¹Institut za patološku fiziologiju "Ljubodrag Buba-Mihailović",
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

KORELACIJA IZMEĐU AKTIVNOSTI ALFA NAFTIL ACETAT ESTERAZE I RAZLIČITOG STEPENA SUŽENJA HUMANE KAROTIDNE ARTERIJE

CORRELATION BETWEEN ALPHA NAPHTHYL ACETATE ESTERASE ACTIVITY AND DIFFERENT DEGREES OF STENOSIS OF HUMAN CAROTID ARTERY

D. Vučević¹, Đ. Radak², D. Kovačević¹, I. Milovanović¹, T. Radosavljević¹, D. Mladenović¹, S. Kovačević¹

Sažetak

Uprkos neprestanom ovladavanju biomedicinskim znanjima i tehnikama, naučnici su još uvek daleko od potpunog razumevanja poremećaja molekulskih funkcija i njihovog značaja u aterogenezi. U tom smislu, posebno polje istraživanja predstavljaju ćelijske nespecifične esterase, s obzirom na ulogu koju imaju u širokom spektru bolesti, uključujući i ateroskleroza. U našoj studiji ispitivana je korelacija između aktivnosti alfa naftil acetat esterase (ANAE) i različitog stepena suženja humane karotidne arterije. Aktivnost ANAE u imprintima karotidnih plakova pacijenata sa aterosklerozom različitih morfoloških grupa (n=100), kao i u kontrolnoj grupi pacijenata sa kinkingom i/ili koilingom karotidnih arterija (n=25), je određivana primenom citohemijskog scoring sistema (metoda po Hejhou /Hayhoe/ i Kvalinu /Quaglino/, koju su modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić). Naši rezultati pokazuju da postoji razlika relativne vrednosti ANAE esteraznog skora u karotidnim arterijama/plakovima između ispitivanih grupa pacijenata. Utvrđena je, takođe, linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE esteraznog skora i različitog stepena suženja karotidne arterije kod pacijenata sa morfološki različitim ateroskleroznim lezijama ovog krvnog suda. Ovi rezultati mogli bi da ukažu na značaj ANAE u procesu aterogeneze.

Ključne reči: alfa naftil acetat esterase (ANAE), ateroskleroza, karotidni plak, kinking, koiling

Summary

In spite of the constantly growing body of biomedical knowledge and techniques, scientists are still far from a complete understanding of molecular system dysfunctions and their relevance in atherogenesis. Accordingly, cellular non specific esterases represent a special field of research, due to

their role in a wide range of diseases, including atherosclerosis. This paper deals with linear correlation between relative α -naphthyl acetate esterase (ANAE) score values and different degrees of carotid stenosis in patients with various morphological atherosclerotic lesions of this blood vessel. In our study analysis of ANAE cytochemical activity was performed in imprints of carotid plaques obtained from patients with different morphological groups of atherosclerotic lesions (n=100), as well as in control group of patients with kinking and/or coiling of carotid arteries (n=25). ANAE status was determined by cytochemical scoring system (Hayhoe and Quaglino's method modified by Cvetković, Radak and Đorđević-Denić). Our results show that there is difference in relative score value of ANAE activity in carotid artery/plaque tissue between investigated groups of patients. One can, also, observed linear correlation between relative ANAE score values and different degrees of carotid stenosis in patients with various morphological atherosclerotic lesions of this blood vessel. This findings may indicate importance of ANAE in atherogenesis.

Key words: α -naphthyl acetate esterase (ANAE), atherosclerosis, carotid plaque, kinking, coiling

Uvod

Ateroskleroza je metaboličko, hronično, inflamacijsko, imunski posredovano oboljenje zida arterijskog krvnog suda (1-3). Ova progresivna, multifaktorska bolest dovodi do očvršćavanja, zakrećavanja i suženja velikih arterija (aorte, karotidnih arterija, ilijačnih arterija, arterija mozga, koronarnih arterija) i arterija srednje veličine, sa predilekcionom lokalizacijom na mestima račvanja, odnosno njihovog odvajanja. Početne patološke promene se nalaze u intimi arterija. Osnovna

karakteristična lezija je aterosklerozna ploča (plak /franc. plaque/), tj. aterom (grčki atheroma) (4).

Centralnu ulogu u razvoju ateroskleroznog plaka, posebno u ranim fazama njegovog stvaranja, imaju potencijalno reverzibilni činioci (poremećena sinteza azot monoksida /NO/), odgovor na vazodilatacijske supstance, inflamacija, aktivnost makrofaga i metaloproteinaza, agregacija trombocita i proliferacija glatkih mišićnih ćelija. Dalje napredovanje i rast ateroskleroznog plaka odvija se kao posledica interakcije različitih frakcija lipida, partikula oksidovanih lipoproteina male gustine (ox-LDL → engl. oxidized low density lipoproteins), reverznog transporta lipoproteina velike gustine (HDL → engl. high density lipoproteins) i lokalnih faktora endotela (4). Međutim, uprkos velikoj pažnji koja se posvećuje proučavanju ateroskleroze, pokretač primarnog patološkog događaja je još uvek nepoznat. U tom smislu posebno polje istraživanja predstavljaju nespecifične esteraze, imajući u vidu ulogu koju ovi enzimi imaju u širokom spektru bolesti, uključujući i aterosklerozu.

Pod terminom nespecifične esteraze (proste esteraze) u citohemiji se podrazumeva grupa enzima (karboksil esteraze, aril esteraze i acetil esteraze) koji vrše hidrolizu prostih estara (α -naftil acetata, α -naftil butirata, hloracetata, indoksil acetata, i dr.), pri čemu nastaju N-slobodni alkoholi i organske kiseline (5).

U modifikovanim uslovima lokalne mikrosredine nespecifične esteraze u većoj količini prelaze iz lizozoma u vanćelijski prostor. Naime, u osoba obolelih od ateroskleroze i u pušača sa razvijenom aterosklerozom dolazi do otpuštanja ovih enzima, koji u sadejstvu sa kiselim fosfatazama, elastazama, hijaluronidazom, katepsinom, kolagenazama i aktivatorima plazmina mogu da oštete okolne plemenite strukture (6, 7).

