolagena, dovodi do pojačane ekspresije molekula MHC na glatkomišićnim ćelijama. Budući da vaskularne mišićne ćelije konstitutivno ne mogu eksprimirati ove molekule, jasno je da je to posledica narušene imunološke homeostaze i protražovanog inflamatornog odgovora na mestu lezije.

Pored toga što su makrofagi glavni izvor penastih ćelija, oni učestvuju u progresiji aterosklerotske lezije produkcijom citokina, ali i metaloproteinaza.



Slika 25. Transverzalni presek krvnog suda u kome je došlo do značajnog suženja lumena usled nastajanja heterogene aterosklerotske lezije. Fibrozna kapa je debela, a prohodnost krvnog suda smanjena. Iz medije započinje proces neoangiogeneze i uspostavljanja mikrovaskularizacije plaka.

Metaloproteinaze (MMP) nastaju u makrofazima i dokazano je da učestvuju u razgradnji fibrozne kape. Pored toga, **MMP mogu odsecati membranske molekule** na površini aktivisanih ćelija, koje su **neophodne za odvijanje procesa apoptoze** – programirane ćelijske smrti (Slika 22), kao što su receptor za faktor nekroze tumora (TNF-RI) ili/i CD95 molekul (član familije receptora za faktor nekroze tumora). To može imati za posledicu **neadekvatnu indukciju programirane ćelijske smrti**, što je deo fiziološkog procesa uklanjanja aberantnih ćelija, a time se izbegava kaskada autoimunskih reakcija.

Naime, **apoptozom** se sprečava rasipanje endogeno nastalih skrivenih antigena, potencijalnih imunogena, što se nekrozom ćelije promoviše. Usled toga, ćelije prisutne

u plaku umiru nekrozom, što doprinosi stvaranju nekrotičnog jezgra (Slika 26.a,b), a zbog oslobađanja nekrotičnog sadržaja, inflamacija se održava^{4,5,6}.

Uloga kolagenolitičkih i elastolitičkih enzima pronađenih u tkivu aneurizmi bila je predmet brojnih studija. Enzimi za koje je elastin substrat delovanja uključuje serin proteaze, neutrofil elastaze i matriks metaloproteinaze (MMPs) kojima pripadaju 92-kD gelatinaze (MMP-9), 72-kD gelatinaza (MMP-2), matrilizin (MMP-8) i makrofag metaloelastaza (MMP-12). MMPs enzimi su familija endopeptidaza koji degradiraju sve komponente ekstracelularnog matriksa. Kristalna struktura enzima MMP-2 je skoro rasvetljena. Obe gelatinaze (MMP-2 i MMP-9) efikasno razgrađuju elastin i kolagen tip IV a MMP-2 ima veoma izraženu kolagenolitičku aktivnost. Povećana aktivnost neutrofilne elastaze i drugih proteolitičkih enzima posledica su aktivnosti glatkih mišićnih ćelija i cirkulišućih neutrofila kod pacijenata sa aneurizmama abdominalne aorte.

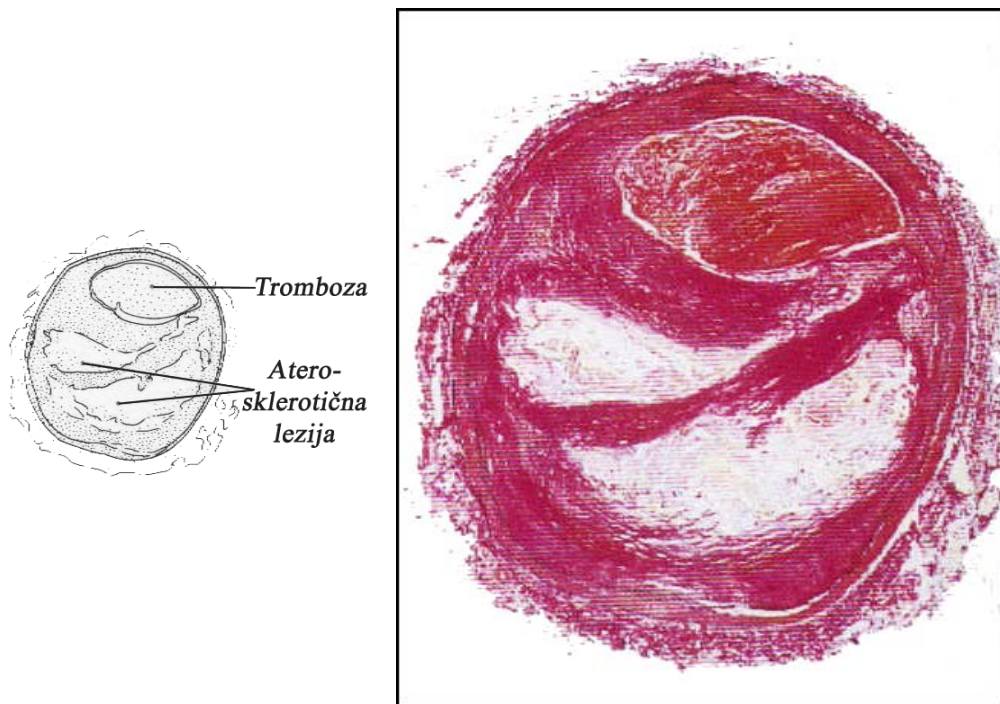
Nekoliko MMPs enzima je identifikovano u tkivu AAA i to MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-12. Matthew⁷ i Newman⁸ su koristeći želatin zimografiju demonstrirali povećanu aktivnost 92-kD gelatinaze u tkivu AAA posebno u poređenju sa normalnim arterijskim zidom. McMillan i Pearce⁹ su identifikovali porast nivoa MMP-9 u cirkulaciji pacijenata sa AAA u poređenju sa aortoiliakalnom okluzivnom bolešću čineći da postane potencijalno važan serumski marker u detekciji aneurizmatске bolesti. Veruje se da su makrofage primarni izvor MMP-9 u pacijenata sa AAA, ali isto tako postoje dokazi koji ukazuju na glatke mišićne ćelije kao mogući izvor ovog enzima. U novijim studijama, MMP-2 se prikazuje kao veoma važan enzim u delovanju na matriks. MMP-2 je jedina proteinaza sposobna da degradira ne samo elastin već i fibrozni kolagen. Pokazalo se da je degradacija fibroznog kolagena u adventiciji od ključnog značaja za nastanak aneurizme abdominalne aorte. Primarni izvor MMP-2 su iste mezenhimalne ćelije koje proizvode elastin i kolagen u mediji, glatke mišićne ćelije, u adventiciji i fibroblasti. Utvrđeno je da su MMP-2 proteinaze potentnije od MMP-9.

Kao i druge MMP, MMP-2 se primarno javlja kao proenzim od 72 kD koji se potom cepa u aktivni oblik od 62 kD. On se aktivira na ćelijskoj površini putem skoro otkrivene grupe enzima vezanih za membranu tj. membranskog tipa (MT) MMPs. Pet različitih MT-MMPs je identifikovano od MT1-MMP do MT5-MMP. Svi su otkriveni homologim skriningom cDNK. Oni čine posebne MT subklase MMP grupe i luče se u rastvorljivoj formi. MT1-MMP izgleda da igra ključnu ulogu u aktivaciji MMP-2 u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Tkivni inhibitor metaloproteinaze (TIMP-2) je pronađen kao kofaktor potreban za aktivaciju MT1-MMP.

Matriks metaloproteinaza 12 je još poznata kao makrofag elastaza, 54 kD proenzim koji se konvertuje u aktivni 22 kD enzim sposoban da degradira elastin. Najveća koncentracija je utvrđena u tunici mediji. MMP-1 proteinaza takođe je prisutna u većim koncentracijama unutar tkiva AAA kao i kod aterosklerotskog oboljenja aorte.

Ćelijski izvor MMP-1 još nije sa sigurnošću utvrđen. Veruje se da mezenhimalne ćelje znatno više proizvode MMP-1 nego makrofage i da je njihova ekspresija regulisana inflamatornim medijatorima. Veruje se da trombocitni faktor rasta i interleukin-1 β regulišu ekspresiju MMP u kulturi aortnih glatkomišićnih ćelija. Takođe su metaboliti

arahidonske kiseline i prostaglandin E2 važni regulatori delovanja MMPs proteaza. Sa druge strane, derivati tetraciklina neovisno od njihovog antibiotskog delovanja imaju mogućnost inhibicije MMPs. Inhibicija se dešava primenom relativno niskih doza, oko 40 mg dnevno. Dokazano je znatno sniženje MMP-2 i MMP-9 prilikom davanja Doxycyclina kod pacova.



Slika 26. Transverzalni presek krvnog suda u kome je došlo do potpune obliteracije lumena, usled pucanja fibrozne kape, delimičnog oslobađanja sadržaja plaka u lumen i tromboze na mestu rupture.

Dobro je poznato da su inflamatorne ćelije sposobne da proizvedu proteolitičke enzime uz odovarajuće citokine koji moduliraju ekspresiju proteina ECM i proteolitičkih enzima. Inflamacija je značajna karakteristika aneurizmi abdominalne aorte i aortne okluzivne bolesti, što je praćeno infiltracijom makrofaga i limfocita razbacanih kroz intimu, mediju, plak kao i adventiciju. Ova dva stanja se razlikuju pre svega po tome što su kod aortne okluzivne bolesti limfociti predominantno T limfociti, dok su u tkivu zida aneurizme abdominalne aorte prisutni T i B limfociti. Adventicija i spoljni deo tunike medije zahvaćeni su inflamacijom samo kod uznapredovale ateroskleroze dok je prisutna u svim slojevima zida aorte kod AAA. Imunski odgovor započinje prepoznavanjem stranog peptida, a u slučaju autoimunosti i sopstvenog imunogenog peptida. T limfociti prepoznaju komplekse antigenski peptidi/molekuli I ili II klase MHC ispoljene na površini antigen-prezentujućih ćelija (Slika 23). Takva interakcija može da dovede do produktivnog, tj. antigen-specifičnog imunskog odgovora - samo uz sadejstvo kostimu-

latorskih signalnih molekula. Umesto kostimulatornih i akcesornih molekula, na intersticijskim ćelijama zapaljenje indukuje ekspresiju adhezivnog molekula ICAM-1, ICAM-3 i dr.⁶ Ova pojava je prolazna i reverzibilna, te se sa prestankom uticaja proinflammatoryh citokina, u potpunosti gubi. U slučaju da se inflamacija održava ili propagira, ekspresija ICAM-1 se sve više intenzivira i vodi ka ireverzibilnom oštećenju, te hronicitetu bolesti. Time se stvaraju uslovi da citotoksični limfociti-T (CTL) direktno oštećuju tkivo autoimunskim mehanizmima^{6,10}.

LITERATURA

1. Coito AJ, Korom S, Van de Water L, Kupiec-Weglinski JW: Distinct fibronectin splicing variants-potential targets for therapeutic immunomodulation in organ allograft recipients. XVI International Congress of the Transplantation Society, Barcelona, August 25-30, (Abstract) pp 114,1996.
2. Petty HR and Todd RF: Integrins as promiscuous signal transductin devices. *Immunol Today* 17: 209-214,1996.
3. Spector WG: The macrophage and their derivatives. In: Weissmann G, Samuelsson B and Paoletti R (Eds). *Advances in Inflammation Research* (Vol I), Raven Press, New York, pp 113-117,1978.
4. Kornbluth RS and Edgington TS: Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: Induction of TNF- α -mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J Immunol* 137: 2585-2591,1986.
5. Henke A, Mohr C, Sprenger H, Graebner C, Stelzner A, Nain M and Gerns D: Cocksackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 148: 2270-2277,1992.
6. Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PE, St John T, Staunton DE: A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-1. *Immunity* 3: 638-640,1995.
7. Matthew Longo G, Wanfen Xiong, Timothy C. Greiner, Yong Zhao, Nicola Fiotti, and B. Timothy Baxter. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* September 1; 110 (5): 625-632, 2002.
8. Newman KM, Y Ogata, AM Malon, E Irizarry, RH Gandhi, H Nagase and MD Tilson Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Vol 14, 1315-1320.
9. McMillan WD, Pearce WH, Yao JST. Inflammation and cytokine signaling in aneurysms. *Cardiovasc Surg*, 5:435-438, 1997
10. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167-180, 2001.

7. ANGIONEOGENEZA

Angioneogeneza predstavlja nastanak, razvoj i rast krvnih sudova nastalih kao odgovor na angiogenetske faktore iz:

- ishemičnih tkiva,
- tkiva koja se naglo razvijaju ili
- onih koji pokazuju veliku metaboličku aktivnost¹.

Kao jedan od osnovnih bioloških procesa angioneogeneza može biti

- fiziološka i
- patološka.

U fiziološkim uslovima ona se može vezati kako za reprodukciju tako i za razvoj i reparaciju. Nasuprot ovome, angioneogeneza ima centralno mesto u etiologiji i patogenezi mnogih neoplastičnih i neneoplastičnih bolesti². U oba slučaja razvijenost vaskularne mreže tkiva određena je potrebama tog tkiva.

Inicijalni događaj u patogenezi stvaranja novih krvnih sudova, kako su Amore i Thompson (1983) izložili predstavlja „**aktivacija**” **endotela matičnih ćelija** praćena prekidom bazalne membrane³.

Novi krvni sudovi pod uticajem angiogenih faktora niču iz postojećih malih venula i kapilara. Prvo dolazi do **pucanja bazalne membrane** i njenog odvajanja od endotelnih ćelija. **Endotelne ćelije** se dalje reprodukuju i migriraju u intersticijalni prostor, usmeravajući se u vidu vrpce (Slika 25) van krvnih sudova **u pravcu izvora angiogenih faktora**. Vrpce ubrzo počnu da se razdvajaju i grupišu stvarajući kanaliće koji će vremenom spajanjem sa drugim kanalićima stvoriti kapilarnu mrežu. Kad kroz njih poteče krv, zidovi novonastalih krvnih sudova počinju **diferencijaciju glatkih mišićnih ćelija**.

Kontroverzna ispitivanja koja su Sholly i sar. (1984.) vršili koristeći model inflamacijom indukovane neovaskularizacije na kornei pacova pokazali su da nastajanje vaskularnog pupoljka ne zahteva proliferaciju endotela³. Nasuprot ovim, „*in vivo*” vršena ispitivanja u inflamiranim tkivima pokazala su da angiogeneza koja nastaje kao odgovor na eksperimentalnu vaskularnu opstrukciju uključuje proliferaciju ne samo

endotelnih već i ćelija glatkih mišićnih ćelija³. Značaj ovih ćelija je istaknut jer se obnavljanje vrši na nivou mikrocirkulacije za vreme procenjeno na tzv. „hiljadu dana”, koliko je potrebno da se bilion i više ćelija, koje pokrivaju skoro 1000 m² površine u krvnim sudovima odraslog čoveka teškog 70 kg, obnove³. Ako dođe i do malog procenta proliferacije endotelnih ćelija kao odgovor na arterijsku okluziju ili kao posledica dejstva egzogenih faktora rasta, taj procenat je sasvim dovoljan da obezbedi osnovu za formiranje novog krvnog suda.

U proliferaciji ne igraju značajnu ulogu samo **endotelni faktori rasta**, već su tu i **angiogeni inhibitorni molekuli**⁴. Ovi endogeni inhibitori su članovi velike grupe supresora koji normalno štite vaskularni endotel od mitogenih stimulusa. Pored pomenutih faktora, endotelnu proliferaciju mogu regulisati i periciti izlučivši potentne mitogene u ekstracelularni matriks. Ovaj matriks je nastao promenom oblika endotelnih ćelija i može da redukuje senzitivnost endotelnih ćelija prema faktorima rasta.

Faktori rasta endotelnih ćelija, za koje se utvrdilo do sada da ih ima 112, pripadaju grupi malih peptida. Trenutno se raspolaže najvećim brojem podataka za dva faktora:

- vaskularni faktor rasta endotelnih ćelija (VEFG) i
- faktor rasta fibroblasta (FGF)⁴.

Oba su izolovana iz tumora ili iz tkiva koja nisu adekvatno snabdevena krvlju, a samim tim ni hranljivim materijama i kiseonikom.

Faktor rasta fibroblasta FGF je glavni medijator angiogeneze⁵. Po hemijskom sastavu on je monomerni polipeptid, a njegova dva najrasprostranjenija tipa su kiseli FGF (aFGF) i bazni FGF (bFGF). Obe vrste su vrlo efikasne u indukciji proliferacije endotelnih ćelija i ćelija glatkih mišića „*in vitro*” i angiogeneze „*in vivo*”⁶.

Bazni faktor rasta fibroblasta bFGF je izolovan iz srca pri istraživanju adultnih miocita u „*in vitro*” uslovima kada je sugerisana njihova prvobitna uloga u koronarnoj vaskularnoj homeostazi. Kasnije je utvrđeno da je ovaj angiogeni faktor u stvari široko rasprostranjen i identifikovan u mnogim tkivima neuroendotelnih i mezodermalnih organa. Njegova uloga je u stimulaciji proliferacije 3 vrste vaskularnih ćelija:

- endotelnih ćelija,
- ćelija glatkih mišića i
- fibroblasta.

