

Uloga i značaj oligoelemenata u patogenezi ateroskleroze

Nebojša Tasić*, Đorđe Radak*, Zoran Cvetković†, Branko Petrović*, Nenad Ilijevski*, Gordana Đorđević-Denić†

*Institut za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, Beograd, Medicinski fakultet, †Institut za histologiju, ‡Institut za patofiziologiju, Beograd

K l j u č n e r e č i : arterioskleroza; elementi u tragu; bakar; cink; gvožđe; selen; mangan; lipidi.

K e y w o r d s : arteriosclerosis; trace elements; copper; zinc; iron; selenium; manganese; lipids.

Uvod

Ispitivanja patogeneze ateroskleroze, odnosno endotelne disfunkcije, danas su u centru naučnih istraživanja kako u inostranstvu tako i u našoj zemlji (1, 2). U tom smislu najveći deo istraživanja je vezan za klasične faktore rizika (3). Nove metodologije u ispitivanju patogeneze ateroskleroze su omogućile da se istraživanja prošire i na druge manje poznate faktore rizika (4). U poslednjih nekoliko godina, pored klasičnih faktora rizika (hiperholesterolemija, pušenje, šećerna bolest, hipertenzija, stres i dr.) koji su predmet brojnih istraživanja sve veći značaj se pridaje drugim faktorima za koje se pokazalo da mogu imati značajnu ulogu u patogenezi ateroskleroze. U tom smislu posebno polje istraživanja su oligoelementi koji su neophodni za normalno funkcionisanje organizma, pa i kardiovaskularnog sistema (5). U patogenezi ateroskleroze opisano je više od 30 oligoelemenata na čiji metabolizam antagonistički ili sinergistički deluju neorganski ili organski sastojci hrane različitog porekla. Smatra se da je najmanje 18 oligoelemenata od vitalnog značaja za žive organizme. Kao najznačajnije oligoelemente treba izdvojiti bakar, cink, hrom, mangan, nikl, olovo i selen.

Cilj ovog rada je prikaz uloge i značaja nekih oligoelemenata u nastanku aterosklerotskog plaka.

Bakar

Kao važan sastojak brojnih enzima bakar je neophodan za mnoge funkcije organizma (ćelijsku respiraciju, apsorpciju gvožđa, stvaranje hemoglobina, stvaranje pigmenta).

Njegov nedostatak u organizmu može dovesti do anemije, osteoporoze, neuroloških poremećaja, psihoze i drugih poremećaja. Koncentracija bakra u serumu zdravih osoba iznosi od 11 do 20 $\mu\text{mol/l}$ (tabela 1). Smatra se da čak 35% populacije ne unosi dovoljne količine bakra ishranom. Preporučeni dnevni unos bakra je oko 2 mg (6).

Klinički podaci

Ranije studije su pokazale da je povišeni rizik da dođe do kardiovaskularne bolesti udružen kako sa sniženim tako i sa povišenim vrednostima bakra u plazmi (7). Poznato je da je bakar sastojak antioksidantnih enzima i u tom smislu mu se pripisuje zaštitni efekat na kardiovaskularni sistem. Aktivnost antioksidantnih enzima (glutation-peroksidaze i superoksid-dizmutaze) zavisi od oligoelemenata, prvenstveno bakra, cinka i selen (8). Novije studije su istakle da je bakar esencijalni oligoelement za kardiovaskularni sistem (9). U patogenezi ateroskleroze poseban značaj pridaje se odnosu koncentracije bakra i lipidnog statusa bolesnika. Veliko epidemiološko ispitivanje pokazalo je direktnu povezanost nivoa bakra i holesterola u serumu. Isti autori su pokazali udruženost deficita bakra sa poremećajem sinteze elastina krvnih sudova (10). Anke je utvrdio da su povećane serumске koncentracije holesterola bile povezane i sa višim i sa nižim koncentracijama bakra u serumu (11). Smatra se da oksidacija LDL u subendotelnom prostoru ima važnu ulogu u procesu ateroskleroze. Kod osoba sa femoralnom aterosklerozom utvrđena je visoka pozitivna korelacija između