U toku sazrevanja makrofaga raste količina hidrolitičkih enzima u njihovim lizozomima. Stepenn aktivnosti esteraza je u mononuklearima u korelaciji sa ćelijskim vijabilitetom i mitotskim kapacitetom. U određenim uslovima makrofagi snažno podstiču imunsku reakciju, oslobađajući citokine i faktore rasta, koji zatim aktiviraju limfocite. Razni lokalni stimulusi (imunski kompleksi, antigeni, limfokini, delovi bakterija, itd.) mogu da pokrenu oslobađanje hidrolitičkih lizozomskih enzima u vanćelijski prostor sa autodestruktivnim posledicama. S tim u vezi, histohemijskim metodama je utvrđeno da je aktivnost nespecifičnih esteraza u makrofagima arterijskog zida povišena u toku aterogeneze indukovane hiperholesterolskom dijetom, a takođe i prilikom povreda endotela balon kateterom. Uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (7).

Citohemijskom analizom aterosklerozno promenjenih plakova ustanovljeno je prisustvo α -naftil acetat esteraze (ANAE → engl. α -naphthyl acetate esterase). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je aktivnost ovog enzima, kao prvenstvenog markera monocitno-makrofagne ćelijske loze, u korelaciji sa morfološkim karakteristikama plaka i njegovom progresijom (5, 8, 9). U tom smislu, utvrđivanje dinamike promene aktivnosti ANAE u aterogenezi bi moglo imati terapijsku implikaciju, s obzirom da ovaj enzim može biti potencijalna meta u prevenciji progresije ateroskleroze. Stoga je cilj ovog rada bio da se ispita korelacija između aktivnosti ANAE i različitog stepena suženja humane karotidne arterije.

Materijal i metode

Ispitanici

Istraživanje, koje je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta u Beogradu, je obuhvatilo 125 bolesnika primljenih u Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" u Beogradu zbog kardioloških i vaskularnih tegoba. Period praćenja ovih bolesnika je bio od oktobra 2007. godine do februara 2008. godine. Od 125 operisanih pacijenata, 100 pacijenta (80%) je imalo aterosklerozu karotidnih krvnih sudova, i zbog stenoze karotidne arterije jednake ili veće od 70%, kao i prisustva fokalnih ili globalnih simptoma cerebralne ishemije, bilo operisano primenom everzione karotidne endarterektomije. 25 pacijenata (20%) bez morfoloških znakova ateroskleroze karotidnih krvnih sudova koji su činili kontrolnu grupu, bilo je podvrgnuto resekciji elongirane karotidne arterije zbog otklanjanja hemodinamski značajnog kinkinga (/engl. kinking/ koleno, pregib) ili koilinga (/engl. coiling/ petlja, klupko). Kod bolesnika je vršeno preoperativno kliničko neuroangiološko i kardiološko ispitivanje, kao i ultrazvučno ispitivanje morfologije i procenta stenoze karotidnih arterija.

Karotidni aterosklerozni plak je ispitivan ultrasonografski preoperativno, kao i makroskopski intraoperativno. Na osnovu makroskopsko-morfoloških karakteristika, sve lezije karotidnih arterija su podeljene u četiri morfološke grupe:

- grupa sa karakteristikama fibroznog tkiva u intimalnom i medijalnom delu karotidne arterije (FIB-fibrolipidni plak),
- grupa sa intraplakalnom hemoragijom (HEM-krvarenje u plaku),
- grupa sa egzulceracijom karotidnog plaka (ULC-egzulcerisani plak) i
- grupa sa kalcifikovanim depozitima u karotidnom plaku (KALC-kalcifikovani plak).

Ispitivanje je obuhvatilo i uzorke normalnog tkiva karotidne arterije kontrolne grupe (K), sa kinkingom ili koilingom.

Citohemijsko ispitivanje ANAE metodom imprinta

Citohemijsko ispitivanje ANAE je vršeno u Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Odstranjeni delovi karotidne arterije sa morfološki prisutnim ateromom i morfološki "zdravim" delovima arterije (kinking i koiling bez ateroskleroznih promena, tj. kontrolne morfološke grupe - K) korišćeni su za citološko i citohemijsko ispitivanje aktivnosti ANAE metodom imprinta (otiska). Ispitivani uzorci tkiva karotidnih arterija utiskivani su na mikroskopsku pločicu prethodno tretiranu rastvorom 70% etilalkohola, a potom su imprinti (otisci) ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva bojeni citohemijskim bojama za vizualizaciju ANAE.

Aktivnost ANAE u imprintima karotidne arterije/plaka određivana je tehnikom koju su primenjivali Vahštajn (Wachstein) i Volf (Wolf), a dopunili Meler (Mueller) i njegovi saradnici (10, 11). U tom cilju upotrebljen je supstrat sastavljen od 40 mL rastvora propilen glikola (0.1 mol/L) u fosfatnom puferu (0.2 mol/L) čiji je pH 6.9 (0.4 mL 1/100 naftol AS ili AS-D acetata /Sigma diagnostics/ u acetonu) i 80 mg Fast blue BB salt (Sigma diagnostics).

Procedura bojenja je obuhvatala fiksiranje preparata u parama formalina u toku 4 minuta, ispiranje preparata destilovanom vodom, preliivanje preparata sveže napravljenim rastvorom supstrata, inkubaciju sa supstratom na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 do 60 minuta, ispiranje preparata destilovanom vodom, sušenje preparata na vazduhu i bojenje preparata Harris ili Karazzi hematoksilinom u trajanju od 10 minuta. Proizvod reakcije su precipitati enzima u vidu granula crne boje.

Citohemijska analiza preparata karotidnih arterija i plakova vršena je pomoću svetlosnog mikroskopa BIO-OPTICA (uveličanje 100x i imerzija). Zatim su specifična polja fotografisana korišćenjem digitalnog fotoaparata na mikroskopu OLYMPUS DP70 (uveličanje 40x, 100x i 400x).

Citohemijska procena ANAE esterase aktivnosti metodom indeksiranja i skoriranja

U proceni citohemijske aktivnosti ANAE pošlo se od iskustava i standarda postavljenih za semikvantitativnu procenu pozitivnosti citohemijskih reakcija metodom indeksiranja i skora (engl. scoring method), koju su opisali Hejho (Hayhoe) i Kvalino (Quaglino) (5), a modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić (12). Navedena iskustva se odnose na procenu pozitivnosti citohemijskih reakcija na hematološkim preparatima, kao i na preparatima alveolarnih makrofaga dobijenim bronhoalveolarnom lavazom na eksperimentalnim modelima.