On je i hemotaktična supstanca za endotelne ćelije „*in vitro*” koja indukuje stvaranje novog krvnog suda⁷. Bazni faktor rasta fibroblasta bFGF se sekvstrira iz ćelije organa i nema direktan pristup target ćelijama. Treba napomenuti i funkciju ugradnje ovog faktora u bazalnu membranu i njegovo oslobađanje kad specifični enzimi razgrade ovu strukturu⁵. Ovako oslobođeni faktor može biti sposoban da stimuliše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koja kasnije može dovesti ili do reparacije intime ili do još veće njene lezije, kao što je **neointimalna hiperplazija**⁸.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) je potentni mitogen za endotelne vaskularne ćelije kako malih tako i velikih krvnih sudova, ali ne izaziva rast epitelnih ćelija sočiva, keratocita, endotelnih ćelija kore i ćelija adrenalnog korteksa. Po

hemijском sastavu ovaj faktor je 45-kD heparin vezujući dimerički glikoprotein. Sastavljen je od dve indentične subjediniце sa јединstvenom NH2 terminalnom aminokiselinskom sekvencom⁹. Heparin vezujući vaskularni endotelni faktor je identifikovan iz folikulo-stelatnih ćelija, ali i kao faktor koga luči tumor, a mogu ga sekretovati i intaktne ćelije⁹.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i bazni faktor rasta fibroblasta bFGF pokreću proliferaciju vaskularnih ćelija, kao delovi **kaskadne reakcija**. Ova kaskada uključuje interakciju ovih, potentnih mitogena sa drugim faktorima, receptori- ma i putevima njihove signalne transdukcije³.

Između ova dva najpotentnija mitogena postoji jak sinergizam u stvaranju novih i rastu već postojećih krvnih sudova, bilo u fiziološkim ili patološkim uslovima³. Primarne funkcije ova dva faktora su pokretanje proliferacije fibrocita i glatkih mišićnih ćelija, kao i njihovo sadejstvo u proliferaciji endotelних ćelija.

Iz **kliničke perspektive** angiogeneza ima poseban značaj kod:

- Neoplastičnih i
- ne-neoplastičnih bolesti

Opšti termin „angiogenetska bolest” upućuje na patološka stanja u kojima se јavlja abnormalan razvoj mikrocirkulacije, u smislu prekomerne ili deficitarne angiogeneze⁴.

Tumori mogu mesecima i godinama da perzistiraju *in situ* bez neovaskularizacije. Klinički posmatrano, oni postanu simptomatski i klinički prepoznatljivi tek posle neovaskularizacije (osim adrenalnog adenoma i melanoma). U pre-angiogeneznoskoј fazi, tumor je retko veći od 2-3 mm³ i tada može imati milion i više ćelija. Ovakve asimptomatske lezije su kod nekih vrsta tumora vidljive na koži, sluzokoži ili nekom organu, ali su najčešće klinički neprepoznatljive. Ђelije tumora bez neovaskularizacije ili ćelije uspavanih mikrometastaza, mogu da se replikuju malom brzinom. Ako dođe do proliferacije novih krvnih sudova u njima, oni mogu da izazovu dalji rast i metastaziranje. Većina neoplazmi tek tada postane prepoznatljiva. Kvantitetom angiogeneze, u situacijama kada je dijagnostikovao tumor, može se predvideti rizik metastaze i recidiva. Veliki broj mikrosudova predviđa metastaze u zavisnosti od njegove veličine ili postojanja njegovih drugih markera⁴.

U neneoplazmatским bolestima angiogeneza ima sasvim drugačiji značaj.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i bazni faktor rasta fibroblasta bFGF mogu izazvati prekomernu ili deficitarnu angiogenezu u nekim drugim sistemima i tkivima i time dovesti do pojave novih bolesti ili pogoršanja starih⁴.

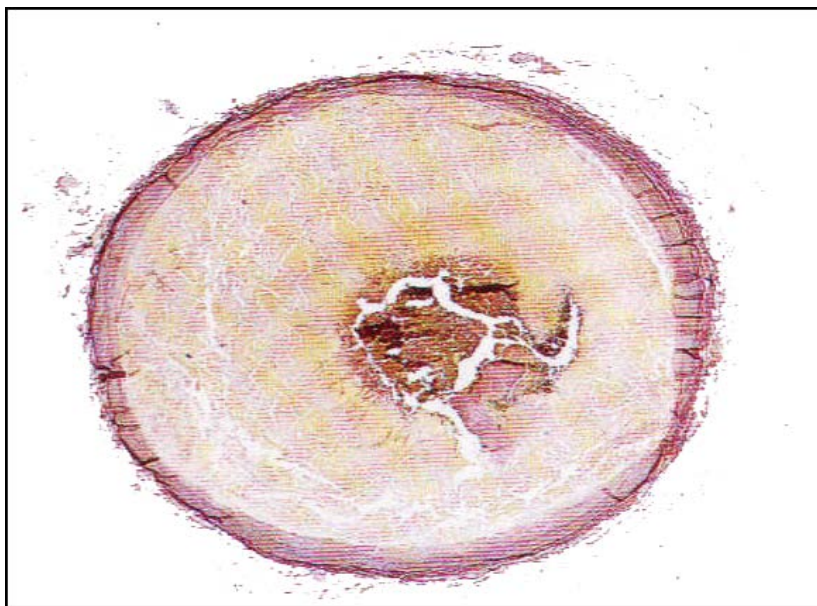
Kod reumatoidnog artritisa povećanje produkcije angiogenih faktora iz makrofaga, imunskih ćelija ili inflamiranih ćelija može posredovati u urastanju vaskularnog panusa u zglob.

Kod pacijenata sa psorijazom, hipervaskularne kožne lezije imaju prekomernuo lučenje angiogenih peptida i to IL-8 i smanjeno lučenje trombospondina-1.

Kod gastričnih ulkusa nivo bFGF je 23 puta manji nego u normalnoj mukozi. Zato oralna upotreba aFGF indikuje angiogenezu u ulceroznom slivu i ubrzava zarastanje ulceracije kod eksperimentalnih životinja.

Bitni momenti u reprodukciji, kao što su ovulacija i reparacija u menstrualnom ciklusu u uterusu, zavise od angiogeneze. Endogeni angiogeni mogu da stimulišu, ili inhibiraju neke nepravilnosti u ženskoj reprodukciji kao što su produženo menstrualno krvarenje i sterilitet⁴.

Arterijska okluzivna bolest, kao širi termin uglavnom obuhvata aterosklerozu i još neka, ređa oboljenja, koja dovode do stenoze i okluzije perifernih, koronarnih, renalni, cerebralnih i drugih arterija. Kada velika vaskularna stabla postanu okludirana (Slike 26-27), njihove sudovne grančice preuzmu ulogu distributera. One tada ne naslanjaju samo da snabdevaju krvlju kapilarno korito već i preusmeravaju krv oko obolelog segmenta. Ovi krvni sudovi nisu u mogućnosti da snabdeju tkivo dovoljnom količinom krvi, što dovodi do hipoksije¹⁰.



Slika 27. Transverzalni presek krvnog suda u kome je došlo do rupture aterosklerotskog plaka, do aktivacije trombocita i formiranja tromba. Lumen krvnog suda je potpuno obliteriran.

Lokalna hipoksija uzrokovana vaskularnom ishemijom reguliše **oslobađanje endogenih faktora rasta**, koji utiču na stvaranje novih krvnih sudova, **kolaterala** koje će premostiti prepreku.

Tako se došlo na ideju da **vaskularni mitogeni** mogu imati terapijski potencijal kod bolesnika sa koronarnom i perifernom arterijskom okluzivnom bolešću^{10,11}.

Nedavna ispitivanja su istakla mogućnost korišćenja **rekombinantnih faktora rasta** da ubrzaju i uvećaju kolateralno arterijsko širenje u eksperimentalnim modelima miokardijalne i ishemije na donjim ekstremitetima⁴. Ovaj novi tretman ishemije nazvan je "**angiogeneza indukovana lekovima**". Angiogeni faktori prvi put korišćeni za ovu svrhu bili su članovi familije FGF¹².

Baffour i saradnici su prvi 1992. godine upotrebili **bazni faktor rasta fibroblasta** bFGF u dnevnoj dozi od 1-2 mikrograma na zečevima sa akutnom perifernom ishemijom¹¹. Na kraju tretmana posle 14 dana, angiografskim merenjem kapilarne gustine, pokazano je veliko povećanje broja kolateralnih krvnih sudova u donjim ekstremitetima.

Terjung. je 1995. godine koristio model ishemije ekstremiteta pacova koja je postignuta ligiranjem arterije femoralis. Životinje je podelio u grupe i prvu tretirao fiziološkim rastvortom, drugu heparinoma, treću grupu sa **baznim faktorom rasta fibroblasta** bFGF, u dnevnoj dozi od 1 mikrogram, tokom 14 dana. Angiografijom je dokazao da su životinje u grupi gde je korišćen bFGF imale značajno povećanje protoka u odnosu na ostale. Tako je bFGF postao dobar kandidat u terapiji perifene vaskularne bolesti ali i potencijalni lek za bolesti koronarnih arterija¹¹.

Koronarna revaskularizacija predstavlja veliki klinički problem zbog velike stope morbiditeta i mortaliteta¹⁰. Ovo je poslužilo kao podsticaj da se pribegne daljim istraživanjima na kardijalnim eksperimentalnim modelima, da bi se otkrilo dejstvo ubrizganog bFGF-na protok krvi kroz srce. Studija Ungera i saradnika¹⁰ je vršena na eksperimentalnom modelu miokardijalnog infarkta izazvanog arteficialnim stvaranjem tromba na levoj koronarnoj arteriji. **Bazni faktor rasta fibroblasta** bFGF, na ovom modelu, doveo je do smanjenja veličine infarkta, povećanja arterijske i kapilarne mreže blizu infarktne zone i do oporavka miokardijalne funkcije.

Simons i saradnici su 1994. godine koristili kardijalni model ishemije izazvane korišćenjem vazokonstriktornih sredstava. U periadventicijalni prostor u i blizinu ishemične zone je zatim ubrizgavan **bazni faktor rasta fibroblasta** bFGF. Ovim istraživanjem došlo se do zaključka da su životinje tretirane sa bFGF imale manju površinu infarkcije i povećan protok kroz koronarne arterije¹⁰.

Preklinička ispitivanja **baznog faktora rasta fibroblasta** bFGF za farmakološko stvaranje kolaterala daju velike nade da se otkriju novi lekovi za perifernu vaskularnu bolest i ishemičnu bolest srca i mozga. Povećanje perfuzije u ishemičnom tkivu zbog korišćenja bFGF tretmana utiče na smanjenje progresije bolesti, a samim tim i smanjenje tegoba¹⁰.

Nasuprot bFGF, koji je poznat kao mitogen za ćelije glatkih mišića, fibroblaste i endotelne ćelije, mitogena aktivnost **vaskularnog endotelnog faktora rasta** VEGF je ograničena na endotelne ćelije. Radovi Takeshite i saradnika, pokazali su dobre rezultate korišćenja VEGF u eksperimentalnim modelima cirkulatorne insuficijencije⁹. U toku su ispitivanja koja će razjasniti u kom stepenu ovaj faktor može biti pogodan za lečenje pacijenata sa okluzivnom bolešću arterija.

LITERATURA

1. Folkman J: Clinical applications of research on angiogenesis. Seminars in medicine of the Beth Israel hospital, Boston Vol 1333, No 26, 1995.

2. Guyton AC: Medicinska fiziologija. Medicinska knjiga, Beograd, 1996.
3. Haimovici H: Vascular surgery. Appleton-Centwy-Crofts, Connecticut 1984.
4. Isner J M: Vascular endothelial growth factor in angiogenesis. Vasc MED Rev 6:311-322, 1995.
5. Lazarous D F et al.: Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. Circulation 91:145-153, 1995.
6. Leung DW et al.: Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. Science Vol. 246, 1992.
7. Lindner V et al.: Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. Circulation Research 68:106-113, 1991.
8. Polverini PJ: Orchestration by Cells, Soluble Mediators and Matrix Molecules. IBCS 2nd Conference on Therapeutic Implications and Mechanisms of Angiogenesis, 1996.
9. Takeshita S et al. Therapeutic angiogenesis. J Clin Invest 93:662-670, 1993.
10. Unger EF et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. Am J Physiol 266:1588-1595, 1994.
11. Unger EF: Pharmacological collateralisation with Bfgf. Scios Nova, 1995.
12. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. Annals of the New York Academy of Sciences 947:167-180, 2001.

8. TERAPIJSKI ASPEKTI IMUNOMODULACIJE U ATEROGENEZI I GENSKA TERAPIJA

Prevenција aterogeneze ima veći značaj nego lečenje i rehabilitacija njenih posledica. Multidisciplinarni programi prevencije trebalo bi da budu strateški prioritet u zdravstvenom planiranju. Treba razlikovati primarnu i sekundarnu prevenciju.

- Primarna prevencija ateroskleroze podrazumeva identifikaciju, otklanjanje i lečenje faktora rizika u opštoj populaciji pre pojave simptoma.
- Sekundarna prevencija ateroskleroze otklanja (ili smanjuje) naknadni rizik kod bolesnika koji su već imali, ili imaju simptome ishemije.

Ateroskleroza se može definisati kao ekstra i intracelularno nagomilavanje lipida u glatkim mišićnim ćelijama i makrofazoma arterijskog zida sa aktiviranim lokalnim endotelom, makrofazima i limfocitima uz ostale znake hronične inflamacije. **Hronična iritacija** koja pokreće aterogenezu može biti delovanje prokoagulacionih, metaboličkih, fizičkih i infektivnih agenasa.

Prevenција i terapija ateroskleroze podrazumeva:

- maksimalnu eliminaciju (ili regulaciju) faktora rizika, uz
- regulaciju nivoa lipoproteina i holesterola (statini) i
- antitrombocitnu terapiju.

Tradicionalni faktori rizika, kao što je dislipidemija, pušenje, hipertenzija i šećerna bolest, očigledno ne pokrivaju sve aspekte aterogeneze, jer se njihovim isključenjem ona ne zaustavlja potpuno. Zato imunološki i infektivni mehanizmi skreću pažnju na sebe.

Ako prihvatimo realnost imunoloških aspekata aterogeneze **imunomodulacija** bi mogla biti deo novog profilaktičko-terapijskog koncepta.

Promene u imunološkom statusu (imunoglobulini, imunski kompleksi, komplement itd.) deo su **patogeneze ateroskleroze**, a naročito **vaskulitisa**, često u vezi sa reumatskim bolestima, bilo da su u pitanju

- imunološki vaskulitisi sa humoralnom patogenezom (poliarteritis nodosa, hipersenzitivni angitis, Wegener-ova granulomatoza, Henoch-Schonleinova purpura, Takayasu bolest, arteritis gigantskih ćelija); ili
- vaskulitisi sa celularnom patogenezom (Wegenerova bolest i arteritis gigantskih ćelija)¹.

Klinički značajni vaskulitisi velikih arterija su: Takayasu arteritis, temporalni arteritis, Morbus Kawasaki i poliarteritis nodosa. **Takayasu arteritis** je hronična, sistem-ska, nespecifična, zapaljenjska arteriopatija koja zahvata aortu i velike grane aortnog luka dovodeći do njihove stenoze ili okluzije. Radi se o nespecifičnom aortoarteritisu (*Nonspecific Aortoarteritis*).

Antigeni povezani sa ovim vaskulitisima su streptokokni, virusni, lekovi, autoantigeni itd². Nekrotizirajući angitisi (periarteritis nodosa, Wegenerova granulomatoza, hipersenzitivni angitis...) pokazuju odlike imunokompleksnih bolesti³, slično kao i ateroskleroza. Prisustvo imunskih kompleksa u serumu i potrošnja komponenti komplementa su dokazani kod koronarne ateroskleroze, infarkta miokarda, cerebralne ateroskleroze i trombangitis obliteransa⁴.

Imunološke abnormalnosti se predlažu kao dijagnostički kriterijum za **Raynaudovu bolest**⁵⁻⁷.

Kod segmentne, multifokalne, inflamatorne bolesti malih i srednjih arterija i vena tj. **trombangitis obliteransu** skoro svi bolesnici su imali porast nivoa komplementnog faktora C4 u serumu, cirkulirajuće imunske komplekse i antitela na „vlastiti” arterijski elastin⁶. Skoro svi bolesnici su imali prisutan histokompatibilni antigen HLA-B 12⁵⁻⁷.

Imunomodulatorna terapija arteritisa

U aktivnoj fazi progresije arteritisa, **anemija** i **povišena sedimentacija eritrocita** su klasični znaci, uz povećanje nivoa imunoglobulina G, antiendotelijalnih antitela i serumskog trombomodulina kao indikatora oštećenja endotelnih ćelija⁸⁻¹⁸.

Osnovni princip lečenja nespecifičnog aorto-arteritisa je:

- medikamentozna kontrola zapaljenjskog sindroma u aktivnoj fazi i
- najneophodnije hirurške procedure u okluzivnoj fazi bolesti.

Medikamentozna terapija podrazumeva steroide i druge imunosupresive.

Kortikosteroidi: Primena kortikosteroida pokazala se korisnom, naročito u pacijenata sa arteritisom i povišenom sedimentacijom eritrocita. Početna doza **Prednizon**-a iznosi 1-1,5 mg/kg dnevno. Do normalizacije indikatora zapaljenja dolazi obično posle tri nedelje i tada se postepeno smanjuje količina leka. Doza održavanja iznosi 5-15 mg dnevno⁹⁻¹⁸.

Imunosupresivna terapija: Daje se **Cyclophosphamid** u dozi od 2 mg/kg/dan uz kontrolu krvne slike (granična vrednost broja leukocita je 3000/μL). U okluzivnoj fazi bolesti nepovoljan prognostički značaj imaju indikatori zapaljenja. Terapijsku efikasnost u takvim slučajevima pokazale su male nedeljne doze Metotreksata u kombinaciji sa kortikosteroidima¹²⁻¹⁵.

