

Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u karotidnom aterosklerotskom plaku

Trbušić, Matias

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:795474>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Trbušić, Matias (2011) *Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u karotidnom aterosklerotskom plaku*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1379>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matias Trbušić

**Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u
karotidnom aterosklerotskom plaku**

DISERTACIJA



Zagreb, 2011.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matias Trbušić

**Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u
karotidnom aterosklerotskom plaku**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena na Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra *Sestre milosrdnice* kao dio zajedničkog projekta u sklopu međunarodne suradnje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog Univerziteta u Grazu.

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Vesna Degoricija, dr. med.

Zahvaljujem se supruzi Sanji na podršci, a kćerima Lauri, Luciji i Eni na strpljenju.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Vesni Degoriciji, dr. med., za podršku, pomoć i savjete u cjelokupnom postupku nastanka ove disertacije.

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
1.1.	Etiologija i patofiziologija aterosklerotske bolesti karotidne arterije	1
1.2.	Simptomi aterosklerotske bolesti karotidne arterije.....	1
1.3.	Povezanost između stupnja stenozе karotidne arterije i simptoma	2
1.4.	Dijagnostika aterosklerotske bolesti karotidne arterije.....	4
1.4.1.	Slikovne metode	4
1.4.2.	Ultrazvučno određivanje morfolоgije aterosklerotskog plaka karotidne arterije	6
1.4.3.	Laboratorijski predskazatelji cerebrovaskularnih događaja	6
1.5.	Liječenje aterosklerotske bolesti karotidne arterije.....	7
1.5.1.	Karotidna endarterektomija	7
1.5.2.	Medikamentni pristup	10
1.6.	Ateroskleroza	12
1.6.1.	Definicija ateroskleroze.....	12
1.6.2.	Rizični čimbenici za nastanak ateroskleroze.....	13
1.6.3.	Stanični elementi u razvoju ateroskleroze.....	14
1.6.4.	Značenje upalnih pokazatelja u aterosklerozi	16
1.6.5.	Reverzni transport kolesterola.....	18
1.6.6.	Rezidualni rizik	20
1.7.	Dosadašnje spoznaje o endotelnoj lipazi	23
1.7.1.	Molekularni sastav	23
1.7.2.	Utjecaj na LDL kolesterol	23
1.7.3.	Utjecaj na HDL kolesterol.....	23
1.7.4.	Utjecaj na reverzni transport kolesterola.....	24
1.7.5.	Regulacija ekspresije endotelne lipaze.....	25
1.7.6.	Endotelna lipaza i makrofazi	26
1.7.7.	Odnos endotelne lipaze i upale.....	27
1.7.8.	Polimorfizam gena za endotelnu lipazu	28
1.7.9.	Utjecaj endotelne lipaze na aterosklerozu	29
2.	CILJEVI I HIPOTEZA DOKTORSKE DIZERTACIJE	30
2.1.	Ciljevi.....	30
2.1.1.	Globalni cilj	30
2.1.2.	Specifični ciljevi.....	30
2.2.	Hipoteza	31
3.	BOLESNICI I METODE	32
3.1.	Plan istraživanja	33
3.2.	Definicija simptomatske karotidne stenozе.....	34
3.3.	Kliničke karakteristike, anamneze i terapija bolesnika.....	35
3.4.	Kardiološki pregled s elektrokardiografijom i ehokardiografijom	36
3.5.	Kolor dopler karotidnih arterija	37
3.6.	Sakupljanje uzoraka karotidnih plakova.....	37
3.7.	Imunohistokemijska analiza	38
3.8.	Laboratorijske analize krvi	38
3.8.1.	Standardne laboratorijske analize.....	38
3.8.2.	Endotelna lipaza u plazmi	39
3.9.	Statistička analiza	40
4.	REZULTATI.....	41
4.1.	Klinički pokazatelji ispitivane populacije bolesnika	41

4.2. Analiza plaka.....	45
4.2.1. Podjela na skupine prema simptomima.....	45
4.2.2. Podjela na skupine prema histološkim kriterijima	54
4.3. Endotelna lipaza u plazmi.....	59
4.3.1. Povezanost endotelne lipaze u plazmi s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima i terapijom	59
4.3.2. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s histološkim tipom plaka i simptomima.....	63
5. RASPRAVA.....	66
5.1. Kliničke karakteristike bolesnika	66
5.1.1. Dob, spol i čimbenici rizika za ateroskleroza	66
5.1.2. Terapija bolesnika	68
5.2. Analiza plaka.....	70
5.2.1. Kliničke karakteristike simptomatskih i asimptomatskih bolesnika	70
5.2.2. Morfološke karakteristike plaka i stupanj stenoze kod simptomatskih i asimptomatskih bolesnika	71
5.2.3. Histološke karakteristike plaka	72
5.2.4. Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u plaku.....	74
5.3. Plazmatska razina endotelne lipaze	80
6. ZAKLJUČCI	85
7. SAŽETAK.....	89
8. SUMMARY	91
9. REFERENCE	93
10. POPIS PRILOGA.....	109
10.1. Popis slika	109
Slika 4.1-1. Dijagram toka bolesnika kod uključivanja u studiju.....	109
Slika 4.2-1. Imunohistokemija za endotelnu lipazu (primjeri tipa A i B)	109
Slika 4.2-2. Histologija - fibrozni plak (Hemalaun-Eozin)	109
Slika 4.2-3. Histologija – ulcerirani komplicirani plak	109
Slika 4.2-4. Lokalizacija endotelne lipaze u karotidnom plaku.....	109
10.2. Popis grafikona	109
10.3. Popis tablica	110
10.4. Popis kratica.....	111
11. ŽIVOTOPIS	113

1. UVOD

1.1. Etiologija i patofiziologija aterosklerotske bolesti karotidne arterije

Moždani udar ili cerebrovaskularni inzult (CVI) vodeći je uzrok smrti žena (19%) i drugi vodeći uzrok smrti muškaraca (19%) u Republici Hrvatskoj.¹ U Europi godišnja incidencija CVI-a na 100 000 stanovnika je 141,3 u muškaraca i 74,9 u žena.² Najveći broj (80%) jest ishemički inzult, dok je hemoragični inzult (11%) i subarahnoidalno krvarenje (3,5%) znatno rjeđi uzrok CVI-a. Oko 50% ishemičkih CVI-a vezano je uz aterosklerotsku bolest intra ili ekstrakranijalnih karotidnih arterija koja je prisutna u gotovo 75% muškaraca i 62% žena starijih od 65 godina s time da je prevalencija $\geq 50\%$ stenoze u toj populaciji oko 7% u muškaraca i 5% u žena.³ Sama aterosklerotska bolest ekstrakranijalnih karotidnih arterija odgovorna je za oko 15 do 20% ishemičkih CVI-a.^{4,5} Simptomi i patološki supstrat karotidne aterosklerotske bolesti prvi je opisao Charles Miller Fischer 1951. godine kada je povezao bifurkacijsku karotidnu stenozu s ipsilateralnim ishemičkim simptomima mozga i oka. Aterosklerotske promjene su obično najizraženije na stražnjoj stijenci unutarnje karotidne arterije (lat. arteria carotis interna – ACI), oko 2 cm od bifurkacije. Karotidna stenoza je povezana s povećanom incidencijom CVI-a i smrtnosti u starijih osoba.^{6,7} Najčešći patofiziološki mehanizmi putem kojih karotidna stenoza postaje simptomatska su embolizacija trombotskog materijala s plaka i kritično smanjenje protoka kroz stenozu uz nedovoljnu kolateralnu cirkulaciju.^{8,9} Preostali mogući mehanizmi su okluzija arterije uslijed progresivnog rasta plaka ili tromboze na rupturiranom plaku, ateroembolizam kolesterolskih kristala (debri ateroma), disekcija žile odnosno subintimalni hematoma.

1.2. Simptomi aterosklerotske bolesti karotidne arterije

Klinički simptomi karotidne bolesti mogu biti CVI, tranzitorna ishemička ataka (TIA) i/ili prolazni gubitak vida na jedno oko uzrokovanog malim embolusom u oftalmičkoj arteriji (lat. amaurosis fugax). Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, CVI je akutni

neurološki deficit uzrokovan poremećenom perfuzijom dijela mozga (ishemija ili krvarenje) koji traje dulje od 24 sata¹⁰ dok je TIA iznenadni, fokalni neurološki deficit koji traje manje od 24 sata unutar kojeg perioda dolazi do potpunog oporavka moždanih funkcija. Iako manjkava, ta je definicija još uvijek u uporabi. Ne uklapa se u potpunosti u današnju spoznaju o patofiziologiji i tijeku CVI-a. Podrazumijeva da kod TIA-e nema oštećenja moždanog parenhima iako se u gotovo 20% slučajeva kompjuteriziranom tomografijom (CT) može vidjeti ishemička lezija koja po svojem smještaju odgovara nastalim prolaznim simptomima. Kod bolesnika bez oporavka moždanih funkcija unutar 1-3 sata do potpunog oporavka unutar 24 sata dolazi u samo 2% slučajeva. Stoga se danas teži redefiniranju vremenske granice između CVI-a i TIA-e na 1 sat.¹¹ TIA je vrlo važan predskazatelj CVI-a; unutar 90 dana od TIA-e učestalost CVI-a je 13% (najviše u prvom tjednu nakon TIA-e), a unutar 5 godina gotovo 30%.^{12, 13} To ukazuje da je TIA hitno stanje koja može prethoditi CVI-u, u patofiziološkom smislu predstavlja ekvivalent nestabilne angine ili akutnog koronarnog sindroma kod koronarne bolesti. Destabilizacija aterosklerotskog plaka s posljedičnom ulceracijom i rupturom te trombozom i hemoragijom unutar plaka jest najznačajniji patogenetski mehanizam koji dovodi do pojave simptoma, slično kao i kod koronarne bolesti.¹⁴

1.3. Povezanost između stupnja stenozne karotidne arterije i simptoma

Povezanost između rasta plaka odnosno stupnja stenozne karotidne arterije i pojave simptoma nije tako stroga kako bi se moglo očekivati, ali opet je puno čvršća nego kod koronarne bolesti srca kod koje se zna da najveći broj infarkta miokarda nastaje upravo na mjestu hemodinamski neznčajnih stenoz. U North American Symtomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) studiji nađena je značajna povezanost: nakon 18 mjeseci medikamentne terapije bez revaskularizacije učestalost CVI-a bila je 19% za stenozne od 70-79%, 28% za stenozne od 80-89% te 33% za stenozne od 90-99% (kod okluzije rizik se smanjuje).¹⁵ U Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS) i Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) studiji, asimptomatski bolesnici sa stenozom od 60% do 80% imali su veću učestalost moždanog udara nego oni s većim stupnjem stenozne.^{16, 17} Medikamentna terapija u vrijeme tih studija bila je značajno inferiornija u usporedbi s današnjim smjericama, temeljena uglavnom samo na primjeni aspirina. U ACAS studiji 5-godišnji rizik ispilateralnog CVI-a bio je 11%¹⁸ dok je u ACST rizik za stenozne više od 70% bio 4.7%¹⁹ što ukazuje da je

medikamentna terapija s vremenom postala uspješnija u prevenciji moždanog udara te da asimptomatska stenoza karotidne arterije ima relativno benigniji tijek. Prema rezultatima studije Second Manifestations of ARterial disease study (SMART) godišnja incidencija ipsilateralnog moždanog udara kod asimptomatske stenoze karotidne arterije jest svega 0.6%.²⁰ U tom kontekstu današnje medikamentne terapije nužno je prepoznati one bolesnike s asimptomatskom stenozom karotidne arterije koji su pod povećanim rizikom da razviju moždani udar. Ističu se tri potencijalne skupine predskazatelja: a) opći pokazatelji (vezani uz bolesnika) b) karakteristike plaka (stupanj stenozе i morfološke karakteristike) i c) biokemijski pokazatelji.

U studiji Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Stroke (ACSRS), do sad najvećoj objavljenoj studiji za asimptomatsku karotidnu stenozu, dob i spol bolesnika nisu prepoznati kao predskazatelji za razvoj simptoma.²¹ U toj su studiji kombinacija tri čimbenika (90-99%-tna karotidna stenoza, anamneza kontralateralne TIA-e i kreatinin iznad 85 $\mu\text{mol/L}$) predskazatelji moždanog udara. Godišnja stopa ipsilateralnog moždanog udara je 6.3% što je još uvijek ispod stope komplikacija za karotidnu endarterektomiju (eng. carotid endarterectomy – CEA) i postavljanje endovaskularne proteze u karotidnu arteriju (eng. carotid artery stenting – CAS) kod određene skupine bolesnika. Kad se gleda izolirano samo stupanj stenozе, kod bolesnika s 90-99%-tnom stenozom prosječni godišnja stopa ishemičkih događaja (TIA, CVI, amaurosis fugax) bila je 5 % s time da je varirala od 1.0 do 6.3% ovisno o kreatininu i ranijim kontralateralnim simptomima. Ostali rizični čimbenici bili su okluzija kontralateralne karotide te brzina progresije stenozе. Rizični čimbenici poput arterijske hipertenzije i hiperlipoproteinemije nemaju visoku prediktivnu vrijednost jer su prisutni u većine bolesnika s karotidnom bolešću. Iako upalni pokazatelji poput leukocita u krvi, C-reaktivnog proteina (eng. C-reactive protein - CRP), lipoprotein-povezane fosfolipaze-A2 (eng. lipoprotein-associated phospholipase-A2 – Lp-PLA2) i homocisteina mogu općenito biti korisni u stratifikaciji rizika za moždani udar, za sad nisu korisni u odabiru za CEA asimptomatskih bolesnika sa značajnom karotidnom stenozom.

Morfološke karakteristike plaka mogu se podijeliti na karakteristike površine i unutrašnjosti plaka. Nepravilna površina plaka i hipoehogene ili miješane (hipo i hiperehogene) zone u plaku su karakteristike koje su dokazano povezane sa sadašnjim ili prošlim simptomima simptomima,^{22, 23} međutim nemaju dokazanu prediktivnu vrijednost kod asimptomatskih bolesnika. Nicolaidis i suradnici objavili su da kod 70-99%-tne stenozе godišnji rizik

ipsilateralnog infarkta od 2% kod hipoehogenih ili mješovitih plakova u usporedbi s 0,14 % kod fibroznih (uniformno ehogenih) ili kalcificiranih plakova.²⁴ Iako se histopatološke karakteristike povezane s nestabilnošću plaka (ulceracije, krvarenje/ruptura plaka i luminalna tromboza) mogu vidjeti u 20-50% simptomatskih bolesnika, mogu se vidjeti i u 15-45% asimptomatskih bolesnika.²⁵⁻²⁷

1.4. Dijagnostika aterosklerotske bolesti karotidne arterije

1.4.1. Slikovne metode

U dijagnostici karotidne bolesti koriste se slijedeće slikovne metode: ultrazvuk (eng. color doppler flow imaging – CDFI), digitalna subtrakcijska angiografija (DSA), CT-angiografija (eng. computed tomography angiography - CTA) i magnetska angiografija s kontrastom (eng. contrast enhanced magnetic resonance angiography – CEMRA).

Cerebralna angiografija je zlatni standard u dijagnostici karotidne bolesti. Razvoj DSA smanjio je vrijeme trajanja pretrage, dozu zračenja, dozu kontrasta kao i veličinu katetera za dijagnostičku proceduru. Prednosti ove pretrage su uvid u cjelokupni arterijski karotidni sliv, morfologiju plaka i kolateralnu cirkulaciju.²⁸ Mane pretrage su invazivnost postupka, cijena i rizik od ozbiljnih komplikacija i smrti (oko 1 %).²⁹ Učestalost pojave komplikacija vezana je sa simptomatičnošću bolesti, uznapredovalom dobi, dijabetesom, arterijskom hipertenzijom, povišenim kreatininom, perifernom vaskularnom bolešću, veličini katetera i količinom kontrasta.²⁹

CDFI uz B-mode prikaz ima zadovoljavajuću senzitivnost (81-98%) i specifičnost (82-89%) u usporedbi sa standardnom angiografijom u detekciji značajnih stenoza. Ultrazvuk ima mogućnost i uvida u morfologiju plaka što ima prognostičku vrijednost.³⁰ Prednosti ultrazvuka su neinvazivnost, sigurnost, cijena te zadovoljavajuća senzitivnost i specifičnost. Nedostaci su manja osjetljivost kod nižeg stupnja stenoza, ograničene mogućnosti kod anatomskih nepogodnosti kao što su jako zavijena i kalcificirana žila i zadebljani vrat bolesnika, te ovisnost o iskustvu i stručnosti ultrasonografičara. Na temelju konsenzusa doneseni su kriteriji pomoću kojih se određuje stupanj stenoze karotidne arterije, navedeni u tablici 1.4-1.³¹

Tablica 1.4-1. Kriteriji za utvrđivanje stupnja stenoze karotidne arterije

	Primarni pokazatelji		Dodatni pokazatelji	
Stupanj stenoze	Maksimalna sistolička brzina protoka u ACI (cm/s)	Redukcija dijametra ACI (%)	Odnos brzina u ACC i ACI	Maksimalna enddijastolička brzina protoka u ACI
Normalno	<125	Norm	<2.0	<40
<50%	<125	<50	<2.0	<40
50-69%	125-230	>50	2.0-4.0	40-100
>70%	<230	>50	>4.0	>100
95-99%	Visoka, niska ili nemjerljiva	Vidljiv protok	Varijabilno	Varijabilno
Okluzija	Nemjerljivo	Bez protoka	-	-

CEMRA: Senzitivnost CEMRA-e iznosi 91-95%, a specifičnost 88-99%. Prednost ove pretrage jest uvid u cijelu arteriju (ekstrakranijalni i intrakranijalni segment) i manja ovisnost o iskustvu dijagnostičara, a mane su manja pouzdanost za umjerene stenoze (precjenjivanje stenoza), nesposobnost razlikovanja subokluzije i okluzije, cijena, ograničena dostupnost kao i poteškoće u provođenju kod bolesnika u teškom općem stanju, klaustrofobičnih bolesnika te bolesnika s elektrostimulatorom srca ili defibrilatorom. Gadolinijski kontrast ima značajno manju učestalost nefropatije i alergijskih reakcija nego jodni kontrast koji se koristi kod DSA.

CTA: omogućava uvid u arteriju, ali i okolne strukture. Senzitivnost pretrage je 77%, a specifičnost 95%. Osobito je korisna u situacijama gdje je ultrazvuk ograničen (npr. tortuoziteti i kalcifikati arterija). Mana je rendgensko zračenje te mogućnost nastajanja kontrastom uzrokovane nefropatije.

Zaključno se može reći da je zbog vrlo široke uporabe, dostupnosti i relativno niske cijene pretrage, CDFI pretraga izbora za probir bolesnika s umjerenim rizikom bolesti, uz određena ograničenja može se koristiti i kao definitivna pretraga. Ako tom metodom nije nađena značajna stenoza u simptomatskih bolesnika, dolazi u obzir upotrijebiti druge metode, osobito radi detekcije proksimalnije odnosno distalnije bolesti.

1.4.2. Ultrazvučno određivanje morfologije aterosklerotskog plaka karotidne arterije

Obzirom na nekonzistentnu povezanost između stupnja stenozе i simptomatologije bolesnika, intenzivno se istražuju i drugi potencijalni pokazatelji vulnerabilnosti plaka i rizika za CVI. Morfološke karakteristike plaka detektirane ultrazvučnom metodom poput ulceracija, hipoehogениh zona i krvarenja unutar plaka povezane su s povećanom učestalošću CVI-a.^{27, 32} Iako su molekularni i stanični procesi odgovorni za sastav plaka vjerojatno značajniji za rizik od cerebrovaskularnih događaja,³³ stupanj stenozе je i dalje osnova za kliničko odlučivanje jer dobro korelira s morfološkim karakteristikama vulnerabilnosti plaka.³²

1.4.3. Laboratorijski predskazatelji cerebrovaskularnih događaja

Kao predskazatelji cerebrovaskularnih događaja odnosno nestabilnosti plaka kod ekstrakranijalne karotidne bolesti istražuju se i biomarkeri poput visoko-senzitivnog C-reaktivnog proteina (eng. high-sensitive C-reactive protein – hsCRP) i određenih matriks-metaloproteinaza.³⁴⁻³⁶ Osjetljivost i specifičnost tih biomarkera još nije utvrđena prospektivnim kliničkim studijama.

1.5. Liječenje aterosklerotske bolesti karotidne arterije

Terapijski pristup kod signifikante stenozе karotidne arterije uključuje CEA, samo medikamentno liječenje te angioplastiku odnosno CAS.

1.5.1. Karotidna endarterektomija

1.5.1.1. Indikacije za endarterektomiju karotidne arterije

Simptomatski bolesnici

Simptomatski bolesnici (oni koji su imali CVI, TIA-u ili amaurosis fugax unutar 6 mjeseci) s umjerenim ili niskim operativnim rizikom imaju indikaciju za CEA ako je neinvazivno dokazana 70%-tna stenozа^{37, 38} ili DSA-angiografijom 50%-tna stenozа karotidne arterije.¹⁵ Alternativa jest CAS ako je procijenjeni rizik periproceduralnog inzulta i smrti manji od 6%.³⁹ Na temelju studije NASCET⁴⁰ i ESCT⁴¹ utvrđeno je da je CEA učinkovita u simptomatskih bolesnika s ipsilateralnom karotidnom stenozom $\geq 70\%$. U NASCET studiji operirani bolesnici imali su apsolutno smanjenje nastanka ipsilateralnog CVI-a za 17% u periodu od 2 godine (učinak se gubi ako je postotak perioperativnih komplikacija veći od 10%). U ESCT studiji operirani bolesnici su imali apsolutno (6,5%) i relativno (39%) smanjenje rizika za nastanak CVI-a. Prema rezultatima subanalize NASCET studije CEA je indicirana i kod simptomatskih muškaraca sa stenozom 50-69% u centrima s niskim postotkom komplikacija (mortalitet manji od 6%). Za stenozе manje od 50% preporuča se medikamentna terapija čak i ako su simptomatske.

Asimptomatski bolesnici

Kod asimptomatskih bolesnika preporuča se CEA u slučaju 70-99% stenozе, očekivanog trajanja života više od 5 godina i rizika od perioperativnog CVI-a i smrti manje od 3% u određenom centru odnosno za operatera.⁴² Korist od operacije manje je izražena u žena nego u muškaraca. Obzirom na veći periproceduralni rizik od CVI-a i smrti ne preporuča se CAS

kod asimptomatskih bolesnika osim ako se provodi kao dio kliničke studije u specijaliziranom centru s niskim stupnjem teških komplikacija (<3%).

CAS se preporuča kod simptomatskih bolesnika s karotidnom stenozom 70-99% u slučaju visokog operativnog rizika⁴³ ako karotidna lezija nije kirurški dostupna, ako je stenoza uzrokovana radijacijom,⁴⁴ te u slučaju restenoze nakon CEA.

1.5.1.2. Kirurška tehnika

CEA se vrši kroz longitudinalnu inciziju na vratu uz rub sternokleidomastoidnog mišića ili kroz poprečnu inciziju na pretpostavljenom mjestu račvišta karotidne arterije. Nakon preparacije dijela zajedničke, unutarnje i vanjske karotidne arterije, davanja heparina i klemanja žila, pristupa se longitudinalnoj arteriotomiji na razini bifurkacije prema proksimalno i distalno. Pojedini kirurzi koriste kod svih bolesnika cerebralni *shunt* (privremeni prostetički spoj između proksimalnog i distalnog kraja anastomoze), dok drugi odabiru bolesnike prema kliničkim znakovima kod budnog bolesnika ili prema EEG monitoringu kod bolesnika u općoj anesteziji (na taj način izbjegava se rizik od cerebralne hipoperfuzije, međutim postoji stanoviti rizik za disekciju arterije i dislokaciju plaka s posljedičnom embolijom prilikom postavljanja shunta). Slijedeći korak je odstranjenje karotidnog plaka (između medije i intime) pri čemu se pazi da područje prijelaza između operiranog i neoperiranog dijela bude glatko da bi se izbjegla postoperativna disekcija. Nakon pažljivog pregleda površine endarterektomije i odstranjenja ostatka plaka, arterija se zatvara primarno ili uporabom zakrpe (biološki materijal kao npr. venski presadak ili protetski materijal kao npr. dacron ili politetrafluoretilen) što je povezano s nižim stupnjem restenoze i nižom stopom perioperativnog CVI-a.⁴⁵ Prije potpunog zatvaranja arterije ista se ispire retrogradno otvaranjem distalne kleme. Distalna arterija se zatim opet klema te kompletno zatvara šavovima. Može se koristiti i lokalni hemostatski materijal da bi se spriječilo krvarenje u vrat. Neurološka procjena stanja izvodi se svaki sat oporavka nakon operacije. Manipulacije oko karotidnog stabla mogu uzrokovati hemodinamsku nestabilnost u perioperativnom periodu što se treba aktivno liječiti da bi se izbjegla cerebralna hipoperfuzija. CEA se može izvoditi u općoj ili lokalnoj anesteziji, a izbor ovisi o operateru i karakteristikama bolesnika. Nema razlike u ishodu (cerebrovaskularni inzult, srčani infarkt, smrt) između ove dvije metode.⁴⁶ Bilateralna CEA u istom aktu izbjegava se zbog rizika od

značajne cerebralne hipoperfuzije, hemodinamske nestabilnosti i respiratorne ugroženosti zbog hematoma vrata kao i bilaterang oštećenja laringealnog živca.

1.5.1.3. Akutne komplikacije zahvata

Mortalitet opisanog zahvata ovisi o centru odnosno operateru te iznosi oko 0.5-3%. Najčešće je uzrokovan srčanim neželjenim događajima, na drugom je mjestu moždani udar. Rizični čimbenici za nepovoljan ishod su: dob iznad 80 godina, teška srčana i plućna bolest, bubrežno zatajivanje, inzult kao indikacija za opeaciju te otežavajuće anatomske okolnosti poput lošeg kirurškog pristupa (zadebljan vrat), ranije zračenje vrata, ranija CEA te okluzija kontralateralne karotidne arterije. Terapija aspirinom i statinom u perioperativnom periodu i kod simptomatskih i kod asimptomatskih bolesnika može smanjiti rizik od komplikacija.^{47, 48}

Više je čimbenika koji mogu dovesti do CVI-a tijekom CEA (incidencija 0,25-3%), a to su embolija plaka, agregati trombocita, nedovoljno ispiranje arterije, loša cerebralna protekcija kao i relativna hipotenzija. Periproceduralni CVI liječi se heparinom, fibrinolitičkom terapijom ili CAS-om. Hiperperfuzijski sindrom javlja se nakon operacije zbog iznenadnog povećanja protoka kroz karotidnu arteriju u karotidni sliv koji se zbog ranije oskudnog protoka prilagodio i dilatirao. Dilatirane arteriole nemaju dovoljne vazokostrikorne sposobnosti da bi zaštitile kapilare od povećanja perfuzijskog tlaka zbog čega može doći do hemoragije (pojavljuje su u 0,6% CEA). Veća je mogućnost za razvoj hiperperfuzijskog sindroma ako se radi o visokom stupnju stenozе karotidne arterije. Stanje se prevenira strogom periperativnom kontrolom tlaka, a kada se dogodi nužan je prekid terapije aspirinom, pa čak i transfuzija trombocita da bi se odmah vratila antitrombocitna funkcija. Ostale moguće komplikacije su: oštećenje živca (vagus, povratni živac, hipoglosus), krvarenje i hematom vrata, infekcija rane, parotitis, oscilacije tlaka.

1.5.1.4. Restenoza karotidne arterije nakon endarterektomije

Restenoza se javlja se u 2.6-10% slučajeva nakon CEA. Može biti *rana* (unutar 2-3 godine) uzrokovana staničnom proliferacijom (ima niski embolički potencijal), te *kasna* koja je vezana uz proces ateroskleroze (ima visoki embolički potencijal). Rizični faktori za razvoj restenoze su dob ispod 65 godina, pušenje i ženski spol (manji promjer karotidne arterije),

renalna insuficijencija za ranu restenozu i povišen kolesterol u serumu za kasnu restenozu karotidne arterije. Terapija statinom kao i uporaba zakrpe može smanjiti rizik restenoze.