Skoring sistem je zasnovan na prisustvu različitog stepena esterase pozitivnosti u

granulocitnoj, limfocitnoj i monocitno-makrofagnoj populaciji ćelija (5).

Procena stepena ANAE esterase aktivnosti se vrši na 100 ćelija, tako što se pozitivnost u vidu većeg broja grubih granula označava sa "+++", pozitivnost u vidu pojedinačnih grubih granula označava se sa "++", pozitivnost u vidu sitnijih diskretnih granula u citoplazmi označava se sa "+", dok se negativna reakcija označava sa "0". Suma aktivnosti 100 ćelija daje ANAE esterase skor za svaki preparat, čije se varijacije kreću od 0 do 300 (5).

Aktivnost ANAE procenjena je na 100 ćelija, koje pokazuju različit stepen aktivnosti (od negativnog do izrazito pozitivnog), pri čemu je na osnovu zajedničkog indeksa (skora) određivana srednja vrednost skora aktivnosti ovog enzima. Kvantifikacijom dobijenih srednjih vrednosti skora, određivana je relativna vrednost skora (5).

Relativna vrednost skora predstavlja izraz srednje vrednosti skora u odnosu na maksimalnu vrednost skora za pojedinačnu aktivnost ispitivane esterase, izražena u obliku procenta (5).

Analiza rezultata istraživanja vršena je na osnovu odgovarajućih statističkih parametara (aritmetička sredina, standardna devijacija, koeficijent varijacije), metoda (Studentov t test, analiza varijanse /ANOVA/, Fišerov /Fisher/ post hoc test, Kruskal-Wallis test), i kompjuterskih statističkih programa (STATISTICA 7.0 Professional Edition, SPSS 15.0 Professional Edition).

Rezultati

Karotidni plak ispitanika je na osnovu nalaza dupleks sonografije podeljen u četiri morfološke grupe. U prvoj grupi sa fibrolipidnim plakom (FIB) bilo je 20 bolesnika (20%). U drugoj grupi sa intraplakalnom hemoragijom (HEM) bilo je 10 bolesnika (10%). Treću morfološku grupu sa egzulcerisanim karotidnim plakom (ULC) činilo je 36 bolesnika (36%), dok je u četvrtoj morfološkoj grupi sa izraženim kalcifikacijama karotidnog plaka (KALC) bilo 34 bolesnika (34%).

Starost bolesnika.- Prosečna starost svih ispitivanih bolesnika iznosila je 62.80 ± 8.22 godine. Bolesnici sa karotidnom aterosklerozom imali su u proseku 63.95 ± 6.67 godine. Kontrolna grupa bolesnika (K) sa kinkingom ili koilingom karotidnih arterija u proseku je bila stara 58.35 ± 9.27 godina. U grupi bolesnika sa karotidnom aterosklerozom bilo je 62 (62%) muškarca (prosečne starosti 63.83 ± 7.69) i 38 (38%) žena (prosečne starosti 65.05 ± 7.43). U kontrolnoj grupi je bilo 7 (28%) muškarca (prosečne starosti 58.55 ± 7.56) i 18 (72%) žena (prosečne starosti 58.15 ± 9.82).

Analizom starosnog doba ispitivanih pacijenata, dobijeni su rezultati, koji su prikazani na grafikonu 1.

Grafikon 1. Starosna raspodela ispitivanih pacijenata

K/ULC → * $p < 0.05$; K/KALC → ** $p < 0.01$; KALC/FIB → * $p < 0.05$

p - nivo statističke značajnosti;

*- $p < 0.05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K);

** - $p < 0.01$ visoko statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K)

Analizom varijanse (ANOVA) za kontinuirane varijable je ustanovljeno da postoji značajna razlika ($p < 0.05$) u prosečnim godinama starosti ovih pet grupa ispitanika. Post-hoc LSD (engl. least significant difference) metodom testiranja međugrupnih razlika značajnosti pokazano je da ta razlika najvećim delom potiče od razlike između prosečnih godina starosti pacijenata sa kalcifikovanim ateroskleroznim plakom (66.18 ± 8.27) i ispitanika kontrolne grupe (58.35 ± 9.27) (grafikon 1).

Pol bolesnika.- Od 125 bolesnika u našoj studiji, 69 bolesnika je bilo muškog pola, dok je 56 bolesnika bilo ženskog pola. Analizom raspodele ispitanika kontrolne grupe i različitih morfoloških grupa po polu, dobijeni su rezultati prikazani na grafikonu 2.

Grafikon 2. Raspodela ispitivanih pacijenata po polu

Stepen stenozе karotidnih arterija.- Dopler sonografskim pregledom karotidnih arterija kod 25 bolesnika u kontrolnoj grupi sa kinkingom ili koilingom karotidnih arterija nisu registrovane stenozе ovog krvnog suda. S druge strane, kod preostalih 100 bolesnika sa aterosklerozno izmenjenim karotidnim arterijama, uočeni su različiti stepeni stenozе ovog

krvnog suda. Rezultati ispitivanja stepena stenozе karotidnih arterija, predstavljeni su grafički (grafikon 3).

Grafikon 3. Distribucija stepena stenozе karotidnih arterija prema morfološkim grupama

Analizom varijanse (ANOVA) za kontinuirane varijable pokazano je da nema značajne razlike ($p > 0.05$) između morfoloških grupa u pogledu stepena stenozе karotidne arterije, uprkos evidentno manjem stepenu suženja karotidne arterije u grupi bolesnika sa intraplakalnom hemoragijom u odnosu na ostale morfološke grupe (grafikon 3).

Analiza ANAE esterazne aktivnosti u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Rezultati dobijeni analizom aktivnosti ANAE u ispitivanim grupama su prikazani na grafikonu 4.