Kombinovana kortikosteroidna i imunosupresivna terapija: **Prednizon** može da se kombinuje sa imunosupresivnim lekovima (**Cyclophosphamid**, **Azathioprin**,

Methotrexat). Kombinovanom terapijom mogu da se postignu bolji rezultati. Male doze Methotrexata smanjuju potrebne terapijske doze kortikosteroida. U cilju postizanja zaštitnog efekta na koštano tkivo uvode se u terapiju preparati kalcijuma, D vitamin itd. Redukciju kortikosteroidne terapije uslovljava aktivnost bolesti⁸⁻¹⁴.

Imunomodulatorna terapija ateroskleroze

- **Urođeni imunitet**, je nosilac imunološki nespecifičnog odgovora na infekciju. Jedna od osnovnih komponenti urođenog imunskog odgovora su makrofazi koji su neophodni za inicijaciju aterogeneze.
- **Stečeni imunitet**, se zasniva na specifičnom prepoznavanju antigena od strane limfocita koji su pokretači celularnog (T limfociti) i humoralnog (B limfociti) imuniteta. Limfociti su uobičajeno prisutni u aterosklerotičnom plaku. Stečeni imunitet se kontroliše sekrecijom citokina. Citokini koje produkuju T ćelije kontrolišu aktivaciju makrofaga, proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, produkciju kolagena, proteolizu, aktivaciju mast ćelija i druge aspekte inflamacije u zidu arterije.

Obzirom da je stečeni imunitet indukovao specifičnim molekularnim signalima, verovatno je kontrola stečenog imuniteta dobar primer za moguće pravce inhibicije inflamacije i sprečavanje aterogeneze¹⁹⁻²¹. Mathews i saradnici²¹ su nagovestili primenu **imunomodulatora**, imunosupresora, antiinflamatornih lekova i restrikcije proteina u dijeti kao zaštitu od aterosklerotičnih bolesti^{22,23}. Bailey i Butler¹⁹ su primenjivali **anti-inflamatorna sredstva** (Fenil-butazon, Amidopirin, Kortizon) i **antihistaminik** Hlorfeniramin u prevenciji ateroskleroze kod već postojeće hiperlipemije. Protektivno dejstvo ovih lekova su objasnili sprečavanjem inflamatornih lezija krvnih sudova i regulacijom permeabilnosti arterijskog endotela ovim agensima. Schiantarellia i sar.²⁴ opisuju antiarteriosklerotično dejstvo **sulfomukopolisaharidnog kompleksa** izolovanog iz teletskog pankreasa. Ovaj sulfomukopolisaharidni kompleks ima snažna **antiinflamatorna i antikomplementna dejstva**, pa se njegovo antiarteriosklerotično delovanje shvata u sklopu inflamatorne i imunološke vizije aterogeneze²⁵. Ima dokaza da se aterogeneza može modulisati.

Imunomodulacija aterogeneze podrazumeva

- imunosupresivnu terapiju,
- aktivnu imunizaciju,
- indukciju tolerancije,
- intravensko davanje imunoglobulina i
- manipulaciju u okviru sistema citokina, genskom terapijom^{20,25-26}.

Imunomodulacija proaterogenih procesa može biti :

- Antigen-specifična imunomodulacija
- Antigen-nespecifična imunomodulacija

Antigen-specifična imunomodulacija znači da je proaterosklerotični antigen primenjen tako se postigne **tolerancija**. Primer je neonatalna inunizacija sa oksidisanim lipoproteinom niske gustine (oxLDL) čime se redukuje razvoj ateroskleroze²⁶.

Stečeni imunitet u svom pro-aterosklerotičnom delovanju zavisi od specifičnih antigena, od koji je najviše dokaznog materijala sakupljeno za oksidisani LDL (oxLDL)^{20,25,27-49} i stres proteine ili izvesne mikrobe^{20,49-54}. Ako je oksidisani LDL važan autoantigen, moglo bi se očekivati da **imunizacija oksidisanim LDL** dovede do zaustavljanja aterogeneze, što je dokazano u hiperholesterolemičkih zečeva^{20,46-49}.

Imunizacija sa oksidisanim LDL zaustavlja aterogenezu⁵⁵⁻⁵⁷. Što je veći titar anti oxLDL imunoglobulina protekcija od ateroskleroze je bolja. **Imunizacija na Heat shock proteins** (HSP), koji nastaju tokom ćelijskog stresa i otpuštaju se pri leziji ćelije⁵⁸ potencira aktivnost humoralne i celularne imunosti. Ovi arhaični proteini pokreću inflamatorne procese, među kojima je i aterogeneza. U imunski odgovor usmeren prema HSP uključeni su kako B limfociti koji proizvode anti-HSP imunoglobuline tako i CD4 i CD8 T limfociti kao nosioci celularnog imunskog odgovora na HSP⁵⁹.

U toku su radovi na prilagođavanju ovih metoda za kliničku - humanu upotrebu.

U svim eksperimentalnim i kliničkim studijama protekcija aterogeneze manifestovala se porastom titra antitela na oksidisani LDL i naglašenim celularnim odgovorom na oksidisani LDL. Zato se pojavila ideja da bi **transfer limfocita specifičnih za oksidovani LDL (antigen-specific lymphocyte)**, kao ćelija nosilaca stečenog imuniteta, moglo da prevenira aterogenezu^{20,46-49}. Eksperimenti su u toku.

Antigen-nespecifična imunomodulacija podrazumeva opštu promenu nivoa imunološkog reagovanja. Prednost ovog pristupa je što specifični antigen ili antigenski epitop ne mora da bude identifikovan i sintetizovan. Imunomodulatorni protokoli koji su uspešno primenjeni za lečenje ateroskleroze su

- Davanje **velikih doza poliklonskih imunoglobulina intravenski** (IVIg), čime se inhibira celularni odgovor i razvoj aterogeneze^{60,61,68}.
- **Injekcija citokina** sa inhibitornim delovanjem, kao što je IL-10, redukuje aterogenezu⁶⁰.
- **Imunosupresivni lekovi, Cyclosporin A**, inhibira proliferativni odgovor intime na vaskularnu leziju⁶²⁻⁶⁴. Analog ciklosporina **Rapamycin** redukuje hiperplaziju neointime nakon angioplastike⁶³. Imunosupresivni lekovi ne deluju samo na imunokompetentne ćelije, već inhibiraju i proliferativni odgovor glatkih mišićnih ćelija na faktore rasta, što je naročito važno kad se razmišlja o zaustavljanju neointimalne hiperplazije^{26,62-67}.

Modulacija imunološke aktivnosti primenom **poliklonskih imunoglobulina** inhibira aterogenezu, sugerišući imunomodulaciju kao moguću terapijsku intervenciju u zaustavljanju ateroskleroze^{20,26}. Imunomodulacija u eksperimentalnom modelu (miš) nedvosmisleno redukuje aterogenezu primenom dva različita protokola sa **intravenskim davanjem polispecifičnog IgG**^{20,26}. Zaključak ovih ogleda je:

- Kratkoročna primena imunomodulatorne terapije inhibira aterogenezu.
- Rane lezije "*fatty streak*" ali i klasični fibrolipidni plak su senzitivni na imunomodulaciju^{26,69-72}. Problem je što ovi eksperimentalni modeli nisu primenjivi u humanoj prevenciji ateroskleroze.

Svi, različiti, uzročnici inflamacije arterijskog zida dovode do otpuštanja **proinflamatornih citokina** u cirkulaciju. Tako se indukuje akutna faza inflamatornog odgo-

vora, pa je akutna ishemija zato praćena visokim nivoom proinflammatoryh medijatora **IL-6, CRP i fibrinogena**, koji su toliko pouzdani da sluŹe za kliniĉku dijagnozu ishemije u razvoju (*developing infarction*). Bilo bi vaŹno identifikovati sve medijatore koji ućestvuju u procesu aktivacije vulnerabilnog aterosklerotičnog plaka, ĉime on postaje simptomatiĉan izazivajući infarkt srca, mozga itd. Time bi postalo terapijski moguće delovati na pojedinim nivoima ove aktivirajuće kaskade citokinske mreŹe^{20,73}.

Antiinflammatory efekat je deo uzgrednog delovanja nekih lekova koji se inaće koriste u prevenciji i lećenju ateroskleroze : **Aspirin**, kao antitrombocitni lek, lekovi koji sniŹavaju nivo lipida u krvi, (*Lipid lowering therapy*) **statini**, *angiotensin-converting enzyme (ACE inhibitori)* itd.

ACE inhibitori (*angiotensin-converting enzyme*) u mnogim kliniĉkim studijama daju neoćekivano dobre rezultate u prevenciji akutnih ishemiĉkih događaja. U velikoj studiji *Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) trial*, ACE inhibitoriska terapija dovodila je do skromnog redukovanja krvnog pritiska, ali uz veliku redukciju broja ishemiĉkih kardiovaskularnih događaja⁷³⁻⁷⁷. Izgleda da ACE inhibitori imaju efekat ne samo na krvni pritisak, već deluju antinflammatoryno.

Angiotenzin II aktivira proinflammatoryne procese u zidu krvnog suda. Angiotenzin II stimuliše produkciju **interleukina-6, monocitni hemotaktički protein-1 (MCP-1)** u ćelijama glatkih mišića arterije⁷⁸⁻⁸³. Angiotenzin II menja fibrinolitiĉki balans pojaćavajući PAI-1 ekspresiju, ĉija ekspresija je sliĉna dejstvu proinflammatoryh citokina⁸³.

Terapija ACE inhibitorima redukuje nivo citokina i smanjuje **aktivaciju NF- κ B** tokom eksperimentalno indukovane ateroskleroze⁸²⁻⁸³. ACE inhibitori usporavaju sintezu **reaktivnog kiseonika** u zidu krvnog suda⁸⁴.

Inhibicija angiotenzin II signala pomoću ACE inhibitora ili blokatora receptora za angiotenzin II moŹe da deluje kao **anti-inflammatoryna terapija**. Angiotenzin II povećaava nivo peptidnog medijatora **bradikina**. Bradikinin podiŹe intracelularni nivo sekundarnog glasnika cGMP. Porast nivoa cGMP izaziva vazodilataciju relaksirajuću glatke mišićne ćelije.

Azot monoksid NO usporava aterogenezu zbog svojih anti-inflammatoryh osobina koje su posledica uticaja NO na kontrolu transkripcije NF- κ B^{79,86,87}.

Dijeta sa povećanim unosom nezasićenih masti moŹe delovati anti-inflammatoryno menjajuću metabolizam prostanoida. Smanjujuću postprandijalnu hiperlipemiju redukuje se proinflammatoryno dejstvo endotela. Naime, unošenje i apsorpcija velikih koliĉina trigliceridom-bogatih lipoproteina aktivira inflammatorynu funkciju endotela⁸⁸.

Genska terapija aterogeneze

Imunogenetiĉke pojave koje su nađene združene sa aterosklerozom i/ili njenim faktorima rizika (hipertenzija, gojaznost, hiperholesterolemija, dijabetes mellitus) potvrđuju gledište o imunopatogenezi ateroskleroze, mada ostaje pitanje da li se radi o direktnoj vezi ili su to samo epifenomeni.

Pretpostavlja se da mnogi genetiĉki faktori i faktori spoljne sredine mogu imati aterogena dejstva putem ili posredstvom imunoloških mehanizama⁷.

Pojava ateroskleroze je povezana sa većom učestalošću

- određenih gena glavnog histokompatibilnog kompleksa (HLA),
- Gm-lokusa i
- alelima sistema krvnih grupa⁷.

Hiperholesterolemija signifikantno korelira sa pojedinim alelima HLA-B lokusa, naročito sa HLA-B 5 i HLA-B 35⁷. U osoba sa genotipom Gm a+x+b zabeležen je povećani mortalitet od koronarne bolesti. Region HLA-A je, izgleda, povezan sa predispozicijom za esencijalnu hipertenziju^{21, 25}.

Autoimunske hiperlipemije koje nastaju, bilo zbog blokiranja lipolitičkih enzima, bilo zbog blokiranja lipidnih akceptora su, takođe češće kod osoba sa određenim imunogenetičkim karakteristikama (HLA-B antigeni)²³.

Ako je aterogeneza pod uticajem genotipa onda se genskim intervencijama, verovatno, može modulisati reakcija organizma na unutrašnje i spoljašnje faktore rizika za aterosklerotičnu bolest (aterogenetski fenotip). Mogućnost primene genske terapije u vaskularnoj medicini zasniva se na činjenici da su krvni sudovi metabolički i enzimski izuzatno aktivni i da stvaranjem specifičnih molekula, regulišu svoju funkciju i strukturu (sposobnost remodelovanja).

Mogućnosti genske modifikacije u prevenciji i terapiji ateroskleroze su trenutno u fokusu mnogih istraživačkih timova. Osim utvrđivanja molekularnog i genskog nivoa patobiološkog procesa, eksperimentalnih istraživanja na animalnom modelu (transfer gena, oligonukleotida itd.), *ex vivo* genska transfer tehnika, danas se sve više terapijski koriste **rekombinantni citokini, faktori rasta i rekombinantna DNK** za izmenu, inhibiciju ili jačanje ekspresije pojedinih gena²⁴.

Cilj terapije genima je da se u somatske ćelije unese strana DNK i da se time *in vivo* koriguje urođena ili stečena bolest putem sinteze produkata gena koji nedostaju ili su defektni. Genska modifikacija endotelnih ćelija bi mogla da bude efikasna u lečenju mnogih vaskularnih bolesti (ateroskleroza, hiperplazija neointime, fibromuskularna displazija itd.)

Genske intervencije se mogu izvesti:

- direktno (*in vivo*) ili
- indirektno (*ex vivo*).

Direktni (*in vivo*) genski transfer obuhvata metode inhibicije ili pojačanja ekspresije ciljnih (*target*) gena posredstvom virusa, lipida, oligonukleotida i rekombinantnom DNK. Velike nade se polažu u studije vaskularnog remodelovanja i angioneogeneze **promenom fenotipske ekspresije faktora rasta** genskim transferom.

Genska terapija može dovesti do stabilizacije aktiviranog, komplikovanog plaka i inhibicije sekundarnog stvaranja prizidnog tromba. Smanjenje infiltracije makrofagima i inhibicija generisanja tzv. penušavih ćelija trebalo bi da smanji rizik od rupture vulnerable plaka i intraplakalne hemoragije sa disekcijom. Polazeći od činjenice da azot monoksid (NO) inhibira hemotaktičnu aktivnost monocita i njihovo nagomilavanje u intimi tokom aterogeneze, transfer gena koji je odgovoran za **transkripciju NO sinteze** mogao bi da dovede do stabilizacije plaka^{88,89}.

Hiperholesterolemija, kao poznat i dokazan akcelerator aterogeneze, bi se mogla korigovati genskim intervencijama i to: u smislu redukcije sinteze nepoželjnih oblika lipoproteina, kao i ubrzavanjem njihovog metabolizma. Direktni metod može da se primeni i kod porodične hiperholesterolemije. Geni koji regulišu metaboličke procese sinteze LDL mogli bi direktno da se dovedu u tkivo jetre. Osim toga, postoji mogućnost povećavanja aktivnosti receptora za LDL genskim inetrvcijama. Na taj način bi se mogli kontrolisati endogeni i egzogeni mehanizmi sinteze holesterola i lipoproteina niske i visoke gustine^{24-29, 37, 38}.

Virusi se mogu upotrebiti kao vektori za direktan unos aktivnih komponenti. Eksperimentalna primena **apo-A1 na adenovirusnom vektoru** dovela je do prolaznog povećanja nivoa lipoproteina visoke gustine (HDL) u serumu pacova. Obzirom da HDL ispoljava protektivne efekte redukcijom nivoa serumskog holesterola i broja makrofaga u plaku, rezultati ovih eksperimenata mogli bi da budu dobar nagoveštaj za razvoj genske terapije kod ljudi⁸⁸⁻⁹².

Simplificirana varijanta ove mogućnosti je ubrizgavanje genskog materijala u neposrednu blizinu ćelija na koje želimo da utičemo. Primenuje se tehnika unosa genskog materijala specifičnim kateterima i njegovog oslobađanja na mestu oštećenja endotela ili u njegovoj blizini. Preduslov za uspeh je održavanje odgovarajućeg, dirigovanog, protoka krvi⁸⁸⁻⁹².

Indirektni (ex vivo) metod podrazumeva **separaciju ćelija** koje imaju ulogu u ključnim metaboličkim aktivnostima, njihovu **gensku modifikaciju i reimplantaciju izmenjenih ćelija** koje su osposobljene da stvaraju novi genetski i/ili enzimski materijal. Konceptija ovog metoda je proširena i na sprečavanje kasnih komplikacija, kao što je neointimalna hiperplazija, nakon arterijske rekonstrukcije (endarterektomija, by-pass, implantacija stenta)⁸⁸⁻⁹³.

Separirane endotelne ćelije pacijenta se genetski modifikuju u *in vitro* uslovima. Ubrizgavanje ovih ćelija omogućava prekrivanje (*endothelial seeding*) arterijskog by pass grafta i/ili stenta genski modifikovanim endotelnim ćelijama. Kod porodične hiperholesterolemije odvojenim ćelijama jetre dodaju se geni odgovorni za sintezu enzima koji aktiviraju LDL receptore posle čega se one vraćaju u jetru. Na taj način se u istog pacijenta može genski intervenisati na više nivoa eliminišući više faktora rizika (hipertenzija, hiperhilesterolemija, hiperplazija neointime itd.)⁸⁸⁻⁹².