1.5.2. Medikamentni pristup

U većini zemalja se CEA za asimptomatsku stenozu karotidne arterije provodi na temelju važećih smjernica⁴⁹ i na temelju kliničke prakse. Temelji dosadašnjih smjernica jesu tri velike kliničke (kirurške) randomizirane studije: Veterans' Affairs Cooperative Study (VACS)⁵⁰, ACAS¹⁸ i ACST¹⁹ koje su provedene od 1983. do 2003. godine. Godinama je taj pristup upitan zbog relativno male koristi kirurškog pristupa koji snažno ovisi o selekciji bolesnika, prirodi kirurškog i medikamentnog liječenja te načinu prikazivanja rezultata.⁵¹ Osim toga, dosadašnjim metodama ne mogu se selekcionirati bolesnici koji bi nedvojbeno imali korist od CEA. Medikamentni pristup je kombinacija neinvazivnih postupaka koja se sastoji od edukacije, promjene životnih navika, zdrave prehrane i lijekova. Uz navedene mjere došlo je do progresivnog pada godišnjeg rizika za CVI čak i ispod incidencije operiranih bolesnika u ranijim kliničkim studijama. Prema rezultatima analize jedanaest prospektivnih studija, prosječna godišnja incidencija CVI-a u bolesnika s asimptomatskom karotidom stenozom značajno je niža od sredine 80-tih godina zahvaljujući medikamentnoj terapiji i odgovara incidenciji kod operiranih bolesnika iz ranijih studija.⁵² Medikamentna terapija zasniva se na liječenju arterijske hipertenzije, hiperkolesterolemije, dijabetesa, apstinenciji od pušenja te antitrombotskim lijekovima poput aspirina i klopidogrela. Meta-analiza od preko 40 studija (ukupno 188000 bolesnika) dokazala je 33% smanjenje rizika od CVI-a za svaku redukciju tlaka od 10 mmHg (do 115/75 mm Hg).^{53,54} Tip antihipertenzivne terapije čini se manje važan nego sam odgovor na terapiju. Povezanost između hiperkolesterolemije i ishemičkog CVI-a nije tako konzistentna kao između hiperkolesterolemije i infarkta miokarda. U metaanalizi preko 45 prospektivnih studija (oko 450 000 osoba) nije nađena veza između hiperkolesterolemije i CVI-a.⁵⁵ Međutim, u Women's Health Study (27 937 žena starijih od 45 godina) povišen ukupni i LDL-kolesterol povećavaju rizik za CVI.⁵⁶ U bolesnika s utvrđenom stenozom karotidne arterije atorvastatin dovodi do 33%-tnog smanjenja učestalosti CVI-a, 56%-tnog smanjenja potrebe za revaskularizacijom karotidne arterije⁵⁷ odnosno može utjecati i na smanjenje aterosklerotskog plaka karotidne arterije.⁵⁸ Kod dijabetičara intenzivirana terapija s ciljem snižavanja hemoglobinaA1c ispod 7.0% nije dokazala dodatnu korist.⁵⁹ U tih su bolesnika statini, s ciljem redukcije LDL-a ispod 2.5 mmol/L, korisni u prevenciji CVI-a.⁶⁰ Hiperhomocisteinurija se u metaanalizi od 16000

bolesnika pokazala kao rizični čimbenik za ishemički CVI⁶¹ i razvoj aterosklerotske bolesti karotidne arterije,^{62, 63} međutim snižavanje razine homocisteina vitaminima (folna kiselina, piridoksin i kobalamin) ne dovodi do smanjenja rizika za CVI.^{64, 65} Povezanost debljine i metaboličkog sindroma s rizikom za CVI je to jača što je prisutno više metaboličkih faktora (osobito arterijska hipertenzija i hiperkolesterolemija).⁶⁶⁻⁶⁸ Međutim, abdominalni tip debljine jest neovisan rizični čimbenik za CVI.⁶⁹ Antitrombotska terapija s aspirinom 75-325 mg/dan preporuča se kod svih bolesnika sa stenozom karotidne arterije radi prevencije CVI-a iako je korist upitna kod asimptomatskih bolesnika.^{61, 70} U simptomatskih bolesnika indicirana je monoterapija aspirinom (75-325 mg) ili klopidogrelom (75 mg).⁷¹

1.6. Ateroskleroza

1.6.1. Definicija ateroskleroze

Ateroskleroza je kronična fibroproliferativna i imunoinflamatorna bolest s postupnim razvojem plaka (asimetrično fokalno zadebljanje intime) i akutnim kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim komplikacijama. Dok se ranije smatralo da akutne manifestacije ateroskleroze nastaju progresivnim suženjem lumena arterije zbog rasta i umnožavanja glatkih mišićnih stanica, danas se zna da su uzrokovane okluzijom arterije trombom na ranije postojećem, često hemodinamski neznčajnom, ali aktivnom, rupturiranom ili erodiranom plaku. Unatoč napretku u prevenciji i liječenju, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti (CCVD) ostaju i dalje vodeći uzrok smrti u svijetu i Republici Hrvatskoj. Ključni problem i izazov u suzbijanju epidemije CCVD je upravo priroda akutnih komplikacija koje su često prva manifestacija bolesti, a mogu imati katastrofalne posljedice poput srčanog infarkta, CVI-a i iznenadne smrti. Upravo ta činjenica je glavni poticaj medicinskim istraživanjima za bolju stratifikaciju rizika za razvoj CCVD odnosno za rano otkrivanje rizičnih osoba prije nego li se pojave akutne komplikacije. Nadalje, bolesnici koji su preživjeli srčani infarkt, unatoč agresivnom liječenju uključujući visoke doze statina, i dalje imaju učestalost smrti, reinfarkta ili nestabilne angine gotovo 23% u slijedeće 2 godine.⁷² Uz današnje spoznaje, ključno pitanje nije više zašto dolazi do ateroskleroze već zašto u životu osobe samo jedan ili nekoliko plakova od više ili mnogo njih u organizmu prolaze opasnu, akutnu, vulnerabilnu fazu kada su skloni trombozi i okluziji žile odnosno distalnoj embolizaciji. Dva najčešća razloga za trombozu arterije su ruptura plaka (koja se može detektirati u 60-70% slučajeva) i endotelna erozija. Ruptura plaka obično nastaje na mjestu gdje je fibrozna kapa tanka i djelomično uništena u čemu ključnu ulogu imaju upalne stanice koje proizvode upalne molekule i proteolitičke enzime koje slabe kapu i dovode do njene rupture s posljedičnim izlaganjem protrombotskog materijala iz srži plaka (fosfolipidi, tkivni faktor) i aktivacijom kolagulacijske kaskade. Obdukcijske studije su pokazale da je ateroskleroza sistemska bolest koja kod bolesnika zahvaća više ili gotovo sve arterije. Najčešći uzrok srčanog infarkta ili iznenadne smrti jest samo jedan rupturirani vulnerabilni plak najčešće smješten u proksimalnim segmentima koronarnih arterija. Iako je praktički svaka akutna manifestacija CCVD uzrokovan aterotrombozom na vulnerabilnom plaku obrnuto ne vrijedi, odnosno ne uzrokuju

svi vulnerabilni plakovi simptome jer ne dolazi kod svih do rupture, a kod onih kod kojih i dođe do rupture ne razviju svi tromboemboliju žile. Pri tome je nužno uvažavati činjenicu da nije samo vulnerabilni plak čimbenik koji bolesnika čini *vulnerabilnim* već i *vulnerabilna* krv (sklona trombozi) te u slučaju koronarne bolesti i vulnerabilni miokard (sklon fatalnim aritmijama). Koncept vulnerabilnog plaka u središtu je interesa unazad 15-tak godina kao ključno mjesto istraživanja novih preventivnih, dijagnostičkih i terapijskih metoda kojim je cilj prevencija nastanka takvih plakova, te ako se pojave njihovo pravovremeno uočavanje i učinkovito rješavanje.

1.6.2. Rizični čimbenici za nastanak ateroskleroze

Među više poznatih rizičnih čimbenika za razvoj ateroskleroze posebno mjesto zauzima hiperkolesterolemija koja je vjerojatno dovoljna da sama po sebi dovede do razvoja ateroskleroze i bez prisustva drugih čimbenika.⁷³ Ostali rizični čimbenici poput arterijske hipertenzije, dijabetesa, pušenja, upale (CRP, citokini) ubrzavaju taloženje lipoproteina niske gustoće (eng. low density lipoprotein - LDL) na način ili da mijenjaju aterogenost LDL-a (sastav, broj i veličina partikala) ili da direktno oštećuju endotel žile. Među zaštitnim čimbenicima koji sprječavaju razvoj ateroskleroze su fizička aktivnost, alkohol, lipoproteini visoke gustoće (eng. high density lipoprotein - HDL) i njegov glavni apolipoprotein apo-A1. HDL i apoA1 sprječavaju aterogenu modifikaciju LDL-a i dovode do reverznog transporta te potencijalno i do smanjenja plaka.^{74, 75} Ipak, unatoč dobrom poznavanju rizičnih i zaštitnih čimbenika, ne može se na temelju danas poznatih tablica rizika sa sigurnošću predvidjeti brzina razvoja ateroskleroze i klinički tijek. Poznavanje individualne sklonosti aterosklerozi u prisustvu aterogenog čimbenika još je uvijek ograničeno. Nisu niti sve arterije kod istog pojedinca jednako sklone aterosklerozi što se ne može objasniti samo mehaničkom ozljedom endotela uslijed turbulencija nastalih na račvištu arterija.

1.6.3. Stanični elementi u razvoju ateroskleroze

Najznačajnije stanične komponente u razvoju ateroskleroze su endotelne stanice, leukociti i glatke mišićne stanice.

1.6.3.1. Uloga endotelnih stanica

U segmentima arterija sklonim aterosklerozi endotelni sloj stanica postaje propustan, aktiviran i disfunkcionalan pod djelovanjem mehaničkih (arterijska hipertenzija, turbulencija na račvištima žila), kemijskih (povećana količina LDL-kolesterola koja mijenja fizikalna svojstva endotelne membrane, pušenje, homocistein), infektivnih (*Chlamydia pneumoniae*) ili imunoloških čimbenika (vaskulopatija nakon presađivanja organa).⁷⁶ Ovisno o veličini i broju partikala, lipoproteini prolaze kroz propusni endotel u subendotelni prostor gdje uslijed oksidacije posredovane mijeloperoksidazom, 15-lipooksigenazom i dušik-monoksid sintazom (eng. nitric oxide synthase - NOS) postaju citotoksični, proupalni, kemotaktični odnosno proaterogeni. Dušični monoksid izlučen sa strane endotelne NOS posjeduje vazodilatacijsku i ateroprotektivnu funkciju dok onaj proizveden sa strane makrofagne NOS, koja ima puno veći kapacitet, posjeduje oksidativnu i antiaterogenu funkciju. Trombociti se, uz pomoć glikoproteina Ib i IIb/IIIa te hiperlipidemijom induciranom pojačanom lučenju inhibitora aktivacije plazminogena 1 (eng. plasminogen activator inhibitor-1 – PAI-1), vežu na mjesto aktiviranog endotela te izlučuju površinske molekule (npr. trombocitni čimbenik rast) koje potiču daljnju aktivaciju endotela. Inhibicija adhezije trombocita u hiperkolesterolemičnih miševa usporava proces ateroskleroze.⁷⁷ Klinički se endotelna disfunkcija može dokazati kao izostanak vazodilatacije posredovane s NO što podrazumijeva također i izostanak i antiupalne i antitrombotske funkcije endotela koje su s kliničkog stanovišta puno značajnije.

1.6.3.2. Uloga leukocita

Aktivirani endotel pokazuje pojačanu ekspresiju adhezijskih molekula žilnih stanica (eng. vascular cell adhesion molecule - VCAM-1), međustaničnih adhezijskih molekula (eng. intercellular adhesion molecule - ICM-1), E-selektina i P-selektina koji omogućuju, uz pomoć kemokina, migraciju monocita i T-limfocita iz krvi u subendotelni prostor. Snažni kemokini su oksigenirani LDL-a i osobito monocitni kemotaktični protein-1 (eng. monocyte chemotactic protein-1 – MCP-1) čiji su receptori gotovo 20 puta jače izraženi na površini monocita i T limfocita pod djelovanjem endotelnih stanica, glatkih mišićnih stanica (GMS) i makrofaga. Pod utjecajem čimbenika koji stimulira makrofagne kolonije (eng. macrophage colony-stimulating factor – MCSF) dolazi do diferencijacije monocita u makrofage koji uz pomoć receptora čistaća A (eng. scavenger receptor A – SR-A) fagocitiraju patogene molekule uključujući bakterijske endotoksine, apoptotičke stanične fragmente i što je najvažnije, oksidirane LDL-čestice. Obzirom da SR-A nemaju mogućnost regulacije, u suvišku aterogenih lipoproteina dolazi do njihove akumulacije u citoplazmi makrofaga, transformacije makrofaga u masne stanice i konačno do apoptoze i nekroze stanica s posljedičnim stvaranjem lipidne, acelularne, nekrotične srži u plaku. Druga vrsta receptora na makrofazima su *Toll-like* receptori (TLR) koji također vežu patogene molekule uključujući oksidirane LDL-čestice i tzv. *heat-shock* proteine 60 (HSP60), ali za razliku od SR-A, pokreću kaskadu koja dovodi do aktivacije makrofaga koji zatim izlučuju upalne citokine, proteaze i slobodne kisikove radikale što dovodi do upale i destabilizacije plaka.⁷⁸

T limfociti (dominantno CD4+) pod utjecajem citokina dovode do tip 1 pomoćničkog odgovora (eng. T-helper-1 - Th-1 response) s posljedičnim izlučivanjem interferona- γ odgovornog za aktivaciju makrofaga. Interferon- γ zatim potiče sintezu upalnih citokina poput tumor-nekrotizirajućeg faktora α (eng. tumor necrosis factor α - TNF- α) i interleukina-1 (IL-1), a time i cjelokupnu lokalnu, ali i sistemsku upalnu kaskadu s pojačanom produkcijom interleukina-6 (IL-6), CRP-a i fibrinogena (osobito u jetri). U prilog toga ide studija koja je pokazala da je u bolesnika s nestabilnom anginom pectoris povišena serumska razina IL-6 i CRP-a što je bilo povezano s lošijim ishodom.^{79, 80}

1.6.3.3. Uloga glatkih mišićnih stanca.

S progresijom ateroskleroze imuno-inflamatorni odgovor je praćen i fibroproliferativnim odgovorom putem proliferacije glatkih mišićnih stanica i lučenja kolagena. Iako fibroproliferativni reparativni odgovor može biti toliko izražen da dovodi do značajnog suženja lumena arterije i pojave ishemije organa, isti se smatra povoljnim i zaštitnim jer štiti od mnogo opasnije situacije kao što je ruptura plaka i tromboza. Apoptoza glatkih mišićnih stanica zajedno s apoptozom i nekrozom endotelnih stanica i makrofaga dovodi do rasta tkivnim faktorom bogate i trombogene lipidne srži i stanjenja fibrozne kape i time do stvaranja vulnerabilnog plaka (eng. ruptured prone, inflamed thin-cap fibroatheroma). U tom procesu su uključeni makrofazi i T-limfociti koji proizvode upalne citokine, slobodne kisikove radikale, vazoaktivne molekule i, što je najvažnije, dvije proteaze: metaloproteinazu (MMP) i cistein proteazu. Pod djelovanjem navedenih enzima može doći do prekida kontinuiteta fibrozne kape odnosno rupture s posljedičnim mogućim krvarenjem unutar plaka i trombozom lumena žile.

1.6.4. Značenje upalnih pokazatelja u aterosklerozi

Proteini akutne faze u zadnje se vrijeme istražuju kao pokazatelji ateroskleroze i destabilizacije plaka.⁸¹ Osim hsCRP, potencijalni predskazatelji kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja su fosfolipaza A2 vezana za lipoprotein (eng. lipoprotein-associated phospholipase A2 - Lp-PLA2), serumski amiloid A (SAA), interleukin-6 (IL-6) i CD40 ligand (CD40L). Dugo godina postojala je dvojba da li je CRP jedan od patofizioloških čimbenika odgovornih za razvoj ateroskleroze ili je jednostavno epifenomen. Ipak, sve više dokaza ukazuje da je CRP direktni uzročni čimbenik. U in vitro pokusima CRP stimulira više citokina i faktora rasta te smanjuje sintezu nitrit-oksida, potentnog vazodilatatora.⁸² HsCRP je detektiran kao predskazatelj cerebrovaskularnih događaja u više populacijskih studija.⁸³ U studiji Women's Health Study, hsCRP, IL-6, topivi ICAM-1 i SAA identificirani su kao predskazatelji kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja.^{84, 85} U multivarijantnoj analizi, hsCRP bio je jedini neovisni predskazatelj; uključivanje hsCRP-a značajno je poboljšalo ukupnu predskazateljsku vrijednost u usporedbi s modelima koji su koristili samo vrijednosti lipida i ostalih standardnih faktora rizika bez CRP-a ($p < 0,001$).^{86, 87} Inicijalne

studije koje su istraživale predskazateljsku vrijednost CRP-a bile su fokusirane na zdrave ljude srednjih godina, bez značajnog kardiovaskularnog rizika. U studiji Cardiovascular Health Study koja je fokusirana na stariju populaciju, hsCRP je bio predskazatelj CVI-a.⁸⁸ U studiji Physicians' Health Study HsCRP bio je nezavisni predskazatelj prvog CVI-a, ali je predskazateljska vrijednost za rizik od CVI-a u odnosu na rizik od srčanog udara bila manja.⁸⁹ U Framinghamskoj studiji muškarci su imali dvostruki rizik, a žene trostruki rizik CVI-a ako su imali CRP u najvišoj kvartili.⁹⁰ Sve je više dokaza u literaturi koji ukazuju da upalni biomarkeri mogu poslužiti kao predskazatelji pojave simptoma kod aterosklerotske bolesti karotidne arterije što je povezano s činjenicom da karotidni plakovi simptomatskih bolesnika imaju značajno više upalnih stanica nego plakovi asimptomatskih bolesnika.⁹¹ Postoje dokazi da je hsCRP predskazatelj mortaliteta nakon CVI-a^{92, 93} što zahtjeva potvrdu u velikim studijama te se za sada ne može preporučiti rutinsko testiranje hsCRP-a kao prognostičkog predskazatelja.

Lp-PLA2 je enzim iz makrofaga koji je uključen u metabolizam LDL-a i jest odgovoran za oslobađanje upalnih medijatora. Nedavne epidemiološke studije su dokazale da je povišena razina serumske Lp-PLA2 povezana s rizikom nastanka infarkta.^{94, 95} U NOMAS studiji, hsCRP i Lp-PLA2 dokazani su kao predskazatelji ponovnog CVI-a, ostalih vaskularnih događaja i smrti u 467 bolesnika s CVI-om.⁹⁶ Oni s Lp-PLA2 u najvišoj kvartili imali su dvostruki rizik za ponovni CVI, srčani udar i smrt. Iz tih podataka može se zaključiti da su upalni pokazatelji povezani s prognozom nakon prvog CVI-a s time da je Lp-PLA2 snažniji predskazatelj ponovnog CVI-a i s tim više povezan s upalom u aterosklerotskom plaku, dok je hsCRP povezan s veličinom CVI-a i mortalitetom, a u manjoj mjeri s ponovnim CVI-om.⁹⁷ Razina upalnih pokazatelja može koristiti za odabir onih bolesnika s visokim rizikom cerebrovaskularnih događaja kod kojih je potrebna stroga sekundarna prevencija. Nekoliko je studija pokazalo da statini smanjuju razinu hsCRP i Lp-PLA2 neovisno o učinku na kolesterol.^{98, 99} Studija Ridkera i suradnika je pokazala da je smanjenje CRP-a povezano sa smanjenjem vaskularnog rizika.¹⁰⁰ Slično je pokazala studija O'Donoghue i suradnika za Lp-PLA2.¹⁰¹ U MIRACL studiji hsCRP bio je povezan s rizikom CVI-a u slijedećih 16 tjedana samo u placebo skupini što ukazuje da statini smanjuju rizik povezan s povišenim CRP-om.¹⁰² U studiji JUPITER gdje je istraživana povoljan učinak terapije rosuvastatinom u onih bolesnika koji su imali povišen hsCRP i niski LDL, zabilježena je redukcija kardiovaskularnih događaja i CVI-a u skupini bolesnika liječenih rosuvastatinom, neovisno o sniženju LDL-a.¹⁰³

1.6.5. Reverzni transport kolesterola

1.6.5.1. Mehanizam reverznog transporta kolesterola

Reverzni transport kolesterola (RTK) način je i put kojim se kolesterol akumuliran u stjenkama krvnih žila prenosi iz stjenke putem krvi natrag u jetru i crijeva. Proces je odgovoran za usporavanje ateroskleroze i ima zaštitnu ulogu. Ključni čimbenik u tom procesu je HDL sa svojim glavnim apolipoproteinom apoA-1. Nakon sinteze u jetri apoA-1 se u plazmi veže za fosfolipide tvoreći diskoidni HDL koji potiče izlazak kolesterola iz makrofaga i glatkih mišićnih stanica u izvanstanični prostor pomoću adenzin-trifosfat vezujućeg kasetnog proteina (eng. adenosin-trophosphate binding membrane cassette transport protein A1 – ABCA1).¹⁰⁴ U tom procesu sudjeluju i drugi faktori poput receptora čistača B1 (eng. scavenger receptor B1 – SR-B1) koji omogućuje vezanje HDL-a na stanice, kaveolina koji direktno omogućuje prelazak kolesterola iz endoplazmatskog retikuluma u izvanstanični prostor, dok dio kolesterola izlazi iz stanice pasivnom difuzijom.¹⁰⁵ Kolesterol se zatim, pod utjecajem enzima lecitin-kolesterol acil-transferaze (eng. lecithin-cholesterol acyl transferase – LCAT) esterificira u kolesteril-ester te spaja pomoću transportnog proteina fosfolipida (eng. phospholipid transfer protein – PLTP) s diskoidnim HDL-om tvoreći HDL₂ i HDL₃ čestice bogate kolesterolom. Enzim kolesterol-ester transportni protein (eng. cholesterol ester transfer protein – CETP) omogućuje prelazak kolesteril-estera na apoB lipoproteine te njihov prelazak u jetru pomoću LDL-receptora gdje se dalje odstranjuju iz tijela pomoću žučnih soli. Mnogo je dokaza kako RTK i ključni čimbenici koji sudjeluju u njemu imaju značajni utjecaj na prevenciju ateroskleroze. Više je studija pokazalo proaterogeni učinak niske razine HDL-a.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Atorvastatin može dovesti do povišenja razine HDL-a na način da poveća sintezu i sekreciju ApoA-1 te smanjuje funkciju CETP-a,¹¹⁰ što pak smanjuje kardiovaskularni rizik kao što je dokazano u studijama sa sekundarnom prevencijom.^{111, 112} Fibrati preko receptora aktiviranih peroksisomskim proliferatorom (eng. peroxisome proliferator-activated receptor- α - PPAR- α) povišuju razinu HDL-a i na taj način smanjuju kardiovaskularni rizik.^{113, 114} Ključni događaj u RTK jest izlazak kolesterola iz makrofaga u subintimu arterija pomoću ABCA1 i ostalih spomenutih mehanizama. Veliki doprinos u razumijevanju RTK i njegove

uloge u patogenezi ateroskleroze pokazala su istraživanja genetskih mutacije čimbenika koji sudjeluju u procesu. Tangierova bolest, autosomno je recesivni poremećaj uzorkovan mutacijom ABCA1, koji je karakteriziran nakupljanjem kolesterola u retikulo-enotelnom sustavu i niskom razinom HDL-a što je pak povezano s ubrzanim procesom ateroskleroze i povećanim kardiovaskularnim rizikom.¹¹⁵ U studijama s transgenskim miševima isključenje ABCA1 može potaknuti aterosklerozu. Oko uloge CETP više je dvojbi. Genski polimorfizam u ljudi s posljedičnim nedostatkom CETP dovodi do smanjenog transporta kolesteril-estera s HDL-a na apo-B lipoproteine odnosno do porasta koncentracije HDL-a. Međutim, postoji dvojba da li je to povećanje razine HDL-a popraćeno smanjenjem kardiovaskularnog rizika.¹¹⁶ Davidson i suradnici objavili su studiju s CETP vakcinom koja dovodi do stvaranja autoantitijela koja zatim inhibiraju endogenu CETP te posljedično dovode do porasta HDL-a s ciljem usporavanja ateroskleroze.¹¹⁷ Nedostatak LCAT kod ljudi je, u skladu s fiziološkom ulogom, praćena niskom razinom HDL-a što nije praćeno porastom kardiovaskularnog rizika.¹¹⁸ Postoje dokazi koji ukazuju da je RTK jedan od glavnih mehanizama na koji životni stil, prvenstveno ograničen unos alkohola i redovita fizička aktivnost, povoljno utječu na proces ateroskleroze.^{119, 120} Pušenje može nepovoljno utjecati na više koraka u RTK i na taj način ubrzavati aterosklerozu.¹²¹ Dodatak HDL-a ili apoA-I može potaknuti RTK i zaustaviti aterosklerozu.⁷⁵ S druge strane, proupalni čimbenici poput interferon- γ , endotoksina, TNF- α i interleukin-1 β mogu usporiti RTK.¹²² Transformirajući čimbenik rasta β (eng. transforming growth factor- β – TGF- β) može doprinijeti stabilizaciji plaka pomoću inhibicije metaloproteinaze i pojačane depozicije matriksa, ali i pojačanim RTK-om zahvaljujući pojačanoj ekspresiji ABCA1.¹²³

1.6.5.2. Odnos HDL-a u serumu i RTK

Novije studije su dovele u pitanje hipotezu da je povećanje razina HDL-a različitim farmakološkim mjerama nužno povoljno, odnosno da dovodi do smanjenja kardiovaskularnog rizika. S time je u vezi i pitanje da li je serumska razina HDL-a ekvivalent RTK-a u smislu izlaska (efluksa) kolesterola iz nakupina makrofaga u stijenci krvnih žila. Nikotinska kiselina i fibrati dovode do porasta HDL-a što nije praćeno tako jasnim učinkom na kardiovaskularni rizik kao sniženje LDL-a uz liječenje statinom.¹²⁴ Kod primjene torcetrapiba, inhibitora CETP, zabilježen je porast kardiovaskularnih događaja unatoč porastu HDL-a za 72%.¹²⁵

Velika heterogenost u sastavu partikala i biološkim svojstvima HDL-a prepreka su da serumska razina HDL-a bude prava mjera RTK. U nedavno objavljenom članku Khera i suradnika u *The New England Journal of Medicine* (NEJM)¹²⁶ mjerena je razina efluksa kolesterola u 203 zdrava dobrovoljca, 442 bolesnika s angiografski dokazanom koronarnom bolesti i u 351 bolesnika bez angiografski dokazane koronarne bolesti na način da su makrofazi inkubirani sa serumom bez apolipoproteina B. Razina HDL-kolesterola i apolipoproteina A-I bila je značajan pokazatelj efluksa kolesterola, no odgovorna za svega 40% varijabilnosti. Muški spol i pušenje također su bili odgovorni za varijabilnost kapaciteta efluksa. Nakon prilagodbe za razinu kolesterola, pušenje je ostalo kao značajniji predskazatelj efluksa ($p = 0,004$) za razliku od spola ($p = 0,14$). Nađena je obrnuto proporcionalna veza između kapaciteta efluksa kolesterola i zadebljanja karotidne intime. Kapacitet efluksa bio je izrazito povezan s prisutnošću koronarne bolesti ($p < 0,001$), a veza je ostala značajna i nakon prilagodbe na razinu HDL-a ($p = 0,002$) ili apolipoproteina A-I ($p = 0,002$). Studija je dodatno pokazala povećanje kapaciteta efluksa kod bolesnika liječenih pioglitazonom, ne i onih koji su bili liječeni statinom.