nivoa bakra, ukupnog i LDL holesterola i niska korelacija sa HDL holesterolom (12). Endotelne ćelije proizvode superoksidne anjone ($O_2^{\cdot -}$), čija uloga u procesu oksidacije LDL *in vivo* nije dovoljno jasna. *In vitro*, povećava se oksidacija humanog LDL-a u uslovima inkubacije sa endotelnim ćelijama aorte goveda ili svinje. Egzogeni bakar, cink superoksid-dizmutaza snižava oksidaciju LDL za oko 80%. Infekcijom endotelnih ćelija adenovirusnim vektorom koji sadrži DNK za humanu bakar, cink superoksid-dizmutazu (Ad-Cu/ZnSOD) ili mangan superoksid-dizmutazu (MnSOD) povećavaju se intraćelijski sadržaj i aktivnost ovih enzima, što ima za posledicu smanjeno oslobađanje ćelijskog $O_2^{\cdot -}$ za dve trećine. U kulturi inficiranih endotelnih ćelija smanjena je oksidacija LDL-a za 77% (AdCu/ZnSOD), odnosno 32% (MnSOD) (13). Aktivnost bakra cink superoksid-dizmutaze u eritrocitima pozitivno korelira sa koncentracijom bakra kod zdravih osoba, dok kod obolelih osoba nije utvrđena pozitivna korelacija. Ovi nalazi sugerišu poremećaj odnosa između koncentracije bakra i bakra, cink superoksid-dizmutaze u patološkim uslovima (6). Isti autori su još 1997. godine pokazali da su kod bolesnika sa obliterantnom aterosklerozom koncentracije bakra i cinka veće u plakovima nego u okolnom tkivu. Takođe su kod obolelih od pomenute bolesti pronađene povišene koncentracije bakra u serumu (14).

Eksperimentni podaci

Izvršene su brojne eksperimentne studije u kojima je ispitana uloga bakra u metabolizmu holesterola i patogenezi ateroskleroze. Ranije studije su pokazale da je deficit bakra kod pacova bio u značajnoj korelaciji sa povećanim vrednostima holesterola (15). Novije studije su pokazale različitu distribuciju frakcija lipoproteina (u smislu veličine i broja) u odnosu na deficit bakra. Uvećanje veličine brojno nepromenjenih čestica karakteristično je za VLDL, dok kod HDL dolazi do povećanja broja bez promene veličine. Jedino je kod LDL frakcije utvrđeno povećanje i broja i veličine čestica (16).

U uslovima eksperimentno izazvanog deficita bakra dolazi do poremećaja više enzima koji poseduju antioksidantnu aktivnost (bakar, cink superoksid-dizmutaza i citohrom c-oksidaaza) i učestvuju u stvaranju ATP-a. Aktivnost ovih enzima se u različitoj meri snižava u limfocitima, neutrofilnim leukocitima i monocitima periferne krvi. Ovi efekti utiču na slabljenje ćelijskog imuniteta (17).

Studija Fieldsa i saradnika je pokazala značajne razlike prema polu u uslovima dijetom uzrokovanog deficita bakra kod pacova (18). U ovoj studiji je pokazan značajno veći mortalitet pacova muškog pola. Parametri deficita bakra bili su istovetni i nezavisni od pola ili tipa indukcione dijetete. Rezultati pokazuju da su ženke pacova na neki način zaštićene od letalnih posledica deficita bakra. Dalja istraživanja su pokazala da su posledice deficita bakra kod mužjaka umanjene kastracijom mužjaka. Rezultati ukazuju da bi nivo testosterona mogao imati ulogu u nastanku posledica deficita bakra (19).

Hamilton i saradnici ukazuju na funkcionalne i strukturne promene na krvnim sudovima slične promenama kod koronarne bolesti u uslovima deficita bakra kod životinja (9). Dijetom izazvan deficit bakra kod miševa dovodi do promena na aorti i do povećanja serumskog holesterola. Rezultati pokazuju da početne patološke promene ne zavise od stepena deficita bakra.

Pored deficita bakra, ispitivan je i uticaj povećane koncentracije bakra u različitim eksperimentnim uslovima. Citotoksički efekti bakra ispitivani su primenom bakarsulfata u kulturama humanih vaskularnih endotelnih ćelija i fibroblasta. Pokazano je da je citotoksičnost bila izraženija na endotelnim ćelijama i da je efekat bio doznno zavisna. Imajući u vidu da je disfunkcija endotela početak aterosklerotskog procesa, ovo ukazuje na značaj poremećaja bakra u ranim fazama patogeneze ateroskleroze (20).