Genska terapija vulnerabilnog plaka podrazumeva mogućnost preveniranja rupture aterosklerotičnog plaka sa formiranjem ulceracije i distalne embolizacije sa prizidnom trombozom, sa ili bez kompletne trombotičke okluzije. Time se sprečava akutni ishemički sindrom distalnog tkiva.

Genska terapija vulnerabilnog plaka moguća je na dva načina:

- Transfer gena čiji produkti stabilizuju vulnerabilni plak redukujući količinu lipida i makrofaga u njemu.
- Ugrađivanje u aterosklerotični plak gena koji pokreću sintezu trombolitičkih proteina i faktora rasta koji restauriraju antitrombotičke osobine endotelних ćelija, sprečavajući prizidnu trombozu⁸⁹.

Integritet i stabilnost aterosklerotičnog plaka zavisi od konstituenata ekstracelularnog matriksa (kolagen tipa I i III, elastin i proteoglikan). Glatke mišićne ćelije arterijskog zida sintetišu makromolekule ECM matriksa. Citokini i lokalni faktori rasta (*growth factors*) iz endotelnih ćelija i trombocita regulišu ovu sintetsku funkciju glatkih mišićnih ćelija⁹³⁻⁹⁹.

Umesto zaključka:

Pokretanje i razvoj ateroskleroze se može tretirati kao imunološki fenomen:

- Aterogeneza ima bitne elemente inflamatornog procesa i autoimunskog stanja.
- Aterogeneza se može imunomodulisati.
- Imunomodulacija aterogeneze podrazumeva imunosupresivnu terapiju, aktivnu imunizaciju, indukciju tolerancije, intravensko davanje imunoglobulina i manipulacije u okviru sistema citokina.
- U budućnosti treba očekivati da će genska terapija u smislu imunomodulacije biti važan način prevencije i terapije ateroskleroze^{25,26,99}.

LITERATURA

1. Fye KH and Talal N: Rheumatic disease. In: Basic and clinical immunology, Ed. by Fudenberg HH Los Altos, California 442-443, 1982.
2. Ortolani C, Bonfatti A, Perrone G: Immunologic vasculitis. In: Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp, London 24: 31-43, 1980.
3. Bach JF: Immunopathologie des maladies arterieles. J Mal Vasc 5(4): 307-314, 1981.
4. Fuest G, Szondy E, Szekely J, Nanai I, Geroe S: Studies on the occurrence of circulating immune complexes in vascular diseases. Artery 7(5): 352-366, 1978.
5. Porter JM, Rivers SP: Evaluation and menagemen of patients with Raynaud syndrome. Am J Surg 142(8): 183-189, 1981.
6. Bollinger A, Hollmann B, Schneider E and Fontana A: Trombangitis obliterans: Diagnose und Therapie im Licht neuer immunologischer Befunde. Schweiz Med Wochenschr 109(15): 537-543, 1979.
7. Mathews JD and Ferry BJ: Cholesterol and the immune response to influenza antigens. Lancet, ii: 1212-1213, 1978.
8. Bond JR, Charboneau JW, Stanson AW: Takayasu's arteritis. Carotid duplex sonographic appearance, including color Doppler imaging, J Ultrasound Med 9(11): 625-629, 1990.
9. Cid MC, Font C, Coll-Vinent B, Grau JM: Large vessel vasculitides. Curr Opin Rheumatol 10(1): 18-28, 1998.
10. Giordano JM : Takayasu's disease and temporal arteritis. Semin Vasc Surg 8(4): 335-341, 1995.

11. Hellmann DB : Immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of giant cell arteritis, temporal arteritis, polymyalgia rheumatica, and Takayasu's arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 5(1): 25-32, 1993.
12. Hunder G: Vasculitis: diagnosis and therapy. *Am J Med* 100(2A): 37S-45S, 1996.
13. Kerr GS: Takayasu's arteritis. *Rheum Dis Clin North Am* 21(4): 1041-1058, 1995.
14. Mascoli F, Taddia MC, Marzola A, Rubbini M, Occhionorelli S, Vasquez G, Romano D, Mari F, Santini M: Takayasu disease in the genesis of cerebrovascular insufficiency. Description and considerations of a clinical case. *Minerva Chir* 47(3-4): 143-149, 1992.
15. Moriwaki R, Noda M, Yajima M, Sharma BK, Numano F: Clinical manifestations of Takayasu arteritis in India and Japan new classification of angiographic findings. *Angiology* 48(5): 369-379, 1997.
16. Park JH: Conventional and CT angiographic diagnosis of Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 54 Suppl:S165-S171, 1996.
17. Sekiguchi M, Suzuki J: An overview on Takayasu arteritis. *Heart Vessels Suppl* 7:6-10, 1992.
18. Tada Y, Sato O, Ohshima A, Miyata T, Shindo S: Surgical treatment of Takayasu arteritis, *Heart Vessels Suppl* 7: 159-167, 1992.
19. Bailey JM Butler J: The influence of antiinflammatory agents on experimental atherosclerosis. *Nature, London* 212: 731-732, 1966.
20. Hanson GK, Zhou H, Tornquist, Paulson G. The Role of Adaptive Immunity in Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 902: 53-64, 2000.
21. Mathews JD: Ischemic heart disease: possible genetic markers. *Lancet* ii: 682, 1975.
22. Mathews JD, Whittingham S and Mackay JR: Autoimmune mechanisms in human vascular disease. *Lancet*, Dec 1423-1427, 1974.
23. Walton KW: Atherogenetic factors intrinsic to the arterx wall. *Atherosclerosis V*. Ed. by: AM Gotto, LC Smith, B Allen. Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin 98-101, 1979.
24. Schiantarelli P, MurmannW i Lupi G: Polyvalent antiinflammatory activity of polyanionic fraction of bovine pancreas. Potential value in the treatment of atherosclerosis. *Arzneim Forcsh* 28(7): 1146-1153, 1980.
25. Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews* 1: 21-27, 2002.
26. Hansson GK. Regulation of Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:157-166, 2001.
27. Navab M, Berliner JA, Watson AD *et al*. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol* 16(7): 831-842, 1996.
28. Kume N, Cybulsky MI and Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90: 1138-1144, 1992.
29. Mattsson-Hultén L, Lindmark H, Diczfalusy U, Bjoumrkhem I, Ottosson M, Liu Y, Bonders G, Wiklund O. Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 97: 461-468, 1996.

30. Seifert PS, Hugo F, Trantum JJ, Zhringer U, Muhly M, Bhakdi S. Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J Exp Med* 172: 547-557, 1990.
31. Palinski W, Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME *et al.* Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arterioscl Thromb* 10: 325-335, 1990.
32. Hörkkö S, Miller E, Dudl E, Reaven P, Curtiss LK, Zvaifler NJ, Terkeltaub R, Pierangeli SS, Branch DW, Palinski W, Witztum JL. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 98: 815-825, 1996.
33. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME *et al.* Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84: 1086-1095, 1989.
34. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792, 1991.
35. Griffith RL, Virella GT, Stevenson HC, Lopes VM. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 168: 1041-1059, 1988.
36. Holvoet P, Perez G, Zhao Z, Brouwers E, Bamar H, Collen D. Malondialdehyde modified low density lipoprotein in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest* 95: 2611-2619, 1995.
37. Palinski W, Hörkkö S, Miller E *et al.* Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest* 98(3): 800-814, 1996.
38. Stemme S, Holm J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscl Thromb* 12: 206-211, 1992.
39. Paulsson G, Zhou X, Törnquist E, Hansson GK. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 10-17, 2000.
40. Freigang S, Hörkkö S, Miller E, Witztum JL, Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 18: 1972-1982, 1998.
41. Stemme S, Rymo L, Hansson GK. Polyclonal origin of T lymphocytes in human atherosclerotic plaques. *Lab Invest* 65(654): 654-660, 1991.
42. Swanson SJ, Rosenzweig A, Seidman JG, Libby P. Diversity of T-cell antigen receptor V-gene utilization in advanced human atheroma. *Arterioscl. Thromb.* 14: 1210-1214, 1994.
43. Nicoletti A, Caligiuri G, Törnberg I, Kodama K, Stemme S, Hansson GK. The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur J Immunol* 29: 512-521, 1999.
44. Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R *et al.* Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 339: 883-887, 1992.
45. Bergmark C, Wu R, de Faire U, Lefvert AK, Swedenborg JP. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 441-445, 1995.

46. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 821-825, 1995.
47. Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, *et al.* Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice [*In Process Citation*]. *Mol Med* 6: 283-290, 2000.
48. George J, Afek A, Gilburd B, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, Kopolovic Y, Wick G, Shoenfeld Y, Harats D. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 138: 147-152, 1998.
49. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, Wick G. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation* 99: 1560-1566, 1999.
50. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscl Thromb* 13: 1501-1504, 1993.
51. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 99: 633-636, 1999.
52. Moazed TC, Campbell LA, Resenfeld ME, Grayston JT, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis* 180: 238-241, 1998.
53. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and are specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* 103: 747-753, 1999.
54. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89(1): 36-44, 1994.
55. Ameli S, Hultgårdh-Nilsson A, Regnström J *et al.* Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 16: 1074-1079, 1996.
56. Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Hansson GK. Protection against atherosclerosis by LDL immunization is associated with T cell dependent IgG antibodies in apoE-deficient mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 21: 108-114, 2001.
57. Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48: 299-302, 2000.
58. Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today* 2: 372-379, 1996.
59. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G *et al.* Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J Clin Invest* 102: 910-918, 1998.
60. Mallat Z, Besnard S, Duriez M *et al.* Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis [*In Process Citation*]. *Circ Res* 85: e17-24, 1999.
61. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK *et al.* Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394: 200-203, 1998.
62. Jonasson L, Holm J, Hansson GK. Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2303-2306, 1988.

63. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T *et al.* Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 99: 2164-2170, 1999.
64. Thyberg J, Hansson GK. Cyclosporine A inhibits induction of DNA synthesis by PDGF and other peptide mitogens in cultured rat aortic smooth muscle cells and dermal fibroblasts. *Growth Factors* 4: 209-219. 1991.
65. Karmann K, Hughes CC, Schechner J *et al.* CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4342-4346, 1995.
66. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages-implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1931-1936, 1997.
67. Karmann K, Hughes C, Fanslow WC, Pober JS. Endothelial cells augment the expression of cd40 ligand on newly activated human CD4+ T cells through a CD2/LFA-3 signaling pathway. *Eur J Immunol* 26: 610-617, 1996.
68. Kazatchkine NM, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune disease with normal polyspecific immunoglobulin G (intravenous immunoglobulin). *In The Decade of Autoimmunity*. Y. Shoenfeld, Ed. Elsevier, Amsterdam 409-419 1999.
69. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR *et al.* Prognostic value of C-reactive protein and plasma amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 331: 417-424, 1994.
70. Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuffi AG, Gallimore R, Caligiuri G, Lanza GA, Quaranta G, Monaco C, Pepys MB, Maseri A. Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 94: 2373-2380, 1996.
71. Neri Serneri GG, Abbate R, Gori AM *et al.* Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 86: 790-797, 1992.
72. Caligiuri G, Lévy B, Pernow J, Thorén P, Hansson GK. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6920-6924, 1999.
73. Yusuf S, Sleight P, Pogue J *et al.* Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342: 145-153, 2000.
74. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA *et al.* Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1623-1629, 1999.
75. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J *et al.* Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappa B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 826-828, 1999.
76. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 84: 695-703, 1999.
77. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, *et al.* Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 952-959, 1998.
78. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1

- expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95: 1532–1541, 1997.
79. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, et al. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 153: 1825–1837, 1998.
 80. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated path-way cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47, 1986.
 81. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85: 23–28, 1999.
 82. DeCaterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96: 60–68, 1995.
 83. Hackman A, Abe Y, Insull I, et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*. 93: 1334–1338, 1996.
 84. Feldman LJ, Isner JM: Gene therapy for the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 26:826–35, 1995.
 85. Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IGH: Cytokines and gene therapy. *Immunology Today* 16(4): 173–75, 1995.
 86. Taniguchi N, Itoh K, Honda M, Obayashi T, Nakamura M, Kawai F, Irie T: Comparative ultrasonographic and angiographic study of carotid arterial lesions in Takayasu's arteritis. *Angiology* 48(1):9–20, 1997.
 87. Bassenge E: Endothelial function in different organs. *Progress in Cardiovascular Diseases* 39:209–228, 1996.
 88. Bauters C, Asahara T, Zheng L, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes J, Isner J: Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 91:2802–2809, 1995.
 89. Beasley D, Cooper AL: Constitutive expression of interleukin-1alpha precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 276(3 Pt 2):H901–12, 1999.
 90. Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, Gondo T, Nakazawa T, Ito H: Distribution of Chlamydia pneumoniae Infection in the Atherosclerotic Carotid Artery. *Stroke* 29: 773–778, 1998.
 91. Brown NJ, Vaughan DE. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med* 45: 419–429, 2000.
 92. Robbie L and Libby P. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167–180, 2001.
 93. Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ, Timms P: Failure to detect Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology* 30(2):169–172, 1998.
 94. Pedersen TR, Kjekshus J, Pyorala K, Olsson AG, Cook TJ, Musliner TA, Tobert JA, Haghfelt T: Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Am J Cardiol* 81(3):333–335, 1998.
 95. Ballantyne CM, Herd JA, Dunn JK, Jones PH, Farmer JA, Gotto AM Jr: Effects of lipid lowering therapy on progression of coronary and carotid artery disease. *Curr Opin Lipidol* 8 (6):354–361, 1997.

96. MacMahon S, Sharpe N, Gamble G, Hart H, Scott J, Simes J, Whyte H: Effects of lowering average of below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: results of the LIPID Atherosclerosis Substudy. LIPID Trial Research Group, *Circulation*, 97(18):1784-1790, 1998.
97. Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344:793-795, 1994.
98. Witztum JL: Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon Press 875-897, 1996.
99. Yamada N: Atherosclerosis. *Nippon Rinsho* 57(10):2345-2348, 1999.

9. ANTIINFLAMATORNI, IMUNOMODULATORNI I ANTITROMBOGENI EFEKTI TRETMANA HIPOLIPIDEMIJSKIM AGENSIMA U TERAPIJI ATEROSKLEROZE

9.1. RAZVOJ ATEROSKLEROZE: KOMBINACIJA LIPIDNIH I NELIPIDNIH POREMEĆAJA

Brojne studije su do sada pokazale da razvoj aterosklerozne lezije započinje formiranjem masne pruge, i nastavlja se progresijom u ploču koja predstavlja komplikovanu i potencijalno dinamičnu leziju zida krvnog suda. Ova ploča, odnosno aterosklerozni plak, može se okružiti fibriznom kapom i biti dugo stabilna ali može, kako je već navedeno, doći do nestabilnosti plaka sa posledičnom fisurom, rupturom, hemoragijama i trombozom koje kompromituju protok u krvnom sudu a time i funkciju odgovarajućeg tkiva odnosno organa¹.

U navedenom redosledu događaja značajnu ulogu imaju procesi nagomilavanja aterogenih produkata metabolizma lipida, naročito oksidovanih LDL čestica, s jedne strane, ali i procesi endotelne disfunkcije, aktivacije zapaljenskih mehanizama, imunološki posredovanog oštećenja plaka i inhibicije lokalne fibrinolize, koji s druge strane ostvaruju efektornu fazu rupture plaka i neposredno dovode do nastanka odgovarajućeg kliničkog događaja.

U okviru brojnih poremećaja metabolizma lipida koji su detektovani u nastanku aterosklerozne ploče, smatra se da je ključni proces oksidacija malih gustih LDL čestica u oksidovane LDL partikule koje se deponuju u ekstracelularnom matriksu subendotela. Pokazano je da oksidovani lipidi, a naročito oksidovane LDL čestice mogu s jedne strane aktivirati transkripcione faktore za ekspresiju gena čiji proteinski produkti menjaju karakteristike endotela i inicijalno podstiču formiranje masnih pruga. S druge strane,

u uslovima promene strukture endotela, oksidovane LDL čestice mogu postati antigeni koji aktiviraju imunološki posredovanu destrukciju zida krvnog suda^{1,2}.

U iniciranju ravoja aterosklerozne ploče, kako je do sada ekstenzivno navedeno, značajnu ulogu ima endotelna disfunkcija, definisana najčešće kao poremećaj sinteze i/ili metabolizma nitrit oksida (NO), što doprinosi poremećenoj relaksaciji krvnog suda, povećanoj agregaciji trombocita, povećanoj proliferaciji glatkomišićnih ćelija, kao i pojačanoj adheziji leukocita na endotel³⁻⁵. Endotelna disfunkcija, prema dosadašnjim podacima predstavlja početnu pojavu u razvoju ateroskleroze⁶, a pokazano je da je oksidovani LDL snažan inhibitor endotelne funkcije, inhibirajući aktivnost NO najvećim delom preko smanjenja aktivnosti enzima endotelne nitrit oksid sintaze (eNOS)^{7,8}.

U opisanim okolnostima nagomilavanja oksidovanih LDL čestica i razvoja endotelne disfunkcije, nastaje adhezija monocita za endotel, koji se zatim diferenciraju u makrofage, akumuliraju lipide u zidu krvnog suda i stvaraju osnovu za formiranje plaka¹. Pokazano je da je ova adhezija povećana kako pod dejstvom metaboličkih stimulusa (npr. hiperholesterolemija), tako i aktivacijom endotelnih ćelija u smislu ekspresije odgovarajućih adhezivnih molekula, na koju mogu stimulišuće delovati kako povećano prisustvo oksidovanih LDL čestica, tako i infektivni agensi kao što su citomegalovirusi i *Chlamydia pneumoniae*².