Grafikon 4. Relativne vrednosti skora (%) aktivnosti ANAE u ispitivanih bolesnika

K/FIB → ** $p < 0.01$; K/ULC → ** $p < 0.01$; FIB/HEM → ** $p < 0.01$;

FIB/KALC → ** $p < 0.01$; HEM/ULC → ** $p < 0.01$; ULC/KALC → ** $p < 0.01$

p - nivo statističke značajnosti;

*- $p < 0.05$ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K);

** - $p < 0.01$ visoko statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K)

U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE koja je registrovana u kontrolnoj grupi, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je u muškaraca viša, dok je u žena niža (grafikon 4).

U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE, koja je registrovana u ispitanika sa fibrolipidnim plakom, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je u muškaraca niža, dok je u žena viša (grafikon 4).

U pacijenata sa intraplakalnom hemoragijom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze niža, dok je u pacijentkinja viša (grafikon 4).

U muškaraca sa egzulcerisanim plakom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze viša, dok je u žena niža (grafikon 4).

U pacijenata sa kalcifikovanim plakom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze viša, dok je u pacijentkinja niža (grafikon 4).

Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između K i FIB grupe, registrovano je visoko statistički značajno povećanje ($p < 0.01$) aktivnosti ovog enzima u FIB grupi u odnosu na njenu ukupnu vrednost skora, kao i vrednosti skora u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno povećanje ($p < 0.01$) aktivnosti ANAE registrovano je i u ULC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno smanjenje ($p < 0.01$) aktivnosti ANAE uočeno je u HEM i KALC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u FIB grupi (grafikon 4).

Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između HEM i ULC grupe, takođe je uočeno visoko statistički značajno smanjenje ($p < 0.01$) aktivnosti ANAE u HEM grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u ULC grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno povećanje ($p < 0.01$) aktivnosti ANAE nađeno je u ULC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u KALC grupi (grafikon 4).

Poređenje citohemijske aktivnosti ANAE i suženja karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata.- Poređenjem citohemijske aktivnosti ANAE i različitog stepena stenoze karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata dobijeni su rezultati,

koji su prikazani grafički (grafikoni 5-8) i tabelarno (tabele 1-4).

Utvrđena je visoko statistički značajna pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom ($p < 0.01$) (tabela 1, grafikon 5).

Grafikon 5. Linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom

Tabela 1. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom

		STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,544 **
	Korelacija		
	Značajnost	.	,007
	N	20	20
ANAE	Pirson (Pearson)	,544(**)	1
	Korelacija		
	Značajnost	,007	.
	N	20	20

** $p < 0.01$

Pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku je na nivou statističke značajnosti ($p < 0.05$) (tabela 2, grafikon 6).

Grafikon 6. Linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom

Tabela 2. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom

/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,687(*)
	Korelacija	.	,014
	Značajnost	.	,014
	N	10	10
ANAE	Pirson (Pearson)	,687(*)	1
	Korelacija	,014	.
	Značajnost	,014	.
	N	10	10

Statistički značajna pozitivna korelacija je nađena između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom ($p < 0.05$) (tabela 3, grafikon 7).

Grafikon 7. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom

Tabela 3. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom

/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,338(*)
	Korelacija	.	,044
	Značajnost	.	,044
	N	36	36
ANAE	Pirson (Pearson)	,338(*)	1
	Korelacija	,044	.
	Značajnost	,044	.
	N	36	36

*- $p < 0.05$

Između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa kalcifikovanim plakom, takođe je registrovana statistički značajna pozitivna korelacija ($p < 0.05$) (tabela 4, grafikon 8).

Grafikon 8. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa kalcifikovanim plakom

Tabela 4. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa kalcifikovanim plakom

/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,355(*)
	Korelacija	.	,039
	Značajnost	.	,039
	N	34	34
ANAE	Pirson (Pearson)	,355(*)	1
	Korelacija	,039	.
	Značajnost	,039	.
	N	34	34

*- $p < 0.05$

Citohemijska analiza ANAE esterase aktivnosti u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Metodološki pristup korišćen u našem radu, potvrđen je i citohemijski. Rezultati citohemijske analize ANAE esterase aktivnosti preparata karotidnih arterija i plakova, koji su prikazani na slikama 1-5, ukazuju na različit stepen esterase pozitivnih makrofaga i granulocita.

Slika 1. ANAE - imprint kontrolne grupe (K) Zapažaju se esterase pozitivni granulociti i makrofagi (uveličanje 100 x).

*Slika 2. ANAE - imprint fibrolipidnog plaka (FIB)
Vide se esteražno pozitivni makrofagi i granulociti sa
krupnim granulama po obodu ćelije
(uveličanje 100 x).*

*Slika 5. ANAE - imprint kalcifikovanog plaka (KALC)
Zapažaju se depoziti kristala karakteristični za
kalcifikaciju, kao i makrofagi sa paketima krupnih
granula (uveličanje 400 x).*

*Slika 3. ANAE - imprint krvarenja u plaku (HEM)
Uočava se izrazita intraplakalna hemoragija, sa
mnoštvom penastih ćelija i esteražno pozitivnih
makrofaga i granulocita (uveličanje 40 x).*

*Slika 4. ANAE - imprint egzulcerisanog plaka (ULC)
Uočava se mnoštvo lipofaga, kao i pozitivnih
makrofaga i granulocita, naročito u egzulcerisanom
oštećenju intime karotidne arterije (uveličanje 100 x).*

Diskusija

Starost ispitanika.- Ateroskleroza predstavlja globalni zdravstveni problem. U razvijenim zemljama ateroskleroza i njene komplikacije dovode do 50% svih smrtnih ishoda i 1/3 smrtnih ishoda kod ljudi između 35. i 65. godine života. Od ukupnog broja oboljelih od ateroskleroze, više od 60% oboljeva u zemljama u razvoju. Od tog broja, više od 50% mortaliteta i invaliditeta pripada bolestima srca i moždanom udaru. Procenjuje se da globalna prevalenca karotidne ateroskleroze iznosi oko 25%, a prevalenca ateroskleroznog plaka oko 13% (13).

U našem istraživanju prosečna starost svih ispitivanih bolesnika iznosila je 62.80 ± 8.22 godine. Bolesnici sa aterosklerozom karotidne arterije su bili u proseku nešto stariji (63.95 ± 6.67) u odnosu na kontrolnu grupu (58.35 ± 9.27), pri čemu ova razlika nije na nivou statističke značajnosti ($p > 0.05$). Ovakav naš nalaz je u skladu sa opšte prihvaćenim mišljenjem da je ateroskleroza bolest starijeg životnog doba.