Eksperimentno ispitivanje odnosa između ateroskleroze i hiperholesterolemije kod zečeva početkom prošlog veka pokazalo je da povećanje holesterola i bakra u plazmi i sniženje bakra u jetri dominiraju u rezultatima ispitivanja životinja na holesterolskoj dijeti. Ovi rezultati su u skladu sa naknadno postavljenim teorijskim modelom uloge deficita bakra u etiopatogenezi ishemijske bolesti srca (21). U novijoj studiji u kojoj je ispitivana uloga bakra u aterogenetskim procesima tako što su životinjama na holesterolskoj dijeti davane različite količine bakra, koncentracija bakra i aktivnost superoksidne dizmutaze u zidu aorte korelirala je sa količinom unetog bakra. Histološki nalazi prilikom pregleda zida aorte žrtvovanih životinja pokazali su značajno veće aterosklerotske promene kod životinja sa visokim unosom bakra u odnosu na grupu koja nije unosila bakar (22). Istraživanje naših autora je pokazalo statistički značajno niže vrednosti ukupnog sadržaja bakra u aterosklerotskom plaku u grupi sa ulcerisanim plakom u odnosu na kontrolnu grupu bez izražene ateroskleroze (23).

Cink

Cink je esencijalni sastojak biomembrana neophodan za njihovo održavanje i funkciju. Neophodan je za metabolizam proteina i ugljenih hidrata, funkcionisanje nekih žlezda (prostata), kao i mnoge druge funkcije. Dokazano je njegovo antiaterogeno dejstvo putem prevencije metaboličkih poremećaja vaskularnog endotela. Antioksidantnim svojstvima i stabilizacijom membrana cink predstavlja ključnu zaštitu od destabilizujućih agensa, prvenstveno polinezasićenih masnih kiselina i inflamatornih citokina. Koncentracija cinka u serumu zdravih osoba iznosi od 11 do 24 $\mu\text{mol/l}$ (tabela 1). Preporučeni dnevni unos cinka je 15 mg (6).

Eksperimentni podaci

U uslovima deficita cinka sadržaj serumskog holesterola kod životinja se po pravilu snižava. Nije potpuno razjašnjen uticaj visokih doza cinka na proces aterogeneze (11). Smatra se da cink ima protektivno dejstvo u održavanju integriteta endotela i da je ovaj efekat u vezi sa aktivacijom citokina u uslovima oksidativnog stresa. Mehanizmom sprečavanja dis-

Tabela 1

Koncentracije nekih oligoelemenata u serumu i urinu zdravih osoba*

Element	Koncentracija u serumu	Koncentracija u urinu
Arsen	<10 µg/l	<40 µg/l
Hrom	<0,5 µg/l	<0,25 µg/l
Bakar	11-20 µmol/l	<0,9 µmol/24 h
Olovo	<0,7 µmol/l	<400 nmol/24 h
Mangan	0,5-1,3 µg/l	0,1-1,5 µg/24 h
Nikl	0,1-1,3 µg/l	0,5-6 µg/24 h
Selen	0,9-1,6 µmol/l	<0,38 µmol/l
Cink	11-24 µmol/l	4,5-9 µmol/24 h

*Referentne vrednosti prema laboratoriji za oligoelemente, Royal Surrey County Hospital, Guildford, Velika Britanija (40)

funkcije endotelnih ćelija u lancu ushodne regulacije inflamatornih citokina objašnjava se značaj cinka u aterogenezi (24). Posle primene cinka u kulturi endotelnih ćelija aorte goveda utvrđeno je uvećanje njihovog broja (25). Smatra se da ovaj jedinstveni stimulativni efekat na umnožavanje endotelnih ćelija cink ostvaruje preko interakcije sa endogenim baznim fibroblastnim faktorom rasta (bFGF).

Eksperimentno je pokazano da cink potencira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija u prisustvu fibroblastnog faktora rasta. Ovim dejstvom se objašnjava njegova uloga u hiperplaziji intime tokom aterogeneze (26).

Smatra se da cink štiti od aktivacije tzv. transkripcijskih faktora oksidativnog stresa: nukleusnih faktora kappa B i AP-1. U tom smislu je poznato da određeni lipidi i nedostatak cinka mogu da potenciraju citokinima uslovljenu inflamatornu reakciju i disfunkciju endotela u procesu ateroskleroze. Na taj način antiaterogenost cinka se sastoji u mogućnosti inhibicije nastanka endotelne disfunkcije pod uticajem faktora koji nastaju u toku oksidativnog stresa (27). Ovo je potvrdio i Addis koji je svrstao cink u grupu antiaterogenih faktora sa bakrom, manganom i selenom (28). Dokazano je da su potrebe vaskularnih endotelnih ćelija za cinkom uvećane u toku inflamatornih procesa gde su procesi apoptoze prevalentni. Apoptoza predstavlja svojstven mehanizam programirane smrti ćelija, koja podrazumeva aktivaciju ćelijskog suicidalnog programa od strane inflamatornih citokina i produkata oksidacije lipida. Zbog stalne ekspozicije dejstvu sastojaka krvi endotelne ćelije su veoma podložne uticaju oksidativnog stresa. Nedostatak cinka povećava efekte delovanja specifičnih masnih kiselina i inflamatornih citokina (TNF) na vaskularne endotelne ćelije. Veruje se da se zaštitno delovanje cinka na integritet endotelne barijere u patološkim uslovima ostvaruje mehanizmom inhibicije delovanja signala na aktivaciju ćelijskog suicidalnog programa i ushodne regulacije inflamatornih citokina (29).