1.6.6. Rezidualni rizik

Rezidualni kardiovaskularni rizik jest rizik koji preostaje u bolesnika u kojih su standardnim liječenjem postignute zadovoljavajuće vrijednosti glukoze, krvnog tlaka i kolesterola (ukupnog i LDL-kolesterola), kod kojih ipak može doći do razvitka ateroskleroze u velikim i malim arterijama. Praktički sve populacijske studije, velike kliničke studije i meta-analize pokazale su kako redukcija LDL-a do ciljnih vrijednosti pomoću statina dovodi do značajnog smanjenja incidencije od kardiovaskularnih događaja.¹²⁷⁻¹²⁹ Međutim, ateroskleroza kod nekih ljudi može i dalje napredovati što se može objasniti rezidualnim rizikom koji je uzrokovan niskom razinom kolesterola i povišenim trigliceridima. Niska razina HDL-a je značajan i nezavisni rizični čimbenik za koronarnu bolest.¹³⁰ Priroda te povezanosti nije potpuno jasna i najvjerojatnije je multifaktorijska. Opisani su višestruki direktni antiaterogeni učinci HDL-a osim RTK-a odnosno efluksa kolesterola iz stanica kao što su protuupalni, antioksidativni, antitrombotski, antiapoptotički i vazodilatatorni učinak. Rezidualni rizik nakon korekcije LDL-a i HDL-a može se pripisati trigliceridima koji su također nezavisni rizični čimbenik za koronarnu bolest. Smanjenje razine triglicerida može dovesti do daljnjeg smanjenja incidencije kardiovaskularne bolesti.¹³¹ Pitanje rezidualnog rizika osobito je značajno kod

dijabetičara. U velikoj metaanalizi od 90056 bolesnika pokazano je da statini smanjuju kardiovaskularne događaje (infarkt srca, koronarna revaskularizacija i smrt) za 20%, ali da je rizik bio veći za dijabetičare liječene statinom u odnosu na nedijabetičare koji nisu liječeni statinom.¹³² Šećerna bolest i metabolički sindrom povezani su s aterogenom dislipidemijom karakteriziranom visokom razinom triglicerida, niskim HDL-om i povišenim LDL-om s malim gustim česticama. Kardiovaskularni rizik ne ovisi samo o razini LDL-a ili HDL-a već i o njihovom obliku. Ako je LDL oblikovan u obliku malih gustih čestica tada tih čestica za istu razinu LDL-kolesterola ima više što predstavlja dodatni kardiovaskularni rizik.¹³³ S druge strane, pod utjecajem enzima CETP dolazi do razmjene triglicerida iz lipoproteina vrlo niske gustoće (eng. very low density lipoprotein – VLDL) s kolesteril-esterima iz HDL-a pri čemu se stvaraju manje čestice HDL-a koje se brže odstranjuju iz cirkulacije putem bubrega. U smanjenju kardiovaskularnog rizika primarni cilj jest sniženje razine LDL-a u čemu su najuspješniji statini. Sekundarni cilj jest povišenje razine HDL-a pri čemu dosadašnji modeli liječenja poput niacina, omega-3 masnih kiselina i fenofibrata imaju ograničenja u vidu razvitka tolerancije i smanjene učinkovitosti.

Omega-3 masne kiseline djeluju tako da potiču aktivnost lipoprotein lipaze i na taj način ubrzavaju klirens triglicerida iz VLDL-a. Studije Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS)¹³⁴ i COMBination of prescription Omega-3 acid ethyl ester added to Simvastatin therapy (COMBOS)¹³⁵ pokazale su pozitivan utjecaj kombinacije statina i omega-3 masnih kiselina na lipidni profil i kardiovaskularni rizik. Niacin smanjuje sintezu triglicerida u jetri što dovodi do smanjene sinteze VLDL čestica, pojačane degradacije apolipoproteina B (apo-B) čestica te smanjenog katabolizma apolipoproteina A (apo-A). Niacin može pojačati izražaj proteina ABCA-1 što povećava efluks kolesterola.¹³⁶ U studijama Open label Evaluation of the safety and Efficacy of a combination of Niacin ER and Simvastatin (OCEAN)¹³⁷ i Safety and Efficacy of a combination of Extended Release Niacin and Simvastatin trial I (SEACOAST I)⁹⁵ dokazana je učinkovitost kombinirane primjene niacina i statina u sniženju LDL-a i porastu HDL-a. U studiji HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS) dokazana je blaga redukcija ateroskleroze kao i gotovo 90%-tno trogodišnje smanjenje kliničkih događaja.¹³⁸ Fibrati djeluju na način da aktiviraju PPAR- α koji pojačava ekspresiju apoA-1, apolipoproteina A-11 (apoA-11) i ABCA1, smanjuje ekspresiju apolipoproteina C1 (apoC-1), povećava HDL partikle i pojačavaju sintezu LPL čime dovode do pojačanog klirensa VLDL-a. U studiji Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) dokazana je redukcija mikrovaskularnih komplikacija u dijabetičara, 24%-tna redukcija nefatalnog infarkta srca i 21%-tna redukcija potrebe za revaskularizacijom.^{139, 140} Visoka učestalost

miopatije kod kombinirane primjene statina i gemfibrozila zbog interakcije lijekova (blokiranje glukoronidacije sa strane gemfibrozila što smanjuje klirens statina) nije zabilježena kod fenofibrata.¹⁴¹ U velikoj kliničkoj studiji s CETP inhibitorom torcetrapibom u kombinaciji s atorvastationom došlo je do značajne redukcije LDL-a i porasta HDL-a, ali bez značajne redukcije kliničkih događaja.¹²⁵

1.7. Dosadašnje spoznaje o endotelnoj lipazi

1.7.1. Molekularni sastav

Endotelna lipaza (EL) je član obitelji gena triglicerid lipaza otkrivena 1999. Godine od dvije nezavisne skupine istraživača.^{142, 143} EL je jedina lipaza sintetizirana u najvećoj mjeri sa strane endotelnih stanica, a u manjoj mjeri sa strane glatkih mišićnih stanica i makrofaga. Ima 482 aminokiseline i molekularnu težinu od 68 kDa. Karakterizira ju snažno izražena fosfolipazna aktivnost; omjer trigliceridazne prema fosfolipaznoj aktivnosti je 0,65 za razliku od ostalih članova lipaza (jetrena lipaza 24,1 i lipoprotein lipaza 139,9). Nakon sekrecije veže se za heparan-sulfat proteoglikane (HSPG) na površini stanica gdje omogućuje vezanje lipoproteina na staničnu površinu te katalizira hidrolizu svih razreda lipoproteina, osobito HDL-a.¹⁴⁴

1.7.2. Utjecaj na LDL kolesterol

Na animalnim modelima miševa s pojačanom ekspresijom EL uočena je smanjena koncentracija VLDL-a i LDL-a kao i smanjena veličina i broj LDL partikala.^{143, 145} S druge strane, u humanim studijama nađeno je da je povišena razina EL u pretilih osoba bila povezana s povišenom razinom ukupnog kolesterola, LDL-a i ApoB te također s veličinom LDL partikala (neovisno o TG ili indeksima debljine), tako da iz većih čestica stvara male guste čestice koje imaju dokazani proaterogeni efekt.¹⁴⁶

1.7.3. Utjecaj na HDL kolesterol

EL je jedan od ključnih čimbenika metabolizma HDL-a što ostvaruje putem apoA-I i apoA-2 koji omogućuju vezanje EL na HDL te na taj način reguliraju njenu funkciju odnosno brzinu kojom hidrolizira fosfolipide iz HDL-a.¹⁴⁷ Obrnuto proporcionalni odnosi između EL s

razinom HDL-a i veličinom HDL partikala dokazan je u animalnim studijama na modelima s genetski modificiranim miševima s pojačanom ili smanjenom funkcijom EL.^{143, 148-150}

U radu Broedl i suradnika pokazano je da EL u miševa može dovesti do redukcije HDL-a i mehanizmom neovisnim o lipolitičkoj funkciji.¹⁵¹ Utjecaj fizičke aktivnosti na HDL je značajan, ali jako varijabilan što potencijalno ovisi i o genetskom polimorfizmu EL.¹⁵²

1.7.4. Utjecaj na reverzni transport kolesterola

Početni događaj u RTK je prelazak (efluks) kolesterola iz makrofaga na HDL na što EL može imati dvojak učinak. U studiji Yanceya i suradnika na kulturi stanica, dokazano je da EL smanjuje efluks kolesterola putem SR-BI za 90% i pojačava efluks putem ABCA1 za 63% te dovodi do stvaranja manjih partikala HDL. Također je dokazano da, putem svoje fosfolipazne aktivnosti, EL mijenja sastav i fizikalna svojstva HDL-a odnosno stvara HDL-a siromašan lipidima koji se brže katabolizira.¹⁵³

S druge strane, u radu Qiu i suradnika uočeno je da EL iz makrofaga pojačava vezanje apoA-1 za makrofage što dovodi do povećanja efluksa kolesterola iz makrofaga.¹⁵⁴

Jahangiri i suradnici su pokazali da EL svojom fosfolipaznom aktivnošću dovodi do smanjenja veličine HDL partikala.¹⁵⁵

EL ima domene kojima se može povezati s heparan-sulfat proteoglikanima (HSPG) i s cirkulirajućim lipoproteinima (HDL-om i LDL-om) te na taj način djeluje kao poveznica između lipoproteina i endotelnih stanica povećavajući inkorporaciju lipoproteina.¹⁵⁶

In vitro studije su pokazale da jetrena EL povećava preuzimanje HDL-kolesterola katalitičkim i nekatalitičkim putem¹⁵⁷ za što postoje dokazi i u animalnim studijama s genetski modificiranim EL^{-/-} miševima.¹⁵⁸

Obzirom na vezanje EL na HSPG, nakon primjene heparina dolazi do oslobađanja EL u plazmu te do posljedičnog povećanja i aktivnosti EL i razine EL što korelira s padom razine HDL-a.¹⁵⁹

Pojačana ekspresija EL u endotelnim stanicama jetre dovodi do povećanja jetrenog apoA1-katabolizma te do povećanog prelaska HDL-kolesterola u jetru putem SR-BI.^{147, 160}

U jetri, EL sudjeluje u vezanju HDL-a te potiče prelazak kolesterol-estera, ali i cijelih HDL partikala u stanice jetre.¹⁵⁷ U radu Nijstada i suradnika pokazano je na miševima da je EL

ključni regulator prelaska kolesterol estera iz HDL-a u jetri te da se proces odvija putem SRBI receptora.¹⁶⁰ Međutim, kod pojačane ekspresije EL ne dolazi do pojačane ekskrecije kolesterola kroz žuč iako je povećana koncentracija kolesterola u jetri.¹⁶¹ I u radu Browna i suradnika na miševima je dokazano da EL ne utječe na ukupni RTK iako dovodi do sniženja HDL-a u serumu i povišenja u jetri.¹⁶² Inhibicija EL može povećati efluks kolesterola iz stanica bez utjecaja na efluks kolesterola iz HDL-a u jetru jer se potonji vrši preko poveznice funkcije EL-e.

1.7.5. Regulacija ekspresije endotelne lipaze

Različiti kemijski i fizikalni (biomehanički) utjecaji mogu pojačati ekspresiju EL. In vitro studije pokazale su da pod utjecajem citokina (TNF α , IL-1 β) i tlaka tekućine dolazi do povećane razine mRNA EL u kulturi umbilikalnih i koronarnih endotelnih stanica.¹⁶³

U modelu hipertenzije na štakorima pokazano je da angiotenzin II i arterijska hipertenzija dovode do pojačane ekspresije EL u glatkim mišićima aorte.¹⁶⁴

U radu Jin W i suradnika (*in vitro* studija) u bazalnim uvjetima nije zabilježena fosfolipazna niti trigliceridazna aktivnost, ali je primjena citokina dovela do povećanja fosfolipazne i trigliceridazne aktivnosti zbog povećane ekspresije EL (u ovisnosti o dozi) što je u suprotnosti sa smanjenom ekspresijom hepatične lipaze i lipoprotein lipaze.¹⁶⁵

U *in vitro* studiji s makrofazima porijeklom od EL^{-/-} i EL^{+/+} miševa istražen je utjecaj lipopolisaharida (LPS) na EL-mRNA.¹⁶⁶ LPS su glavna komponentna vanjske membrane endotelnih stanica koji uzrokuju produkciju citokina, dovode do pojačane regulacije SR-A i uzrokuju akumulaciju LDL-kolesterola u makrofazima putem receptora TLR. Izloženost makrofaga LPS-u dovodi do pojačane ekspresije EL-mRNA direktno putem TLR, neovisno o autokrinom produkciji citokina, što pak dovodi do povećanog ulaska neoksidiranog LDL-a (nLDL) u stanice. Oksidirani LDL ulazi u makrofage putem SR i dovodi do stvaranja masnih stanica. Smatralo se da nLDL nema ulogu u nakupljanju kolesterola u makrofazima zbog smanjenog broja receptora za LDL. Međutim rad Krutha i suradnika pokazao je da stimulirani monociti – makrofazi mogu nakupljati nLDL.¹⁶⁷ EL moguće ima veznu funkciju između nLDL-a i makrofaga potičući makropinocitozu nLDL-a. Navedeni mehanizam inhibiran je primjenom heparina (što ukazuje da je mehanizam vezna funkcija pomoću HSPG). U istoj studiji statini su inhibirali ekspresiju EL uzrokovanu LPS-om kao i preuzimanje nLDL-a.

(inače smanjuju ekspresiju SR i ulazak oksidiranog LDL-a kao i oksidaciju lipoproteina).¹⁶⁸ Pokazano je da su regulatorni mehanizmi za ekspresiju EL u makrofazima drugačiji nego za endotelne i glatke mišićne stanice. Autori su zaključili da je razlika u prisutnosti TLR kojih ima na makrofazima, a nema na endotelnim stanicama.

EL podliježe i specifičnoj tkivnoj regulaciji *in vivo*. Yu i suradnici testirali su EL u jetri i aorti kod apoE^{-/-} miševa te našli niže vrijednosti glasniče ribonukleinske kiseline (eng. messenger ribonucleid acid – mRNA) za EL u endotelnim stanicama jetre i više vrijednosti mRNA za EL u stanicama aorte što je dodatno povećalo razliku u ekspresiji EL.

Poznati su i neki posttranskripcijski mehanizmi regulacije. EL u plazmi čovjeka formira dimer, a homo-dimer *head to tail* je nužan za EL aktivnost. Nadalje, posttranskripcijska regulacija odvija se putem proprotein konvertaze (eng. proprotein convertase - PC) koja cijepa i inaktivira EL. Profurin je inhibitor PC-a, njegova pretjerana ekspresija dovodi do pojačane aktivnosti EL i do smanjenja HDL-a u plazmi.¹⁶⁹ Angiopietinu nalik protein 3 (eng. angiopoietin-like 3 protein - ANGPTL3) prepoznat je kao endogeni inhibitor EL i njegova razina u plazmi korelira s razinom HDL-kolesterola u ljudi. Osim toga, za njegovu aktivaciju potreban je PC sustav tako da je to indirektan mehanizam kako inhibicija PC-e dovodi do porasta aktivnosti EL i smanjenja HDL-a.¹⁷⁰ Broedl je sa suradnicima na apoA-II miševima dokazao da Apo A-II može djelovati kao inhibitor EL aktivnosti *in vivo*.¹⁷¹

1.7.6. Endotelna lipaza i makrofazi

Za proaterogenu ulogu EL ključan je odnos EL i makrofaga koji je uočen već kod otkrića EL. U radu Jaye i suradnika dokazano je da oksidirani LDL povećava ekspresiju EL u humanim monocitima/makrofazima.¹⁴³

Na obdukcijskoj studiji, koristeći imunohistokemijsku metodu, Azumi i suradnici detektirali su EL u humanim koronarnim arterijama i utvrdili da je sintetizirana u makrofazima i glatkim mišićnim stanicama.¹⁷²

In vitro studija pokazala je da EL potiče adheziju monocita na endotel kroz interakciju s HSPG (nekatalitička vezna funkcija).¹⁷³ Adhezija monocita za vaskularni endotel ključna je za početak aterosklerotskog procesa. Zbog ekspresije na endotelu i pojačane regulacije upalnim citokinima EL je uključena u proces. Ovom studijom je dokazano da je EL jako potaknuta LPS *in vivo* (mišji model) te da ima veznu funkciju. Oslobođanje EL s površine

pomoću heparina onemogućava EL da potakne adheziju monocita. Također degradacija HSPG-a pomoću heparinaza potiskuje adheziju monocita što dokazuje da EL ima nekatalitičku veznu funkciju putem HSPG-a pomoću koje omogućuje adheziju monocita.

U radu Ma i suradnika pokazano je da EL^{-/-} miševi imaju višu koncentraciju HDL-a u plazmi, veći broj većih čestica HDL-a (subklase H4, i H5) tako da je prosječni HDL veći kod EL^{-/-} (10,25±0,34 nm u usporedbi s 9,46 ± 0,37 nm kod divljeg tipa), te da je klirens HDL-a iz cirkulacije manji.¹⁷⁴ Također je u ljudskom genu za EL nađen polimorfizam nukleotida 584 C/T pri čemu ljudi s T/T varijantom imaju 14% veću razinu HDL-a nego C/C varijanta.¹⁷⁵

1.7.7. Odnos endotelne lipaze i upale

U skupini od 74 zdravih, pretilih ljudi sa smanjenom tjelesnom aktivnošću (prosječni indeks tjelesne mase (eng. body mass index – BMI) bio je 29,8 kg/m²) Paradis i suradnici pokazali su da razina EL u plazmi korelira s upalnim pokazateljima (CRP, IL-6 i s Lp-PLA2) te s različitim indeksima pretilosti (EL je bila najviša kod muškaraca s metaboličkim sindromom i povišenim CRP-om, a najniža kod muškaraca bez metaboličkog sindroma i s niskim CRP-om).¹⁷⁶

Badelino i suradnici su pokazali direktnu korelaciju između razine EL u plazmi i upalnih pokazatelja (hsCRP, IL-6, topivi TNF receptor 2, ICAM 1 i leptin) i inverznu korelaciju s adiponektinom u plazmi 858 zdravih učesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom koronarne bolesti.¹⁷⁷ Kod 20 učesnika studije provedena je eksperimentalna endotoksemija pri čemu je 12-16 sati nakon primjene bakterijskog lipopolisaharida došlo do porasta EL koncentracije za 2,5 puta što je bilo praćeno padom ukupnog kolesterola i HDL-a.

U studiji Matsua i suradnika utvrđeno je da je HsCRP kao odraz kronične subkliničke upale povezan s komponentama metaboličkog sindroma i s njihovim brojem te da povećana ekspresija EL u proupalnim stanjima kao što je ateroskleroza i metabolički sindrom može spustiti razinu HDL-a.¹⁷⁸

Svojom fosfolipaznom aktivnošću EL cijepa HDL-fosfatidilkolin (HDL-PC) oslobađajući slobodne masne kiseline (eng. free fatty acids - FFA) i lizofosfatidil kolin (eng. lysophosphatidylcholine - lyso-PC). Oni su sposobni u kulturi humanih aortnih endotelnih stanica (eng. human aortic endothelial cells - HAEC) modulirati inflamatorni odgovor mnogih gena uključujući gene za adhezijske molekule žilnih stanica (eng. vascular cell

adhesion molecule-1 - VCAM1), E-selektin i IL-6, dovesti do apoptoze te služiti kao energija za neovaskularizaciju.¹⁷⁹

Obzirom na ključnu ulogu upalnih medijatora u razvoju ateroskleroze, povezanost upale i EL je svakako presudna u razumijevanju kako EL utječe na razvoj ateroskleroze te njenog potencijalnog učinka na destabilizaciju plaka. Razina EL-mRNA povećana je u kulturi endotelnih stanica koronarnih arterija pod utjecajem citokina koji su povezani s aterosklerozom (TNF- α i IL-1 β)¹⁶³ i to ovisno o dozi citokina i u odgovarajućem vremenskom slijedu.¹⁶⁵ *In vitro* studija Kojima i suradnika pokazala je da EL potiče adheziju monocita na endotelne stanice uz pomoć HSPG.¹⁷³

Značajna je povezanost dokazana između plazmatske razine EL-a te hsCRP-a i IL-6¹⁷⁶ kao i drugih proupalnih markera poput topivog TNF-receptora II, ICAM-1 i leptina.¹⁷⁷ Eksperimentalna endotoksemija koja je povezana s akutnim upalnim odgovorom dovodi do porasta koncentracije EL u plazmi.¹⁷⁷ U pretilih bolesnika s metaboličkim sindromom, u kojih je dokazana sistemska upala niskog stupnja, povišena je plazmatska razina EL¹⁵⁹ kao i u bolesnika sa šećernom bolešću.¹⁸⁰

S druge strane, EL utječe na ekspresiju citokina. Inhibicija EL ekspresije u THP-1 makrofaga dovodi do smanjenja indukcije proupalnih gena i čimbenika rasta.¹⁸¹ Ekspresija mRNA za EL povezana je s CD 68 mRNA (oznaka makrofaga) i značajno je povišena kod diferencijacije monocita u makrofage, a zatim se smanjuje kod prelaska makrofaga u masne stanice.¹⁸² Atorvastatin i simvastatin dovode do smanjene ekspresije EL u THP-1 makrofaga¹⁸³ što je jedan od mogućih mehanizama kako statini smanjuju akumulaciju lipida u makrofazima neovisno o utjecaju na reduktazu.

1.7.8. Polimorfizam gena za endotelnu lipazu

Do sada je otkriveno nekoliko genetskih varijacija EL s posljedičnom smanjenom funkcijom te povišenim HDL kolesterolom u plazmi, a za sada bez jasne kliničke implikacije na cerebrovaskularni i kardiovaskularni morbiditet i mortalitet. Primjer je Asn396Ser koja je najčešća varijanta u bijelaca.¹⁸⁴

1.7.9. Utjecaj endotelne lipaze na aterosklerozu

U apo E^{-/-} miševa inaktivacija EL povećava razinu HDL-a i usporava aterosklerozu za 70%. Na temelju imunohistokemije aterosklerotskih plakova u aorti, gdje je nađena povećana ekspresija EL u makrofazima, zaključeno je da EL ima i direktni efekt na aterosklerozu potičući adheziju monocita i infiltraciju u vaskularnu stijenku.¹⁴⁹

S druge strane, Ko i suradnici pokazali su da inaktivacija EL u hiperlipidemičnih miševa ne utječe na aterosklerozu.¹⁸⁵

Brown i suradnici pokazali su da je kod EL^{-/-} miševa povećana koncentracija malih gustih čestica LDL-a. Iako je koncentracija HDL-a u plazmi bila veća nego u kontrolnoj skupini *in vivo* nije dokazan povećan RTK iz makrofaga što se objašnjava reduciranim klirensom kolesterola.¹⁶² Povećana ekspresija EL dovodi do povećanog katabolizma odnosno smanjenja razine apoB lipoproteina u serumu.¹⁴⁵ Ahmed i suradnici pokazali su da je EL aktivnost nužna za inhibiciju adhezijskih molekula putem HDL-om posredovane aktivacije PPAR α sustava.¹⁸⁶

U radu Bartelsa i suradnika gdje je dokazana povezanost EL ekspresije i makrofaga¹⁸² utvrđeno je da se EL mRNA i proteini najviše nalaze u humanom karotidnom plaku simptomatskih bolesnika u području između fibrozne kape i nekrotične srži.

Azumi i suradnici pokazali su da je kod koronarne arterije bez aterosklerotskih promjena EL izražena u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama dok je u ateromatoznom plaku izražena i u upalnim stanicama (makrofazima).¹⁷²

EL iznenađujuće potiče efluks kolesterola katalitičkim i nekatalitičkim putem iz THP-1 makrofaga putem ABCA1.¹⁵⁴ Kod EL^{-/-} miševa smanjena je monocitna adhezija te smanjena mogućnost makrofaga da preuzmu i oksidiraju LDL.^{173, 187} Atorvastatin, ovisno o dozi, smanjuje ekspresiju EL na način da inhibira jetreni X receptor α (eng. liver X receptor α - LXR α) i jezgri faktori kapa B (eng. nuclear factor kB - NF-kB).¹⁸³

Uzimajući u obzir sposobnost EL odnosno njezinih produkata da pojačavaju ekspresiju inflamatornih molekula u endotelnim stanicama zajedno s njenom pojačanom ekspresijom u proinflamatornim uvjetima, pretpostavljamo da bi EL mogla biti pojačano zastupljena u nestabilnom humanom karotidnom aterosklerotskom plaku, zajedno s inflamatornim molekulama poput adhezijskih molekula i citokina (VCAM1, E-selektin, IL6).

2. CILJEVI I HIPOTEZA DOKTORSKE DIZERTACIJE

2.1. Ciljevi

2.1.1. Globalni cilj

- 1) Utvrditi razliku u ekspresiji EL u humanom karotidnom aterosklerotskom plaku (HKAP) kod simptomatskih i asimptomatskih bolesnika.

2.1.2. Specifični ciljevi

- 1) Utvrditi razliku u ekspresiji i lokalizaciji EL kod stabilnih i vulnerabilnih plakova.
- 2) Utvrditi povezanost ekspresije EL u plaku s razinom IL-6 i hsCRP u plazmi
- 3) Utvrditi povezanost ekspresije EL u plaku s terapijom bolesnika.
- 4) Utvrditi povezanost razine EL u plazmi sa simptomima bolesnika, rizičnim čimbenicima, upalnim pokazateljima (IL-6, hsCRP) te HDL-om i LDL-om.

2.2. Hipoteza

Prema dosadašnjim spoznajama o ulozi EL u patofiziologiji nastajanja aterosklerotskog plaka i njegovoj destabilizaciji, smatramo da je ekspresija EL veća u plaku simptomatskih bolesnika i u histološki nestabilnom plaku te da je u pozitivnoj korelaciji s upalnim biljezima (IL-6, CRP) u plazmi. Obzirom na ulogu makrofaga u destabilizaciji plaka kao glavnog staničnog medijatora upalnog procesa, smatramo da je pojačana ekspresija EL u nestabilnom plaku najizraženija upravo u makrofazima. Očekujemo različitu razinu EL u plazmi obzirom na simptome bolesnika: najizraženije kod bolesnika sa simptomima unutar 4 mjeseca, nešto manje izraženom kod bolesnika sa simptomima koji vremenski i lokalizacijski nisu vezani uz irigacijsko područje dotične kardidne arterije, te najmanje izraženim u bolesnika koji su potpuno asimptomatski.

3. BOLESNICI I METODE

Istraživanje jest zajednički projekt pod nazivom *Expression of endothelial lipase and inflammatory molecules in human carotid atherosclerotic plaques* koji je nastao u sklopu znanstvene suradnje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (MEF) i Medicinskog univerziteta u Grazu (MUG), a trajao od 2007. do 2010. godine . U istraživanje su uključeni simptomatski i asimptomatski bolesnici hospitalizirani u Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra *Sestre milosrdnice* (KBCSM) u vremenu od prosinca 2008. do prosinca 2009. godine koji su imali značajnu stenozu karotidne arterije te time indikaciju za endarterektomiju i odstranjenje aterosklerotskog plaka. Istraživanje je provedeno prema principima *Dobre kliničke prakse* i odredbama Helsinške deklaracije. Svi bolesnici koji su bili potencijalni kandidati za uključivanje u studiju obaviješteni su o karakteru i ciljevima istraživanja te su uključeni nakon davanja pisanog pristanka. Liječenje bolesnika koji su bili uključeni u studiju bilo je u potpunosti jednako liječenju bolesnika koji nisu bili uključeni u studiju. Bolesnici su mogli u bilo kojem trenutku, bez dodatnih objašnjenja, odustati od sudjelovanja u istraživanju. Svi klinički, laboratorijski, histološki i imunokemijski rezultati uneseni su u medicinski dosje svakog pojedinog bolesnika. Istraživanje je odobreno sa strane Etičkog povjerenstva KBCSM i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1. Plan istraživanja

Kriterij za uključivanje u istraživanje bila je prisutnost simptomatske ili asimptomatske 70-99%-tne stenoze zajedničke (lat. arteria carotis communis - ACC) ili ekstrakranijalnog segmenta unutarnje karotidne arterije (lat. arteria carotis interna - ACI) zbog čega je kod tih bolesnika indicirana karotidna endarterektomija (eng. Carotid Endarterectomy - CEA). Stenoza je utvrđena ultrazvučnom metodom odnosno kolor-doplerom (eng. Color Dopler Flow Imaging - CDFI) sa strane iskusnog sonografičara u KBCSM. U slučajevima gdje je točnost ultrazvučne metode ograničena kalcifikacijama ili tortuozičnostima žile odnosno gdje je bilo nužno bolje prikazati anatomske odnose, učinjena je digitalna subtrakcijska angiografija (DSA), kontrastna MR angiografija (engl. Contrast Enhanced Magnetic Resonance Angiography - CEMRA) ili CT-angiografija (eng. Computed Tomography Angiography - CTA). Klinička indikacija za karotidnu endarterektomiju postavljena je na temelju kliničke prezentacije i rezultata slikovnih metoda (CDFI i/ili DSA, CEMRA, CTA) prema važećim smjernicama za liječenje ekstrakranijalne bolesti karotidne arterije, a nakon pregleda neurologa i vaskularnog kirurga.