Analiza starosti naših bolesnika u odnosu na pol je pokazala da nema značajne razlike u pogledu starosti muškaraca i žena, kako u grupi oboljelih koji su imali različite morfološke tipove ateroskleroznog plaka, tako i u kontrolnoj grupi ($p > 0.05$). Naše istraživanje je pokazalo da među bolesnicima sa komplikacijama ateroskleroznih lezija karotidnog plaka preovlađuju muškarci starosti između 55 i 65 godina, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (14, 15).

Analiza starosti ispitivanih bolesnika u odnosu na morfološke grupe je pokazala da su pripadnici morfološke grupe sa kalcifikovanim karotidnim plakom značajno stariji u odnosu na bolesnike u kontrolnoj grupi ($p < 0.01$) (grafikon 1), potvrđujući, na taj način, međusobnu povezanost starenja i uznapredovale ateroskleroze. Naime, poznato je da sa starenjem kod bolesnika sa karotidnom aterosklerozom dolazi do povećanja incidence kalcifikovanih plakova,

a smanjenja incidence fibroznih plakova, što je praćeno redukcijom glatkih mišićnih ćelija unutar samog plaka (16). Različite studije sprovedene u poslednje dve decenije, su pružile potvrdu da starenje arterija, koje se karakteriše zadebljanjem i dilatacijom zidova arterija (prvenstveno intime i medije), značajno utiče na razvoj ateroskleroze (14, 17).

Međusobnu povezanost starenja i uznapredovale ateroskleroze, koja predstavlja nalaz dobijen u našem istraživanju, potkrepljuje i činjenica da je povećana biosinteza fosfolipida, masnih kiselina i sterola dokazana u arterijama u kojima su već nastali ateromi. Osim toga, pokazano je da su aktivnosti lipaza i esteraza smanjene u aortama eksperimentalnih životinja na aterogenoj dijeti, uz lokalni gubitak aktivnosti adenozintrifosfataze (ATP-aze) u ateromatoznim lezijama (18). Takođe je naglašen značaj funkcijskog stanja lizozomskog enzimskog sistema arterijskog zida za normalnu rezistenciju intime u odnosu na hiperlipemiju i lezije endotela. Lizozomski enzimi mogu da dovedu do generalizovane razgradnje ćelijskih komponenti bitnih za kontinuirano samoobnavljanje. Ovaj enzimski sistem je uključen u proces starenja (nakupljanja lipofuscina, tj. pigmenta starenja). Smatra se da povećano taloženje estara holesterola u glatkim mišićnim ćelijama arterija može biti povezano sa delimičnim nedostatkom lizozomske hidrolaze holesterolskih estara. Estri holesterola se nagomilavaju u lizozomima i mogu da dovedu do ćelijske smrti. U saglasnosti sa ovim, osobe kod kojih je ustanovljena ova retko zastupljena enzimopatija mogu imati ubrzanu aterosklerozu (19).

Pol bolesnika.- Od 125 bolesnika u našoj studiji, 69 bolesnika je bilo muškog pola, dok je 56 bolesnika pripadalo ženskom polu. Kontrolna grupa je obuhvatila 7 (28%) muškarca i 18 (72%) žena. U grupi bolesnika sa karotidnom aterosklerozom bilo je 62 (62%) muškarca i 38 (38%) žena. Ovaj podatak je u skladu sa činjenicom da su procesu ateroskleroze podložnije osobe muškog pola (20).

Analizom raspodele ispitanika različitih morfoloških grupa i kontrolne grupe po polu, dobijeni su rezultati koji pokazuju značajnu razliku između grupa, pre svega usled većeg prisustva žena u kontrolnoj grupi u poređenju sa ostalim morfološkim grupama. Takođe, kao što je već naglašeno, registrovan je veći broj pripadnika muškog pola u bolesnika sa značajnom aterosklerozom karotidne arterije u svim morfološkim grupama u odnosu na ženski pol (grafikon 2). Distribucija naših ispitanika po polu je u skladu sa većom incidencom karotidne ateroskleroze u muškoj populaciji (20), odnosno kinkinga i koilinga u ženskoj populaciji (21). Pokazano je, takođe, da u svim uzrasnim grupama muškarci imaju veći procenat "mekših" karotidnih plakova, koji su bogati lipidima, u odnosu na žene (22). Pored toga, kod žena posle menopauze je utvrđena značajna razlika u smislu veće

prevalence karotidnog plaka ($p < 0.001$) u odnosu na žene pre menopauze (23). Posebno je interesantno istraživanje uticaja muških polnih hormona na karotidnu aterosklerozu, koje ukazuje na naglašen razvoj zadebljanja zida zajedničke karotidne arterije i karotidnog bulbosa u sredovečnih muškaraca u tzv. andropauzi (testosteron < 9.8 nmol/L) (24).

Stepen stenozе karotidnih arterija.- Na osnovu ultrazvučnog ispitivanja morfologije karotidnog plaka, kod bolesnika u kontrolnoj grupi je dijagnostifikovan kinking i/ili koiling karotidne arterije bez značajnih suženja lumena krvnog suda. Kinking i koiling predstavljaju dva osnovna morfološka oblika, tj. dve osnovne simptomatske forme arterijske elongacije, koje nemaju značajnu korelaciju sa aterosklerozom i glavnim kardiovaskularnim faktorima rizika.

U našem istraživanju kod svih bolesnika sa aterosklerozom karotidnog plaka izvršena je kvantifikacija stepena karotidne stenozе. Analizom prosečnih vrednosti stepena stenozе karotidnih arterija po morfološkim grupama je utvrđen manji stepen karotidne stenozе u grupi bolesnika sa intraplakalnom hemoragijom i veći stepen karotidne stenozе u grupi bolesnika sa fibrolipidnim plakom u poređenju sa ostalim morfološkim grupama (grafikon 3). Ovi naši nalazi nisu statistički značajni ($p > 0.05$).