Snižene vrednosti cinka u aterosklerozi su poznate od ranije (30), a posledice su vezane za smanjenje mitogene funkcije endotelnih ćelija, kao i smanjenu migraciju neutrofila i ostalih polimorfonuklearnih ćelija pod uticajem bFGF (25, 31).

Ulogu cinka u aterogenezi potvrđuju i rezultati eksperimenata kojima je dokazana njegova uloga u indukciji agregacije trombocita *in vitro*. Smatra se da se agregacioni efekat cinka ostvaruje preko membranskih receptora trombocita za fibrinogen (glikoproteini IIb i IIIa). Agregacioni efekat izostaje kod trombocitnih i normalnih trombocita prethodno tretiranih monoklonskim antitelima koja blokiraju membranske receptore (32). Na osnovu eksperimentnih rezultata došlo se do zaključka o jedinstvenom efektu cinka da u interakciji sa trombospodinom (TSP) stimuliše umnožavanje glatkih ćelija aorte goveda. Kako se velika količina TSP posle agregacije oslobađa iz alfa-granula trombocita, veruje se da cink uvećava njegovu aktivnost koja je značajna u fiziologiji vaskularnog tkiva (33).

Klinički rezultati

Ispitivanje sadržaja različitih oligoelemenata u krvi i organima zdravih osoba sa aterosklerozom pokazalo je sniženje sadržaja cinka i povećanje koncentracije bakra kod starijih ispitanika sa razvijenim aterosklerotskim promenama. Primena inhibitora HMGCoA reduktaze (fluvastatin) dovela je do sniženja ukupnog holesterola (24%), triglicerida (26%) i cinka u plazmi (8%), što ukazuje na povezanost cinka sa metabolizom lipida (34).

Cink je esencijalni oligoelement antioksidantnih svojstava značajan za stabilizaciju membrana i aktivnost cink-metaloenzima. U *in vitro* ispitivanjima dokazano je da deficit cinka dovodi do oštećenja endotelne barijere (31).

Postmortalno ispitivanje sadržaja oligoelemenata u aorti kod akcidentno poginulih osoba pokazalo je da je njihov nivo viši u fibroznim plakovima nego u zidu zdrave aorte. Ova razlika je bila visoko statistički značajna (35). U drugoj studiji metodom protonima-uzrokovane emisije rendgenskih zraka (PIXE) posmrtno su ispitivani kalcifikovani aterosklerotski plakovi i uzorci zida karotidne račve bez plakova. U svim uzorcima otkriven je cink, dok je bakar otkriven samo u uzorcima bez aterosklerotskih plakova (36). Prilikom obdukcije osoba umrlih od ishemijske bolesti srca utvrđene su niže vrednosti cinka i bakra u plakovima trbušne aorte nego u kontrolnoj grupi umrlih iz drugih razloga sa zdravom aortom (37). U studiji Mielcarza i saradnika kod

osoba iste starosti obolelih od femoralne ateroskleroze ispitivani su nivoi oligoelemenata i holesterola u serumu (38). Utvrđeni su statistički značajno viši nivoi oligoelemenata i ukupnog holesterola i niži nivoi HDL holesterola, dok razlike nije bilo u koncentraciji LDL holesterola u odnosu na kontrolnu grupu. Nađene razlike ukazuju na moguću vezu oligoelemenata i poremećenog metabolizma holesterola.

Unos velikih količina cinka može da stimuliše aterogenezu povećanjem agregacionih svojstava trombocita i indukcijom sekundarne hipokupremije čiji su efekti poremećaj lipida (sniženje HDL, povećanje ukupnog i LDL holesterola) i biohemijska modifikacija konstituenata arterijskog zida. Sa druge strane, deficit cinka dovodi do uvećanog stvaranja slobodnih radikala i konsekventnih oštećenja. Potrebno je voditi računa i o antagonističkom dejstvu cinka na kalcijum, čime nestaje više njegovih povoljnih dejstava na aterogenezu. Kod osoba sa dokazanom koronarnom ateroskleroznom bolešću nije utvrđena korelacija nivoa cinka i bakra u plazmi sa serumskim koncentracijama lipida i lipoproteina. Stoga neki autori smatraju da se vrednosti ovih oligoelemenata ne mogu smatrati pouzdanim markerom koronarne bolesti (39).