Nakon adhezije i u toku akumuliranja makrofaga u zidu krvnog suda započinje zapaljenski proces u kome je karakteristično prisustvo, pored makrofaga, i T limfocita, aktiviranih prisustvom kako antigena oksidovanih LDL čestica tako i drugim mehanizmima (videti prethodna poglavlja). Makrofazi i T limfociti sekretuju inflamatorne citokine, kao što su interferon gama, interleukini 1, 2 i 6 i faktor nekroze tumora, koji u kombinaciji sa trombocitnim faktorom rasta (platelet derived growth factor, PDGF) i drugim faktorima rasta, kao što su insulinu sličan faktor rasta 1 i fibroblastni faktori rasta alfa i beta, dodatno pojačavaju endotelnu disfunkciju i stimulišu proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, degradaciju kolagena, i trombozu⁹⁻¹². Sa kliničkog aspekta, ovi procesi dovode do formiranja masnih pruga, a novija ispitivanja ukazuju da bi nivo C-reaktivnog proteina (CRP), koji je u osnovi pre svega marker sistemske inflamacije, mogao biti značajan marker i navedenih događanja na nivou endotela^{9,10}.

Endotelna disfunkcija takođe doprinosi abnormalnoj ili ekscesivnoj sekreciji vazokonstriktivnih supstanci kao što je endotelin 1 (ET-1)^{13,14}. Povećano prisustvo oksidovanih LDL partikula pojačava produkciju i otpuštanje ET-1, a povišeni ET-1 u kombinaciji sa PDGF potencira migraciju i proliferaciju glatkomišićnih ćelija u intimu krvog suda što je u osnovi progrediranja masne pruge u komplikovanu leziju¹⁴.

U cilju dopune mozaika složenih interakcija koje doprinose progresiji ateroskleroze treba istaći smanjenu fibrinolizu u području razvoja ateroskleroznog plaka, prozrokovanu najverovatnije povišenim nivoom plazminogen aktivator inhibitora 1 (PAI-1), koja dovodi do inhibicije degradacije fibrinskih naslaga i povećanog deponovanja sastojaka ateromatoznog plaka¹⁵.

9.2. TERAPIJA HIPOLIPEMIJSKIM AGENSIMA: ZNAČAJ PLEIOTROPNIH NELIPIDNIH EFEKATA

S obzirom na veliki značaj koji poremećaji metabolizma lipida imaju u formiranju ateroskleroznog plaka, značajna pažnja u oblasti terapijske intervencije u prevenciji nastanka i razvoja plaka bila je usmerena na efikasnost hipolipidemijskih agensa i to prvenstveno na njihovu sposobnost redukcije nivoa frakcija lipoporteina do ciljnih vrednosti. Međutim, poslednjih godina je pokazano da neki hipolipidemijski agensi mogu ostvarivati i značajne nelipidne, pleiotropne efekte na nivou krvnog suda, sprečavajući razvoj nekih od opisanih zapaljenskih, imunološki posredovanih ili fibrinoliznih aterogenih poremećaja. Među ovim agensima posebnu važnost imaju inhibitori HMG-CoA reduktaze, odnosno statini, čiji će pleiotropni efekti od značaja za sprečavanje aterogeneze biti navedeni u daljem tekstu.

Statini predstavljaju snažne inhibitore sinteze holesterola, a pokazalo se da neki od statina mogu snažnije inhibirati sintezu LDL-holesterola i da ova podgrupa statina može značajnije da inhibira produkciju oksidovanih LDL čestica kao moćnog faktora inicijacije i amplifikacije daljeg zapaljenskog procesa u razvoju ateroskleroze².

Međutim, novije studije su ukazale da pored navedenog uticaja na snižavanje produkcije aterogenih proizvoda metabolizma lipida, tretman statinima ima i druge brojne holesterol nezavisne pleiotropne vaskularne efekte. Ovi efekti se odnose prvenstveno na poboljšanje endotelne funkcije i modulaciju inflamatornog i imunog odgovora a delimično i na poboljšanje fibrinolizne aktivnosti, što je nedavno i potvrđeno kako u eksperimentalnim tako i u kliničkim studijama².

Rezultati kliničkih studija su pokazali da obustavljanje terapije statinama značajno povećava broj koronarnih incidenata u pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom. Važno je istaći da je ovaj efekat statina uočen tokom prve nedelje trajanja simptoma i bio je nezavisan od nivoa holesterola¹⁶.

Studije proučavanja holesterol nezavisnih efekata statina su ukazale na značajan efekat ovih agensa na endotelnu funkciju. Kliničke studije su ukazale na poboljšanje endotelne funkcije u pacijenata samo nakon mesec dana od započinjanja terapije statinima, pri čemu se smatra da ovaj efekat statini najverovatnije ostvaruju upravo podizanjem nivoa i funkcije eNOS u uslovima hipoksije i produžavanjem poluživota mRNA za endotelijalnu eNOS¹⁷⁻¹⁹. Ovaj efekat statini ostvaruju i inhibicijom biosinteze produkata koji nastaju razgradnjom mevalonata, a koji učestvuju u posttranslacionoj modifikaciji raznih proteina, uključujući eNOS kao i Rho protein. Rho protein je endogeni inhibitor endotelne sinteze NO, tako da inhibicija ovog proteina dovodi do tri puta većeg stvaranja NO¹⁹. Najnovija istraživanja su pokazala da neki statini aktiviraju Akt protein kinazu i tako uzrokuju pojačanu fosforilaciju eNOS i stvaranje NO²⁰. U tom smislu sugerisano je da statini mogu proizvesti veoma brzo poboljšanje endotelijalne funkcije i nezavisno od promena u nivou mRNA za eNOS. Takođe, ove studije su

ukazale da terapija nekim statinima može ublažiti apoptozu endotela i istovremeno stimulisati angiogenezu u eksperimentalnom modelu²⁰.

Nakon izuzetno značajnog otkrića da statini povećavaju funkciju eNOS, veliki broj studija je pokazao snažan antiinflamatorni efekat statina koji se zasniva upravo na ovom mehanizmu delovanja. Brojni radovi *in vitro* su potvrdili ovaj efekat statina u akutnom infarktu miokarda. Terapija statinima inhibira akumulaciju leukocita u ishemičnom reperfundovanom miokardu, što je proces zavisen od eNOS, kako je pokazano u eksperimentalnim studijama koje su potvrdile da su eNOS deficijentni miševi bili u potpunosti rezistentni na kardioprotektivni efekat statina²¹. Nakon toga u više kliničkih studija je potvrđen potentan produženi antiinflamatorni i kardioprotektivni efekat statina u uslovima akutnog infarkta miokarda kako u hiperholesterolemičnih tako i u normoholesterolemičnih pacijenata^{22,23}.

Nedavno je pokazano da statini imaju i veoma snažan sistemski antioksidativni efekat koji ostvaruju supresijom različitih puteva oksidacije, između ostalog i indukcijom sniženja nivoa proteina nitrotirozina (NO₂Tyr) u plazmi. U tom smislu, uloga statina u redukciji oksidativnog stresa zasniva se pre svega na inhibiciji formiranja oksidovanih produkata. U celini, pokazano je da statini mogu imati potentne sistemske antioksidantne efekte nezavisno od promena u nivou lipidnih parametara²⁴.

Statini redukuju i broj inflamatornih ćelija u ateroskleroznom plaku. Mehanizam ovog efekta nije još uvek u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da se pre svega zasniva na inhibiciji ekspresije adhezivnih molekula kao što je intercelularni adhezivni molekul 1 (ICAM-1) i sinteze interleukina 6 i 8, koji učestvuju u mobilizaciji inflamatornih ćelija¹⁴. U tom smislu novije studije su pokazale da statini mogu da suprimiraju inflamatorni odgovor nezavisno od inhibicije HMG-CoA reduktaze i to vezujući se direktno za posebno β_2 regulatorno mesto integrina, leukocitnog funkcionalnog antigena-1, koje predstavlja receptor sa afinitetom za ICAM-1 molekul, čime se inhibira vezivanje za ovaj adhezivni molekul na endotelu²⁵. Takođe, noviji rezultati su ukazali da neki statini mogu uticati na smanjenje adhezije monocita na vaskularni endotel takođe i preko smanjivanja ekspresije integrina²⁶.

Terapija statinima dovodi do značajne redukcije nivoa markera inflamacije kao što je visoko senzitivni C-reaktivni protein (high-sensitive, hsCRP)²⁷.

Pokazano je da statini snižavaju nivo hsCRP-a uporedo ali ne i u značajnoj povezanosti sa redukcijom nivoa holesterola i njegovih supfrakcija, kao i da je u pacijenata tretiranih statinima snižen nivo hsCRP-a bio povezan sa značajnim sniženjem incidencije kako novih tako i rekurentnih ishemijskih događaja i mortaliteta nakon perkutane koronarne intervencije²⁸⁻³¹.

U eksperimentalnom modelu je pokazano da terapija statinima uspešno inhibira ne samo proces inflamacije već i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i u samom zidu stenta, što još nije potvrđeno u kliničkim studijama³².

U radovima na eksperimentalnom modelu, a zatim i u brojnim kliničkim studijama pokazano je da statini ostvaruju povoljan efekat i na parametre hemostaze, i to prvenstveno na one koji favorizuju razvoj koronarne aterogeneze, kao što su PAI-1 ali i tkivni plazminogen aktivator (tPA), von Willebrand-ov faktor (vWF), faktori VII i VIII i solubilni trombomodulin. Takođe, u *in vitro* studijama pokazano da statini deluju

fibrinolitički u kulturi glatkomišićnih ćelija i endotela, smanjujući nivo PAI-1 i povećavajući t-PA³³.

Pokazano je da statini smanjuju prokoagulantu aktivnost, koja je prisutna u različitim stadijumima kaskadnog procesa koagulacije, uključujući aktivnost tkivnog faktora (TF) konverzije protrombina u trombin, i trombinsku aktivnost. U nekim studijama je pokazano da statini takođe smanjuju i nivo fibrinogena.

Pretpostavlja se da je mehanizam koji je u osnovi ovog efekta statina pre svega sposobnost inhibicije produkata razgradnje mevalonata, koji imaju značajnu ulogu u regulaciji ključnih koraka u procesima koagulacije i fibrinolize, posebno u regulaciji sinteze TF, tPA i PAI-1³³.

U celini, holesterol nezavisni, pleiotropni vaskularni efekti statina, u vidu poboljšanja endotelne funkcije, modulacije zapaljenskog procesa, imunomodulatornih uticaja i favorizovanja fibrinolize, upućuju na mogućnost ostvarivanja značajnog i višestrukog povoljnog uticaja na sprečavanje razvoja ateroskleroze primenom ovih agensa, bilo u početnoj ili u kasnijim fazama ovog procesa.

LITERATURA

1. Berliner, J.A., Navab M., Fogelman AM. Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*. 91(9): 2488-2496, 1995.
2. Wolfrum, S., Jensen, K., Liao, JK., et al. Endothelium-Dependent Effects of Statins. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(5): 729-736, 2003.
3. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K., et al.. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 14: 753–759, 1994.
4. Liao JK, Bettmann MA, Sandor T., et al. Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. *Circ Res*. 68: 1027–1034, 1991.
5. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 4651–4655, 1991.
6. Werns SW, Walton JA, Hsia HH., et al. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation*. 79: 287–291, 1989.
7. Liao JK, Shin WS, Lee WY., et al. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 270: 319–324, 1995.
8. Liao JK. Inhibition of Gi proteins by low density lipoprotein attenuates bradykinin-stimulated release of endothelial-derived nitric oxide. *J Biol Chem*. 269: 12987–12992, 1994.
9. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I., et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 106: 1439–1441, 2002.

10. Verma S, Wang CH, Li SH., et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 106: 913–919, 2002.
11. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 138: S419–420, 1999.
12. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA., et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 1194–1199, 2002.
13. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW., et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*. 325: 997–1001, 1991.
14. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V., et al. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque: a clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*. 91: 941–947, 1995.
15. Aznar J, Estelles A. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the pathogenesis of coronary artery diseases. *Haemostasis*. 24: 243–251, 1994.
16. Lefer, D.J. et al. Statins as Potent Antiinflammatory Drugs *Circulation*. 106(16): 2041–2042, 2002.
17. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 49: 281–287, 2001.
18. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 97: 1129–1135, 1998.
19. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA activity stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 273: 24266–24271, 1998.
20. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 6: 1004–1010, 2000.
21. Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 103: 2598–2603, 2001.
22. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V., et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 7: 687–692, 2001.
23. Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. April 27. 10.1096, 2001.
24. Shishehbor M.H., Brennan M. Ronnier J.: Statins Promote Potent Systemic Antioxidant Effects Through Specific Inflammatory Pathways. *Circulation*, 108(4): 426–431, 2003
25. Jones SP, Trocha SD, Lefer DJ. Pretreatment with simvastatin attenuates myocardial dysfunction after ischemia and chronic reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21: 2059–2064, 2001.
26. Yoshida M, Sawada T, Ishii H., et al. Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21: 1165–1171, 2001.
27. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation*. 106: 399–402, 2002.

28. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M., et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med.* 344: 1959–1965, 2001.
29. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA., et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein: the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 100: 230–235, 1999.
30. Albert MA, Staggars J, Chew P., et al. The pravastatin inflammation CRP evaluation (PRINCE): rationale and design. *Am Heart J.* 141: 893–898, 2001.
31. Chan AW., Bhatt DL., Chew DP., et al. Relation of inflammation and benefit of statins after percutaneous coronary interventions. *Circulation.*, 8; 107(13): 1750-6, 2003.
32. Walter DH; Fichtlscherer S; Britten MB., et al. Statin therapy, inflammation and recurrent coronary events in patients following coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol.*;38(7): 2006-12, 2001.
33. Bourcier T, Libby P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 556–562, 2000.

10. ANTIBIMIKROBNA TERAPIJA U PREVENCIJI ATEROGENEZE

Još od vremena *Jenner*-a and *Koch*-a, **hipoteza o infekciji**, kao pokretaču mnogih bolesti utiče na globalno medicinsko razmišljanje.

Etiopatogeneza ateroskleroze je, sigurno, multifaktorijelna međutim ova formulacija može da posluži kao dobar izgovor za stvarno nepoznavanje njenog uzroka. Klasični faktori rizika za aterogenezu su poznati, međutim, ova bolest napada i one koji nemaju ni jedan tradicionalni faktor rizika.

Infekcija-inflamacija koncept može biti

- inicijator ili uz druge faktore rizika
- akcelerator aterogeneze.

Aterogeneza se može pokrenut kao „kolateralna šteta” tokom protektivnog, inflamatorno-proliferativnog odgovora arterijskog zida na agresiju različitih infektivnih agenasa. Ako se iritacija-inflamacija, lezija, održava dugo i ako su prisutni drugi faktori rizika za aterogenezu, ona postaje ekcesivna.

Proaterogeni mehanizmi delovanja infektivnih agenasa

- **Direktna invazija** zida krvnog suda sa inflamatornim odgovorom, lokalnom akumulacijom limfocita i makrofaga, uz produkciju citokina i tkivnih faktora rasta;
- Lokalno otpuštanje **endotoksina** (lipopolisaharidi), koji povećavaju unos holesterol-estara u makrofage, koji postaju penušave ćelije;
- **Molekularna mimikrija** mikrobnih stres proteina *heat shock protein*-a HSP-60, sa humanim HSP, koja indukuje autoimunsku reakciju;
- **Indirektni sistemski efekat** udaljene infekcije, zbog otpuštanja lipopolisaharida, koji lediraju endotel, sistemski povećavaju citokine, aktiviraju inflamatorne markere, deluju prokoagulantno izazivajući trombozu i akutnu ishemiju;
- **Indukcija promena u serumskim lipoproteinima** preko citokina, porast nivoa *low-density lipoprotein*-a (LDL), pad nivoa *high-density lipoprotein*-a

(HDL), što je uvod u aterogenezu. Lipidni metabolizam se bitno menja u odgovoru na infekciju. Lipoproteini predstavljaju deo odbrambenog mehanizma jer hvataju infektivne partikule i endotoksine. Medijatori su citokini, kao što je TNF- α , interleukin-1, interleukin-6 i interferoni. Citokini mogu da smanje aktivnost lipoprotein lipaze i klirens triglicerida povećavajući nivo *very-low-density lipoprotein*-a (VLDL).

Hipoteza da **infektivni agensi** i konsekventni **inflamatorni odgovor** mogu dovesti do ateroskleroze vrlo je aktuelna. Paradigma ovog modela je autoimunski proces koji po principu okidača, izaziva *Chlamydia pneumoniae*.

Chlamydia pneumoniae je gram-negativna, intracelularna bakterija, koja obično izaziva infekcije respiratornog trakta. Rasprostranjena je svuda i može da se umnožava u glatkomišićnim, endotelnim ćelijama, makrofagama itd. Prisustvo *Chlamydia* u aterosklerotskim lezijama prvi put je **dokazano** 1992. godine^{2,3}, a potvrđeno različitim metodama u preko 50 studija publikovanih do sada⁴.

Postavlja se pitanje da li *C. pneumoniae*

- pokreće aterogenezu ili samo
- čini ivaziju oštećene intime ateromatozno degenerisane arterije, i u tom slučaju da li je ona nedužni posmatrač – *bystander*, ili potencira razvoj hronične aterogeneze.