U studiju nisu bili uključeni bolesnici koji nisu dali pisani pristanak za sudjelovanje u studiji, bolesnici s akutnom i/ili kroničnom infektivnom ili autoimunom bolešću, bolesnici s malignom bolešću, bubrežnom insuficijencijom III-IV stupnja prema međunarodnoj klasifikaciji (klirens kreatinina <60 mL/min, kreatinin >200 mmol/L), jetrenom insuficijencijom umjerenog ili težeg stupnja (prema klasifikaciji Child Pugh razred B ili C), nedavno traumom ili operacijom te stanjem nakon već učinjene endarterektomije karotidne arterije na istoj strani. Isključeni su i bolesnici na antikoagulantnoj terapiji, bolesnici sa sumnjom na kardiogeni uzrok embolije temeljenom na anamnezi i elektrokardiogramu (fibrilacija atrijsa) te ehokardiografiji (aneurizma lijevog ventrikula, raniji veliki infarkt srca prednje stijenke, dilatacijska kardiomiopatija, aneurizma interatrijskog septuma, otvoreni foramen ovale).

3.2. Definicija simptomatske karotidne stenoze

Karotidna stenoza smatrana je simptomatskom ako je bolesnik imao žarišni neurološki simptom (cerebrovasularni inzult, TIA ili prolazni gubitak vida na jedno oko) koji je naglo nastao, po svojoj lokalizaciji odgovarao distribuciji dotične karotidne arterije, unutar 4-6 mjeseci od utvrđivanja stenoze karotidne arterije. U ovom radu arbitrarno je uzet interval od 4 mjeseca. Simptomi koji odgovaraju ishemiji odnosno infarktu u distribucijskom području desne karotidne arterije su slabost (ili plegija), te parestezija ili gubitak osjeta lijeve strane tijela i desnostrana homonimna hemianopsija, dok simptomi ili znakovi koji odgovaraju distribucijskom području lijeve ACI su slabost (ili plegija), parestezija ili gubitak osjeta desne strane tijela, lijevostrana homonimna hemianopsija i afazija. Djelomični gubitak vidnog polja, diskordinacija i ataksija odgovaraju irigacijskom području vertebralne arterije, pa su takvi bolesnici, ako nisu imali druge simptome, uključeni u skupinu s asimptomatskom karotidnom stenozom. CT odnosno NMR mozga nije se rutinski radio da bi se bolesnici klasificirali u simptomatske odnosno asimptomatske. Ako je period bio dulji od 4 mjeseca tada se navedeni simptomi sa značajno manjom sigurnošću mogu pripisati dotičnom karotidnom plaku. Osim toga, izvan tog perioda od 4 mjeseca na plaku su, pod djelovanjem terapije ili spontano, mogle nastati patofiziološke i morfološke promjene koje su mogle dovesti do stabilizacije odnosno destabilizacije plaka. Prilikom analize EL u plazmi bolesnici su bili klasificirani u tri skupine: prva skupina su bili potpuno asimptomatski bolesnici, druga skupina bili su bolesnici sa simptomima nastalim unutar 4 mjeseca (skupina *svježi simptomi*) dok su treću skupinu činili bolesnici koji su imali simptome u prošlosti izvan perioda od 4 mjeseca, ne nužno vezane uz irigacijsko područje karotidne arterije (skupina *stari simptomi*). Različita podjela bolesnika kod analize EL u plazmi u odnosu na analizu ekspresije EL u plaku korištena je zato jer je EL u plazmi oslobođena ne samo iz dotičnog karotidnog plaka već iz cijelog vaskularnog stabla, kao odraz odnosno biljeg difuzne ateroskleroze i endotelne disfunkcije.

3.3. Kliničke karakteristike, anamneze i terapija bolesnika

Nakon uzimanja općih podataka (dob, spol, tjelesna težina i visina) svim bolesnicima uzeta je detaljna anamneza s osobitim osvrtom na dosadašnje akutne odnosno kronične komplikacije ateroskleroze kao što su koronarna bolest srca (preboljeli infarkt srca, angina pektoris, pozitivan test koronarne rezerve, ishemička kardiomiopatija), periferna vaskularna bolest (intermitentne klaudikacije, gangrena) ili ateroskleroza intraabdominalnih ogranaka aorte (abdominalna angina, infarkt bubrega, bolest renalnih arterija). U svih bolesnika utvrđeno je prisustvo velikih čimbenika rizika za aterosklerozu: arterijska hipertenzija, šećerna bolest, pušenje, hiperlipoproteinemija i nasljeđe. Pozitivna obiteljska sklonost definirana je kao znaci preuranjene ateroskleroze kod uži članova obitelji, muškaraca prije 55. i žena prije 65. godine života.

Krvni tlak je mjereno živinim sfingomanometrom (Riester, Jungingen, Njemačka) kao srednja vrijednost od tri mjerenja u standardiziranim uvjetima u ležećem položaju. Arterijska hipertenzija definirana je prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organization - WHO)¹⁸⁸ kao krvni tlak jednak ili veći od 140/90 mmHg ili ako je već ranije uvedena antihipertenzivna terapija. Hiperlipoproteinemija definirana je s LDL-kolesterolom većim od 3,5 mmol/L ili ako je bolesnik već bio na antilipemičnoj terapiji. Obzirom na pušenje bolesnici su razvrstani kao nepušači, bivši pušači ili sadašnji pušači (u zadnja tri mjeseca puše više od 5 cigareta na dan). Šećerna bolest (dijabetes) definirana je kod bolesnika koji već jesu na antidijabetičkoj terapiji odnosno imaju od ranije utvrđen dijabetes ili ako im je glukoza u krvi nakon osamsatnog gladovanja bila veća od 7,0 mmol/L odnosno nakon jela veća od 11,1 mmol/L. Metabolički sindrom je definiran po kriterijima Međunarodne dijabetičke federacije (eng. International Diabetes Federation - IDF)¹⁸⁹ kao povećani opseg struka (u muškaraca veći od 94 cm i žena veći od 80 cm) uz još dva od slijedećih kriterija (serumski trigliceridi >1,7 mmol/L, HDL kolesterol <1,03 mmol/L u muškaraca i <1,29 mmol/L u žena, sistolički arterijski tlak iznad 130 i/ili dijastolički iznad 85 mmHg, glukoza na tašte veća od 5,6 mmol/L ili ranije dijagnosticirana šećerna bolest). Opseg struka je mjereno fleksibilnom mjernom trakom u horizontalnoj ravnini na razini zdjeličnog grebena. Indeks tjelesne mase (eng. body mass index – BMI) izračunat je prema Outletovoj

formuli kao omjer tjelesne težine u kilogramima i kvadrata tjelesne visine izražene u metrima (kg/m^2).

Kod svih bolesnika vođena je evidencija dosadašnje antihipertenzivne terapije klasificirane po skupinama lijekova (ACE inhibitori, blokatori kalcijevih kanala, beta blokatori) uključujući generičko ime lijeka i ukupnu dnevnu dozu. Također je vođena evidencija antilipemičke terapije koja se prvenstveno odnosi na statine (generičko ime lijeka i doza) dok je bolesnika s drugim vrstama antilipemičke terapije (fibrati, ezetimib, niacin) bilo vrlo malo. Također je zabilježeno uzimanje antiagregacijske terapije (acetilsalicilna kiselina u dozi 50 – 300 mg/dan te klopidogrel 75 mg/dan).

U medicinski dosje svih bolesnika upisani su komorbiditeti koji nisu bili jedan od kriterija za isključivanje iz studije.

3.4. Kardiološki pregled s elektrokardiografijom i ehokardiografijom

Cilj kardiološkog pregleda s ehokardiografijom bilo je isključenje bolesnika koji imaju potencijalni nekarotidni uzrok neuroloških simptoma odnosno kardijalni uzrok embolizma. Isključeni su bolesnici s permanentnom fibrilacijom atrijske ili bolesnici koji su prema anamnezi ili opisu simptoma imali paroksizmalnu fibrilaciju atrijske. Ehokardiografski pregled je vršen na aparatu Sequoia Acuson (Oceanside, California, SAD). Isključeni su bolesnici s dokazanim trombotom u lijevom ventrikulu ili atrijsku, aneurizmom lijevog ventrikula bez vidljivog tromba, jačom dilatacijom lijevog ventrikula (promjer na kraju dijastole iz parasternalne projekcije >65 mm) i ejijskom frakcijom $<30\%$ mjenom metodom po Simpsonu, jasnom patologijom interatrijskog septuma (atrijski septalni defekt, aneurizma interatrijskog septuma (veća od 10 mm) te kontrastnom pretragom dokazan otvoren foramen ovale). Također su isključeni bolesnici s vidljivim trombima odnosno egzulceriranim plakovima uzlazne aorte.

3.5. Kolor dopler karotidnih arterija

CDFI obje karotidne arterije izvršen je na komercijalno dostupnim aparatima Aloka 5500 i Alfa 10 Premium (Tokyo, Japan) s 10–MHz linearnom sondom. Stupanj stenozе karotidne arterije definiran je sukladno angiografskim kriterijima North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)⁴⁰ koji dobro koreliraju s ultrazvučnom³¹ kao i ostalim metodama. Ovisno o prisutnosti hipoehognih zona i kalcifikacija, plakovi su podijeljeni na: 1) fibrozne (bez hipoehogenih zona i bez kalcifikacija), 2) meke (dominiraju hipoehogene zone), 3) kalcificirane, 4) miješane (prisutne i hipoehogene zone i kalcifikati) i 5) nedefinirane (fibrozni plakovi s manjim područjem hipoehogenog i kalcificirajućeg materijala).

3.6. Sakupljanje uzoraka karotidnih plakova

Kompletni tubularni uzorci karotidnog plaka uzeti su za vrijeme CEA sa strane iskusnog vaskularnog kirurga, sa što manje traume odnosno oštećenja osobito luminalne površine. Uzorak je odmah ispran s 0,9%-tnom fiziološkom otopinom te fiksiran kroz 24 sata u 5 mL 10%-tnog puferiranog formalina. Nakon toga je u više navrata ispran te je pohranjen u puferiranoj otopini fosfatnih soli (PBS) kroz 2 tjedna prije uklapanja u parafinski blok. Morfologija plaka određena je standardnom histološkom analizom 5-mikrometarskih rezova preparata bojanih hematoksilinom i eozinom. Ključni cilj histološke analize bio je određivanje vulnerabilnosti (nestabilnosti) plaka. U nedostatku novijih, prospektivno valoriziranih kriterija, korištena je Sary klasifikacija.¹⁹⁰ Plakovi su podijeljeni u tri skupine: 1) fibrozni (F), prekriveni glatkom luminalnom površinom i s intaktnom fibroznom kapom, 2) ulcerirani nekomplicirani plakovi (UNC) koji su imali tanku kapu s fisurama ili rupturom i 3) ulcerirani komplicirani plakovi (UC) koji su imali tanku fibroznu kapa s erozijama ili rupturom te s trombom na plaku ili krvarenjima.

3.7. Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu korišteni su 5 µm debeli rezovi humanog karotidnog plaka, fiksiranog u formalin i uklopljenog u parafin, dobiveni pomoću kriostata Superfrost Plus (Menzel, Braunschweig, Njemačka) koji su zatim osušeni preko noći na 40 °C. Nakon toga rezovi su odvošteni pomoću ksilena kroz 10 minuta. Imunohistokemija je učinjena pomoću sistema Ultravision LP detection system (Thermo Scientific, Fremont, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon blokiranja endogene peroksidaze, rezovi su isprani PBS-om. Korištena je negativna kontrola kod koje je primarno protutijelo zamijenjeno s PBS da bi se testiralo nespecifično vezanje. Rezovi su zatim inkubirani kroz jedan sat s razrijeđenim zečjim klonskim anti-humanim protutijelima na CD163 (DB Biotech, Kosice, Slovačka) uz razrijeđenje 1:100 i zečjim anti-EL protutijelima uz razrijeđenje 1:1500.¹⁷⁹ Nakon pranja PBS-om preparati su inkubirani s UltraVision HRP označenim polimerskim sustavom kroz 15 minuta i s 3-amino-9-etilkarbakolom (AEC, Dako, Danska) prema uputama proizvođača. Za negativnu kontrolu korišteni su zečja protutijela IgG Ab-1 (Thermo Scientific, Fremont, SAD) umjesto primarnih protutijela. Mikroskopska analiza izvršena je na AxioPhot mikroskopu opremljenim s AxioCam HRc digitalnom kamerom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka) sa strane tri neovisna istraživača koji nisu imali kliničke podatke o bolesnicima. U slučajevima gdje se ocjena razine bojanja razlikovala među istraživačima, konačna ocjena dobivena je većinom (dva istraživača). Ekspresija EL izražena je pomoću semikvantitativne skale kao: bez bojanja (0), slabije bojanje (0–25% stanica pozitivno - A) i jače bojanje (više od 25% stanica pozitivno - B).

3.8. Laboratorijske analize krvi

3.8.1. Standardne laboratorijske analize

Uzorci periferne venske krvi za laboratorijske testove uzeti su neposredno prije operacije, oko 8 sati ujutro, nakon prekonoćnog gladovanja. Epruvete s etilen-diamin-tetraoctenom kiselinom (EDTA)-K3 korištene su za hematološke testove na komercijalno dostupnom

aparatu (Coulter-Counter S plus junior, Coulter Electronics Limited, Luton, UK). Koagulacijski testovi dobiveni su Quick metodom iz epruveta s 3,8% natrij-citratom. Nakon separacije plazma centrifugiranje (3000 G kroz 10 min), analiza je učinjena na automatskom koagulometru Behring coagulation timer (Dade Behring, Marburg, Njemačka). Standardna biokemijska analiza (kreatinin, bilirubin, aspartat transaminaza, alanin transaminaza, glukoza u krvi, ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL) određeni su na automatskom multikanalnom analizatoru Olympus AU2700 i Olympus Fractoscan junior (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Njemačka). HsCRP mjereno je na automatskom multikanalnom analizatoru Modular (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), dok je IL-6 mjereno ELISA metodom (QuantiGlo; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Njemačka) prema uputama proizvođača.

3.8.2. Endotelna lipaza u plazmi

EL u plazmi određivana je prije primjene heparina. Naime, obzirom na vezanost EL na površinu stanice putem HSPG, prilikom primjene heparina dolazi do oslobađanja EL u cirkulaciju tako da je koncentracija EL u postheparinskoj plazmi gotovo 3 puta veća nego u preheparinskoj, ali su obje razine u vrlo čvrstoj vezi kao što je pokazano u radu Bedellina i suradnika.¹⁵⁹

U ovom istraživanju razina EL u plazmi određena je u 55 od ukupno 66 uzoraka pomoću ELISA metode nedavno objavljene sa strane Shiu i suradnika.¹⁸⁰ Jedanaest uzoraka plazme bilo je oštećeno pri transportu te određivanje nije bilo moguće. Pet nanograma N-terminalnog peptida humane EL (Novus Biologicals, Littleton, CO, SAD) imobilizirano je u plastične pločice s 96 zdenaca (Costar 96-well EIA microtiter plate, Bloomington, MN, SAD). Nakon blokiranja nespecifičnog vezanja s 5%-tnim albuminom iz goveđeg seruma (eng. bovine serum albumine - BSA), mješavina koja sadržava 50 µl plazme u razrjeđenju 1:6 i 50 µl anti-EL protutijela (Novus Biologicals, Littleton, CO, SAD) stavljena je u zdence i inkubirana na sobnoj temperaturi kroz tri sata. Nakon pranja, pločica je inkubirana s HRP (eng. horseradish peroxidase) - označenim sekundarnim zečjim protutijelima. Količina protutijela vezana za imobilizirani N-terminalni peptid humane EL određena je na ELISA-čitaču pomoću bezbojnog supstrata TMB (Pierce, Rockford, IL, SAD). Križna reakcija s ostalim serumskim lipazama, testirana je na način da je razrijeđena plazma zamijenjena s komercijalno dostupnim pročišćenim preparatima lipoprotein-lipaze i hepatične lipaze (ustupljeno sa strane Dr. G. Olivecrona sa Sveučilišta u Umeu, Švedska) bila je negativna.

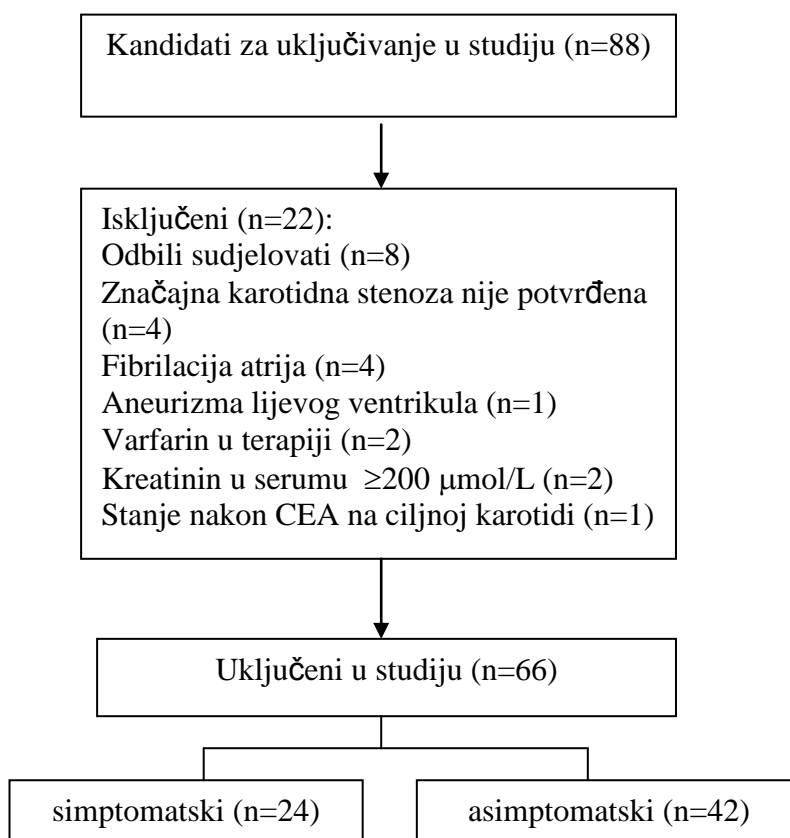
3.9. Statistička analiza

Podaci su prikazani koristeći srednje vrijednosti standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrijednosti za kontinuirane varijable i kao postoci za kategorijske varijable. Distribucija podataka analizirana je Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Na temelju tih rezultata odgovarajući ne-parametrijski testovi su korišteni u budućim analizama. Student t-test ili Mann-Whitney U test korišten je za utvrđivanje razlika u kvantitativnim varijablama među skupinama temeljenim na simptomatologiji (simptomatski i asimptomatski) i imunohistokemiji (skupina A i B). Razlike u histološkim skupinama (F, UC i UNC) analizirane su Kruskal-Wallis testom. χ^2 test korišten je za analizu razlika u kvalitativnim i kategorijskim varijablama. Razina p ispod 0,05 smatrana je statistički značajnom. Korišten je statistički softver PASW 17.02 (IBM, Chichago, IL, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Klinički pokazatelji ispitivane populacije bolesnika

Od 88 bolesnika koji su bili kandidati za uključivanje u studiju 22 bolesnika su bila isključena: 8 bolesnika odbilo je sudjelovati te nisu dali pisani pristanak, u 4 bolesnika CDFI nije potvrdio ambulantni nalaz signifikantne karotidne stenoze tako da ti bolesnici nisu bili operirani, i 10 bolesnika je imalo ostale kriterije za isključivanje (fibrilacija atriya u 4 bolesnika, aneurizma lijevog ventrikula kod jednog bolesnika, terapija varfarinom u dva bolesnika, kreatinin viši od 200 $\mu\text{mol/L}$ kod 2 bolesnika, već ranije učinjena CEA na toj strani kod jednog bolesnika). Konačno je u studiju uključeno 66 bolesnika, Slika 4.1-1.

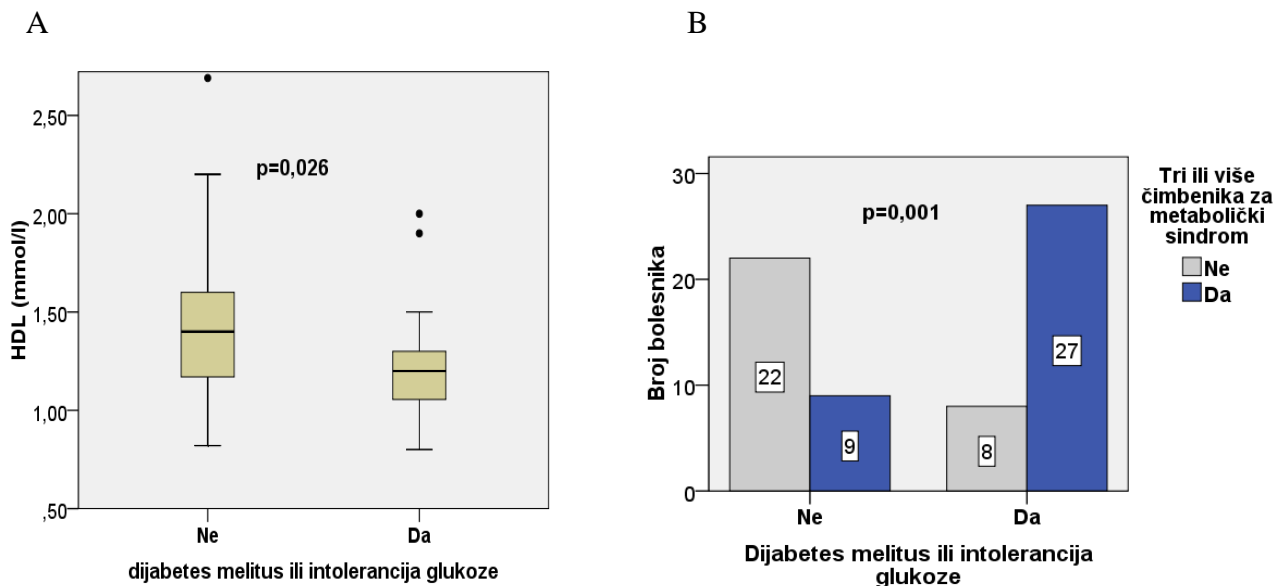


Slika 4.1-1. Dijagram bolesnika kod uključivanja u studiju.

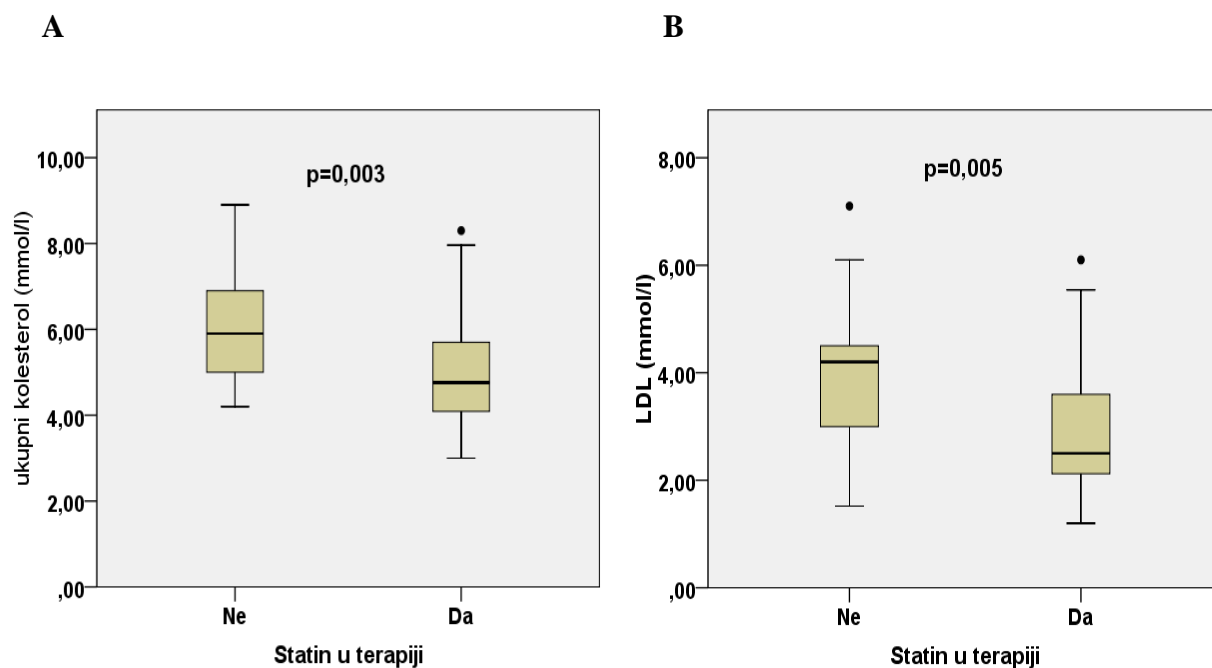
Bolesnici su bili prosječne dobi $66,9 \pm 8,7$ godina, u rasponu od 43 do 84 godine, medijan 69 godina. Od 66 bolesnika 43 (65,2%) su bili muškarci. U 58 slučajeva (87,9%) prisutna je bila arterijska hipertenzija, a u 52 slučajeva (78,8%) hiperlipoproteinemija. Dijabetes melitus i intolerancija glukoze zabilježena je u 35 slučajeva (53%); ti bolesnici su imali značajno niže vrijednosti HDL-a u odnosu na bolesnike bez dijabetesa melitusa ili intolerancije glukoze ($1,21 \pm 0,25$ vs. $1,43 \pm 0,46$; T-test, $p=0,026$) te su značajno češće imali tri ili više čimbenika metaboličkog sindroma, Grafikon 4.1-1. Pušenje (sadašnje ili u anamnezi) bilo je prisutno u 30 bolesnika (45,5%) i jasna obiteljska sklonost u 13 bolesnika (19,7%).

Na terapiji statinima bilo je 45 bolesnika (68,2%) koji su imali značajno manju prosječnu razinu ukupnog kolesterola ($4,9 \pm 1,3$ vs. $6,1 \pm 1,33$; T-test, $p=0,003$) i LDL-a ($2,9 \pm 1,1$ vs. $3,9 \pm 1,3$; T-test, $p=0,005$), Grafikon 4.1-2.

Na terapiji ACE inhibitorima i blokatorima angiotenzinskih II receptora (eng. angiotensin II receptor blockers – ARB) bilo je ukupno 33 bolesnika (65,1%), dok je blokatore kalcijevih kanala koristilo 29 bolesnika (43,9%). Na terapiji acetilsalicilnom kiselinom bili su 44 bolesnika (66,7%), i to 19 simptomatskih (79,2%) i 25 asimptomatskih (56,8%). Prosječan opseg struka kod muškaraca je bio $95,2 \pm 6,8$ cm, kod žena $87,6 \pm 7,5$ cm, prosječan BMI $27,3 \pm 3,1$ kg/m², a tri ili više komponenata metaboličkog sindroma bilo je prisutno u 36 bolesnika (54,6%).