Starenjem koncentracija cinka u serumu značajno se smanjuje kod zdravih i obolelih od obliterantne ateroskleroze u svim stadijumima bolesti za razliku od obolelih od thrombangiitisa obliteransa kod kojih takva korelacija nije utvrđena (14). Cvetković je našao statistički značajno niže vrednosti ukupnog sadržaja cinka u aterosklerotskom plaku u grupi sa ulcerisanim plakom u odnosu na kontrolnu grupu (23).

Odnosu cink/bakar u ishrani i u organizmu pridaje se poseban značaj u patogenezi ateroskleroze. Ispitivanjem bakra i cinka u kosi osoba posle infarkta miokarda nađena su značajna povećanja koncentracije cinka i odnosa cink/bakar (41). Ispitivanjem lokalizacije i koncentracije elemenata u različitim slojevima zida krvnog suda (metodom protonima uzrokovane emisije rendgenskih zraka) pokazano je da *tunica media* poplitealne arterije sadrži najveću koncentraciju cinka (42).

Gvožđe

Gvožđe je jedan od najvažnijih oligoelemenata, čiji je najveći deo u telu uskladišten u molekulima hemoglobina. Ostatak je neophodan sastojak važnih enzima i koenzima (peroksidi, citohrom). Potrebne dnevne količine su 10–20 mg. Uloga gvožđa u procesu ateroskleroze nije dovoljno proučena. Nekoliko epidemioloških studija je pokazalo da je nivo depozita gvožđa u organizmu u direktnoj korelaciji sa incidencom koronarne bolesti kod ljudi. Chau i saradnici su uočili značajne depozite gvožđa u humanim aterosklerotskim lezijama koje su bile lokalizovane neposredno uz oksidovane lipoproteine (43). Poznato je da gvožđe može da vrši inhibiciju oksidacije LDL u endotelnim ćelijama, a time i zaštitnu ulogu u procesima oksidativnog oštećenja ćelije (44). Gvožđe smanjuje toksičnost lipidne hidroksiperoksidaze koja dovodi do oštećenja endotelne ćelije. Matthews i saradnici su pokazali da su primenom helata gvožđa deferiprona *in vivo* i *in vitro* značajno usporili proces aterogeneze,

iako nije značajnije promenjena koncentracija gvožđa u serumu (45). Studija Cvetkovića i saradnika pokazala je značajno sniženje gvožđa u aterosklerotskom plaku u odnosu na normalno karotidno tkivo (23).

Selen

Selen je neophodan sastojak enzima glutathion-peroksidaze i mišićnog citohroma, što mu daje poseban značaj u uslovima oksidativnog oštećenja ćelije, posebno karcinogeneze i kardiovaskularnih oboljenja. Glutathion peroksidaza se nalazi u mnogim ćelijama (eritrociti, leukociti, makrofagi, trombociti i druge) i nedostatak selen može dovesti do brojnih poremećaja: hemolize eritrocita, poremećaja homeostaze, edema i peroksidacije kapilarnih membrana, oštećenja jetre i drugih. Normalna koncentracija selen u plazmi je od 0,9 do 1,6 $\mu\text{mol/l}$. Dnevne potrebe selen su između 50 i 200 $\mu\text{g/dl}$. Eksperimentne studije su pokazale da je nedostatak selen bio povezan sa kardiomiopatijom, naglom smrću, kao i sniženim brojem i funkcijom T-limfocita (46). Kang i saradnici su pokazali značajnu anti-aterogenu ulogu selen kod zečeva na dijeti bogatoj holesterolom (47). Klinička i eksperimentna ispitivanja su pokazala da selen ima značajnu ulogu u kardiovaskularnoj homeostazi preko sprečavanja oksidativnog oštećenja ćelije stimulisanjem ekspresije tzv. selenoproteina – citoplazmatske glutathion peroksidaze (cyGPX), fosfolipidne hidroperoksidne glutathion peroksidaze (PHGPX) i tiroredoksin reduktaze, odnosno inhibicijom slobodnih radikala koji blokiraju oslobađanje azot-monoksida iz endotela, a takođe utiče na oslobađanje prostaciklina, a time i na proces ateroskleroze (48). Studija Bora i saradnika je pokazala značajno niže koncentracije selen u serumu i eritrocitima kod bolesnika sa akutnim infarkt miokarda (49). Studija Cvetkovića i sar. pokazala je značajno sniženje selen u aterosklerotskom plaku u odnosu na normalno karotidno tkivo (23). Druge kliničke studije su pokazale da sniženje koncentracije selen dovodi do poremećaja funkcije trombocita, polimorfonuklearnih leukocita i povećanog oštećenja endotela usled peroksidacije lipida (50).