Seroepidemiološke studije su pokazale povezanost anti-*Clamidia pneumoniae* antitela i ateroskleroze. **Elektronskom mikroskopijom** je pokazano prisustvo intracelularnih bakterija u ateromatoznoj leziji, kojih nema i u zdravim segmentima krvnog suda. Detekcija *C. Pneumoniae* u plaku se retko može potvrditi tehnikom kulture ćelija. Ipak, ovi podaci podupiru hipotezu da inflamatorno oboljenje izazvano *C. Pneumoniae* dovodi do razvoja ateroskleroze⁴.

Inficirane endotelne ćelije pokazuju znake aktivacije sa oslobađanjem **slobodnih radikala** i sekrecijom **citokina** (faktora nekroze tumora – alfa, TNF-alfa i interleukina-1, IL-1)^{16,17} i hemokina (makrofagni hemotaktički protein-1, MCP-1 i interleukin-8, IL-8)¹⁸. Dokazano je **pojačano ispoljavanje važnih adhezivnih molekula** (E-selektin, CD62-E; intercelularni adhezivni molekul-1, ICAM-1; vaskularni adhezivni molekul-1, VCAM-1)¹⁹. Svi ovi solubilni produkti i membranski molekuli imaju važnu ulogu u započinjanju i održavanju inflamatornog odgovora.

Eksperimentalna (*in vitro*) infekcija humanih ćelija glatkih mišića izaziva produkciju interleukina-6 (IL-6) i bazičnog faktora rasta fibroblasta (bFGF, engl. *Basic fibroblast growth factor*) dok nema uticaja na produkciju tzv. faktora rasta poreklom iz trombocita (PDGF, engl. *Platelet derived growth factor*)²⁰.

C. pneumoniae, kao stimulus inflamatornog odgovora u intimi:

- indukuje produkciju citokina,
- pokreće oksidativne procese,
- povećava nivo C-reaktivnog proteina,
- povećava nivo plazmatskih triglicerida i ukupnog holesterola sa redukcijom HDL

- pokreće proteolizu i autoimunske procese preko *stres-proteina* (HSP-60),
- a kao posledica se ubrzava ateroskleroza.

Osobe koje imaju visok titar IgG antitela na *Chlamydiae* poseduju trostruko veći rizik od nastajanja abdominalne aneurizme aorte (AAA) i karotidne aterosklerotične bolesti od zdravih individua⁴ (Slika 31).

Iako 70-80% pacijenata sa koronarnom aterosklerotičnom bolešću i skoro 100% pacijenata sa aneurizmom abdominalne aorte poseduju bakteriju u aktivnom stanju, za razvoj aterogeneze potrebno je više od toga. Dodatni **faktori rizika** su klasični: starost, pol, pušenje duvana, fizička inaktivnost, hiperholesterolska ishrana i stres^{4,10}.

Pacijenti sa povećanim nivoom **C-reaktivnog proteina** (≥ 0.5 mg/dL) i *C. pneumoniae* seropozitivni imaju najbržu progresiju debljine intimomedijskog kompleksa (IMT). Multivarijantna regresiona analiza pokazala je *C. pneumoniae* seropozitivnost kao nezavisni faktor rizika za progresiju rane karotidne ateroskleroze. *C. pneumoniae* seropozitivni pacijenti imaju znatno veću učestalost cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih ishemičkih događaja⁵⁴⁻⁵⁶.

Aterosklerotična srednja cerebralna arterija sadržala je uvek partikule DNA *C. pneumoniae*, što se moglo dokazati PCR metodom i elektronskom mikroskopijom. Ne-aterosklerotična arterija nije **nikada** sadržala partikule DNA *C. pneumoniae*⁵⁷.

C. pneumoniae olakšava proces koagulacije, čime može dovesti do nastanka **komplikovane lezije i tromboze** (simptomatski - aktivni plak). Naime, lipopolisaharid (LPS) *C. Pneumoniae* ugrađen u membranu inficiranih ćelija ili sekretovan u krvotok može da pokrene koagulacionu kaskadu. Inficirane endotelne ćelije, ispoljavanjem tkivnog faktora i povećanom adherentnošću za trombocite olakšavaju trombozu¹⁶.

Prospektivna studija: **Caerphilly, South Wales**, pokazala je da muškarci srednjih godina sa cirkulirajućim IgA antitelima na *C pneumoniae* imaju, pri prećenju tokom 13 godina, značajno **povećan mortalitet**, uglavnom zbog ekscenno česte ishemičke koronarne bolesti. Ova korelacija nije statistički bila u vezi sa drugim faktorima rizika za aterosklerozu⁴⁵.

Chlamydia pneumoniae je često prisutna u tkivu ateromatozno obolelih arterija, ali je nikada nema u neizmenjenim delovima arterija. Krvni sudovi koji se koriste kao graftovi u kardiovaskularnoj hirurgiji često imaju areale u kojima se PCR metodom nalazi *Chlamydia pneumoniae*. To bi mogao biti razlog rane, **neobjašnjive tromboze by pass grafta**⁵³.

Helicobacter pylori je mikroaerofilni bacil, spiralnog oblika, naseljava sluznicu želuca i može biti uzročnik gastritisa, ulkusne bolesti i karcinoma želuca²¹. Prema epidemiološkim studijama *H. Pylori* je prisutan u skoro svih pacijenata sa verifikovanim ulkusom duodenuma, u 60% slučajeva prati ulkusnu bolest želuca i u oko 50% različite oblike dispepsije¹⁶.

Povezanost aterogeneze i *H. Pylori* infekcije je poznata. Serološke studije, u kojima je ispitivan uticaj prisustva *H. Pylori* na aterogenezu ukazuju da postoji značajna povezanost²². Direktni efekat infekcije, nije uvek presudan, značajno je istovremeno prisustvo i drugih, već potvrđenih faktora rizika^{26,27}. Različiti podaci mogu, biti posledica postojanja više sojeva *H. Pylori*, različite virulentnosti. Značajna

povezanost sa razvojem ateroskleroze dokazana je za sojeve veće virulentnosti. Nažalost, uobičajenim dijagnostičkim (serološkim) metodama detektuje se prisustvo bakterije nezavisno od stepena njene virulentnosti^{24, 26, 27, 52}.

H. Pylori nije detektovana u aterosklerotski izmenjenim, niti u zdravim krvnim sudovima, čime se isključuje mogućnost njenog direktnog proinformatornog delovanja^{23, 24, 25, 26}. Uloga *H. Pylori* u procesu ateroskleroze najverovatnije je posredna. **Povišeni nivo fibrinogena, CRP i povećan broj leukocita**, kao posledica infekcije, mogli bi biti sistemski markeri i pokretači ateroskleroze, tako da je malo verovatno da je ova bakterija samo nedužni posmatrač "*innocent bystander*" aterogeneze^{22, 26, 52}.

H. Pylori utiče na povećanje nivoa **homocisteina**, koji može dovesti do disfunkcije endotela i olakšati razvoj inflamatornog procesa u zidu krvnog suda^{26, 27}.

Dugotrajno prisustvo *H. Pylori* u gastrointestinalnom traktu dovodi do **sindroma malapsorpcije** sa sledstvenom deficijencijom folata i vitamina B grupe, neophodnih kofaktora za konverziju homocisteina u metionin, usled čega dolazi do otežanog uklanjanja i nagomilavanja homocisteina²³.

Opisana je **galopirajuća ateroskleroza** kod **sifilisa, tuberkuloze i salmoneloznih infekcija** u vrlo mladih osoba. Pretpostavlja se da cirkulišući imunski kompleksi u ovom slučaju ne moraju da se vežu za endotel da bi ga oštetili, već je dovoljno da se za endotel fiksira aktivirani C5b fragment komplementa^{5, 6}. Sam proces inflamacije dovodi do svih promena koje se sreću u različitim stadijumima aterogeneze⁷.

Najčešći uzročnici peridentalnih infekcija ***Porphyromonas gingivalis* i *Streptococcus sanguis*** dokazani su u koronarnim i karotidnim aterosklerotskim lezijama^{28, 29}. Njihovo proaterogeno delovanje može biti direktno, aktivacijom ćelija zida krvnog suda, ali i indirektno preko aktivacije sistemskog inflamatornog odgovora (povišeni nivo fibrinogena i CRP-a). Usled imunske reakcije prema bakterijskim antigenima stvaraju se antitela koja poseduju „unakrsnu reaktivnost” sa sopstvenim antigenima. Potvrđeno je da humani HSP (*Heat shock proteins*) i molekuli *P. gingivalis* pokazuju oko 60% strukturne sličnosti, što dovodi do interreakcije po tipu autoimunosti^{30, 46}. Koincidencija sa prisustvom drugih faktora rizika, povećava rizik i otežava donošenje definitivnih zaključaka.

Periodentalna bolest je verovatno infektivni sindrom koji predisponira aterogenezu. Veliki broj peridentalnih Gram negativnih bakterija produkuje lipopolisaharide, proinformatorne citokine, stimuliše inflamatorne ćelije itd. *Streptococcus sanguis* i *P. gingivalis* stimulišu agregaciju trombocita. Međutim, kliničkih studija koje bi potvrdile ovu vezu i nagovestile mogućnosti antimikrobne terapije nije bilo^{30, 46-51}.

Cytomegalovirus-na infekcija je u brojnim bazičnim i kliničkim ispitivanjima povezana sa aterogenezom, međutim više je dokaza da uzrokuje restenozu nakon angioplastike i ubrzava koronarnu bolest u transplantiranom srcu⁴⁵. Infekcija sa **herpes virusima** može da izazove aterosklozu i kod normoholesterolemičnih i kod hiperholesterolemičnih jedinki. Nije jasno da li je u pitanju direktni efekat virusa, ili samo posledica imunološke reakcije na virus u kojoj endotel strada kao „nedužni posmatrač” sa posledičnim vaskulitisom i hiperplazijom intime, nalik na početne stadijume aterogeneze^{8, 45}.

Slični mehanizmi stupaju u akciju prilikom hroničnih bakterijskih infekcija i ponovljenih i masivnih vakcinacija. Ateroskleroza je česta pri infekcijama **coxacki i polio-virusima**⁹. Naročit značaj se pridaje infekcijama **u dečijoj dobi**, jer jednom stečena hipersenzitivnost se održava ponavljajući „uzgredne” lezije vaskularnog tkiva. Porast incidence arterioskleroze u zapadnim zemljama desio se istovremeno sa opadanjem smrtnosti od dečijih infektivnih bolesti i **sistematskom imunizacijom**. Moguće je da početna senzibilizacija infektivnim agensom razvija imuno-patološke kosekvence koje pokreću aterogenezu^{8, 9, 10}.

Autoimunizacija na stres-proteine, tzv. proteine toplotnog šoka, engl. *Heat shock proteins*, **HSP** je koncept koji objedinjava razne puteve kojima iritacija infektivnim i drugim agensima može pokrenuti i razbuktati aterogenezu.

Teorijski, svaka bakterijska i virusna infekcija, kao i imunizacija, mogu pokrenuti produkciju **antitela koja prepoznaju specifične epitope HSP molekula** koji bi, zbog sličnosti između bakterijskih i humanih molekula, mogli da injiciraju autoimunske patološke procese.

Hronične i subkliničke infekcije su pogotovo opasne zato što izazivaju kontinuiranu stimulaciju sinteze antitela. Endotelne ćelije, makrofazi i glatke mišićne ćelije u ateromatozno izmenjenim krvnim sudovima ispoljavaju HSP molekule na svojoj membrani. Time se stvara mogućnost za unakrsnu reakciju. Inače, HSP molekule obično nisu prikazane na površini zdravih ćelija. Njihovo ispoljavanje dešava se pri različitim oblicima **stresa**.

Prevenција i terapija ateroskleroze u kliničkim uslovima podrazumeva:

- maksimalnu eliminaciju faktora rizika uz
- regulaciju nivoa lipoproteina i holesterola (statini) i
- antitrombotičnu terapiju.

Imunomodulatorna¹³ i genska terapija^{11, 12} u prevenciji aterogeneze prikazana je u prethodnom poglavlju. Ako prihvatimo dokaze o inflamatornim aspektima aterogeneze, antimikrobna terapija bi mogla pružiti mogućnost za direktno delovanje na patogeni agens koji injicira kaskadu aterosklerotične bolesti.

Antibiotska terapija

- **tetraciklini** (*doxycyclin*)⁵⁴ i
- **makrolidni antibiotici** (*azithromycin, roxithromycin*) su uspešni u lečenju pacijenata zaraženih sa *Chlamydia pneumoniae*⁴⁰.

Antibiotska terapija uz otklanjanje drugih faktora rizika, može da prevenira razvoj aterogeneze, a njenim ukidanjem dolazi do ponovnog razvoja ateroskleroze^{4, 7, 54}.

Infekcija sa *C. pneumoniae* potvrđena serološkim testovima i detekcijom bakterijskog antigena u plaku akceleriра aterogenezu izazvanu hiperholesterolskom dijetom. Jednonedeljni tretman **azithromycin**-om prevenira intimalno zadebljanje i razvoj aterogeneze na animalnom modelu⁴⁰.

Prevenција vaskularne infekcije antihlamidijalnim tretmanom može biti problematična, obzirom da *C. pneumoniae* koristi cirkulirajuće monocite kao transportni sistem za sistemsku diseminaciju. U monocitima je ona, izgleda, rezistentna na antihlami-

dialnu terapiju. Time je **reinfekcija** moguća, uz dalje stvaranje proinflatornih medijatora^{41, 46}.

Osnovi problem kod antibiotskog lečenja infekcije u aterosklerozi je nespecifično, sistemsko, delovanje leka. Razvijeni su **lipozomi** koji mogu biti konjugovani antitelima, zbog specifičnog dostavljanja **inkapsuliranog azithromycin-a**. Ispitivanje delovanja ovog antibiotika, spakovanog u lipozomima, na rast *C. pneumoniae* u kulturi ćelija, pokazalo je da je efekat statistički značajno bolji, uz omogućavanje dostavljanja azithromycin-a na specifično mesto, za terapijske intervencije u inhibiranju aterogeneze.⁷¹

Svi ovi podaci pokrenuli su lavinu kliničkih studija.

Kliničke studije

U velikom broju **kontrolisanih kliničkih studija** su praćeni efekti specifične antibiotske terapije u pacijenata sa aterosklerozom.

Efekat primene **azithromycin-a**: Prospektivna randomizirana studija uključila je 220 pacijenata koji su preživeli akutni infarkt miokarda. Pacijenti sa koronarnom bolešću su, na osnovu koncentracije specifičnih antitela protiv *C. Pneumoniae*, podeljeni u tri grupe: prva sa nedetektabilnim, druga sa povećanim i treća grupu sa značajno povećanim titorom specifičnih antitela. Zatim je deo pacijenata primio specifičnu antibiotsku terapiju, a deo placebo.

Nakon 18 meseci praćenja, bez terapije, akutni koronarni sindrom se javio u 28% pacijenata u grupi sa jako povećanim titrom antitela, u 15% pacijenata u grupi sa povećanim titrom i u 7% pacijenata u grupi sa odsustvom specifičnih antitela. Kod pacijenata sa značajno visokim titrom antitela koji su primili antibiotsku terapiju akutni koronarni sindrom javio se samo u 8% slučajeva, što odgovara grupi pacijenata sa nedetektabilnim titrom specifičnih antitela¹⁴.

Zaključak je da porast titra anti-*C. pneumoniae* antitela signalizira buduće ishemijske komplikacije ateroskleroze. **Azithromycin**, čak i kao kratkoročna terapija može da smanji rizik od ishemičkih kardiovaskularnih događaja snižavajući nivo anti-*C. Pneumoniae* antitela¹⁴.

Makrolidni antibiotici (**Azithromycin**) mogu da redukuju broj novih ishemijskih epzoda u pacijenata sa aterosklerozom koji su preživeli akutni koronarni sindrom. Pretpostavlja se da makrolidi redukuju *C. Pneumoniae*-indukovanu aktivaciju vaskularnog endotela, **smanjujući nestabilnost plaka**.

Organizovana je prospektivna randomizirana studija u kojoj je praćeno 141 pacijent sa ranijim akutnim koronarnim sindromom, koji su preživeli pre najmanje tri meseca. Jedna grupa bolesnika randomizirana je za terapiju **azithromycin-om**, 500mg dnevno, tokom pet dana, a druga grupa je primala placebo. Rezultati su pokazali da markeri endotelne aktivacije, solubilne adhezivne molekule i inflamatorni markeri nisu bili povezani sa *C. pneumoniae* – seropozitivnošću. Terapija azithromycinom redukovala je nivo solubilnih celularnih adhezivnih molekula (sCAM-1), ali nije uticala na ostale markere inflamacije. Planiraju se studije dugotrajnije antibiotske terapije uz praćenje procesa aktivacije leukocita.⁷⁰

Postavlja se pitanje da li tretman **Azithromycin-om** popravlja endotelnu funkciju u pacijenata sa koronarnom aterosklerotičnom bolešću, koji su seropozitivni na *C. pneumoniae*.

Izvedena je randomizirana, prospektivna, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana studija u koju je uključeno 40 muškaraca sa arteriografski dokumentovanom koronarnom aterosklerotičnom bolešću i pozitivnim Ig antitelima na *C. pneumoniae*. Nakon randomizacije jedna grupa je dobijala **azithromycin**, a druga placebo. Tretman sa azithromycinom, tokom 5 nedelja, doveo je do značajnog popravljavanja endotelne disfunkcije. Registrovan je značajan porast vazodilatacije indukovane protokom, a pad nivoa serumskog E-selektina, vWF, CRP. Odraž ovih nalaza na dugoročnu smanjenu progresiju ili regresiju aterogeneze, kao i smanjivanje mortaliteta i morbiditeta bi trebalo tek da se utvrdi.⁷²

Prospektivna, randomizirana, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana studija - *South Thames Trial of Antibiotics*, **STAMINA**, bavila se praćenjem 324 bolesnika koji su primljeni u bolnicu zbog nestabilne angine ili infarkta miokarda. Randomizacijom su opredeljeni za jednonedeljni tretman,

- azithromycin 500mg,
- amoxycillin 500mg ili
- placebo.