Grafikon 4.1-1. Posebnosti bolesnika s dijabetesom melitusom i intolerancijom glukoze. Značajno manja razina HDL-a ($1,21 \pm 0,25$ vs. $1,43 \pm 0,46$ mmol/L; T-test, $p=0,026$) (A). Češća prisutnost tri ili više čimbenika za metabolički sindrom ($p=0,001$) (B).



Grafikon 4.1-2. Utjecaj statina na koncentraciju ukupnog kolesterola i LDL-a. Na terapiji statinima bilo je ukupno 68,2% bolesnika koji su imali značajno manju prosječnu razinu ukupnog kolesterola ($4,9 \pm 1,3$ vs. $6,1 \pm 1,33$ mmol/L; T-test, $p=0,003$) (A) i LDL-a ($2,9 \pm 1,1$ vs. $3,9 \pm 1,3$ mmol/L; T-test, $p=0,005$) (B) u odnosu prema bolesnicima koji nisu imali statine, ali još uvijek iznad preporučene razine sa strane Europskog kardiološkog društva.

Obrada dobivenih rezultata podijeljena je na dvije osnovne skupine: rezultati analize plaka i rezultati analize razine plazmatske EL. Statistička obrada rezultata analize plaka provedena je nakon grupiranja bolesnika na temelju dva kriterija: simptomi bolesnika i histološka podjela plaka. Osnovna podjela na skupine temeljila se na prisutnosti simptoma (TIA/CVI) kompatibilnih s ciljnom karotidnom arterijom unutar odnosno izvan perioda od 4 mjeseca od uključivanja u studiju tako da su bolesnici koji nisu imali simptome ili su imali simptome izvan intervala od 4 mjeseca uključeni u skupinu *asimptomatski* (42 bolesnika), dok su bolesnici sa simptomima unutar intervala od 4 mjeseca koji odgovaraju irigacijskom području ciljane karotidne arterije uključeni u skupinu *simptomatski* (24 bolesnika). Slijedeća podjela u skupine temeljila se je na histološkim karakteristikama plaka indikativnih za vulnerabilnost plaka. Plakovi su podijeljeni u fibrozne (F), ulcerirane-nekomplicirane (UNC) i ulcerirane komplicirane plakove (UC).

Tablica 4.1-1. Kliničke karakteristike ukupne populacije bolesnika uključenih u studiju

Kliničke karakteristike i terapija	Bolesnici (n=66)
	SV±SD
Dob (godine starosti)	66,9 ± 8,7 (43/69/84)
BMI (kg/m ²)	27,3±3,1 (21,4/26,4/35,1)
Opseg struka (cm)	M 95,2 ±6,8 Ž 87,6 ±7,5
	Broj (%) bolesnika
Spol:	
Muški	43 (65,2)
Ženski	23 (34,8)
Povećan opseg struka	31 (47,0)
Kardiovaskularni rizični čimbenici:	
Arterijska hipertenzija	58 (87,9)
Hiperlipoproteinemija	52 (78,8)
Dijabetes melitus ili intolerancija glukoze	35 (53,0)
Pušenje	30 (45,5)
Obiteljska sklonost	13 (19,7)
Periferna vaskularna bolest	30 (45,5)
Koronarna bolest srca	18 (27,3)
Lijekovi:	
Statini	45 (68,2)
ACE inhibitori	33 (50,0)
Blokatori angiotenzinskih receptora	10 (15,1)
Blokatori kalcijevih kanala	29 (43,9)
Acetil salicilna kiselina	44 (66,7)
Broj metaboličkih parametara ^a	
0	4 (6,1)
1	6 (9,1)
2	20 (30,3)
3	12 (18,2)
4	20 (30,3)
5	4 (6,1)

*Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – najniža vrijednost, maks – najviša vrijednost, med – medijan, indeks tjelesne BMI – indeks tjelesne mase (eng. body mass index) ACE – angiotenzin konvertirajući enzim (eng. angiotensin-converting enzyme)

^aMetabolički parametri: 1) opseg struka kod muškaraca >94 cm, kod žena >80 cm, 2) seruski trigliceridi >1,7 mmol/L, 3) HDL kolesterol <1,03 mmol/L kod muškaraca i <1,29 mmol/L kod žena, 4) sistolički arterijski tlak >130 i/ili dijastolički >85 mmHg, 5) glukoza na tašte veća od 5,6 mmol/L ili ranije dijagnosticirana šećerna bolest).

4.2. Analiza plaka

4.2.1. Podjela na skupine prema simptomima

4.2.1.1. Kliničke karakteristike i terapija bolesnika

Kliničke karakteristike bolesnika i terapija grupirane prema simptomima prikazani su u Tablici 4.2-1.

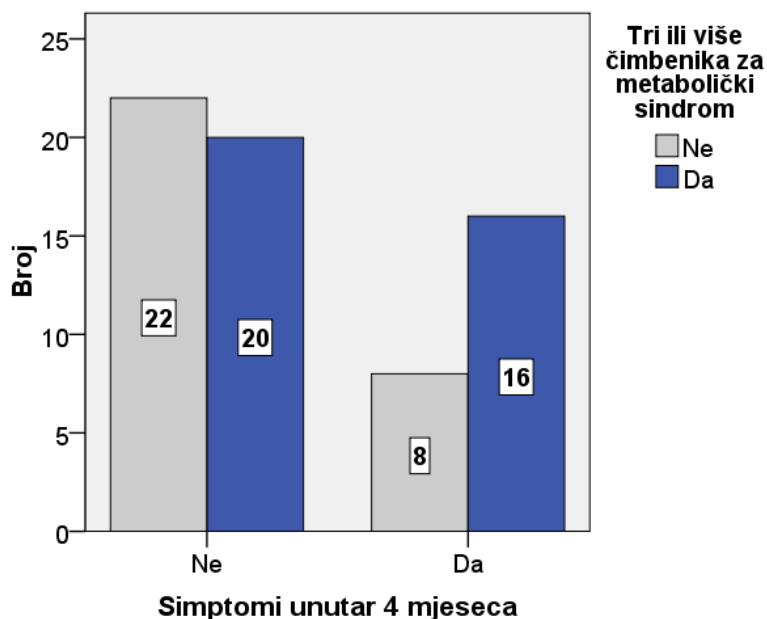
Skupine *asimptomatski* i *simptomatski* bolesnici nisu se značajno razlikovale u dobi, spolu, individualnim čimbenicima rizika, terapiji ili u prisutnosti aterosklerotske bolesti na ostalim organima (periferna vaskularna bolest i koronarna bolest srca). U skupini *simptomatski* zabilježena je veća učestalost bolesnika s povećanim opsegom struka u skladu s kriterijima Međunarodne dijabetičke federacije (International Diabetes Federation - IDF) za metabolički sindrom (*simptomatski* 15 (62.5%), *asimptomatski* 16 (38%); χ^2 test, $p=0,049$). Međutim, prosječni opseg struka ipak se nije razlikovao po skupinama ($p=0,21$). BMI bio je viši u skupini *simptomatski*, bez statističke značajnosti ($28,2 \pm 3,0$ vs. $26,8 \pm 3,0$; Mann Whitney U test, $p=0,085$). U skupini *simptomatski* bilo je 16 bolesnika (66,7%) s metaboličkim sindromom, a u skupini *asimptomatski* 20 (47,6%), bez statistički značajne razlike (χ^2 test, $p=0,113$), Grafikon 4.2-1. Osnovni biokemijski i hematološki kao i pokazatelji upale (leukociti, hs-CRP, sedimentacija eritrocita, fibrinogen i IL-6) prikazani su u Tablici 4.2-2.

Tablica 4.2-1. Kliničke karakteristike bolesnika i terapija podijeljene u skupine prema simptomima.

Kliničke karakteristike bolesnika i terapija	Asimptomatski (n=42)	Simptomatski (n=24)	Test	P
	(SV±SD) (min/med/maks)			
Dob (godine starosti)	67,2 ± 8,2 (43/69,0/83)	66,4 ± 9,73 (50/65,5/84)	MWU	0,583
BMI (kg/m ²)	26,8 ± 3,0 (21,4/26,5/33,4)	28,2 ± 3,0 (22,9/27,7/35,1)	MWU	0,085
Opseg struka (cm)				
Muški	93,9 ± 6,8	97,6 ± 6,2	T test	0,092
Ženski	87,14 ± 6,8	88,2 ± 8,9		
Spol:	Broj (%) bolesnika		χ^2 test	0,731
Muški	28 (66,6)	15 (62,5)		
Ženski	14 (33,3)	9 (37,5)		
Povećan opseg struka	16 (38,1)	15 (62,5)	χ^2 test	0,049
Kardiovaskularni rizični čimbenici:				
Arterijska hipertenzija	36 (85,7)	22 (91,6)	χ^2 test	0,402
Hiperlipoproteinemija	31 (73,8)	21 (87,5)	χ^2 test	0,193
Dijabetes melitus/intolerancija glukoze	20 (47,6)	15 (62,5)	χ^2 test	0,135
Pušenje	16 (38,0)	14 (58,3)	χ^2 test	0,276
Obiteljska sklonost	9 (21,4)	4 (16,7)	χ^2 test	0,648
Periferna vaskularna bolest	21 (50,0)	9 (37,5)	χ^2 test	0,326
Koronarna bolest srca	12 (28,5)	6 (25,0)	χ^2 test	0,861
Lijekovi:				
Statini	29 (69,0)	16 (66,6)	χ^2 test	0,568
ACE inhibitori	21 (50,0)	12 (50,0)	χ^2 test	0,954
Blokatori angiotenzinskih receptora	7 (16,6)	3 (12,5)	χ^2 test	0,755
Blokatori kalcijevih kanala	19 (45,2)	8 (33,3)	χ^2 test	0,617
Acetil salicilna kiselina	25 (59,2)	19 (79,1)	χ^2 test	0,101
Broj metaboličkih parametara			χ^2 test	0,463
0	3 (7,1)	1 (4,2)		
1	4 (9,5)	2 (8,3)		
2	15 (35,7)	5 (20,8)		
3	8 (19,0)	4 (16,7)		
4	9 (21,4)	11 (45,8)		
5	3 (7,1)	1 (4,2)	χ^2 test	0,113
Tri ili više faktora metaboličkog sindroma	20 (47,6)	16 (66,7)		

*Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – najniža vrijednost, maks – najviša vrijednost, med – medijan, BMI–indeks tjelesne mase (eng. body mass index) ACE–angiotenzin II konvertirajući enzim (eng. angiotensin II converting enzyme), MWU- MannWhitney U test.

U skupini *simptomatski* su bolesnici koji su imali simptome unutar 4 mjeseca i koji prema svom karakteru pripadaju slivnom području ciljne karotide. U skupini *asimptomatski* su bolesnici bez simptoma te oni koji su imali simptome izvan perioda od 4 mjeseca i/ili simptome koje se ne mogu pripisati ciljnoj karotidi. U skupini *simptomatski* veća je učestalost bolesnika s povećanim opsegom struka



Grafikon 4.2-1. Povezanost metaboličkog sindroma i simptoma. Uočena je veća učestalost metaboličkog sindroma kod grupe *simptomatski*, ali razlika nije bila statistički značajna (66,7:47,6 %, $p=0,011$). Svijetli stupac - bolesnici bez metaboličkog sindroma, tamni stupac - bolesnici sa metaboličkim sindromom.

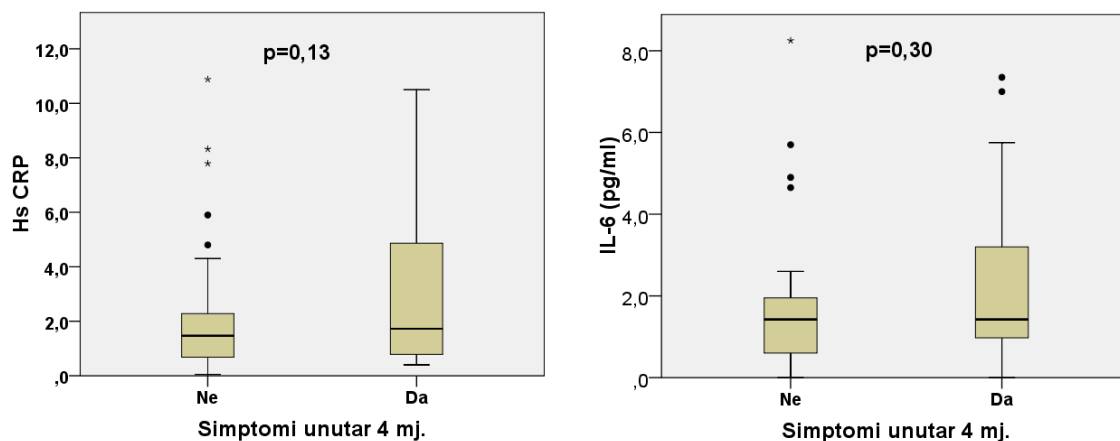
Nije uočena statistički značajna razlika u rezultatima laboratorijskih pretraga. Kod hsCRP-a zabilježen je trend viših vrijednosti kod skupine *simptomatski*, ali bez značajne razlike (*asimptomatski* $2,6 \pm 3,9$, medijan $1,47 \mu\text{g/mL}$, raspon $0,1-23,03 \mu\text{g/mL}$; *simptomatski* $4,9 \pm 7,3$, medijan $1,73 \mu\text{g/mL}$, raspon $0,4-31,5 \mu\text{g/mL}$; Mann-Whitney U test, $p=0,132$). Također nije zabilježena razlika u IL-6 premda je prosječna vrijednost bila zamjetno viša kod skupine *simptomatski* (*asimptomatski* $2,2 \pm 3,3$ medijan $1,43 \text{ pg/mL}$, raspon $0-15,8 \text{ pg/mL}$; *simptomatski* $4,3 \pm 8,9$ medijan $1,43 \text{ pg/mL}$, raspon $0-43,2 \text{ pg/mL}$; Mann-Whitney U test, $p=0,301$), Grafikon 4.2-2.

Tablica 4.2-2. Laboratorijski pokazatelji bolesnika podijeljenih u skupine prema simptomima

Parametri	Asimptomatski (n=42)	Simptomatski (n=24)	Mann-Whitney U test
	SV±SD (min/med/maks)		P
Trombociti (x10 ⁹ /L)	237 ±67 (105/219/450)	219 ±52 (144/210/353)	0,242
Hemoglobin (g/L)	137,8 ±14,1 (90/128/174)	140,5 ±9,1 (122/141/157)	0,464
Leukociti (x10 ⁹ /L)	8,21 ±2,4 (3,4/7,4/16,1)	7,33 ±1,65 (4,7/7,2/10,6)	0,196
fibrinogen (g/L)	4,28 ±0,86 (2,4/4,3/6,8)	4,62 ±1,02 (3,1/4,3/7,8)	0,341
APTV (sekunda)	25,2 ±4,6 (21/26/35)	26,4 ±3,4 (22/26/31)	0,508
PV (%)	104,3 ±11,8 (65/104/126)	103,6 ±8,9 (88/104/118)	0,664
SE (mm/h)	18,5 ±8,7 (2/19/45)	19,2 ±11,2 (2/19/47)	0,773
hs-CRP (µg/mL)	2,6 ±3,9 (0,1/1,47/23,03)	4,9 ±7,3 (0,4/1,73/31,5)	0,132
kreatinin (µmol/L)	95,1 ±21,7 (63/94/166)	96,7 ±20,4 (63/94/152)	0,529
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,2 ±1,5 (3,0/4,9/8,9)	5,5 ±1,4 (3,3/4,55/8,30)	0,294
LDL (mmol/L)	3,1 ±1,3 (1,5/2,61/7,10)	3,5 ±1,3 (1,2/3,89/6,1)	0,1651
HDL (mmol/L)	1,3 ±0,4 (0,8/1,2/2,9)	1,3 ±0,3 (0,9/1,3/2,0)	0,843
Trigliceridi (mmol/L)	1,8 ±0,7 (0,8/1,6/3,6)	1,8 ±0,9 (0,9/1,4/4,9)	0,493
Lp(a) (mg/dL)	23,4 ±21,2 (<10/10,1/83,2)	19,9 ±18,7 (<10/10,0/66,2)	0,444
IL-6 (pg/mL)	2,2 ±3,3 (0,0/1,43/15,8)	4,3 ±8,9 (0,0/1,43/43,25)	0,301

*Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – najniža vrijednost, maks – najviša vrijednost, med – medijan; APTV – aktivno parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PV – protrombinsko vrijeme; SE – sedimentacija eritrocita u prvom satu; hs-CRP – visoko senzitivni C-reaktivni protein (eng. high sensitivity C-reactive protein); LDL – lipoprotein niske gustoće (eng. low density lipoprotein); HDL – lipoprotein visoke gustoće (eng. high density lipoprotein); IL-6 – interleukin-6; Lp(a) – Lipoprotein (a)

Nije bilo razlike u laboratorijskim parametrima između skupina *simptomatski* i *asimptomatski* uključujući i razinu IL-6 i hsCRP-a. Razina hsCRP-a u obje skupine veća je nego kod zdrave populacije.



Grafikon 4.2-2. Razina CRP-a i IL-6 u skupinama *simptomatski* i *asimptomatski*. Nije bilo statistički značajne razlike.

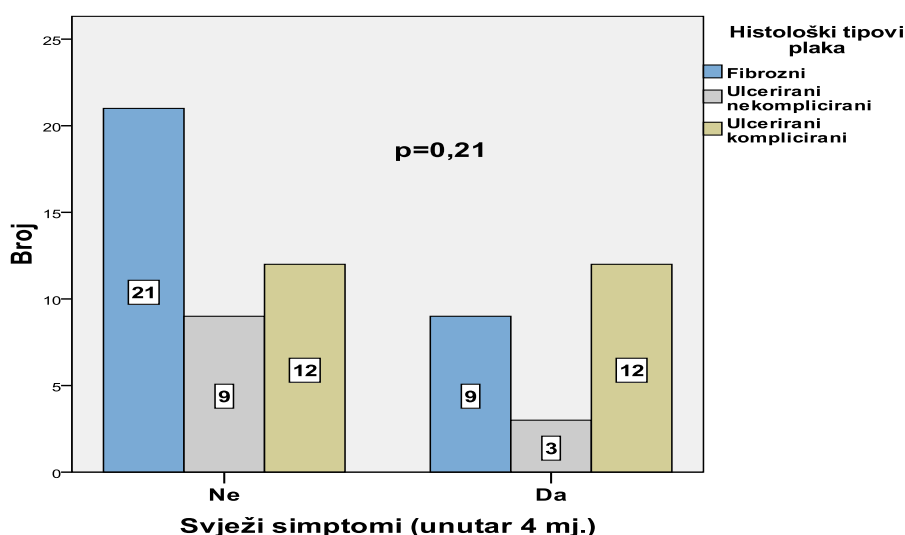
4.2.1.2. Morfološke karakteristike plaka i stupanj stenozе

Kod 61 bolesnika (92%) završna dijagnoza postavljena je na temelju ultrazvuka (CDFI) dok je dodatna slikovna metoda bila potrebna u 5 slučajja (DSA 2 bolesnika, CEMRA 1 bolesnik, CTA 2 bolesnika). Određen je stupanj plaka i morfološki izgled plaka indikativan za vulnerabilnost (hipoehogene *meke* zone s ili bez ulceracija na površini plaka). Visokosignifikantnu stenozu (95-99%) imalo je 19 bolesnika (79,2 %) u skupini *simptomatski* te 19 bolesnika (45,2%) u skupini *asimptomatski* što je bila statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,027$), Tablica 4.2-3. Osim toga, 12 bolesnika (50%) skupine *simptomatski* i 11 bolesnika (26,2%) skupine *asimptomatski* imalo je *meke* (hipoehogene) plakove što je također bila statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,039$). Međutim, kod histološke analize, pri čemu su plakovi bili podijeljeni na fibrozne, ulcerirane – nekomplikirane (UNC) i ulcerirane komplikirane (UC) nije nađena statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,213$), iako je 50% (12) bolesnika iz skupine *simptomatski* imalo UC plakove, dok je taj postotak u skupini *asimptomatski* bio primjetno niži (28,6%, 12).

Tablica 4.2-3. Stupanj stenozе, morfološke i histološke karakteristike plakova u skupinama *asimptomatski* i *simptomatski*

Karakteristika	<i>Asimptomatski</i> (n=42)	<i>simptomatski</i> (n=24)	Test	p
Slikovne metode (CDFI, DSA, CEMRA, CTA)				
Broj (%) bolesnika				
Stupanj stenozе (%):				
70-85	18 (42,9)	4 (16,7)	χ^2 test	0,027
85-95	5 (11,9)	1 (4,2)		
95-99	19 (45,2)	19 (79,2)		
Morfološke karakteristike plaka (CDFI)				
Fibrozni	5 (11,9)	0	χ^2 test	0,039
Meki	11 (26,2)	12 (50,0)		
Kalcificirani	4 (9,5)	3 (12,5)		
Mješani	14 (33,3)	9 (37,5)		
Nedefinirani	8 (19,0)	0		
Histološka podjela				
Fibrozni	21 (50,0)	9 (37,5)	χ^2 test	0,213
Ulcerirani nekomplikirani (UNC)	9 (21,4)	3 (12,5)		
Ulcerirani komplikirani (UC)	12 (28,6)	12 (50,0)		

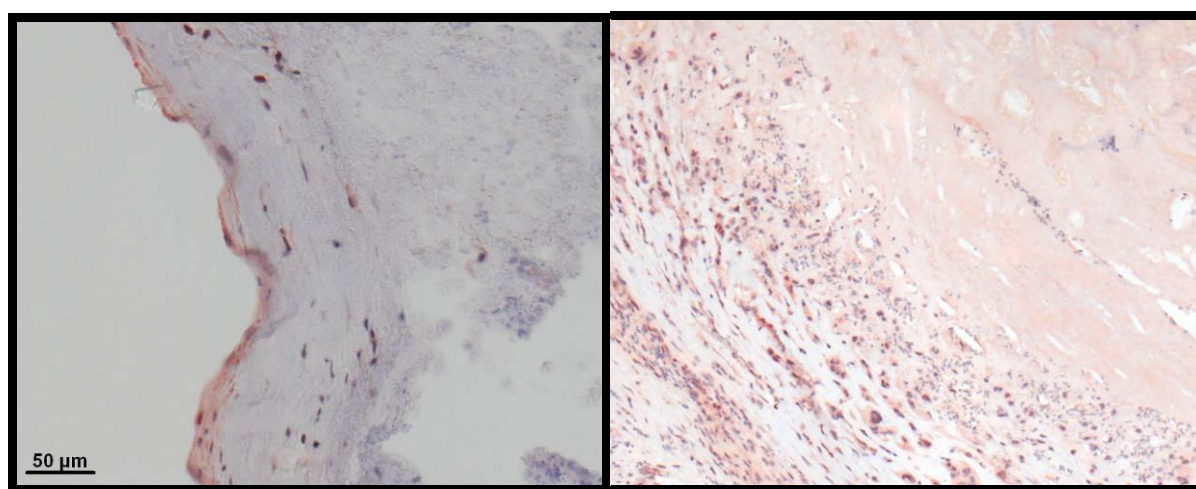
Stupanj stenozе određen je slikovnim metodama (CDFI, DSA, CEMRA, CTA). Vidi se značajno veća učestalost 95-99%-tne stenozе kod skupine *simptomatski* ($p=0,027$). Morfološke karakteristike plaka određene su ultrazvukom. Vidi se značajno veća učestalost *mekih* hipohogenih plakova (koji upućuju na *vulnerabilni* plak) kod skupine *simptomatski*. Plakovi se nisu razlikovali prema histološkom tipu.



Grafikon 4.2-3. Histološka analiza plakova kod skupine *simptomatski* i *asimptomatski*. Kod skupine *simptomatski* bilo je 50% ulceriranih-komplikiranih (UC) plakova, dok je kod skupine *asimptomatski* takvih plakova bilo 28,6%. Razlika nije bila statistički značajna ($p=0,213$).

4.2.1.3. Imunohistokemija za endotelnu lipazu

Prema intenzitetu imunoflorescentnog bojenja plakovi su semikvantitativno podijeljeni na tip A (slabiji intenzitet bojenja - do 25% stanica) i tip B (jači intenzitet bojenja – više od 25% stanica), Slika 4.2-1.

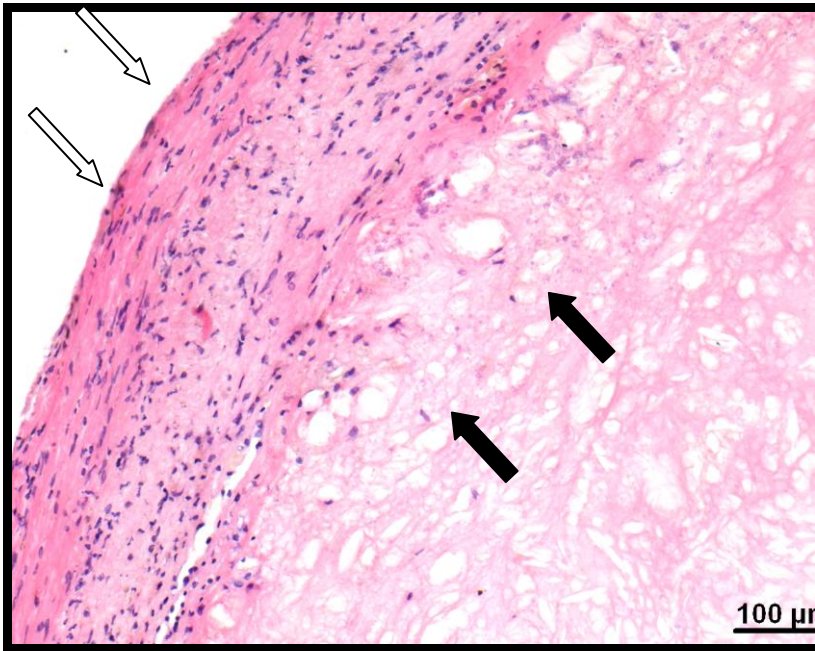


A

B

Slika 4.2-1. Imunohistokemija za endotelnu lipazu (primjeri tipa A i B). Na slici A vidljiv tipičan plak tip A (s manje od 25 % obojenih stanica). Na slici B je tipičan plak tip B s više od 25% obojenih stanica.

Od 66 plakova 31 je bilo tip A, dok je 35 bilo tip B. U skupini *simptomatski* 17 uzoraka (70,8%) bili su tip B, dok je kod skupine *asimptomatski* 18 uzoraka (42,9%) bilo tip B što je statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,028$). Statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,038$) zadržala se i nakon što su bolesnici regrupirani u tri skupine: *bez simptoma* (bolesnici koji nikad nisu imali simptome), *svježi simptomi* i *stari simptomi*, Tablica 4.2-4. i Grafikon 4.2-4. Učestalost plakova tip B u skupini *stari simptomi* bila je veća u odnosu na potpuno asimptomatske bolesnike, ali manja nego u skupini *svježi simptomi*.



Slika 4.2-2. Histologija - fibrozni plak (Hemalaun-Eozin). Vidi se fibrozna kapa (*prazne* strelice) glatke površine i bez ulceracija, te nekrotična srž (*pune* strelice). Između fibrozne kape i nekrotične srži imao relativno malo upalnih stanica (limfocita, makrofaga). Nema krvarenja unutar plaka kao niti tromboze na površini.