Dosadašnja raznovrsna istraživanja na ovom polju su potvrdila povezanost heterogenih plakova i relevantne stenozе karotidne arterije. Nedavno je utvrđeno da je prevalenca stenotičnih plakova kod asimptomatskih bolesnika 2.7% kod muškaraca i 1.5% kod žena. Poređenjem brzine protoka kroz iste stepene suženja karotidne arterije, registrovane su veće brzine protoka kod žena u odnosu na muškarce, naročito kod stenozа karotidne arterije koje su se kretale u intervalu od 60 do 70%. Interesantno je napomenuti i to da su mlađe životno doba, prisustvo koronarne bolesti i eholucentni plak označeni kao faktori progresije stepena karotidne stenozе. Pokazalo se, takođe, da se višestrukim merenjem progresije stepena karotidne stenozе mogu u značajno većem obimu predvideti budući cerebrovaskularni poremećaji u odnosu na njegovo bazalno merenje (25).

Pokazano je da su simptomatski karotidni plakovi najčešće eholucentni, manje kalcifikovani i sa većim stepenom intraplakalne nekroze u odnosu na asimptomatske plakove. Sa sigurnošću se još uvek ne može reći koje lokalne promene u karotidnom plaku neposredno izazivaju njegov prelazak iz stabilnog (asimptomatskog) u nestabilno (simptomatsko) stanje. Izgleda da porastom stenozе plak postaje nestabilan i daje simptome koji postaju stabilni nakon arterijske okluzije (26).

Najveći broj naših ispitanika je imao egzulcerisan karotidni plak, što je u saglasnosti sa publikovanim podacima (27).

Bolesnici sa fibrolipidnim plakom i intraplakalnom hemoragijom u našoj studiji su imali karotidne stenoze veće od 75% lumena u većem broju u odnosu na podatke iz literature. Ovakav naš rezultat se može dovesti u vezu sa većim stepenom preciznosti Dupleks sonografskog pregleda korišćenog u našoj studiji, s obzirom na činjenicu da je Dopler analiza, koja daje nešto preciznije podatke o kvalitetu stenoze karotidne arterije, sastavni deo ovog pregleda.

Naučna istraživanja su pokazala da su karotidni plakovi sa visokim rizikom za rupturu uglavnom heterogeni, fibrozni i sa varijacijama u pogledu količine lipida (25-27). Do rupture plaka najčešće dolazi zbog intramuralnog hematoma ili disekcije usled pritiska krvi u toku sistole, koji je u suprotnom smeru u odnosu na otpor izazvan stenotičnom lezijom (27).

ANAE esterazna aktivnost u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između ispitanika kontrolne grupe i ispitanika sa fibrolipidnim karotidnim plakom, registrovano je visoko statistički značajno povećanje ($p<0.01$) aktivnosti ovog enzima u ispitanika sa fibrolipidnim karotidnim plakom u odnosu na njenu ukupnu vrednost skora, kao i vrednosti skora u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4, slike 1 i 2). Visoko statistički značajno povećanje ($p<0.01$) aktivnosti ANAE registrovano je i u ispitanika sa egzulceracijom karotidnog plaka u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4, slika 4). Ovi naši rezultati su potvrda teze da se citohemijska aktivnost ANAE može koristiti kao parametar u ispitivanjima normalnih ćelija, kao i ćelija koje su izmenjene inflamacijskim ili neoplastičnim procesom (8). Poznato je da u modifikovanim uslovima lokalne mikrosredine, koji odlikuju i aterosklerozu, ćelijske nespecifične esteraze u većoj količini prelaze iz lizozoma u ekstracelularni prostor, gde u sadejstvu sa drugim enzimima (kiselim fosfatazama, elastazama, hijaluronidazom, katepsinom, kolagenazama, aktivatorima plazmina, mijeloperoksidazama i dr.) mogu da dovedu do tkivnog oštećenja (4, 7, 9). Poznato je, takođe, da u tom štetnom sadejstvu prednjače mijeloperoksidaze, koje su zastupljene u makrofagima i predstavljaju realnu potencijalnu opasnost, kako za "domaćina", tako i za patogen na koga atakuju makrofagi, pa samim tim imaju veliku odgovornost za oštećenje tkiva u inflamacijskim procesima (1-3). S obzirom na činjenicu da su naučnici vrlo blizu potvrde hipoteze, prema kojoj je ateroskleroza po svojim patogenetskim karakteristikama najbliža generalizovanoj inflamaciji, logično se nameće zaključak da su, pored ostalog, ANAE i mijeloperoksidaze verovatno odgovorne za uključivanje makrofaga u ovaj proces. Najverovatniji mehanizam dejstva enzimskog sinergističkog oštećenja endotela je konverzija slobodnog L-tirozina u plazmi u

tirozil-radikal, koji zatim dovodi do oksidacije LDL molekula. Nedavna istraživanja su pokazala da mijeloperoksidaze, oksiduju nitrite, stvarajući pri tom u prvom redu peroksinitrit, koji se smatra najtoksičnijom reaktivnom azotnom vrstom (3, 4).

Visoko statistički značajno smanjenje ($p<0.01$) aktivnosti ANAE uočeno je u grupi pacijenata sa krvarenjem u plaku i u ispitanika sa kalcifikovanim plakom u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola ispitanika sa fibrolipidnim plakom (grafikon 4, slike 3 i 5). Ovi rezultati naše studije, takođe idu u prilog široko zastupljenom gledištu, po kome nakupljanje masnih materija u zidu krvnog suda može da pokrene oslobađanje hidrolitičkih lizozomskih enzima u vanćelijski prostor sa autodestruktivnim posledicama (7). S tim u vezi, uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (8). Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom i ispitanika sa egzulceracijom plaka, nađeno je visoko statistički značajno smanjenje ($p<0.01$) aktivnosti ANAE u grupi ispitanika sa krvarenjem u plaku u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola ispitanika sa egzulceracijom plaka (grafikon 4, slike 3 i 4). Osim toga, visoko statistički značajno povećanje ($p<0.01$) aktivnosti ANAE nađeno je u pacijenata sa egzulcerisanim plakom u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola pacijenata sa kalcifikovanim plakom (grafikon 4, slike 4 i 5). Ovi naši rezultati su u saglasnosti sa publikovanim podacima, prema kojima ANAE pozitivnost varira u zavisnosti od stepena aktivacije makrofaga (8). Uz to, oni predstavljaju potvrdu da povećan broj monocita i ostalih zapaljenjskih ćelija, pored ostalog, preko izlučenih esteraznih enzima razgradnjom osnovnog matriksa u vezivnoj kapi plaka, dovode do njegove ulceracije (7, 28).