Oba antibiotika dovela su do značajne redukcije učestalosti ponovnih epizoda klinički značajne ishemije tokom godinu dana trajanja studije. **Amoxycillin**-ski tretman je, osim toga, značajno redukovao koncentraciju serumskog fibrinogena, koji je dokazani marker aterosklerotskog rizika. Ukupni nalazi ukazuju da bi protektivni anti-aterogeni efekat antibiotika mogao biti posledica njihovog **anti-inflamatornog** efekta, a ne samo antibakterijskog delovanja⁷³.

Upravo problem inflamacije u pacijenata sa infekcijom *C. pneumoniae* i aterogeneza analiziran je u manjoj, ali prospektivnoj, randomiziranoj, placebo-kontrolisanoj studiji, Gabriel i sar, 2001⁷⁴. Analizirano je 38 pacijenata sa infekcijom *C. pneumoniae* i 15 bolesnika bez infekcije, pri čemu su svi imali ateroskleroza sa koronarnom bolešću. Randomizacijom su bolesnici opredeljeni za terapiju **azithromycin-om** ili placebo. Pokazalo se da bolesnici sa aterogenezom i dokazanom infekcijom *C. pneumoniae* imaju znake prenaplašenog inflamatornog odgovora, pogotovo humoralnog, i sniženu agregabilnost trombocita. **Azithromycin**, je delovao antiaterogeno, moguće i preko fibrinolitičkog sistema, jer je dokazan porast novog t-PA u grupi pacijenata koja je primala ovaj antibiotik⁷⁴.

Azithromycin i njegov anti-aterosklerotski efekat se testira u velikoj studiji, čiji rezultati će biti poznati 2003 godine. Radi se o **WIZARD** *Weekly intervention with zithromax (azithromycin) for atherosclerosis and its related disorders* studiji, koja je prospektivna, randomizirana i placebo-kontrolisana. Uključila je oko 3500 pacijenata sa infarktom miokarda zbog aterosklerotične koronarne bolesti, pre više od 6 meseci, i povišenim titrom anti *C. pneumoniae* antitela. Cij je da se proceni efekat antibiotske terapije u prevenciji kardiovaskularnih događaja i zaustavljanju aterogeneze. Pacijenti će primiti 600 mg **azithromycin**-a dnevno tokom tri dana, a potom istu dozu nedeljno, tokom 11 nedelja ili placebo. Studija traje tri godine⁸⁰.

Treba istaći i nedavno završenu multicentričnu studiju u kojoj je ispitivan efekata **roxithromycin**-a (**ROXIS** – studija), u pacijenta sa nestabilnom anginom ili infarktom bez pojave Q – talasa (nezavisno od titra specifičnih antitela). **Roxithromycin** je pokazao povoljne efekte, kako tokom prvih 30 dana, tako i tokom višemesečnog praćenja u smislu značajnog smanjenja smrtnog ishoda i pojave novog akutnog koronarnog sindroma¹⁵. Međutim, donošenje definitivnih zaključaka otežava saznanje da pored anti-mikrobnog, ispitivani makroloidni antibiotici ispoljavaju i značajan anti-inflamatorni efekat, odnosno da mogu povoljno delovati i nezavisno od eradikacije bakterije.

Međutim, bilo je kliničkih studija sa negativnim rezultatima. U randomiziranoj studiji 873 bolesnika sa akutnim infarktom miokarda tretman sa **roxithromycin**-om (300 mg dnevno, tokom 6 nedelja) nije doveo do redukcije ponovljenih ishemičkih epizoda tokom 12-to mesečnog praćenja³⁸.

Hronična infekcija infekcija sa *Chlamydia pneumoniae* povezana je sa pojavom astme. Šestonedeljni tretman sa **roxithromycin**-om dovodio je do smanjenja tegoba i lakše medikamentozne kontrole astme³¹. *C. pneumoniae* se dokazuje serološki, elektronskomikroskopski u tkivu arterije, PCR i imunocitochemijskim bojenjem, može se izolovati kulturom ćelija iz ateroma. Serološki kriterijumi još uvek nisu potpuno standardizovani, što problematizuje rezultate dosadašnjih kliničkih studija³².

Makrolidni antibiotici (**roxithromycin**) nisu pokazali protektivni efekat (*cardiac events*) u pacijenata sa aterosklerozom u randomiziranoj, placebo-kontrolisanoj studiji u koju je uključeno 84 pacijeta, pa autori predlažu izvođenje veće multicentrične studije koja bi uključila serološku potvrdu hronične *C. pneumoniae* infekcije³³.

Efekat **roxithromycin**-a u eradikaciji *Chlamydia pneumoniae* u karotidnom plaku ispitivan je u prospektivnoj, otvorenoj, randomiziranoj studiji. Analizirano je 32 pacijenata koji su imali karotidnu endarterektomiju. Tokom operacije, za analizu je uzet plak, ali i uzorak lingualne veine i a. thyroid-ea superior. Pre operacije pacijenti su randomizirani da primaju ili roxithromycin 150 mg dvaput dnevno ili placebo, tokom mesec dana. Randomizirane grupe pacijenata su bile komparabilne po faktorima rizika i seroprevalenci za *C. pneumoniae*. Tehnika *polymerase chain reaction* (PCR) korištena je za ispitivanje uzoraka arterije i vene. U serumu je osredivan nivo: IgG, IgA, and IgM antitela na *C. pneumoniae* mikroimunofluorescentnom tehnikom. U 12 od 16 placebo pacijenata su nađeni dokazi o postojanju *C. pneumoniae* DNA u karotidnom plaku. Nasuprot tome, *C. pneumoniae* DNA je otkrivena u samo 5 od 16 pacijenata koji su primali antibiotik ($p=0.034$, Chi-squared test). PCR je bio uvek negativan za lingualnu veinu i thyroid-nu arteriju. Roxithromycin se pokazao efikasan u eradikaciji bakterije *C. pneumoniae* iz aterosklerotskog plaka karotidne arterije³⁴. Bilo bi dobro organizovati duže praćenje (*follow-up*) da bi utvrdili dugotrajni korisni efekat (*long-term benefit*).

Interesantno je pitanje da li hirurška resekcija aortne aneurizme, sa ili bez antibiotskog tretmana, eradiciira infekciju u zidu koja je pokrenula patološki proces.

Vaskularna infekcija sa *Chlamydia pneumoniae* može pokrenuti inflamatornu reakciju koja promovise **neointimalnu hiperplaziju** koja izaziva restenozu nakon arterijskih rekonstrukcija, dilatacija i plasiranja stenta. Da bi se utvrdilo da li lečenje infekcije *C. pneumoniae* sa antibiotikom prevenira restenozu nakon uspešnog plasiranja koronarnog stenta, uključeno je 1010 pacienata u randomiziranu, kontrolisanu studiju.

Jedna grupa primala je makrolidni antibiotik **roxithromycin** 300 mg tokom mesec dana (506), a druga placebo (504). Pojava restenoze (*diameter stenosis* >50%) proveravana je **follow-up** angiografijom. U roxithromycin grupi angiografska restenoza nađena je u 31% , a u kontrolnoj grupi u 29% pacijenata. Visok titar antitela na *C. pneumoniae* bio je povezan sa boljim rezultatima terapije **roxithromycin**-om u prevenciji restenoze³⁵.

Efekat **roxithromycin**-a (150 mg dvaput dnevno, tokom 30 dana) na progresiju intimo-medijalnog kompleksa, *intima-to-media thickness* (IMT) **karotidne arterije** praćen je duplex ultrasonografijom u prospektivnoj randomiziranoj studiji sa *follow-up*-om 2 godine u 272 pacijenta sa ranijim ishemičkim insultom CNS. Merenje IMT i određivanje nivoa anti-*C. pneumoniae* (Cp) antitela (IgG and IgA) vršeno je najmanje 3 godine pre početka **roxithromycin**-ske terapije. Tokom trogodišnjeg praćenja pre antibiotske terapije, Cp-pozitivni pacijenti imali su ubrzanu IMT progresiju, koja nije bila povezana sa drugim faktorima rizika za aterogenezu.

C. pneumoniae pozitivni pacijenti koji su dobijali **roxithromycin** pokazali su signifikantan pad IMT progresije nakon 2 godine u poređenju sa *C. pneumoniae* pozitivnim pacijentima bez terapije ($P < 0.01$). Ova razlika nije nađena kod *C. pneumoniae* negativnih pacijenata. Nađen je pozitivan uticaj antibiotske terapije na progresiju ateroskleroze u Cp-seropozitivnih pacijenata sa cerebrovaskularnim ishemijskim insultom³⁶.

Uticaj antibiotske terapije na aterosklerozu sa simptomima i znacima periferne arterijske okluzivne bolesti je nešto ređe istraživano.

Prospektivna, randomizovana placebo-kontrolisana studija obuhvatila je 40 pacijenata seropozitivnih na *C. pneumoniae* sa **perifernom arterijskom okluzivnom bolešću**. Randomizacijom su formirane dve grupe: prva koja je dobijala **roxithromycin** (300 mg dnevno), a druga placebo tokom 28 dana. Tokom 2.7-godina dugog praćenja nađeno je:

Endovaskularne interventne procedure morale su biti urađene u 20% pacijenata iz roxithromycin-ske grupe, a u 45% bolesnika iz placebo grupe.

Karotidni plak je pokazivao regresiju u **roxithromycin**-skoj grupi, a ostajao je bitno neizmenjen u placebo grupi. Regresija veličine karotidnog plaka opservirana u **roxithromycin**-tretiranoj grupi bila je signifikantna za homogeni (**soft**) plak³⁷.

Skraćenje klaudikacione distance na 200 m ili manje konstatovano je u 20% pacijenata u **roxithromycin**-om tretiranoj grupi, a u 65% u placebo grupi. Uticaj drugih klasičnih faktora rizika za perifernu okluzivnu bolest isključen je primenom multiple regresione analize³⁷. Ukupno, nađen je pozitivan uticaj makrolidne antibiotske terapije na progresiju ateroskleroze u Cp-seropozitivnih pacijenata sa znacima periferne arterijske okluzivne bolesti.

Povezanost između prevencije hroničnih infekcija antibioticima sa zaustavljanjem aterogeneze bi se morala prikazati i redukcijom njenih kliničkih posledica.

Da li upotreba antibiotika snižava rizik od razvoja cerebrovaskularne ishemičke bolesti?

Zbog odgovora na ovo pitanje Brassard i saradnici su ispitali 29 937 starijih osoba na antihipertenzivnoj terapiji, između 1982 i 1995 prema podacima zdravstvenog

osiguranja Quebec. Svaki pacijent sa ishemičkim moždanim udarom upoređivan je sa pet osoba koje su metodom slučajnog uzorka uzete kao kontrola. **Penicillin** se pokazao kao antibiotik sa značajnim protektivnim dejstvom, za razliku od **fluoroquinolona**, **macrolida**, **tetracyclina**, i **cephalosporina**, u odnosu na pojavu ishemičkog moždanog infarkta, šloga³⁹.

Ipak, kako doneti odluku o tome **ko** i **kada** bi trebalo da bude lečen antibiotikom ako želimo da sprečimo i lečimo aterosklerozu.

Serološko ispitivanje nije pouzdan indikator postojanja *C. pneumoniae* u atermatoznim plakovima, dok je detekcija mikroorganizma u monocitima periferne krvi znatno bolji indikator infektivnog procesa u ateromu. Međutim odnos, korelacija, pozitivnog nalaza u makrofazima i ateromu još uvek nije pouzdano utvrđen.

Da problem bude još veći, antibiotskim tretmanom postignuta redukcija ishemičkih incidenata, kao što su infarkt miokarda i mozga ili periferna ishemija, ne mora da znači da je *C. pneumoniae* krivac za njih. Naime, antihlamidijalni lekovi inhibiraju rast nekih drugih mikroorganizama koji bi, takođe mogli biti pokretači aterogeneze. ***Mycoplasma pneumoniae*** se ponaša kao *C. pneumoniae*, epidemiološki, ima istu mogućnost da pokrene autoimune mehanizme i sličnu osetljivost na antibiotike⁴³. ***Mycoplasma gallisepticum***, koja se najčešće sreće u Turskoj ima sličan tropizam za unutrašnje slojeve arterijskog zida⁴⁴.

Iznenadjuće je da su svi pacijenti koji su primali antibiotike, bez obzira da li su u njihovim aterosklerotičnim pločama dokazane bakterije ili ne, klinički bili bolje. Zato autori spekuliraju da antibiotski tretman stabilizuje plak ili da **makrolidni antibiotici imaju antiinflamatorne karakteristike**⁵⁸.

Serološka i imunohistopatološka ispitivanja svakako treba nastaviti, ali antimikrobna terapija svakako zaslužuje proveru u **velikim multicentričnim prospektivnim randomiziranim kontrolisanim studijama**. Osim toga, treba **precizirati indikacije** za antibiotsku prevenciju, koja izgleda verovatnija nego terapija ateroskleroze, imajući u vidu da

- Cp-seropozitivnost nije pouzdan indikator postojanja *C. pneumoniae* u atermatoznim plakovima, a
- detekcija mikroorganizma u monocitima periferne krvi predstavlja bolji indikator infekcije u ateromu.

Antiinflamatorna prevencija i terapija aterogeneze

Aterogeneza se, izgleda, može imunomodulisati.

Imunomodulacija aterogeneze podrazumeva imunosupresivnu terapiju, aktivnu imunizaciju, indukciju tolerancije, intravensko davanje imunoglobulina i manipulacije u okviru sistema citokina, genskom terapijom^{58,77,78}.

Antiinflamatorni efekat je deo uzgrednog delovanja nekih lekova koji se inače koriste u prevenciji i lečenju ateroskleroze.

- **Aspirin**, kao antitrombocitni lek,
- lekovi koji snižavaju nivo lipida u krvi (*Lipid lowering therapy*) **statini**,

- **ACE inhibitori** (*angiotensin-converting enzyme*) itd.

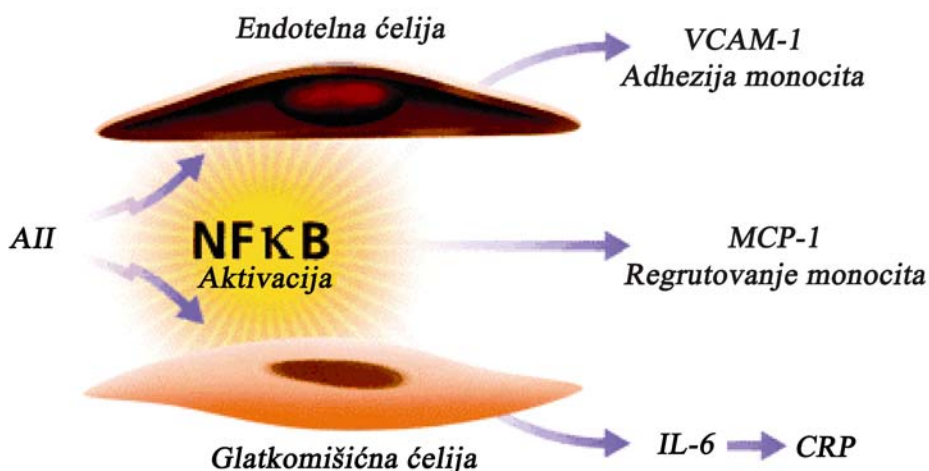
Angiotenzin- konvertujući enzim (*angiotensin-converting enzyme* ACE) inhibitori

ACE je cink-metaloproteinaza, koja katalizira konverziju angiotenzina I u angiotenzin II, koji je potentan vazokonstriktor. ACE se nalazi na endotelnim ćelijama i inflamatornim ćelijama, gde inaktivira bradikinin i supstancu P. Aktivacija ACE dešava se pri endotelnoj disfunkciji, prilikom

- dugotrajne hipertenzije
- diabetes mellitus-a,
- hiperholesterolemije,
- pušenja,
- inflamatornog i oksidativnog stresa,
- proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija⁶²⁻⁷¹.

Mnoge kliničke studije su pokazale neočekivano dobre rezultate u prevenciji akutnih ishemičkih događaja kod bolesnika lečenih angiotenzin-konvertujućim enzimskim inhibitorima. Izgleda da ACE inhibitori imaju druge korisne efekte, osim snižavanja krvnog pritiska. U velikoj studiji *Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE)* trial, ACE inhibitorska terapija dovodila je do skromnog redukovanja krvnog pritiska, ali uz veliku redukciju broja ishemičkih kardiovaskularnih događaja⁵⁹.

Dodavanje ACE inhibitora aspirinu i statinima u terapiji aterogeneze bi moglo imati povoljne sinergistične efekte, redukujući vaskularne proinflamatorne i oksidativne mehanizme⁵⁹⁻⁷⁶.



Slika 28. Angiotenzin II je proinflamatorni medijator. Angiotenzin II pojačava ekspresiju endotelnih adhezivnih molekula, kao što je VCAM-1. Angiotenzin II stimuliše produkciju leukocitnog hemoatraktanta, kao što je monocitni hemotaktički

protein-1 (MCP-1). Angiotenzin II stimulise ekspresiju interleukina-6 (IL-6), koji je deo akutnog inflamatornog odgovora. Angiotenzin II izaziva produkciju reaktivnog oksigena u vaskularnim ćelijama naglašavajući oksidativni stres, koji je snažan proinflamatorni stimulus.