Mangan

Mangan je značajan kofaktor mnogobrojnih enzima (oksidoreduktaze, hidrolaze, ligaze i dr.). Ima važnu ulogu u sintezi polisaharida, glikoproteina i holesterola. Poznato je da je nivo mangana povećan u serumu posle infarkta miokarda. Potreba za unosom mangana putem ishrane je od 2 do 5 mg dnevno. Koncentracija mangana u serumu je od 0,5 do 1,3 $\mu\text{g/l}$. Mangan stimuliše stvaranje azot-monoksida putem inhibicije superoksid-dizmutaze i time utiče na povećanje relaksacije krvnih sudova. U celini je značajan faktor u procesu aterogeneze putem povećanja fluidnosti lipidne mikrosredine i stabilizacije superoksidnih anjona (51). Eksperimentne studije su pokazale značaj funkcije mangan superoksid-dizmutaze u sprečavanju endotelne disfunkcije i procesa apoptoze (52). Studija Cvetkovića i saradnika ukazuje na značajno sniženje mangana u aterosklerotskom plaku u odnosu na normalno karotidno tkivo (23).

Ostali oligoelementi

Brojna istraživanja su pokazala ulogu i drugih oligoelemenata u procesu ateroskleroze: nikla, hroma, olova i drugih. Niske koncentracije nikl-hlorida dovode do vazokonstrikcije koronarnih arterija kod pacova (53). Pokazano je povećanje nikla u krvi bolesnika sa akutnim infarktom miokarda i nestabilnom anginom pectoris. Studija je pokazala udruženost deficita hroma i povećane incidence oštećenja aorte (54), dokazano je proaterogeno delovanje olova putem povećanja hipertrofije glatkih mišića (55).

Zaključak

Veliki broj istraživanja je pokazao da učešćem u važnim etapama homeostaze kardiovaskularnog sistema oligoelementi mogu imati značajnu ulogu u patogenezi brojnih kardiovaskularnih poremećaja. Njihova uloga u patogenezi ateroskleroze je u poslednjoj deceniji delimično razjašnjena zahvaljujući novim tehnološkim dostignućima, kao i razjašnjenju patofizioloških mehanizama. Ipak, neophodna su nova, pre svega, klinička istraživanja radi potpunijeg uvida u ulogu i značaj oligoelemenata.