Uzorci aterosklerozno izmenjene humane karotidne arterije u odnosu na kontrolne vrednosti se razlikuju u pogledu stepena i vrste celularnosti. Ovakav nalaz naše studije ukazuje na aktivnu ulogu monocitno-makrofagnih ćelijskih populacija u nastanku i razvoju karotidnog plaka.

Korelacija aktivnosti ANAE i suženja karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata.- U našem istraživanju utvrđena je visoko statistički značajna ($p<0.01$) pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom (tabela 1, grafikon 5). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa brojnim istraživanjima aterogeneze, koja su istakla značaj makrofaga kao lipofaga, uz preporuku da »lizozomima treba pokloniti pažnju u vaskularnoj patologiji, jer su skoro uvek umešani u odgovor organizma na spoljašnje izazove«

(1-11). Tako se ispitivanjem makrofaga iz ateroskleroznih karotidnih lezija došlo do zaključka da ove ćelije imaju više lipofagnih vakuola i veću aktivnost lizozomskih esteraza, β -glukuronidaze, kisele fosfataze i katepsina. Pokazano je, takođe, da lizozomski enzimi makrofaga imaju stimulacijski efekat na DNK sintezu i pokreću mitotske procese u ćeliji (8). Naš rezultat je u saglasnosti sa citohemijskim nalazima povećane aktivnosti ANAE u toku eksperimentalne ateroskeroze (7, 9, 28). U makrofagima i penastim ćelijama dobijenim iz ateroskleroznih plakova životinja koje su bile na hiperholesterolskoj dijeti nađen je povećan broj lizozoma, sekundarnih lizozoma, fagolizozoma, postlizozoma i rezidualnih tela. Fibrolipidni plak je metabolički veoma dinamična tvorevina, u kojoj imunski kompleksi i drugi imunski efektori ostvaruju svoj uticaj svojevrsnim podešavanjem stepena aktivnosti lizozomskog enzimskog sistema (28). Pokazano je da ANAE pozitivnost varira u zavisnosti od stepena aktivacije makrofaga (8). Razni lokalni stimulusi (cirkulišući imunski kompleksi, antigeni, ćelijski debris, produkti inflamacijskih procesa, nagomilavanje stranih materija, delovi mikroorganizama, i dr.) mogu da aktiviraju makrofage, i izazovu nakupljanje i otpuštanje lizozomskih enzima (7). Osim toga, preovlađuje mišljenje da bi ANAE mogla učestvovati u antigenskoj prezentaciji i aktivaciji T limfocita (29). Imajući sve ove činjenice u vidu, naš rezultat bi trebalo shvatiti i kao pokušaj dela monocitnog klirens sistema da, pored ostalog, ubrza uklanjanje nagomilanih lipoproteina i imunskih kompleksa.

Pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku, koja je na nivou statističke značajnosti ($p < 0.05$) (tabela 2, grafikon 6), predstavlja naš rezultat, koji ide u prilog shvatanjima da morfološke promene ateroskleroznog suženja, koje iznenada nastaju u toku intraplakalne hemoragije, mogu da aktiviraju makrofage i njihove lizozomske enzime (30, 31). Prepoznatljiva akutna hemoragija, praćena infiltracijom polimorfonuklearnim leukocitima i ranom fokalnom makrofagnom aktivacijom, uočljiva je u vremenskom periodu do jedne nedelje od pojave erozije fibrozne kape. Dalja promena u intraplakalnoj hemoragiji, praćena u vremenskom intervalu do šest nedelja od pojave erozije fibrozne kape, vezana je za prisustvo intaktnih i raspadnutih eritrocita, pri čemu se hemosiderin nagomilava u lokalnim makrofagima. Zatim, dolazi do formiranja gigantskih ćelija, precipitacije kristala holesterola i početka angioneogeneze na periferiji lezije. Poslednja značajna promena u evoluciji intraplakalne hemoragije, koja je karakteristična za period nakon šest nedelja od pojave erozije fibrozne kape, odnosi se na prisustvo amorfne materijala, koji kada se boji elastohromom, zadobija

tamno prebojenje. Pored toga, formiraju se i krupni depoziti holesterolskih kristala, koji mogu biti praćeni znacima okolne angioneogeneze. Ćelije monocitnog klirens sistema sa "pocepanim membranama", u stanju raspada i prosipanja lizozomskog i vakuolarnog sadržaja, su takođe, često prisutne (31). Prema tome, čini se sasvim izvesnim, da krvarenje u plaku, može da uslovi otpuštanje lizozomskih enzima makrofaga, na šta upućuje i statistički značajna pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku, koja je registrovana u našoj studiji.

Praćenjem citohemijske aktivnosti ANAE, u našem istraživanju je nađena statistički značajna pozitivna korelacija ($p < 0.05$) između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom (tabela 3 i grafikon 7). Ovakav naš nalaz potkrepljuju i ranija istraživanja značaja egzulceracije karotidnog plaka, koja su pokazala da u jednom trenutku razvoja plaka, makrofagi preopterećeni lipoproteinima gube sposobnost lizozomskih lipoproteinskih transformacija i postaju podložni autolizi. Oslobođanjem lizozomskih enzima u okolna tkiva, potom nastaje nekroza sa egzacerbacijom ateroskleroze i daljim oštećenjem bazalne membrane. Interesantno je napomenuti da je nekroza praćena padom nivoa adenozintrifosfata (ATP) i metaboličkom insuficijencijom ćelija intime, koje su zadužene za uklanjanje lipoproteina. Međutim, pokušaji bližeg definisanja metaboličkih uzroka za prelazak stabilnog u nestabilni plak su još uvek nerazjašnjeni (30, 32). Izgleda da lizozomski enzimi aktiviranih makrofaga imaju neposredan uticaj na nedovoljno istražena metabolička zbivanja u egzulcerisanom plakom. Na takav zaključak bi mogla da nas navede statistički značajna pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom, koja je dobijena kao rezultat našeg istraživanja.