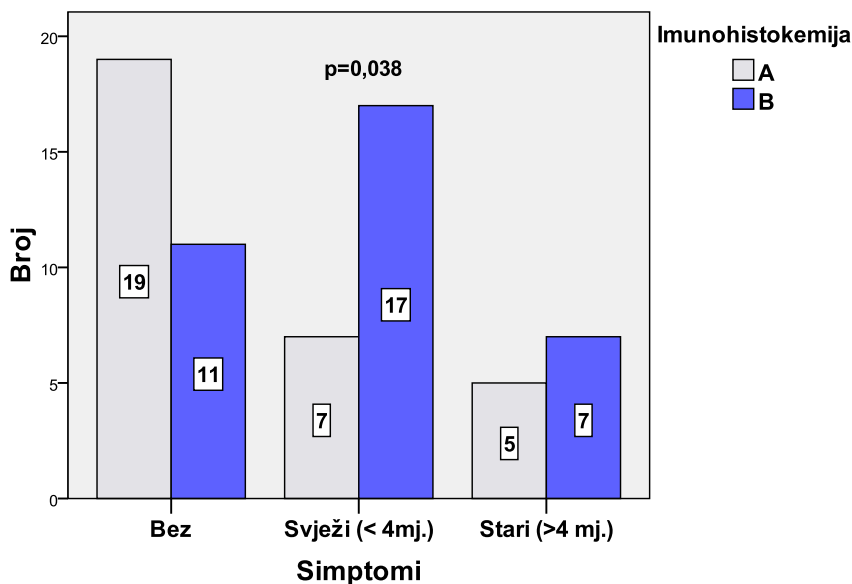


Slika 4.2-3. Histologija – ulcerirani komplicirani plak. Na površini se nalazi ulcerirana (rupturirana), relativno tanka fibrozna kapa (*prazna* strelica). Između nekrotične srži (*puna* strelica) i fibrozne kape vidljivi su upalni infiltrati te eritrociti odnosno krvarenje unutar plaka (*zvezda*).

Tablica 4.2-4. Imunohistokemija za endotelnu lipazu u ovisnosti o simptomima

Simptomi	n	Tip A (n=31)	Tip B (n=35)	test	P
Simptomi					
<i>Asimptomatski (bez simptoma + stari simptomi)</i>	42	24 (57,1)	18 (42,9)	χ^2 test	0,028
<i>Simptomatski (svježi simptomi)</i>	24	7 (29,2)	17 (70,8)		
Simptomi (preraspodjela)					
<i>Bez simptoma</i>	30	19 (63,3)	11 (36,7)	χ^2 test	0,038
<i>Stari simptomi</i>	12	5 (41,7)	7 (58,3)		
<i>Svježi simptomi</i>	24	7 (29,2)	17 (70,8)		

Kod skupine *simptomatski* zabilježen je značajno veći broj bolesnika s jačom (tip B) reakcijom za EL ($p=0,028$). Nakon preraspodjele u skupine *bez simptoma*, *stari simptomi* (bolesnici koji su imali simptome izvan perioda o 4 mjeseca i/ili bez lokalizacijske povezanosti s karotidnim plakom) te *svježi simptomi* (kao skupina *simptomatski*) razlika u ekspresiji EL i dalje je bila signifikantna ($p=0,038$): najizraženija kod skupine *svježi simptomi*, a najmanje izražena kod skupine *bez simptoma*.



Grafikon 4.2-4. Ekspresija endotelne lipaze u ovisnosti o simptomima. Svijetli stupci predstavljaju slabiju (tip A), a tamniji stupci jaču (tip B) imunohistokemijsku reakciju. Statistički značajno je veća učestalost tip B plakova kod skupine *svježi simptomi*.

4.2.2. Podjela na skupine prema histološkim kriterijima

4.2.2.1. Kliničke karakteristike i terapija bolesnika grupiranih prema histološkim kriterijima

Bolesnici su, obzirom na histološki izgled plaka, podijeljeni na tri skupine: fibrozni (30 bolesnika), ulcerirani-nekomplicirani (12 bolesnika) te ulcerirani-komplicirani (24 bolesnika). Skupine se nisu značajno razlikovale prema dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, opsegu struka, prisutnosti koronarne i periferne vaskularne bolesti, Tablica 4.2-5. Također nije bilo razlike niti u laboratorijskim pokazateljima, Tablica 4.2-6, osim što je sedimentacija eritrocita brža kod bolesnika s ulceriranim (kompliciranim i nekompliciranim) plakovima (fibrozni 15 ± 7 mm/h, ulcerirani-nekomplicirani 21 ± 11 mm/h, ulcerirani komplicirani 22 ± 10 mm/h; Kruskal Wallis, $p=0,017$).

Bolesnici s ulceriranim kompliciranim i nekompliciranim plakovima imali su češće arterijsku hipertenziju (χ^2 , $p=0,014$) i dijabetes melitus/intoleranciju glukoze (χ^2 , $p=0,040$), dok nije bila zabilježena razlika u učestalosti hiperlipoproteinemije, pušenja i obiteljske sklonosti ubrzane ateroskleroze.

Skupine se nisu razlikovale u učestalosti primjene acetyl-salicilne kiseline, ACE inhibitora, ARB i beta-blokatora. Međutim, u bolesnika s fibroznim plakovima, značajno veći postotak je koristio statine; 83,3% (25 od 30 bolesnika) u usporedbi s 58,3% (7 od 12 bolesnika) bolesnika s ulceriranim-nekompliciranim i 54,2% (13 od 24 bolesnika) s ulceriranim-kompliciranim plakovima (χ^2 , $p=0,047$).

Nije zabilježena razlika među skupinama u ultrazvučnim pokazateljima - stupnju stenozе karotidne arterije kao i prema nalazu hipoehogenih zona (*meki* i *mješoviti* plakovi) koji ukazuju na instabilitet plaka.

Tablica 4.2-5. Kliničke karakteristike bolesnika i terapija nakon podjele plakova prema nalazu histologije (histološka podjela) na fibrozne (F), ulcerirane nekomplikirane (UNC) i ulcerirane-komplikirane plakove (UC)

Kliničke karakteristike i terapija	Fibrozni (n=30) (SV±SD)	Ulcerirani-nekomplikirani (n=12) (min/med/maks)	Ulcerirani-komplikirani (n=24)	Test	p
Dob (godine starosti)	66,10 ± 8,1 (50/68/82)	65,8 ± 9,8 (43/65/83)	68,5 ± 8,9 (50/84/65,5)	Kruskal-Wallis	0,54
BMI (kg/m ²)	26,7 ± 2,8 (22,2/26,4/33,7)	26,8 ± 3,5 (21,3/26,3/32,2)	28,2 ± 3,0 (22,9/35,1/27,7)	Kruskal-Wallis	0,19
Opseg struka (cm)	91,7 ± 7,8 (78/91,5/105)	93,1 ± 8,0 (80/93,5/104)	93,2 ± 8,2 (80/91,0/110)	Kruskal-Wallis	0,77
Broj (%) bolesnika					
Spol:					
Muški	18 (60,0)	10 (83,3)	15 (62,5)	χ^2	0,33
Ženski	12 (40,0)	2 (16,7)	9 (37,5)		
Kardiovaskularni rizični čimbenici:					
Arterijska hipertenzija	24 (80,0)	12 (100,0)	22 (91,7)	χ^2	0,014
Hiperlipoproteinemija	26 (86,7)	8 (66,7)	18 (75,0)	χ^2	0,305
Dijabetes melitus ili intolerancija glukoze	11 (36,7)	9 (75,0)	15 (62,5)	χ^2	0,040
Pušenje	12 (40,0)	8 (66,7)	10 (41,6)	χ^2	0,383
Obiteljska sklonost	9 (30,0)	2 (16,7)	2 (8,3)	χ^2	0,132
Periferna vaskularna bolest	11 (36,7)	9 (75,0)	10 (41,7)	χ^2	0,071
Koronarna bolest srca	7 (23,3)	2 (16,7)	4 (16,7)	χ^2	0,793
Lijekovi:					
Statini	25 (83,3)	7 (58,3)	13 (54,2)	χ^2	0,047
ACE inhibitori	14 (46,7)	7 (58,3)	12 (50,0)	χ^2	0,791
Blokatori angiotenzinskih receptora	6 (20,0)	1 (8,3)	2 (8,3)	χ^2	0,51
Blokatori kalcijevih kanala	15 (50)	6 (50,0)	8 (33,4)	χ^2	0,342
Acetil salicilna kiselina	20 (66,7)	6 (50,0)	18 (75,0)	χ^2	0,324
Stupanj stenoze karotidne arterije (%)					
70-85	12 (40,0)	5 (4,87)	5 (20,8)	χ^2	0,462
85-95	1 (3,3)	0	5 (20,8)		
95-99	17 (56,7)	7 (58,3)	14 (58,3)		
Meki ili mješoviti plak (slikovna metoda)	21 (70,0)	8 (66,7)	17 (70,8)	χ^2	0,962

*Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – najniža vrijednost, maks – najviša vrijednost, med – medijan, BMI–indeks tjelesne mase (eng. body mass index) ACE–angiotenzin II konvertirajući enzim (eng. angiotensin II-converting enzyme)

Kod ulceriranih plakova značajno je bila veća učestalost arterijske hipertenzije (p=0,014) i dijabetesa melitusa (p=0,04). Bolesnici s fibroznim plakovima češće su imali statine u terapiji (p=0,047).

Tablica 4.2-6. Laboratorijski pokazatelji nakon podjele plakova na temelju nalaza histologije (histološka podjela)

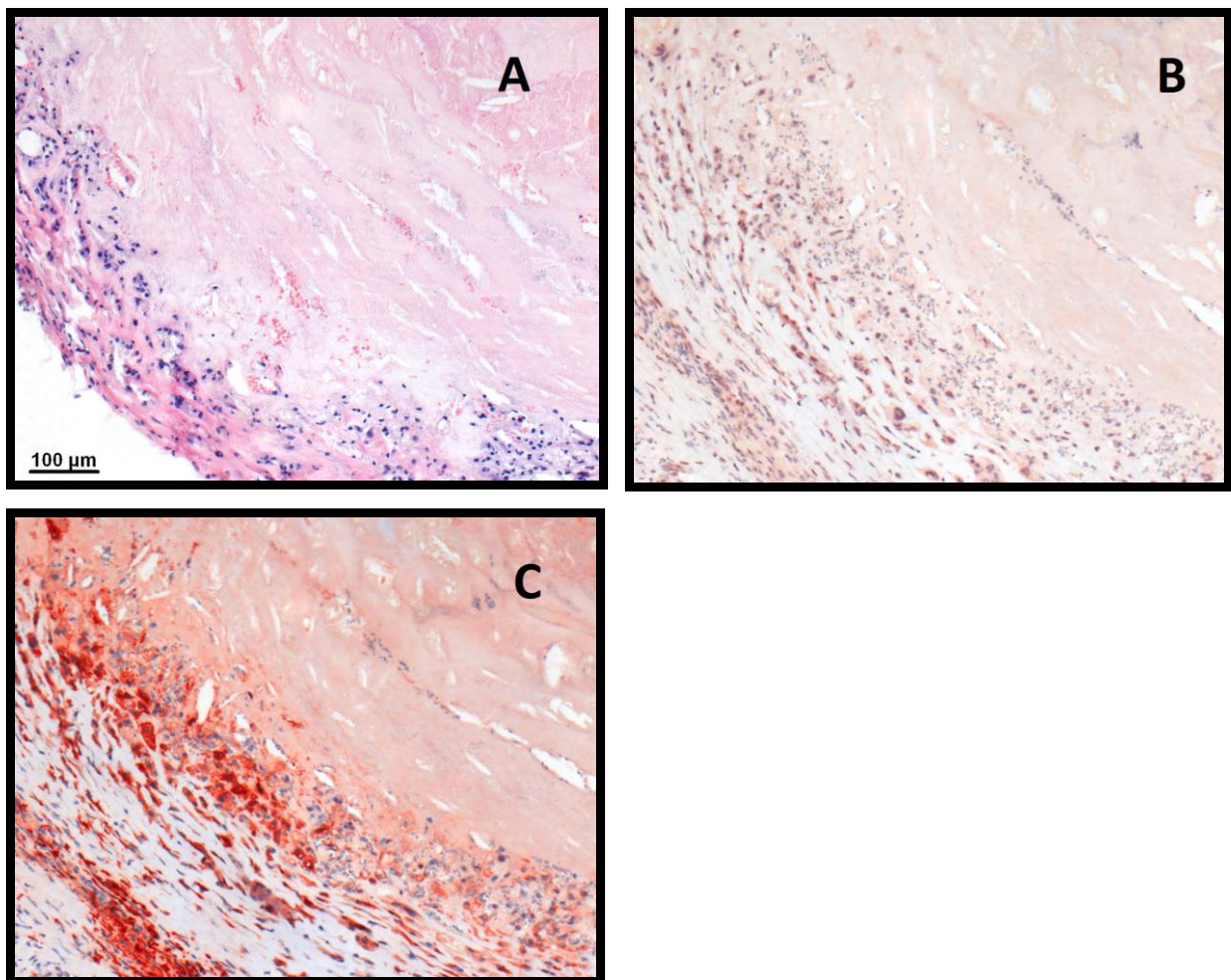
Parametri	Fibrozni (n=30) SV±SD (min/med/maks)	Ulcerirani-nekomplicirani (n=12)	Ulcerirani-komplicirani (n=24)	Kruskal-Wallis P
Trombociti (x10 ⁹ /L)	221 ±55 (136/210/391)	254 ±97 (105/242/450)	231 ±49 (163/223/353)	0,417
Hemoglobin (g/L)	141 ±11,2 (119/140/174)	135,0 ±17,7 (90/139/157)	137,9 ±10,8 (117/138/157)	0,744
Leukociti (x10 ⁹ /L)	7,9 ±2,1 (4,70/7,4/13,6)	8,1 ±1,8 (5,5/7,8/11,8)	7,7 ±2,5 (3,4/7,4/16,1)	0,799
fibrinogen (g/L)	4.2 ±0.9 (2,4/4,3/6,1)	4.8 ±1.3 (3,7/4,3/7,8)	4.4 ±0,7 (2,9/4,3/6,2)	0,618
APTV (sec)	26,1 ±2,7 (21/26/34)	24,3 ±3,3 (21/25/35)	25,8 ±2,5 (20/26/30)	0,892
PV (%)	105,9 ±8,1 (89/104/126)	105,1 ±16,1 (65/107/124)	101,1 ±10,3 (84/98/119)	0,118
SE (mm/h)	15 ±7 (2/18/25)	21 ±11 (6/20/45)	22 ±10 (5/21/47)	0,017
hs-CRP (µg/mL)	2.6 ±4,0 (0,2/1,48/21,8)	5,59 ±6,8 (0,1/1,87/23,0)	3,4 ±6,3 (0,3/1,48/31,5)	0,414
kreatinin (µmol/L)	92 ±16 (63/93/127)	102 ±28 (76/93/152)	96 ±22 (63/95/166)	0,738
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,1 ±1,4 (3,0/4,8/8,3)	5,7 ±2,0 (3,20/5,2/8,9)	5,5 ±1,2 (3,6/5,4/7,9)	0,414
LDL (mmol/L)	3,1 ±1,2 (1,6/2,5/6,1)	3,5 ±1,8 (1,2/3,1/7,10)	3,4 ±1,1 (1,1/3,2/5,2)	0,524
HDL (mmol/L)	1,3 ±0,3 (0,8/1,2/2,2)	1,2 ±0,2 (0,9/1,2/1,6)	1,4 ±0,5 (0,9/1,3/2,9)	0,441
Trigliceridi (mmol/L)	1,7 ±0,7 (0,8/1,5/3,4)	1,9 ±0,7 (1,1/1,9/3,4)	1,9 ±0,9 (0,9/1,6/4,9)	0,419
IL-6 (pg/ml)	1,8 ±2,1 (0,0/1,4/8,2)	6,6 ±12,3 (0,0/2,1/43,2)	2,6 ±4,2 (0,0/1,6/15,8)	0,401

*Kratice: SV – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – najniža vrijednost, maks – najviša vrijednost, med – medijan; APTV – aktivno parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PV–protrombinsko vrijeme; SE–sedimentacija eritrocita u prvom satu; hs-CRP–visoko senzitivni C-reaktivni protein (eng. high sensitivity C-reactive protein); LDL–lipoprotein niske gustoće (eng. low density lipoprotein); HDL–lipoprotein visoke gustoće (eng. high density lipoprotein); IL-6–interleukin-6

4.2.2.2. Imunohistokemija za endotelnu lipazu

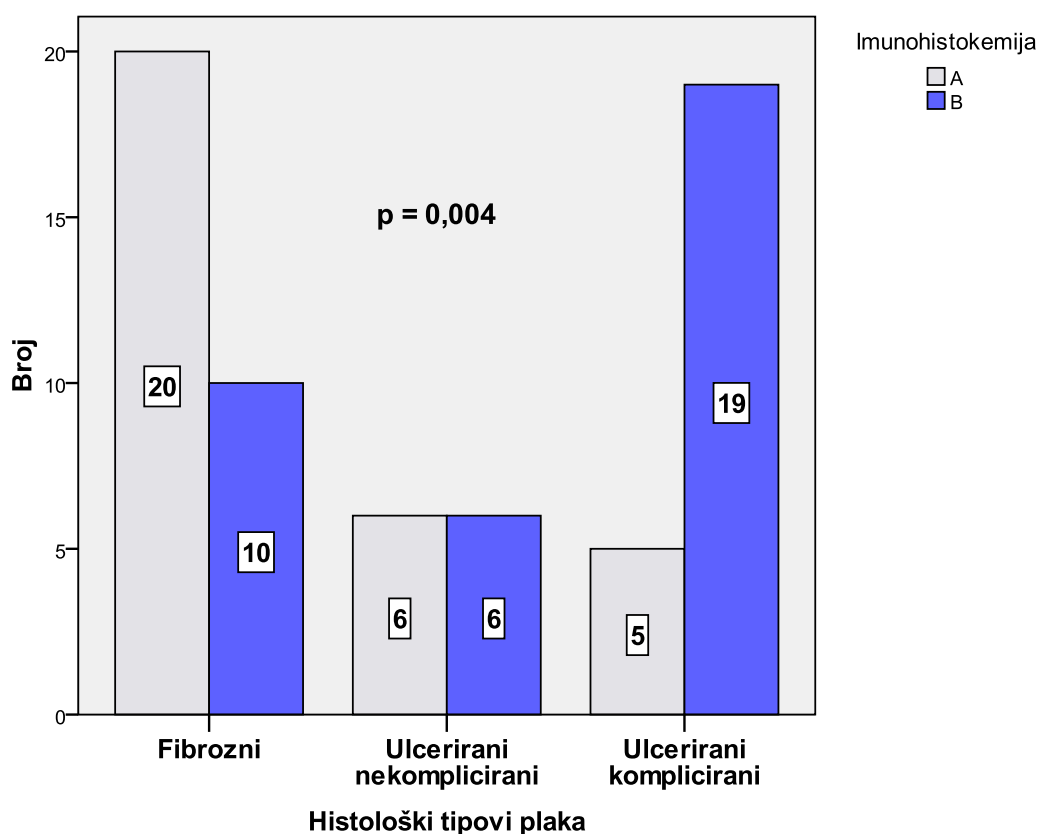
U tipičnom F plaku nekrotična srž prekrivena je fibrinskom kapom s očuvanim endotelom i s malo upalnih stanica. U tipičnom UC plaku nekrotična srž prekrivena je upalnim infiltratom koji sadrži limfocite, makrofage, siderofage i eritrocite koji upućuju na krvarenje unutar plaka i oznaka su UC plaka. U F plaku, slabo (tip A) imunobojanje uočeno je u endotelnom

sloju i u stanicama unutar fibrozne kape. Fibrozna kapa također ima umjereno CD163 imunobojanje što ukazuje na prisustvo monocita i makrofaga. U usporedbi s F plakovima, EL je bilo značajno izraženije (tip B) kod UC plakova i to na mjestu staničnih upalnih infiltrata u području između nekrotične srži i fibrozne kape plaka koji pokazuju snažno CD163 imunobojanje odnosno gdje se dominantno nalaze makrofazi, Slika 4.2-4.



Slika 4.2-4. Lokalizacija endotelne lipaze u karotidnom plak. Na slici A je ulcerirani plak bojen Hemalaun-Eozinom. Na slici B vidi se imunohistokemija na EL osobito u području između fibrozne kape i nekrotične srži. Imunohistokemijom na CD163 potvrđeno da je EL najizraženija na mjestu gdje se nalaze i makrofazi.

U skupini bolesnika s F plakovima bilo je 10 plakova (33,3%) s jačim intenzitetom bojanja (tip B) što je bilo značajno manje u odnosu na skupinu s UNC plakovima gdje je 6 plakova (50%) bilo tip B, dok je u skupini bolesnika s UC plakovima tip B imalo 19 bolesnika (79,2%). Razlika je statistički značajna (χ^2 , $p=0,004$), Grafikon 4.2-5.

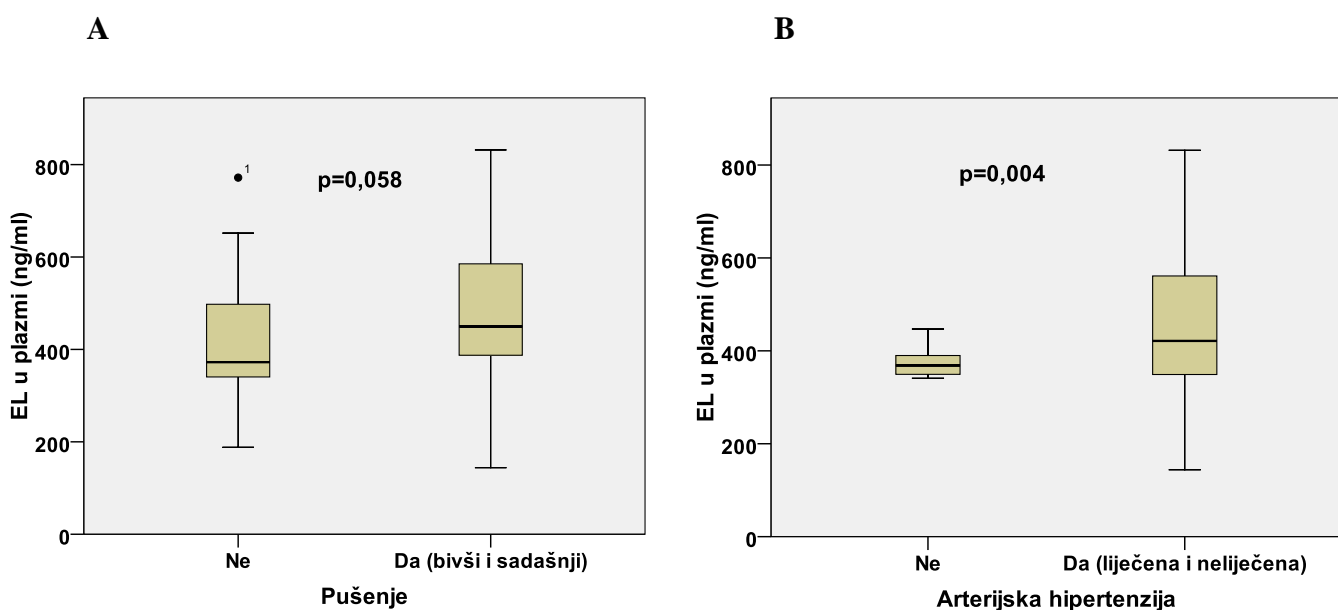


Grafikon 4.2-5. Imunohistokemija u ovisnosti o histološkom tipu plaka. Svjetliji stupci prikazuju slabiju (tip A), a tamniji stupci jaču (tip B) imunoreakciju za endotelnu lipazu. Kod ulceriranih-komplikiranih plakova bila je značajno veća učestalost tip B reakcije, a kod fibrozni plakova veća učestalost tip A reakcije, $p=0,004$.

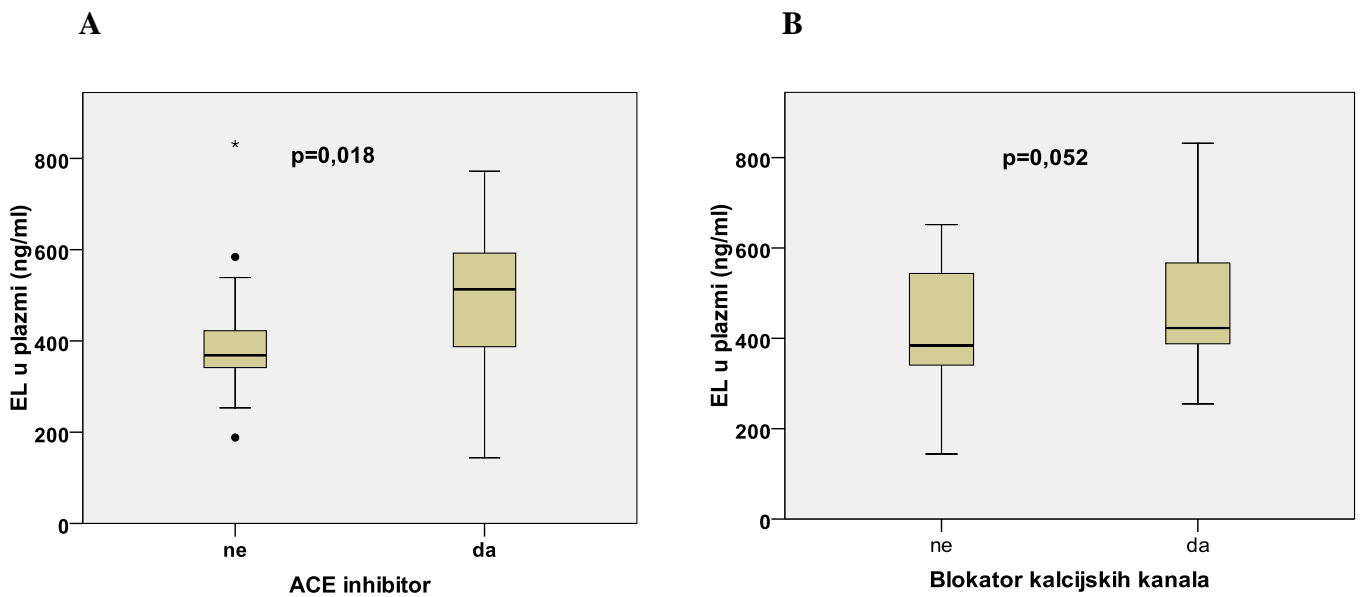
4.3. Endotelna lipaza u plazmi

4.3.1. Povezanost endotelne lipaze u plazmi s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima i terapijom

EL u plazmi određena je za 55 bolesnika. EL u plazmi nije se razlikovala u ovisnosti o dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, opsegu struka kao i prisutnosti tri ili više metabolička čimbenika, Tablica 4.3-1. Bila je značajno povišena u bolesnika s arterijskom hipertenzijom ($459,4 \pm 157,7$ ng/mL) u usporedbi s bolesnicima koji ju nisu imali ($376,4 \pm 38,1$ ng/mL; T-test; $p=0,004$). Bivši i sadašnji pušači također su imali povišenu razinu EL ($485,3 \pm 156,5$ ng/mL) u usporedbi s nepušačima ($409,6 \pm 132,8$ ng/mL), a razlika je gotovo dosegla statističku značajnost (T-test, $p=0,058$). Nije bila zabilježena ovisnost o terapiji statinom odnosno acetyl-salicilnom kiselinom, ali je nađena značajno veća razina kod bolesnika koji su koristili ACE inhibitore ($487,1 \pm 157,6$ ng/mL) u usporedbi s onima ih nisu koristili ($395,35 \pm 120,7$ ng/mL; T test, $p=0,018$). Bolesnici koji su koristili kalcijске blokatore također su imali višu razinu EL u plazmi ($491,0 \pm 158,5$ ng/mL vs. $412,6 \pm 133,2$ ng/mL), a razlika je bila na granici statističke značajnosti (T-test, $p=0,052$), Tablica 4.3-1. i Grafikon 4.3-2.