Angiotenzin II aktivira inflamatornu aktivnost u zidu krvnog suda (Slika 28), kao "honorarni" **proinflamatorni** citokin, sa vazokonstriktornim osobinama, on stimulise produkciju **interleukina-6**, **hemotaktički protein za makrofage-1** (MCP-1) u ćelijama glatkih mišića arterije u kulturi⁶⁰⁻⁶³. Angiotenzin II provocira **stvaranje CRP i fibrinogena**, a osim toga menja fibrinolitički balans **pojačavajući PAI-1 ekspresiju**, čija ekspresija je slična dejstvu mnogo poznatijih proinflamatornih citokina⁶⁶.

Terapija ACE inhibitorima redukuje nivo citokina i smanjuje aktivaciju NF- κ B tokom eksperimentalno indukovane ateroskleroze^{64,65}. Aktivacija renin-angiotenzin sistem usporava sintezu reaktivnog kiseonika u zidu krvnog suda, sa svim pozitivnim posledicama⁵⁸.

Inhibicija angiotenzin II signala pomoću ACE inhibitora ili blokatora receptora za angiotenzin II može da deluje kao anti-inflamatorna terapija. Angiotenzin II povećava nivo peptidnog mediatora **bradikinina** prekidajući time dalju angiotenzin II produkciju. Bradikinin, kao endotel-zavisni vazodilatator, povećava lokalnu produkciju azot monoksida NO (*nitric oxide*).

Osim vazodilatatornih osobina, **NO** usporava aterogenezu zbog svojih anti-inflamatornih osobina koje se ispoljavaju preko **interferiranja sa NF- κ B transkripcijskim kontrolnim putem**^{67,68}. Bradikinin podiže intracelularni nivo sekundarnog glasnika cGMP. Porast nivoa cGMP izaziva vazodilataciju relaksirajući glatke mišićne ćelije, što je pozitivan efekat ACE inhibitora.

Dijeta sa povećanim unosom nezasićenih masti može delovati anti-inflamatorno menjajući metaboizam prostanoida. Smanjujući postprandijalnu hiperlipemiju redukuje se proinflamatorno dejstvo endotela. Naime, unošenje i absorpcija velikih količina trigliceridom-bogatih lipoproteina aktivira inflamatornu funkciju endotela⁶⁹.

Interesantana je prospektivna randomizirana studija koja je obuhvatila 124 pacijanta sa dokazanom koronarnom aterosklerozom, koji su svi bili lečeni **aspirinom** i **atorvastatinom**. Randomizacijom su neki od njih dobili dodatno, **ACE inhibitor** Quinapril, 20 mg dnevno, a druga grupa je dodatno primala **angiotenzin tip 1 AT 1 receptorski antagonist**, Irbesarten 120 mg dnevno. Pokazalo se da renin-angiotenzin regulatorni lekovi, uz dodatak aspirina i statina povoljno regulišu markere zapaljenja i oksidacije vaskularnog tkiva⁷⁵, što je zajedno sa restauriranjem regionalne koronarne rezerve protoka korisno u sekundarnoj prevenciji komplikacija ateroskleroze⁷⁶.

Vulnerabilnost plaka je mera njegove sklonosti da se razvijanjem rupture ili prizidne tromboze prevede iz asimptomatsko stanje u emboligeno značajan, simptomatski plak. Vulnerabilnost plaka zavisi od

- očuvanosti endotelne barijere, disfunkcija endotela
- histološke kompozicije (homogen, heterogen) i na kraju
- procenta stenotičnog suženja.

Integritet i stabilnost aterosklerotičnog plaka najviše zavisi od konstituenta **ekstracelularnog matriksa** (kolagen tip I i III, elastin i proteoglikan). Glatke mišićne ćelije arterijskog zida sintetišu makromolekule matriksa. **Citokini i lokalni faktori rasta** (*growth factors*) iz endotelnih ćelija i trombocita regulišu ovu sintetsku funkciju glatkih mišićnih ćelija⁷⁷. Redukcija nivoa lipida u plazmi smiruje inflamatorne procese u aterosklerotičnom plaku.⁷⁸

Lekovi koju snižavaju nivo serumskih lipida (*lipid-lowering drugs*), **statini**, dovode do porasta sadržaja kolagena u ekstracelularnom matriksu, porasta broja lokalnih glatkih mišićnih ćelija i pada svih znakova inflamacije u aterosklerotičnom plaku. Na taj način se favorizuje stabilizacija plaka i smanjuje njegova prokoagulantna površinska aktivnost. Lekovi koju snižavaju nivo serumskih lipida redukuju broj trombotičkih komplikacija u pacijenata sa aterosklerozom. To objašnjava zašto terapija lekovima koji snižavaju nivo lipida u serumu dovode ne samo do lokalnog zaustavljanja progresije aterogeneze, već smanjuju i broj ishemičkih incidenata: infarkt mozga, infarkt srca, TIA itd.⁷⁹.

LITERATURA

1. Bhakdi S: Immunopathogenesis of atherosclerosis: the Mainz concept. *Ann Med* 30:503, 1999.
2. Saikku P: Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 14;116:273-8, 1992.
3. Bellosta S: Infections, CHD and atherosclerosis. XIIth International Symposium on Atherosclerosis. Stockholm, 166 Abstack, 2000.
4. Koehler L, Kuipers JG, Zedler H: Persistent Chlamydial Infections. *Biomedical Progress* 15:28-34, 2002.
5. Gallagher PJ, Gibney MJ and Taylor TG: Dietary antigens, immune tolerance and atherosclerosis. *Artery* 8(4):315-322, 1980.
6. Geertinger P: The complement sistem and the initiation of atherosclerosis with special reference to the preventive effect of chronic alcoholism. In: *Immunity and atherosclerosis. Proc of the Sero Symp*, London 24:151-164, 1980.
7. Joris I and Majno G: Atherosclerosis and inflammation. *Adv Exp Med Biol* 104:227-233, 1978.
8. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM and Minick CR: Virus induced atherosclerosis. *J Exp Med* 148:335-340, 1978.
9. Mathews JD and Ferry BJ: Cholesterol and the immune response to influenza antigens. *Lancet*, ii: 1212-1213, 1978.
10. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
11. Feldman LJ, Isner JM: Gene therapy for the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 26:826-35, 1995.
12. Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IGH: Cytokines and gene therapy. *Immunology Today*. 16(4):173-75, 1995.

13. Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 1: 21-27, 2002.
14. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*, 96(2):404-7, 1997.
15. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the Roxis Studi. *Eur Heart J*. 20(2):121-7, 1999.
16. 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*. 31(6):1217-510, 1998.
17. Carlisle SS, Nahata MC. *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease. *Ann Pharmacother*, 33(5):615-22, 1999.
18. Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A, Kreuzer J, Maass M, Katus Ha. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation* Apr. 18, 101(15):1760-3, 2000.
19. Krull M, Klucken AC, Wuppremann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J, Hippenstiel S, Hegemann JH, Jantos CA, Suttorp N. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol*, 162(8): 4834-41, 1999.
20. Rodel J, Woytas M, Groh A, Schmidt KH, Hartmann M, Lehmann M, Straube E. Production of basic fibroblast growth factor and interleukin 6 by human smooth muscle cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 68(6):3635-41, 2000.
21. Pakodi F, Abdel – Salam OM, Debrececi A, Mozsik G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J Physiol Paris*, 94(2):139-52, 2000.
22. Markus HS, Mendall MA. *Helicobacter pylori* infection: a risk factor for ischaemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64(1): 104-7, 1998.
23. Gurfinkel E, Scirica B, Bozovich G. Atherosclerosis and infection – have we forgotten something? *Eur Heart J*. 19:677-8. 33, 1998.
24. Folsom AR, Nieto FJ, Sorlie P, Chambless LE, Graham DY. *Helicobacter pylori* seropositivity and coronary heart disease incidence. Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation*, 98(9):845-50, 1998.
25. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux N, Levy J, Blakeston C, Seymour CA, Camm AJ. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ*, 311(7007):711-4, 1995
26. Pellicano R, Broutet N, Ponzetto A, Megraud F. *Helicobacter pylori*: from the stomach to the heart. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11(11):1335-7, 1999.
27. Bhakdi S. Pathogenesis of atherosclerosis: infectious versus immune pathogenesis. A new concept. *Herz*, 25(2):84-6, 2000.
28. Scannapieco FA, Genxo RJ, Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. *J Periodontal Res*, 34(7):340-5, 1999.

29. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J.* 138(5 Pt 2): S534-6, 1999.
30. Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H, Nagai A, Kurihara H, Muryama Y. Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett*, 124(1):121-2, 1994.
31. Black PN, Blasi F, Jenkins CR, Scicchitano R, Mills GD, Rubinfeld AR, Ruffin RE, Mullins PR, Dangain J, Cooper BC, David DB, Allegra L. Trial of roxithromycin in subjects with asthma and serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug 15. 164(4):36-41, 2001.
32. Boman J, Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev.* Jan. 15(1):1-20, 2002.
33. Leowattana W, Bhuripanyo K, Singhaviranon L, Akaniroj S, Mahanonda N, Samranthin M, Pokum S. Roxithromycin in prevention of acute coronary syndrome associated with *Chlamydia pneumoniae* infection: a randomized placebo controlled trial. *J Med Assoc Thai.* Dec. 84 Suppl 3:S669-75, 2001.
34. Melissano G, Blasi F, Esposito G, Tarsia P, Dordoni L, Arosio C, Tshomba Y, Fagetti L, Allegra L, Chiesa R. *Chlamydia pneumoniae* eradication from carotid plaques. Results of an open, randomised treatment study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* Oct. 18(4):355-9, 1999.
35. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, Pogatsa-Murray G, Mehili J, Valina C, Joethaei N, da Costa CP, Wagner H, Schomig A. Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection with roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* Jun 30. 357(9274):2085-9, 2001.
36. Sander D, Winbeck K, Klingelhofer J, Etgen T, Conrad B. Reduced progression of early carotid atherosclerosis after antibiotic treatment and *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Circulation.* Nov 5. 106(19):2428-33, 2002.
37. Wiesli P, Czerwenka W, Meniconi A, Maly FE, Hoffmann U, Vetter W, Schulthess G. Roxithromycin treatment prevents progression of peripheral arterial occlusive disease in *Chlamydia pneumoniae* seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation.* Jun 4. 105(22):2646-52, 2002.
38. Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M, Gottwik M, Altmann E, Seidel F, Rox J, Hoffler U, Neuhaus KL, Senges J; Working Group of Leading Hospital Cardiologists. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation.* Mar 11. 107(9):1253-9, 2003.
39. Brassard P, Bourgault C, Brophy J, Kezouh A, Suissa S. Antibiotics in Primary Prevention of Stroke in the Elderly. *Stroke.* Aug 7 [Epub ahead of print]. 2003.
40. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe E, Carlquist JF. Infection With *Chlamydia pneumoniae* Accelerates the Development of Atherosclerosis and Treatment With Azithromycin Prevents It in a Rabbit Model; *Circulation.* 97:633-636, 1998.
41. Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Werner Solbach, Matthias Maass. *Chlamydia pneumoniae* Infection in Circulating Human Monocytes Is Refractory to Antibiotic Treatment. *Circulation.* 103:351-356, 2001.
42. Maass M, Krause E, Krüger S, Engel PM, Bartels C. Coronary arteries harbour viable *C pneumoniae*. Fourth international symposium on modern concepts in endocarditis and cardiovascular infections, Yverdon-Les-Bains, Switzerland, May 1997. (Abstract No 101.)

43. Clyde WA, Thomas L. Tropism of *Mycoplasma gallisepticum* for arterial walls. *Proc Natl Acad Sci.* 70:1545-9, 1973.
44. Strachan DP, Carrington D, Mendall MA, Ballam L, Morris J, Butland BK, Elwood PC. Relation of *Chlamydia pneumoniae* serology to mortality and incidence of ischaemic heart disease over 13 years in the Caerphilly prospective heart disease study. *BMJ*, 318:1035-1040 (17 April), 1999.
45. Fong IW. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. *CMAJ.* July 11. 163 (1):1035-1040, 2000.
46. Lowe GDO, Kweider M, Murray GD, Kinase D, McGowan DA. Fibrinogen and dental disease - a coronary risk factor. In: Ernst E, Koenig W, Lowe GDO, Meade T, editors. *Fibrinogen - a „new” cardiovascular risk factor.* Oxford: Blackwell, . p. 187, 1992.
47. Matilla KJ, Rasi V, Nieminen M. Von Willebrand factor antigen and dental infections. *Thromb Res.* 56:325-91, 1989.
48. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 66:5337-43, 1998.
49. Herzberg MC, MacFarlane GD, Gong K. The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 60:4809-18, 1992.
50. Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. Activation of blood coagulation factor X by anginase-specific cysteine proteinase (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* 272:16062-7, 1997.
51. Herzberg MC, Meyer MW. Dental plaque, platelets and cardiovascular disease. *Ann Periodontol*, 3:151-60, 1998.
52. Markus HS, Mendall MA. *Helicobacter pylori* infection: a risk factor for ischaemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64:104-7, 1998.
53. Taylor-Robinson T, Thomas D, Goldin R and R Stanbridge. *Chlamydia pneumoniae* in infrequently examined blood vessels. *Journal of Clinical Pathology* 55:218-220, 2002.
54. Tanne JH. Antibiotics may prevent heart attacks. *BMJ*, 318:417, 1999.
55. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 342:836–843, 2000.
56. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J, Etgen Z, Conrad B. Enhanced Progression of Early Carotid Atherosclerosis Is Related to *Chlamydia pneumoniae* (Taiwan Acute Respiratory) Seropositivity. *Circulation.*;103:1390, 2001.
57. Virok D, Kis Y, Karai L, Intzedy L, Burian K. *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerotic Middle Cerebral Artery. *Stroke.* 32:1973, 2001.
58. Agen C, Danesi R, Blandizzi C, Costa M, Stacchini B, Favini P, Del Tacca M: Macrolide antibiotics as antiinflammatory agents: Roxithromycin in an unexpected role. *Agents & Actions*, Vol 38:-2, 1993.
59. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 342:145–153, 2000.
60. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1623–1629, 1999.

61. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, et al. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappa B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:826–828, 1999.
62. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res.* 84: 695–703, 1999.
63. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, et al. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 83: 952–959, 1998.
64. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation.* 95:1532–1541, 1997.
65. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, et al. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol.* 153:1825–1837, 1998.
66. Brown NJ, Vaughan DE. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med.* 45:419–429, 2000.
67. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 85: 23–28, 1999.
68. DeCaterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 96: 60–68, 1995.
69. Hackman A, Abe Y, Insull I, et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation.* 93: 1334–1338, 1996.
70. Hillis GS, Pearson C, Dawson P, Stirling D, Ludlam CA, Fox KAA, Flapan AD. The effect of azithromycin on soluble cell adhesion molecules and markers of inflammation: A randomised double blind placebo controlled study, *European Heart Journal*, 4: Abstr. Suppl. 260, 2002.
71. Tiukinhoy SD, Khan A, Huang S, MacDonald RC, McPherson DD. Novel acoustic azithromycin/encapsulated liposomes inhibit chlamydial growth in endothelial cells. *Journal of American College of Cardiology*, 39(5, Suppl. A);1, 2002.
72. Parchure N, Zouridakis E, Kaski JS. Azithromycin treatment improves endothelial function in patients with coronary artery disease and evidence of chlamydia pneumoniae infection. *European Heart Journal*, 4(Abstr. Suppl.):594, 2002
73. Kaski J, Stone AFM, Mendall MA, Edger TM, Gupta S, Poleniecki J, Camm AJ, Northfield TC. The South Thames trial of antibiotics in myocardial infarction and unstable angina STAMINA trial, *European Heart Journal*, 22(Abstr. Suppl.) :643, 2001.
74. Gabriel A, Ahnve S, Gnarpe H, Gnarpe J, Martinson A. Chlamydia pneumoniae infection in patients with coronary artery disease. Effect of azithromycin therapy on infection, inflammation, coagulation and blood lipids. *European Heart Journal*, 22(Abstr. Suppl.):648, 2001.
75. Khan B, Lauten WB, Khan QA, Rahman ST, Pathasarathy. Inhibition of the renin-angiotensin system regulates the anti-inflammatory response of statins and aspirin in coronary artery disease. *European Heart Journal*, 4(Abstr. Suppl.):172, 2002.

76. Horning B, Hausmann D, Borner A, Klocke J, Jategeonkar S, Engberdig N, Knapp W, Drexler H. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and AT 1-receptor antagonism on myocardial perfusion in patients with endothelial dysfunction. *European Heart Journal*, 4(Abstr. Suppl.): 462, 2002.
77. Aikawa, M., E. Rabkin, S. Sugiyama, et al. An HMG-CoA Reductase Inhibitor, Cerivastatin, Suppresses Growth of Macrophages Expressing Matrix Metalloproteinases and Tissue Factor In Vivo and In Vitro. *Circulation* 103: 276-283, 2001.
78. Aikawa, M. & P. Libby. Lipid lowering reduces proteolytic and prothrombotic potential in rabbit atheroma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 902: 140-152.
79. Robbie L and P Libby. Inflammation and Atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 947:167-180, 2001.
80. Dune MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: The WIZARD (Weekly intervention with zithromax (azithromycin) for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J.Infect Dis.* 181(Suppl 3): S572-8, 2000.