L I T E R A T U R A

1. Đurić D, Stefanović E, Tasić N, Jakovljević V, Kanjuh V, Bojić M. The use of brachial artery reactivity tests for assessment of endothelial dysfunction in the process of aging. *Kardiologiya (Moscow)* 2000; 40 (11): 24–7.
2. Đurić D, Popović Z, Tasić N, Vuković M, Plečaš B, Bojić M. The effects of reactive hyperemia and nitroglycerol on the human brachial artery diameter and blood flow. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1996; 32(3): 307–12.
3. Tasić N, Đurić D, Bojić M. Gender, age and genetic factors as independent risk factors in the onset of atherosclerosis syndrome and its complications. *Kardiologija* 1998; 19(4): 18–25. (in Serbian)
4. Tasić N, Đurić D, Kanjuh V, Radak Đ. Novelities in the diagnostics of endothelial dysfunction. *Med Istraž* 2000; 34(2): 106–7. (in Serbian)
5. Radak Đ, Cvetković Z, Tasić N, Petrović B, Lačković V, Đorđević-Denić G. The content of copper and zinc in human atherosclerotic ulcerated carotid plaque. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132(3–4): 80–4. (in Serbian)
6. Iskra M, Majewski W. Copper and zinc concentrations and the activities of ceruloplasmin and superoxide dismutase in atherosclerosis obliterans. *Biol Trace Elem Res* 2000; 73(1): 55–65.
7. Albala C, Salazar G, Vio F, Araya F, Feurhacker W, Olivares S, et al. Copper intake and blood levels as risk factors for atheromatous disease. *Rev Med Chil* 1997; 125(8): 887–92.
8. Delattre J, Lepage S, Jaudon MC, Bruckert E, Assogba U, Bonnenfont-Rousselot D. The plasma antioxidant status and trace elements in patients with familial hypercholesterolemia treated with LDL-apheresis. *Ann Pharm Fr* 1998; 56(1): 18–25.
9. Hamilton IM, Gilmore WS, Strain JJ. Marginal copper deficiency and atherosclerosis. *Biol Trace Elem Res* 2000; 78(1–3): 179–89.
10. Menditto A, Morisi G, Alimonti A, Caroli S, Petrucci F, Spagnolo A, et al. Association of serum copper and zinc with serum electrolytes and with selected risk factors for cardiovascular disease in men aged 55–75 years. *NFR Study Group. J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1993; 7(4): 251–3.
11. Anke M. Role of trace elements in the dynamics of arteriosclerosis. *Z Gesamte Inn Med* 1986; 41(4): 105–11.
12. Iskra M, Patelski J, Majewski W. Relationship of calcium, magnesium, zinc and copper concentrations in the arterial wall and serum in atherosclerosis obliterans and aneurysm. *J Trace Elem Med Biol* 1997; 11(4): 248–52.
13. Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chappell DA, Zwacka RM, Engelhardt JF, et al. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82(12): 1289–97.
14. Uza G, Vlaicu R. Serum zinc and copper in patients with atherosclerosis and thromboangiitis obliterans. *Biol Trace Elem Res* 1989; 20(3): 197–206.
15. Allen KG, Klevay LM. Cholesterolemia and cardiovascular abnormalities in rats caused by copper deficiency. *Atherosclerosis* 1978; 29(1): 81–93.
16. al-Othman AA, Rosenstein F, Lei KY. Copper deficiency alters plasma pool size, percent composition and concentration of lipoprotein components in rats. *J Nut* 1992; 122(6): 1199–204.
17. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Cytochrome c oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res* 2000; 73(3): 269–78.
18. Fields M, Lewis C, Scholfield DJ, Powell AS, Rose AJ, Reiser S, et al. Female rats are protected against the fructose induced mortality of copper deficiency. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 183(1): 145–9.
19. Fields M, Lewis CG, Beal T, Scholfield DJ, Patterson K, Smith JC, et al. Sexual differences in the expression of copper deficiency in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 186(2): 183–7.
20. Kishimoto T, Fukuzawa Y, Abe M, Hashimoto M, Ohno M, Tada M. Injury to cultured human vascular endo-