Grafikon 4.3-1. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s pušenjem (A) i arterijskom hipertenzijom (B)



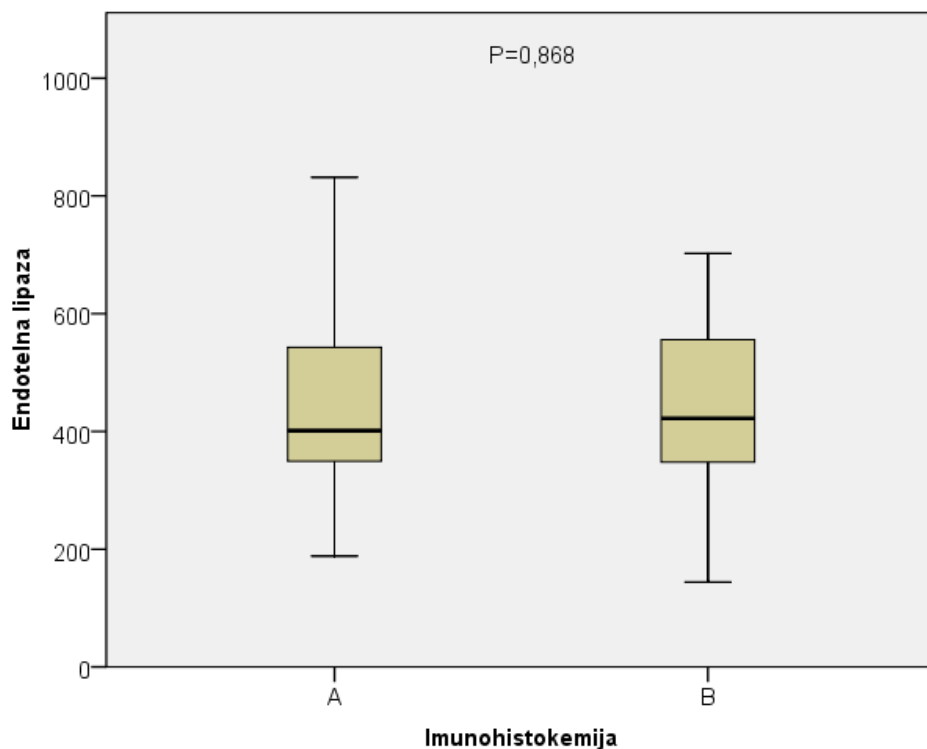
Grafikon 4.3-2. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s primjenom ACE inhibitora (A) i blokatora kalcijских kanala (B)

Tablica 4.3-1. Povezanost kliničkih karakteristika i vrijednosti endotelne lipaze u plazmi

Pokazatelj		Broj	EL (ng/mL) (SV \pm SD)	p
Spol	Muški	35	425,9 \pm 140,8	0,19
	Ženski	24	479,5 \pm 158,1	
Povećan opseg struka	Ne	30	417,8 \pm 142,6	0,13
	Da	25	478,6 \pm 150,74	
Tri ili više faktora metaboličkog sindroma	Ne	25	428,6 \pm 151,0	0,44
	Da	30	459,4 \pm 146,8	
Faktori rizika				
Arterijska hipertenzija	Ne	7	376,4 \pm 38,1	0,004
	Da	46	459,4 \pm 157,7	
Hiperlipoproteinemija	Ne	10	411,3 \pm 116,6	0,42
	Da	45	453,0 \pm 154,41	
Dijabetes melitus/intolerancija glukoze	Ne	27	454,4 \pm 174,6	0,66
	Da	28	436,7 \pm 119,9	
Pušenje	Ne		409,6 \pm 132,8	0,058
	Da		485,3 \pm 156,5	
Obiteljska sklonost	Ne	44	448,4 \pm 129,8	0,77
	Da	11	433,5 \pm 214,3	
Lijekovi				
Statini	Ne	17	437,2 \pm 133,6	0,78
	Da	38	449,1 \pm 155,8	
ACE inhibitori	Ne	25	395,35 \pm 120,7	0,018
	Da	30	487,1 \pm 157,6	
Blokatori Ca kanala	Ne	32	412,6 \pm 133,2	0,052
	Da	23	491,0 \pm 158,5	
Acetil-salicilna kiselina	Ne	19	413,4 \pm 99,1	0,18
	Da	36	462,3 \pm 167,2	

Razine EL u plazmi bila je viša kod bolesnika s arterijskom hipertenzijom ($p=0,004$), pušača ($p=0,052$) i kod bolesnika koji su liječeni blokatorima kalcijских kanala i ACE inhibitorima.

Između plakova s tip A i tip B imunohistokemijom za EL nije nađena statistički značajna razlika u razini EL u plazmi (tip A $448,75 \pm 159,9$ ng/mL vs tip B $442,0 \pm 137,9$ ng/mL, T-test, $p=0,868$), Grafikon 4.3-3.



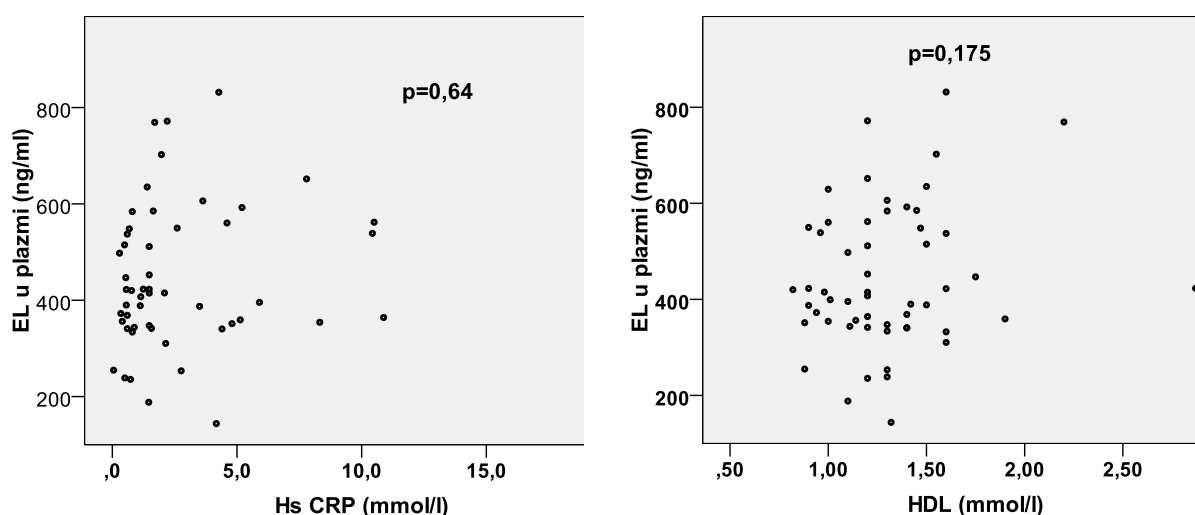
Grafikon 4.3-3. Povezanost između plazmatske razine endotelne lipaze (ng/mL) i jačine imunohistokemijske reakcija za endotelnu lipazu u plaku. Bolesnici s tip A plakom (bojenje ispod 25% stanica) imali su prosječnu razinu EL u plazmi 448,75 ng/mL (prvi stupac), dok su bolesnici s tip B plakom imali prosječnu razinu EL u plazmi 442,01 ng/mL (drugi stupac). Razlika nije statistički značajna (T-test, $p=0,868$).

Korelacijskim testom nije nađena signifikantna povezanost EL u plazmi sa sedimentacijom eritrocita ($p=0,598$), fibrinogenom ($p=0,310$), leukocitima u krvi ($p=0,397$), hsCRP-om ($p=0,647$) i IL-6 ($p=0,325$), Tablica 4.3-2, Grafikon 4.3-4. Također nije nađena statistički značajna korelacija između EL u plazmi s HDL-om ($p=0,175$), LDL-om ($p=0,687$) i ukupnim kolesterolom ($p=0,794$).

Tablica 4.3-2. Korelacija plazmatske razine endotelne lipaze i kliničkih i laboratorijskih pokazatelja

Pokazatelj	Pearson koeficijent	P
Dob	- 0,38	0,784
BMI*	0,056	0,684
Opseg struka	0,008	0,955
Hemoglobin	- 0,009	0,947
Trombociti	- 0,125	0,363
Leukociti	0,116	0,397
fibrinogen	0,139	0,310
APTV*	- 0,026	0,850
PV*	0,205	0,133
SE*	0,073	0,598
hs-CRP*	0,063	0,647
Kreatinin	- 0,095	0,492
Ukupni kolesterol	0,036	0,794
LDL*	0,056	0,687
HDL*	0,186	0,175
Trigliceridi	- 0,014	0,919
IL-6*	0,135	0,325

*Kratice: BMI – indeks tjelesne mase (eng. body mass index); APTV – aktivno parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PV – protrombinsko vrijeme; SE – sedimentacija eritrocita u prvom satu; hs-CRP – visokosenzitivni C-reaktivni protein (eng. high sensitivity C-reactive protein); LDL – lipoprotein niske gustoće (eng. low density lipoprotein); HDL – lipoprotein visoke gustoće (eng. high density lipoprotein); IL-6–interleukin-6.



Grafikon 4.3-4. Korelacija plazmatske razine endotelne lipaze i hsCRP-a (A) i HDL-a (B) u serumu bolesnika

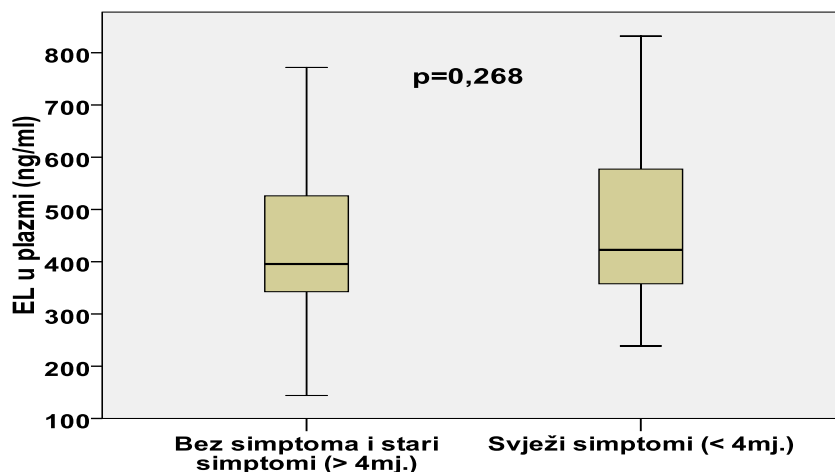
4.3.2. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s histološkim tipom plaka i simptomima

Analizom razine EL u plazmi u ovisnosti o histološkoj podjeli plaka nije nađena značajna razlika između fibroznih, ulceriranih – nekompliciranih i ulceriranih kompliciranih plakova (ANOVA, $p=0,341$). Kod svrstavanja bolesnika u skupine kakvo je inicijalno upotrebljeno kod analize EL u plaku, a to su skupina *asimptomatski* i *simptomatski* (bolesnici sa simptomima unutar 4 mjeseca koji se lokalizacijski mogu povezati s ciljnom karotidnom arterijom), nije nađena signifikantna razlika u razini EL u plazmi (T test, $p=0,268$), Grafikon 4.3-5. Bolesnici su zatim bili pregrupirani u tri skupine: 1) *bez simptoma* (asimptomatski bolesnici), 2) *stari simptomi* (bolesnici koji su imali simptome izvan perioda od 4 mjeseca i/ili bez lokalizacijske povezanosti s karotidnim plakom i 3) *svježi simptomi* (bolesnici koji su imali simptome unutar 4 mjeseca koji su lokalizacijski odgovarali karotidnom plaku). Nađena je statistički značajna razlika u plazmatskoj razini EL između skupina *bez simptoma* i *svježi simptomi* (T test, $p=0,048$) te skupina *bez simptoma* i *stari simptomi* (T test, $p=0,015$). Pri usporedbi skupina *bez simptoma* s bolesnicima koji su imali simptome (skupine *svježi simptomi* i *stari simptomi* zajedno), nađena je značajna razlika u plazmatskoj razini EL (T test, $p=0,011$). Kod usporedbe skupina *svježi simptomi* i *stari simptomi* nije nađena značajna razlika u plazmatskoj razini EL (T test, $p=0,459$), Tablica 4.3-3. i Grafikon 4.3-6.

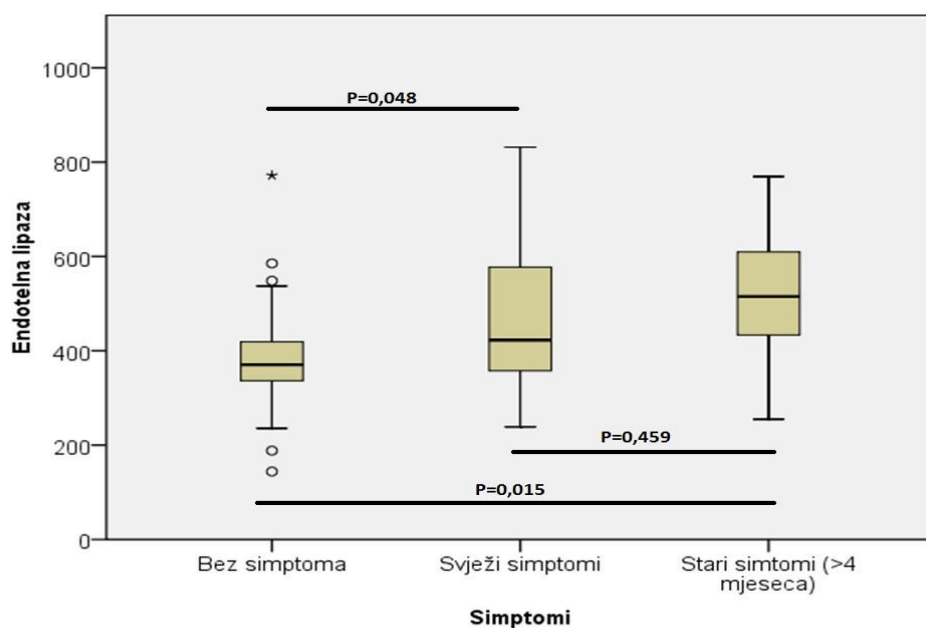
Tablica 4.3-3. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s histološkim tipom plaka i simptomima

Pokazatelj	Skupine	Broj	SV±SD	Test p
Histološki tipovi plaka	Fibrozni	25	477,6±177,0	ANOVA
	Ulcerirani- nekomplikirani	10	419,4±105,1	0,34
	Ulcerirani- komplicirani	20	418,2±122,7	
Simptomi	<i>Bez simptoma</i>	24	388,39±133,6	T-test
	<i>Svježi simptomi</i>	20	474,9±147,5	0,048
	<i>Bez simptoma</i>	24	388,39±133,6	T-test
	<i>Stari simptomi</i>	11	516,26±145,3	0,015
	<i>Svježi simptomi</i>	20	474,9±147,5	T-test
	<i>Stari simptomi</i>	11	516,26±145,3	0,459
	<i>Bez simptoma</i>	24	388,39±133,6	T-test
	<i>Svježi simptomi i stari simptomi</i>	31	489,6±145,7	0,011
	<i>Bez simptoma i stari simptomi</i>	35	428,6±143,0	0,268
	<i>Svježi simptomi</i>	20	474,9±147,5	(T-test)

U skupinu *bez simptoma* svrstani su bolesnici koji su asimptomatski, u skupinu *stari simptomi* oni koji su imali simptome izvan perioda o 4 mjeseca i/ili bez lokalizacijske povezanosti s karotidnim plakom, dok su u skupinu *svježi simptomi* svrstani bolesnici koji su imali simptome unutar perioda od 4 mjeseca koji odgovaraju ciljnoj karotidnoj arteriji. Nađena je značajno viša plazmatska razina EL u skupinama *svježi simptomi* i *stari simptomi* u usporedbi sa skupinom *bez simptoma* ($p=0,011$). Nije nađena statistički značajna razlika u plazmatskoj razini EL između skupina *svježi simptomi* i *stari simptomi* ($p=0,459$) kao niti među skupinama bolesnika s različitim histološkim tipom plaka ($p=0,341$).



Grafikon 4.3-5. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze sa simptomima prema kriterijima kakvi su korišteni kod analize plakova. Nije nađeno statistički značajne razlike između skupina *asimptomatski* (bez simptoma i stari simptomi zajedno) i *simptomatski* (svježi simptomi), $p=0,268$.



Grafikon 4.3-6. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze sa simptomima nakon pregrupiranja bolesnika u skupine *bez simptoma*, *svježi simptomi* i *stari simptomi*. Nađena je značajno niža razina plazmatske razine EL kod skupine *bez simptoma* ($388,39 \pm 133,6$ ng/mL) u usporedbi sa skupinama *svježi simptomi* ($474,9 \pm 147,5$ ng/mL, $p=0,048$) i *stari simptomi* ($516,26 \pm 145,3$ ng/mL, $p=0,015$). Nije bilo statistički značajne razlike između skupina *svježi simptomi* i *stari simptomi* ($p=0,459$)

5. RASPRAVA

5.1. Kliničke karakteristike bolesnika

5.1.1. Dob, spol i čimbenici rizika za aterosklerozu

Prosječna dob ispitivanih bolesnika ($66,9 \pm 8,7$ godina) kao i odnos spolova (muški:ženski = 65,2:34,8%) slična je prosječnoj dobi i odnosu spolova bolesnika uključenih u NASCET studiju (prosječna dob 65 godina, muški:ženski = 69:31%).⁴⁰ Bolesnici uključeni u našu studiju u većem su postotku imali arterijsku hipertenziju (87,9% vs. 61%) koja je dokazano najznačajniji čimbenik rizika za aterosklerotsku bolest karotidnih arterija.⁵⁴ Tako visoki postotak hipertoničara u našoj studiji nije iznenađujući. U studiji Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP) arterijski je tlak bio najznačajniji predskazatelj stenozne karotidne arterije¹⁹¹ što je u skladu s epidemiološkom Framinghamskom studijom koja je također pokazale povezanost između arterijske hipertenzije i ateroskleroze karotidnih arterija.¹⁹² U toj studiji nađen je dva puta veći rizik za stenozu karotidne arterije za svako povećanje tlaka za 20 mmHg. U studiji Rodgersa i suradnika dokazana je linearna veza između arterijske hipertenzije i učestalosti CVI-a.¹⁹³ U metaanalizi objavljenoj u časopisu Lancet 1990. godine pokazano je da za svaki porast sistoličkog tlaka od 10 mmHg rizik za CVI raste za 30-45%.¹⁹⁴ U ovom istraživanju bolesnici su također imali veću učestalost hiperlipoproteinemije u usporedbi s NASCET studijom (78,8 vs. 37,0%) što je najvećim dijelom rezultat strožih kriterija za definiciju hiperlipoproteinemije. Do sada nije nađena tako čvrsta povezanost između hiperlipoproteinemije s CVI-om kao što je dokazano za koronarnu bolest srca.¹⁹⁵ U metaanalizi 45 prospektivnih studija (450,000 osoba) nije nađena veza između hiperkolesterolemije i CVI-a.⁵⁵ S druge strane, u Women's Health Study (WHS), gdje je uključeno 27,937 žena starijih od 45 godina, dokazano je da je LDL-kolesterol snažan rizični čimbenik za CVI.¹⁹⁶ U najvećoj metaanalizi (61 studija, uključeno 900,000 ljudi u dobi od 40 do 59 godina) ukupni kolesterol je utvrđen kao rizični čimbenik za CVI, ali ne kao neovisan već povezan s arterijskom hipertenzijom.¹⁹⁷ Kod bolesnika sa stenozom karotidne arterije atorvastatin je doveo do 33%-tnog smanjenja učestalosti CVI-a i 56%-tnog smanjenja potrebe

za karotidnom revaskularizacijom.⁵⁷ U Heart Protection Study (HPS) dokazano je da statini zaustavljaju progresiju te čak dovode i do regresije karotidne ateroskleroze.⁵⁸ Obzirom na relativno slabu i dvojbenu povezanost između hiperlipoproteinemije i karotidne bolesti te snažnog učinka statina na smanjenje učestalosti CVI-a i smanjenje plaka kod bolesnika s aterosklerotskom bolešću karotidnih arterija, može se zaključiti da nije važan samo učinak statina na kolesterol već su važni i njihovi pleiotropni učinci.

Šećernu bolest imalo je u ovoj studiji ukupno 20 bolesnika (18 bolesnika tip II, 2 bolesnika tip I) odnosno 30% što je nešto veća učestalost nego u NASCET studiji (23%), dok je intoleranciju glukoze imalo 15 bolesnika (22,7%). U tih je bolesnika nađena značajno manja razina HDL-a ($1,21 \pm 0,25$ vs. $1,43 \pm 0,46$ mmol/L, t test, $p=0,026$) što je u skladu s dosadašnjim saznanjima o povezanosti dijabetesa i aterogene dislipidemije. Ti su bolesnici imali i značajno veću učestalost metaboličkog sindroma (77,1%). U više studija jest dokazana povezanost šećerne bolesti i zadebljanja intime karotidne arterije kao i progresije karotidne bolesti.^{198, 199}

Međutim, sama stroga kontrola glikemije nije dovoljna za smanjenje cerebrovaskularnog rizika što je velikim dijelom povezano s istovremenom prisutnošću drugih čimbenika rizika, aterogenom dislipidemijom i metaboličkim sindromom. U studiji United Kingdom Transient Ischemic Attack (UK-TIA) dokazano je da je liječenje arterijske hipertenzije u dijabetičara važnije nego kontrola glikemije.²⁰⁰ Kod bolesnika s tip II šećernom bolešću, koji su imali normalnu koncentraciju LDL-a, 10 miligrama atorvastatina dnevno povezana je sa smanjenjem kardiovaskularnog rizika za 37% i rizika za CVI za 48%.⁶⁰

Pušača je u našoj studiji bilo 30 (45,5%) od kojih su 18 (27,3%) bili aktivni pušači cigareta. To otprilike odgovara postotku pušača u NASCET studiji (31%). Pušenje je dokazan značajan čimbenik rizika za stenozu karotidne arterije. U studiji Howarda i suradnika nađeno je da pušači imaju 50%, a bivši pušači 25% veću učestalost pogoršanja aterosklerotske bolesti karotidne arterije u odnosu na nepušače.²⁰¹ U Framinghamskoj studiji ekstrakranijalna aterosklerotska bolest karotidnih arterija korelirala je s ukupnim brojem popušanih cigareta.¹⁹² I u studiji Cardiovascular Health Study (CHS) jasno je utvrđena povezanost između pušenja i stupnja stenoze karotidne arterije.²⁰²

5.1.2. Terapija bolesnika

U studiji su 53 bolesnika (80%) liječena antihipertenzivnom terapijom za razliku od NASCET studije gdje je antihipertenzivnom terapijom liječeno 60% bolesnika. Najčešće korišteni antihipertenzivi u našoj studiji bili su ACE inhibitori i blokatori angiotenzin II receptora (ukupno 65,1%) te blokatori kacijskih kanala (43,9%). Liječenje arterijske hipertenzije pokazalo se korisno za smanjenje cerebrovaskularnog rizika. U metaanalizi od 40 studija (188,000 bolesnika) zabilježen je pad rizika za 33% za svako sniženje tlaka za 10 mmHg sve do vrijednosti 115/75 mmHg, bez obzira na vrstu antihipertenziva kojim su bolesnici liječeni.⁵³ Zaštitni učinak antihipertenzivne terapije prisutan je čak i kod bolesnika koji nemaju arterijsku hipertenziju kao što je dokazano u studiji Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) što su autori objasnili blokiranjem direktnog učinka angiotenzina II na vazokonstrikciju, proliferaciju glatkih mišićnih stanica i rupturu plaka.²⁰³

Iz tog razloga antihipertenzivna terapija preporučena je u smjernicama Američkog kardiološkog društva (American Heart Association – AHA) i Američkog društva za moždani udar (American Stroke Association – ASA) za sekundarnu prevenciju CVI-a kod bolesnika s već preboljenim CVI/TIA.²⁰⁴ Međutim, kod simptomatskih bolesnika sa značajnom aterosklerotskom stenozom karotidne arterije upitan je povoljan učinak antihipertenzivne terapije zbog poremećene cerebralne autoregulacije s posljedičnom redukcijom protoka i ishemijom mozga.²⁰⁵ U najnovijim AHA/ASA smjernicama za liječenje ekstrakranijalne karotidne i vertebralne bolesti kod asimptomatskih bolesnika preporuča se antihipertenzivna terapija da bi se održao tlak ispod 140/90 mmHg, dok su kod simptomatskih bolesnika preporuke manje određene. U tih bolesnika antihipertenzivna terapija je indicirana kod bolesnika s arterijskom hipertenzijom (osim u hiperakutnoj fazi CVI-a), ali nije jasna granica do koje bi trebalo, odnosno do koje bi se smjelo, spuštati krvni tlak obzirom na opasnost od moguće ishemije mozga.²⁰⁶

U našoj studiji statinima je liječeno 45 bolesnika (68,2%) što je značajno više nego u NASCET studiji (13%). Tako velika razlika prisutna je prvenstveno zbog toga što se NASCET studija provodila od 1987. do 1996. godine kada statini još nisu bili u raširenoj uporabi. Prosječni ukupni kolesterol neliječenih bolesnika bio je $6,1 \pm 1,33$ mmol/L, a LDL $3,9 \pm 1,3$ mmol/L što je značajno više nego što je preporučena ciljna razina LDL-a ($< 2,5$

mmol/L za asimptomatske i <2,0 mmol/L za simptomatske bolesnike) u AHA/ASA smjernicama za liječene aterosklerotske karotidne bolesti.²⁰⁶ Bolesnici koji su liječeni statinima imali su prosječni ukupni kolesterol $4,9 \pm 1,3$ mmol/L, a LDL $2,9 \pm 1,3$ mmol/L što je znatno bliže ciljnoj razini prema navedenim smjernicama.