Između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa kalcifikovanim plakom u našoj studiji je registrovana statistički značajna pozitivna korelacija ($p < 0.05$) (tabele 4, grafikon 8). Pojava kalcijumskih depozita u zidu karotidnog krvnog suda sa izmenjenim morfološkim i mehaničkim osobinama dovodi do značajnih hemodinamskih poremećaja, usled smanjenja elastičnosti i promena kinetike krvne struje u tako izmenjenom krvnom sudu (16, 33). U tim uslovima, nije isključeno da funkcijsko stanje lizozomskog enzimskog sistema arterijskog zida biva narušeno usled mehaničkog stresa, tj. sila tenzije između rigidnog plaka i znatno elastičnijeg zdravog dela arterijskog tkiva. Ovakvo razmišljanje je u saglasnosti sa našim rezultatom i podacima iz literature, koji se odnose na porast broja lizozoma u fagocitozno aktivnim makrofagima u uslovima hipertenzije (34).

Zaključak

Registrovane pozitivne linearne korelacije ANAE esteraznog skora i različitog stepena suženja karotidne arterije kod pacijenata sa aterosklerozno promenjenim tkivom ovog krvnog suda mogle bi da

ukažu na značaj aktivnosti ANAE u aterogenezi. One takođe upućuju na potrebu detaljnijeg ispitivanja uloge ovog enzima u tkivu aterosklerozno izmenjenih arterija.

Literatura

1. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(19/26):868-74.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
4. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Zapaljenski proces u aterogenezi: nove činjenice o starom plamenu. *Med Pregl* 2012;65(9-10):388-95.
5. Hayhoe FGJ, Quaglini D. Haematological cytochemistry, Churchill & Livingstone, Edinburgh, London, 1990.
6. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-55.
7. Vučević D, Radak Đ, Milovanović I, Radosavljević T, Mladenović D, Stanković M, i sar. Citoheimske karakteristike i uloga ćelijskih nespecifičnih esteraza u aterogenezi. *Med Istraživ* 2012;46(3):24-34.
8. Uphoff CC, Drexler HG. Biology of monocyte-specific esterase. *Leukemia and Lymphoma* 2000;39(3-4):257-70.
9. Vučević D, Radak Đ, Kovačević D, Milovanović I, Radosavljević T, Mladenović D, i sar. Citoheimska analiza alfa naftil acetat esteraze u ateroskleroznim lezijama humane karotidne arterije. *Med Istraživ* 2012;46(2):33-43.
10. Wachstein M, Wolf G. The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. *J Histochem Cytochem* 1958;6:457.
11. Mueller J, Del Re GB, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 1975;5:270.
12. Đorđević-Denić G, Radak Đ, Cvetković P, Perović M. Cytochemical examination of the amount of lipids in alveolar macrophages during experimental atherosclerosis. *Yugoslav Physiol et Pharmacol Acta* 1987;23(1):105-6.
13. Đurić D. Ateroskleroza: epidemiologija, faktori rizika i globalno uspešne intervencije. U: Đurić MD (ur.). Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija: sa međunarodno prihvaćenim preporukama za prevenciju ateroskleroze. Društvo fiziologa Srbije (Kragujevac: Grafičar), Beograd, 2005, 7-13.
14. Oostrom O. Age-related changes in plaque composition. A study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:126-34.
15. Rapp JH, Owens CD, Johnson MD. Blood vessel and lymphatic disorders. In: Mc Phee SJ, Papadakis MA, editors. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. New York, Chicago, London: Mc Graw Hill Companies, Inc; 2011. p. 446-69.
16. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in innominate arteries of apoE-deficient mice. Potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1420-5.
17. Hunter R, Chun Y, Vasily L, Baocheng C, Minako O, Nayak L, et al. Arterial remodeling in the subclinical carotid artery disease. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2009;2:1381-9.
18. Velkovski S. Bazična istraživanja ateroskleroze i eksperimentalni modeli. U: Đurić MD (ur.). Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija: sa međunarodno prihvaćenim preporukama za prevenciju ateroskleroze. Društvo fiziologa Srbije (Kragujevac: Grafičar), Beograd, 2005, 73-78.
19. Porth MC. Cellular adaptation, injury and death. In: Porth MC (ed.). *Pathophysiology. Concepts of altered health states*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005, 103-17.
20. Lawlor DA. Sex differences in body fat distribution and carotid intima media thickness: cross sectional survey using data from the British regional heart study. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:700-4.
21. Togay-Isikay C. Carotid artery tortuosity, kinking, coiling: stroke risk factor, marker or curiosity? *Acta Neurol Belg* 2005;105(2):68-72.
22. Fujii K, Abe I, Ohya Y, Ohta Y. Risk factors for the progression of early carotid atherosclerosis in a male working population. *Hypertens Res* 2003;26:465-71.
23. Sutton-Tyrrell K. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and

- its association with risk factors measured after menopause. *Stroke* 1998;29:1116-21.
24. Makinen J. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. *JACC* 2005;45(10):1603-8.
25. Radovanović N, Ilić T. Korelacija kliničke ekspresije karotidne bolesti sa verifikovanim stepenom suženja karotidnih krvnih sudova. *Med Podmladak* 2011;(1-2):73-7.
26. Grogan JK. B-mode ultrasonographic characterization of carotid atherosclerotic plaques in symptomatic and asymptomatic patients. *J Vasc Surg* 2005;42:435-41.
27. Kostić VS, Raičević R i sar. Karotidna bolest-etilogija, patofiziologija, dijagnostika i terapija. Medicinski fakultet u Beogradu/Vojnomedicinska akademija Beograd, Beograd, 2004.
28. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Fibrozni plak kao metabolički stadijum aterogeneze. *Med Istraživ* 2009;43(1):35-47.
29. Sandikci M, Eren U, Kum S. Alpha-naphthyl acetate esterase activity in the spleen, lymph nodes and conjunctiva associated lymphoid tissues of camels (*Camelus dromedarius*). *Revue Méd Vét* 2005;156(2):99-103.
30. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque. Pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:125-38.
31. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011;32:1977-85.
32. Stoger JL, Goossens P, de Winther MP. Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:233-48.
33. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, Morgan C, Ix JH, Wright CM, et al. Calcified atherosclerosis in different vascular beds and the risk of mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:140-6.
34. Cunningham KS, Gotlieb AL. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005;85:9-23.