- thelial cells by copper (CuSO₄). *Nippon Eliseigaku Zasshi* 1992; 47(5): 965–70.
21. *Klevay LM*. Dietary cholesterol liver copper in rabbits. *Biol Trace Elem Res* 1988; 16(1): 51–7.
 22. *Lamb DJ, Avades TY, Ferns GA*. Biphasic modulation of atherosclerosis induced by graded dietary copper supplementation in the cholesterol-fed rabbit. *Int J Exp Pathol* 2001; 82(5): 287–94.
 23. *Cvetković Z*. Cytochemical analysis and determination of oligoelements in atherosclerotically altered carotid plaque [dissertation]. Beograd: Medicinski Fakultet; 2000. (in Serbian)
 24. *Conell P, Young VM, Toborek M, Cohn DA, Barve S, McClain CJ*, et al. Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. *J Am Coll Nutr* 1997; 16(5): 411–7.
 25. *Kaji T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H*. Stimulation by zinc of cultured vascular endothelial cell proliferation: possible involvement of endogenous basic fibroblast growth factor. *Life Sci* 1994; 55(23): 1781–7.
 26. *Fujiwara Y, Kaji T*. Zinc potentiates the stimulation by basic and acidic fibroblast growth factors on the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 97(1): 95–106.
 27. *Hennig B, Toborek M, McClain CJ*. Antiatherogenic properties of zinc: implications in endothelial cell metabolism. *Nutrition* 1996; 12(10): 711–7.
 28. *Addis PB, Carr TP, Hassel CA, Huang ZZ, Warner GJ*. Atherogenic and anti-atherogenic factors in the human diet. *Biochem Soc Symp* 1995; 61: 259–71.
 29. *Meerarani P, Ramadass P, Toborek M, Bauer HC, Bauer H, Hennig B*. Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1): 81–7.
 30. *Strain WH, Pories WJ*. Zinc content of the blood. In: *Prasad AS, Thomas CC*, editors. *Zinc metabolism*. Thomas: Springfield 1966. p.363.
 31. *McClain C, Morris P, Hennig B*. Zinc and endothelial function. *Nutrition* 1995; 11(1 Suppl): 117–20.
 32. *Heyns Adu P, Eldor A, Yarom R, Marx G*. Zinc-induced platelet aggregation is mediated by the fibrinogen receptor and is not accompanied by release or by thromboxane synthesis. *Blood* 1985; 66(1): 213–9.
 33. *Kaji T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H*. Stimulation of cultured vascular smooth muscle cell proliferation by thrombospondin is potentiaded by zinc. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(9): 1264–6.
 34. *Leonhardt W, Kurkschiev T, Meissner D, Lattke P, Abletshauser C, Weidinger G*, et al. Effects of fluvastatin therapy on lipids, antioxidants, oxidation of low density lipoproteins and trace metals. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 53(1): 65–9.
 35. *Mendis S*. Magnesium, zinc and manganese in atherosclerosis of the aorta. *Biol Trace Elem Res* 1989; 22(3): 251–6.
 36. *Peltomaa M, Mattila K, Wolf J, Hyvonen-Dabek M*. Proton-induced X-ray emission analysis of atherosclerotic plaques of the carotid bifurcation. *Biol Trace Elem Res* 1992; 34(3): 249–55.
 37. *Vlad M, Caseanu E, Uza G, Petrescu M*. Concentration of copper, zinc, chromium, iron and nickel in the abdominal aorta of patients deceased with coronary heart disease. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1994; 8(2): 111–4.
 38. *Mielcarz G, Majewski W, Patelski J, Uryszek W*. Calcium, magnesium, copper and zinc in blood serum in men with femoral atherosclerosis. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1995; 46(1): 59–65.
 39. *Tiber AM, Sakhaei M, Joffe CD, Ratnaparkhi MV*. Relative value of plasma copper, zinc, lipids and lipoproteins as markers for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1986; 62(2): 105–10.
 40. *Di Ferrante E*, editor. *Trace metals: exposure and health effects*. Proceedings of the research seminar held at the University of Surrey; 1978 10–13 July; Guildford, United Kingdom. New York: Published for the Commission of the European Communities by Pergamon Press; 1979.
 41. *Bialkowska M, Hoser A, Szostak WB, Dybczynski R, Sterlinski S, Nowicka G*, et al. Hair zinc and copper concentration in survivors of myocardial infarction. *Ann Nutr Metab* 1987; 31(5): 327–32.
 42. *Cichocki T, Heck D, Jarczyk L, Rokita E, Strzalkowski A, Sych M*. Elemental composition of the human atherosclerotic artery wall. *Histochemistry* 1985; 83(1): 87–92.
 43. *Chau LY*. Iron and atherosclerosis. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2000; 24(4): 151–5.
 44. *Thompson AB, Bohling T, Heires A, Linder J, Rennard SI*. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *J Lab Clin Med* 1991; 117(6): 493–9.
 45. *Matthews AJ, Vercellotti GM, Menchaca HJ, Bloch PH, Michalek VN, Marker PH*, et al. Iron and atherosclerosis: inhibition by the iron chelator deferiprone (L1). *J Surg Res* 1997; 73(1): 35–40.
 46. *Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA*. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit* 2003; 9(1): RA9–18.
 47. *Kang BP, Mehta U, Bansal MP*. Selenium supplementation protects from high fat diet-induced atherogenesis in rats: role of mitogen stimulated lymphocytes and macrophage NO production. *Indian J Exp Biol* 2001; 39(8): 793–7.

48. *Miller S, Walker SW, Arthur JR, Lewin MH, Pickard K, Nicol F*, et al. Selenoprotein expression in endothelial cells from different human vasculature and species. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588(1): 85–93.
49. *Bor MV, Cevik C, Uslu I, Guneral F, Duzgun E*. Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* 1999; 54(5): 271–6.
50. *Ito Y, Fujita T*. Trace elements and blood pressure regulation. *Nippon Rinsho* 1996; 54(1): 106–10.
51. *Kasten TP, Settle SL, Misko TP, Currie MG, Nickols GA*. Manganese potentiation of nitric oxide-mediated vascular relaxation. *Eur J Pharmacol* 1994; 253(1–2): 35–43.
52. *Zanetti M, Sato J, Jost CJ, Gloviczki P, Katusic ZS, O'Brien T*. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Hum Gene Ther* 2001; 12(11): 1407–16.
53. *Coogan TP, Latta DM, Snow ET, Costa M*. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. *Crit Rev Toxicol* 1989; 19(4): 341–84.
54. *Mertz W*. Chromium research from a distance: from 1959 to 1980. *J Am Coll Nutr* 1998; 17(6): 544–7.
55. *Fujiwara Y, Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H*. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* 1995; 98(1–3): 105–10.
- Rad je primljen 17. III 2003. god.