Acetil-salicilnom kiselinom (ASK) liječeno je 44 bolesnika (66,7%) dok je od preostalih 22 bolesnika 10 bolesnika imalo neku od kontraindikacija za uzimanje ASK. Simptomatski bolesnici liječeni su s ASK u 79,2 % slučajeva, dok su asimptomatski bolesnici liječeni s ASK u 59,5% slučajeva. U navedenim aktualnim smjernicama za liječenje aterosklerotske bolesti karotidnih arterija preporuča se antiagregacijska terapija kod svih bolesnika²⁰⁶ bez obzira na simptome iako kod asimptomatskih bolesnika korist nije jasno dokazana.²⁰⁷ U našoj studiji nije bilo razlike u razini CRP-a ($5,2 \pm 2,5$ vs. $2,6 \pm 2,7$ $\mu\text{g/mL}$, t-test, $p=0,171$) i IL-6 ($3,4 \pm 2,8$ vs. $2,8 \pm 6,7$ pg/mL , t-test, $p=0,703$) među bolesnicima koji su liječeni u odnosu na one koje nisu liječeni s ASK što smo očekivali obzirom na protuupalni učinak ASK. Dosadašnje studije pokazale su dvojbene rezultate o utjecaju ASK na CRP. Kod bolesnika sa stabilnom anginom 300 mg aspirina dovodi do 29%-tne redukcije hsCRP-a.²⁰⁸ U studiji Woodwarda i suradnika dokazano je da 75 mg ASK dovodi do značajnog smanjenja CRP-a mjesec dana nakon infarkta miokarda.²⁰⁹ Za razliku od citiranih studija, utjecaj 100 mg ASK na razinu CRP-a u plazmi nije dokazan u studiji Joynta i suradnika.²¹⁰

5.2. Analiza plaka

5.2.1. Kliničke karakteristike simptomatskih i asimptomatskih bolesnika

Rezultati naše studije pokazali su da između simptomatskih i asimptomatskih bolesnika nema značajne razlike u kliničkim karakteristikama uključujući dob, spol, učestalost arterijske hipertenzije, hiperlipoproteinemije, šećerne bolesti i pušenja. U simptomatskih bolesnika zabilježena je veća učestalost bolesnika s povećanim opsegom struka prema kriterijima IDF za metabolički sindrom (62,5% simptomatskih bolesnika u odnosu na 38% asimptomatskih bolesnika; χ^2 test, $p=0,049$). BMI bio je viši kod simptomatskih bolesnika ($28,2 \pm 3,0$ vs. $26,8 \pm 3,0$ kg/m^2) ali bez statističke značajnosti (Mann Whitney U test, $p=0,085$). Također je kod simptomatskih bolesnika nađena veća učestalost bolesnika s metaboličkim sindromom (66,7% vs. 47,6%), ali bez statistički značajne razlike (χ^2 test, $p=0,113$). Prema ranijim radovima metabolički sindrom usko je povezan s aterosklerotskom bolešću karotidnih arterija. U radu Kawamota i suradnika nađena je povezanost aterosklerotske bolesti karotidnih arterija s brojem čimbenika metaboličkog sindroma.⁶⁷ Abdominalni oblik pretilosti neovisan je rizični čimbenik za CVI odnosno TIA-u. U radu Wintera i suradnika rizik za CVI/TIA bio je 4,25 puta veći kod bolesnika koji su imali opseg struka u gornjoj tercili u usporedbi s bolesnicima koji su imali opseg struka u donjoj tercili. BMI u toj studiji nije se pokazao kao neovisni prediktor cerebrovaskularnih događaja.⁶⁹ U populaciji zdravih žena u WHS studiji (39,053 učesnica) nađen je 1,72 puta veći rizik za ishemički CVI kod žena s BMI >30 kg/m^2 u usporedbi s onima koje su imale BMI <25 kg/m^2 . Slično je nađeno i za muškarce u studiji Physician's Health Study.⁵⁶ U kros-sekcijskoj studiji Maksimovića i suradnika u 657 bolesnika sa značajnom stenozom karotidne arterije 56% bolesnika imalo je metabolički sindrom. Ti bolesnici nisu se značajno razlikovali u kliničkim manifestacijama u usporedbi s bolesnicima bez metaboličkog sindroma.²¹¹ U više studija opseg struka se pokazao kao bolji prediktor kardiovaskularnih događaja od BMI. Primjeri takvih studija su studija INTERHEART²¹² te studija International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA) koja je uključila 168,000 bolesnika u dobi između 18 i 80 godina gdje je pokazano da povećanje opseg struka za 14 cm kod muškaraca i 14,9 cm kod žena povećava mogućnost kardiovaskularne bolesti za 21-40%.²¹³ Abdominalni oblik pretilosti povezan je s dislipidemijom i inzulinskom rezistencijom.²¹⁴ Masno tkivo, osim što je povezano s

inzulinskom rezistencijom, luči i različite upalne medijatore uključene u ateroskerozu i destabilizaciju plaka.²¹⁵ Aterosklerotski karotidni plakovi simptomatskih bolesnika imaju značajno više upalnih stanica nego plakovi asimptomatskih bolesnika.⁹¹ Međutim, u našoj studiji nije nađena razlika u razini upalnih medijatora (hsCRP, IL-6) u ovisnosti o prisutnosti metaboličkog sindroma i kliničkoj manifestaciji bolesti. Uzrok može biti što se radi o kros-sekcijskoj studiji gdje su lijekovi, ponajprije ASK i statini, mogli utjecati na razinu upalnih medijatora.

5.2.2. Morfološke karakteristike plaka i stupanj stenoze kod simptomatskih i asimptomatskih bolesnika

U ovoj studiji nađena je značajna povezanost između stupnja stenoze i morfoloških karakteristika plaka s kliničkim manifestacijama bolesnika. Visoko-značajnu stenozu (95-99%) imalo je 19 simptomatskih bolesnika (79,2 %) te 19 asimptomatskih bolesnika (45,2 %) što je statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,027$). Pedeset posto simptomatskih bolesnika (12) i 26,2% asimptomatskih bolesnika (11) imalo je *meke* (hipoehogene) plakove što je također statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,039$). U ranijim studijama dokazano je da je ultrazvuk korisna metoda za razlikovanje stabilnih od nestabilnih plakova, da je hipoehogenost plaka potencijalni ultrazvučni marker vulnerabilnosti plaka i prediktor simptomatologije i da nalaz dobro korelira s upalnim pokazateljima.²¹⁶ U studiji Dinga i suradnika, plakovi simptomatskih bolesnika bili su uglavnom hipoehogeni, a asimptomatskih uglavnom hiperehogeni.²¹⁷ U studiji Northern Manhattan Study (NOMAS), plakovi nepravilne i ulcerirane površine bili su više povezani s pojavom CVI-a nego glatki plakovi.²³ Nicolaides i suradnici objavili su da je kod 70-99%-tne stenoze karotidne arterije godišnja stopa ipsilateralnog CVI-a 2% kod hipoehogenih ili mješovitih plakova u usporedbi s 0,14 % kod fibroznih (uniformno ehogenih) ili kalcificiranih plakova.²⁴ Veza između stupnja stenoze karotidne arterije i simptomatologije nije tako jasna i nedvosmilna kako bi se to moglo očekivati. Uzrok je tome činjenica da je kritično smanjivanje protoka kroz suženo mjesto tek jedan od načina kako može doći do pojave simptoma. Puno veću ulogu u pojavi simptoma ima distalna embolizacija trombotskog materijala, a tu je kvaliteta i sastav plaka (odnos fibrozne kape i kolesterolske srži) i stupanj upale unutar plaka puno važniji čimbenik. Može se pretpostaviti da je stupanj stenoze vezan sa simptomatologijom jer su veći plakovi koji

uzrokuju značajniju stenozu obično i vulnerabilniji. U studiji NASCET nakon 18 mjeseci medikamentne terapije bez revaskularizacije učestalost CVI-a bila je 19% za stenozе od 70-79%, 28% za stenozе od 80-89% te 33% za stenozе od 90-99% (kod okluzije se rizik smanjuje).¹⁵ U studijama ACAS i ACST, asimptomatski bolesnici sa stenozom od 60% do 80% imali su veću učestalost inzulta nego oni s većim stupnjem stenozе^{16, 17} Ipak, medikamentna terapija u vrijeme tih značajnih studija bila je značajno inferiornija u usporedbi s današnjim standardima i zasnovana uglavnom samo na primjeni ASK. U ACSRS studiji stupanj stenozе karotidne arterije ima prediktivnu vrijednost, ali tek u kombinaciji s anamnezom kontralateralne TIA-e i kreatininom iznad 85 $\mu\text{mol/L}$.²¹

5.2.3. Histološke karakteristike plaka

U našoj studiji nije nađena povezanost između kliničke prezentacije i histološke slike plaka indikativne na vulnerabilnost. Prema mogućim pokazateljima vulnerabilnosti (oštećenje fibrozne kape odnosno ulceracije površine, prisutnost tromba na plaku i krvarenje unutar plaka) plakovi su podijeljeni u tri skupine: 1) Fibrozni plakovi (F) koji su bili bez oštećenja fibrozne kape, 2) ulcerirani nekomplikirani plakovi (UNC) s oštećenom fibroznom kapom, ali bez tromboze i krvarenja i 3) ulcerirani komplikirani (UC) s oštećenom fibroznom kapom, krvarenjima i/ili trombozom. Iako je 50% simptomatskih bolesnika (12) i 28,6% asimptomatskih bolesnika (12) imalo UC plakove, razlika nije bila statistički značajna (χ^2 test, $p=0,21$). Ovi rezultati su u skladu s ranijim studijama koje su pokazale da nema stroge ovisnosti između histoloških karakteristika vulnerabilnosti plaka i kliničke slike odnosno simptomatologije.²¹⁸ Mogući razlozi za taj paradoks su: 1) nedostatak specifičnih i senzitivnih kriterija za vulnerabilnost plaka, 2) arteficialno (laboratorijsko) oštećenje površine plaka, i 3) činjenica da neki bolesnici imaju nestabilne plakove koji se postupno stabiliziraju ne uzrokujući simptome. Osim toga, neki od ishemičkih događaja su vjerovatno uzrokovani embolijom iz srca i sa stijenke aorte. Transtorakalnom ehokardiografijom možemo prepoznati i isključiti neke, ali ne i sve bolesnike s izvorom embolusa koji nije iz karotidne arterije. Nadalje, nije samo vulnerabilni plak taj koji bolesnika čini vulnerabilnim već i *vulnerabilna krv*, sklona trombozi, što može imati značajnu ulogu u ukupnom ishodu. U metaanalizi 21 studije Gollegdga i suradnika pokazano je da je ulceracija plaka vidljiva u 48 % simptomatskih bolesnika te 31% asimptomatskih bolesnika ($p=0,001$).²⁶ Međutim, krvarenje unutar plaka nije se razlikovalo između simptomatskih i asimptomatskih bolesnika (48% vs.

50%) kao niti tromboza (40% vs. 35%). U većini studija je pokazano da je kod simptomatskih bolesnika fibrozna kapa tanja²¹⁹ te da je jače izražena upala s većim brojem makrofaga i T limfocita.²²⁰ U studiji Seegera i suradnika nađena je veća količina slobodnih lipida u plaku²²¹ što zapravo dobro kolerira s ultrazvučnim nalazom hipoehogenih zona u plaku.²²² Kod simptomatskih bolesnika lipidna srž je smještena bliže fibroznoj kapi i širina plaka je manja.²²³ Iako je volumen fibrozne kape i lipidne srži sličan kod simptomatskih i asimptomatskih bolesnika, položaj srži i lokalano stanjenje fibrozne kape ukazuju na njenu potencijalnu rupturu. U radu Fishera i suradnika u koji je uključeno 241 bolesnik iz NASCET i ACAS studije (128 asimptomatski bolesnik, 80 s ispilateralnim i 33 s kontralateralnim simptomima) ulceracije su nađene u 36% simptomatskih i 14% asimptomatskih bolesnika ($p < 0,001$) dok je tromboza nađena u 44% ulceriranih plakova bolesnika s ipsilateralnim simptomima u usporedbi s 14% ne-ulceriranih plakova simptomatskih bolesnika ($p < 0,005$). Kalcifikacije plaka nisu bile povezane sa simptomatologijom.²⁷ Ulceracija plaka kompleksan je proces koji ovisi o upalnim promjenama plaka s jedne strane te naglim promjenama intraarterijskog tlaka s druge strane. Jedan od navažnijih čimbenika u upalnoj kaskadi su metaloproteinaze.²²⁴ Makrofazi su lokalizirani na onom mjestu u plaku koji je izložen kroničnom hemodinamskom stresu odnosno turbulencijama za razliku od glatkih mišićnih stanica koje su više lokalizirane na mjestu u plaku koji nije izložen stresu.²²⁵ Citokini su također jače izraženi u plakovima simptomatskih bolesnika.²²⁰ Aterosklerotski plak predstavlja prokoagulantni supstrat odnosno može potaknuti razvoj tromboze u krvnoj žili. PAI-1, najvažniji inhibitor tkivnog plazminogen aktivatora, pojačano je izražen u aterosklerotskom plaku.²²⁶ Međutim, glavni protrombogeni čimbenik u plaku je tkivni faktor, lokaliziran na mjestima pojačanog nakupljanja lipida, masnih stanica i kolesterolskih kristala.²²⁷ Kod pucanja fibrozne kape tkivni faktor dolazi u interakciju s koagulacijskim čimbenicima potičući vanjski put koagulacijske kaskade koja dovodi do stvaranja tromba.

5.2.4. Ekspresija i lokalizacija endotelne lipaze u plaku

Dvanaest godina nakon otkrića EL još uvijek se ne može sa sigurnošću reći, na temelju sadašnjih saznanja, da li EL ima proaterogenu funkciju, antiaterogenu funkciju ili njen utjecaj na aterosklerozu nije značajan. Temelj za teoriju o mogućem antiaterogenom učinku EL jest njen utjecaju na metabolizam LDL-a. Brown i suradnici pokazali su da je kod EL^{-/-} miševa povećana koncentracija malih gustih čestica LDL-a.¹⁶² Povećana ekspresija EL dovodi do povećanog katabolizma odnosno smanjenja razine apoB lipoproteina u serumu.¹⁴⁵ Ahmed i suradnici pokazali su da je EL aktivnost nužna za inhibiciju adhezijskih molekula putem HDL-om posredovane aktivacije PPAR- α sustava.¹⁸⁶

Većina dokaza ipak ukazuje na proaterogeni utjecaj EL, premda nisu definirani najznačajniji mehanizmi te eventualne proaterogenosti, te da li su oni više vezani uz bazičnu funkciju EL (reverzni transport kolesterola), ili uz neenzimatsku funkciju EL i vezu s upalnim procesom u plaku.

Rezultati imunohistokemije za EL u plaku u ovom istraživanju dokazuju da je EL povezana s aterosklerozom i njenom klinički najznačajnijom fazom - destabilizacijom plaka i pojavom simptoma. Ključni celularni element u plaku odgovoran za vezu između upale, povećane ekspresije EL i destabilizacije plaka je makrofag, stanica za koju se od ranije zna da svojim djelovanjem i odnosom s ostalim vrstama stanica, upalnim citokinima i faktorima rasta zauzima središnje mjesto u patogenezi destabilizacije plaka. Rezultati ovog istraživanja također podupiru dosadašnje spoznaje o važnoj ulozi makrogafa u razvoju nestabilnog plaka.

Imunofluorescentno bojanje za EL bilo je prisutno u sloju endotelnih stanica i glatkih mišićnih stanica, ali najviše je bilo izraženo u području između nekrotične srži i fibrozne kape plaka gdje se dominantno nalaze makrofazi. Ta prostorna povezanost u plaku potvrđena je kolokalizacijom imunofluorescentnog bojanja za EL i za anti-CD163, specifični biljeg za makrofage.

Prema intenzitetu imunofluorescentnog bojenja plakovi su semikvantitativno podijeljeni na tip A (slabiji intenzitet bojenja - do 25% stanica) i tip B (jači intenzitet bojenja – više od 25% stanica). Od 66 plakova 31 je bilo tip A, dok je 35 bilo tip B. U skupini *simptomatski* bilo je 70,8% (17) tip B plakova, dok je u skupini *asimptomatski* bilo 42,9% tip B plakova (18) što je statistički značajna razlika (χ^2 test, $p=0,028$). Nakon što su bolesnici razvrstani u skupine 1) *bez simptoma*, 2) *svježi simptomi* i 3) *stari simptomi* zadržala se statistički značajna razlika (χ^2

test, $p=0,038$). Učestalost plakova tip B u skupini *bez simptoma* bila je 27,5% (11/40), u skupini *stari simptomi* bila je 58,3% (7/12), dok je najveća učestalost plakova tip B nađena u skupini *svježi simptomi* (70,8%, 17/24).

Posebno je zanimljivo da, iako nije bilo statistički značajne veze između histološkog tipa plaka (F, UC i UNC) i simptomatologije, nađena je značajna povezanost između histološkog tipa i jačine imunohistokemijske reakcije za EL. Kod najkompleksnijih plakova (UC) koji imaju ulceriranu površinu, krvarenja unutar plaka ili trombozu nađena je značajno veća učestalost tip B reakcije (79,2%) u usporedbi s UNC plakovima (ulcerirani plakovi bez tromboze i krvarenja) gdje je ta učestalost manja (50%), a osobito u usporedbi s fibroznim plakovima gdje je učestalost tip B reakcije bila 33,3% (χ^2 , $p=0,004$).

Povezanost makrofaga s upalom, pojačanom ekspresijom EL i destabilizacijom plaka dokazana je u više radova, međutim, prema pregledanoj literaturi, do sada nije objavljen klinički rad koji bi pokazao vezu između pojave simptoma (što je klinička prezentacija nestabilnog plaka) i ekspresije EL u plaku.

Azumi i suradnici su na obdukcijskoj studiji dokazali da se EL ne proizvodi samo u endotelnim stanicama, već i u makrofazima i glatkim mišićnim stanicama humanih koronarnih arterija.¹⁷² Bartels i suradnici utvrdili su da je EL mRNA i/ili protein u području između fibrozne kape i srži karotidnog plaka u kolokalizaciji s makrofag-specifičnim CD68 biljegom pri čemu su u studiju uključili isključivo simptomatske bolesnike.¹⁸² Imunohistokemija za EL u tom je radu učinjena za ukupno 6 plakova. Imunohistokemijska reakcija bila je najizraženija na granici između fibrozne kape i nekrotične srži i poklapa se s imunohistokemijskom reakcijom na CD68. Metodom *in situ* hibridizacije dokazano da je i EL mRNA najviše prisutna na tom istom području između fibrozne kape i nekrotične srži. Kad su bolesnici bili podijeljeni na tercile na temelju količine CD68 - mRNA u plaku određene metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *real – time* polymerase chain reaction) dokazana je pozitivna povezanost između količine EL-mRNA i CD68-mRNA tako da je EL-mRNA bila gotovo 7,1 puta više izražena u skupini s najvišom razinom CD68-mRNA ($p=0,006$).

EL može na više načina djelovati na funkciju makrofaga. U *in vitro* studiji s makrofazima dokazano je da lipopolisaharid (LPS) putem *Toll-like receptora-4* (TLR-4) povećava ekspresiju EL-mRNA što dovodi do povećanog ulaska neoskidiranog LDL-a (nLDL) u stanice¹⁶⁶ koji se, prema radu Krutha i suradnika,¹⁶⁷ nakuplja u monocitima – makrofazima. EL moguće ima veznu funkciju (putem heparan-sulfat proteoglikana) između nLDL-a i

makrofaga te time sudjeluje u makropinocitozi nLDL-a. Statini, osim što smanjuju ekspresiju receptora čistača (eng. scavenger receptor – SR) na makrofazima, ulazak oksidiranog LDL-a i oksidaciju lipoproteina, oni inhibiraju i ekspresiju EL uzrokovanu LPS-om kao i preuzimanje nLDL-a.¹⁶⁸ Upravo prisutnost TLR-4 jedna je od razlika između makrofaga i endotelnih stanica kojom se može objasniti relativno veći značaj makrofagne EL u uznapredovalom aterosklerotskom plaku.

Pojačana ekspresija EL može dovesti do pojačanja upale u plaku na način da potiče produkciju citokina ili ulazak LDL-a u plak. Studija Kojma i suradnika pokazala je da EL potiče adheziju monocita na endotel, ključnu za početak i razvoj aterosklerotskog procesa, kroz interakciju s HSPG (nekatalitička vezna funkcija).¹⁷³ U tom radu je također dokazana *in vivo* pojačana ekspresija EL nakon stimulacije s LPS, i to u tkivima aorte, jetre, srca, pluća, bubrega i slezene kao i u plazmi. To je značajan dokaz da je EL ekspresija povećana u stanju akutne sistemske upale što je njena specifična karakteristika jer ostale dvije članice obitelji lipaza (lipoprotein lipaza i hepatična lipaza) imaju smanjenu ekspresiju u stanjima upale. Uslijed pojačane ekspresije EL u stanju upale dolazi do pada razine HDL-a u serumu što se tipično i inače može vidjeti u upalnim stanjima za što je barem djelomice odgovorna povećana ekspresija EL. Međutim, osim tog sistemskog i lokalnog djelovanja na metabolizam lipida, barem podjednako je važna vezna funkcija EL koja dovodi do pojačane adhezije monocita na vaskularni zid. Taj učinak može se inhibirati heparinom koji dovodi do oslobađanja EL s površine stanice (plazma nakon primjene heparina ima tri puta veću koncentraciju slobodne EL). Primjena heparinaze također inhibira adheziju monocita što je dokaz da se vezna funkcija EL odvija putem heparan-sulfat proteoglikana.

Dosadašnji radovi pokazali su da je odnos između upale plaka i ekspresije EL dvosmjernan odnosno da se ekspresija EL pojačava pod utjecajem upalnih medijatora, ali i da EL u plaku sama po sebi pojačava upalnu kaskadu koja dovodi do destabilizacije plaka. Dobro je poznato da se u aktiviranim makrofazima nalaze brojni citokini koji dovode do progresije lezije pogoršavajući endotelnu disfunkciju, aktivirajući ostale upalne stanice u plaku ili stimulirajući proliferaciju glatkih mišićnih stanica.²²⁸ Neki od citokina i upalnih medijatora pojačavaju ekspresiju EL u makrofazima. Razina EL-mRNA povećana je u kulturi endotelnih stanica koronarne arterije pod utjecajem citokina koji su povezani s aterosklerozom (TNF- α i IL-1 β).¹⁶³ Odgovor EL na citokine ovisan je o količini citokina i javlja se u odgovarajućem vremenskom slijedu.¹⁶⁵ Oksidirani LDL također povećava ekspresiju EL u humanim monocitima/makrofazima.¹⁴³

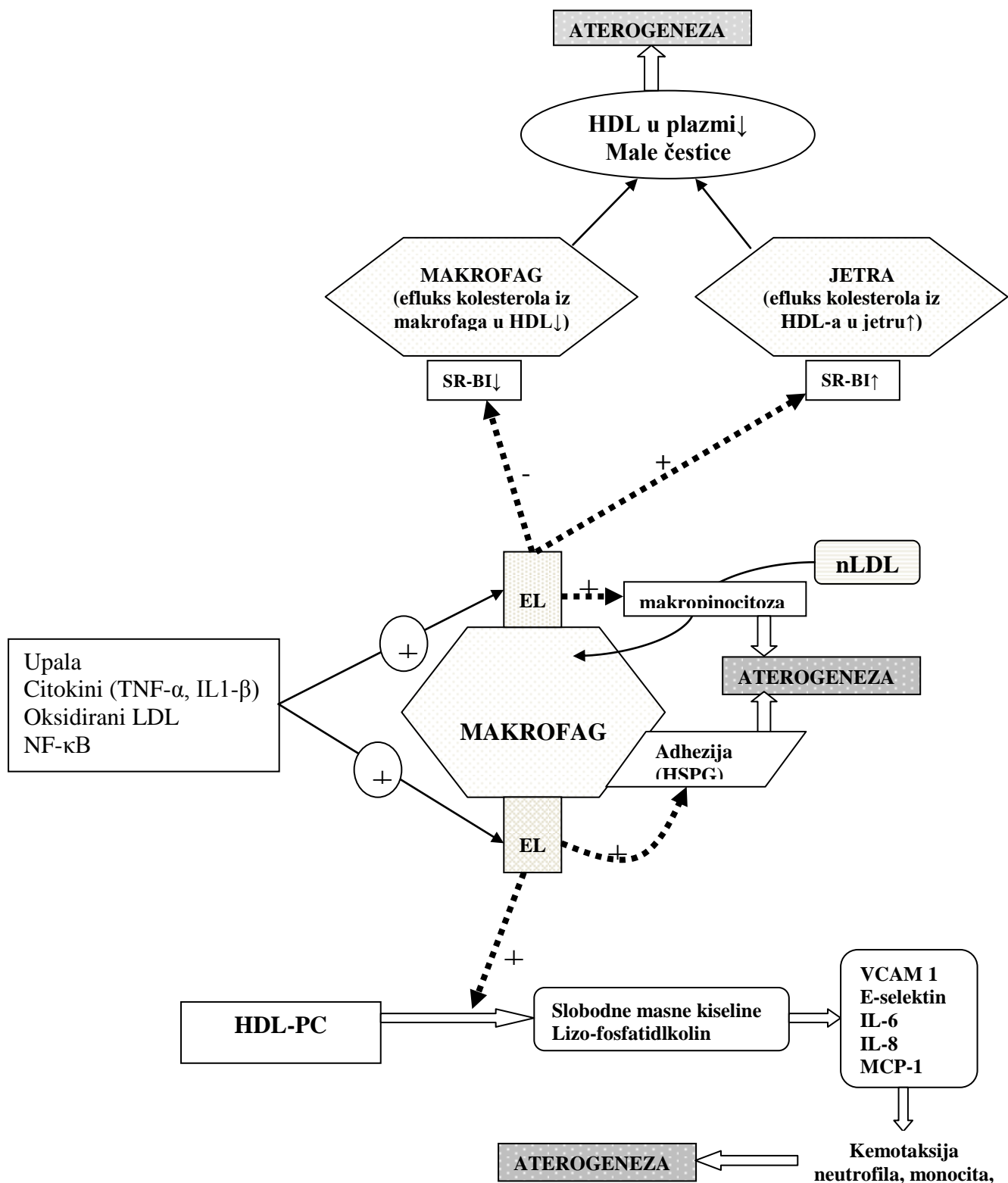
Međutim, dokazani su i mehanizmi kojima EL pojačava upalni odgovor stimulirajući produkciju upalnih citokina. Svojom fosfolipaznom aktivnošću EL cijepa HDL-PC oslobađajući slobodne masne kiseline (eng. free fatty acids - FFA) i lizofosfatidil kolin (eng. lysophosphatidylcholine - lyso-PC) koji su sposobni modulirati upalni odgovor aktivacijom mnogih gena uključujući gene za adhezijske molekule žilnih stanica (eng. vascular cell adhesion molecule-1 - VCAM1), E-selektin i IL-6 u kulturi humanih aortalnih endotelnih stanica (eng. human aortic endothelial cells - HAEC), dovesti do apoptoze te služiti kao energija za neovaskularizaciju.²²⁹ U radu Qiu i suradnika dokazano je da endogena inhibicija EL ekspresije kod makrofaga dovodi do smanjenje ekspresije proupalnih citokina TNF- α , IL-6, IL-1 β , monocitnog kemotaktičnog proteina-1 (eng. monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1), te smanjene unutarstanične koncentracije kolesterola i lyso-PC, razgradnog produkta fosfatidilkolina koji nastaje kao produkt fosfolipazne aktivnosti EL.¹⁸¹ Smanjenu ekspresiju proinflammatory citokina nakon blokiranja EL autori objašnjavaju smanjenom produkcijom lyso-PC koji ima niz bioloških proupalnih aktivnosti poput pojačavanja ekspresije IL-8 i MCP-1 u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama te pojačavanja kemotaksije neutrofila, monocita i limfocita kao i smanjenja produkcije FFA koje su aktivatori PPAR γ i NF- κ B.²³⁰

Atorvastatin i simvastatin dovode do smanjene ekspresije EL u makrofazima na način neovisan o reduktaznoj aktivnosti.¹⁸³ Oni inhibiraju učinak NF- κ B, za kojeg je dokazano da pojačava ekspresiju EL mRNA i proteina,¹⁶⁵ što je jedan od mogućih mehanizama kako statini smanjuju akumulaciju lipida u makrofazima neovisno o utjecaju na reduktazu (pleiotropni učinak).

Iako je dokazano da EL ima utjecaj na razinu HDL-a u serumu, ostaje otvoreno pitanje kakvu to ima ulogu na ukupni reverzni transport kolesterola (RTK). EL pojačava efluks kolesterola iz makrofaga krvnih žila putem enzima ABCA1 za 63%, ali dovodi do 90%-tnog smanjenja efluksa putem SR-BI što posljedično dovodi do smanjenja ukupnog efluksa kolesterola iz stanica. Međutim, pod utjecajem EL dolazi do promjene sastava i fizikalnih svojstava HDL-a i stvaranja manjih čestica siromašnih kolesterolom koji se brže kataboliziraju.¹⁵³ EL u jetri pak povećava preuzimanje HDL-kolesterola katalitičkim i nekatalitičkim putem¹⁵⁷ za što postoje dokazi i u animalnim studijama na genetski modificiranim EL^{-/-} miševima.¹⁵⁸ Pojačana ekspresija EL u endotelnim stanicama jetre dovodi do povećanja jetrenog apoA1-katabolizma¹⁴⁷ te do povećanog prelaska HDL-kolesterola u jetru putem SR-BI kao što je vidljivo i u radu Nijstada i suradnika koji su na miševima dokazali da je EL ključni regulator prelaska kolesterol-estera iz HDL-a u jetru.¹⁶⁰ Smanjujući

efluks kolesterola iz makrofaga u HDL i povećavajući efluks iz HDL-a u jetru, EL značajno smanjuje ukupnu serumsku razinu HDL-a, ali nema većeg utjecaja na ukupni RTK što je i pokazano u radu Browna i suradnika.¹⁶² U tom radu na HL/EL^{-/-} miševima (homozigoti koji nemaju aktivnost niti HL niti EL) nađena je povišena razina HDL-a i povećan efluks kolesterola iz makrofaga, ali je ukupni RTK (*iz makrofaga u feces*) bio nepromjenjen što je objašnjeno smanjenim klirensom HDL-kolesterola. Time se mogu djelomično objasniti dvojbene rezultati studija na genetski modificiranim miševima koji nemaju EL. Može se pretpostaviti da je za proaterogeni učinak EL mnogo važnija veza između EL i lokaliziranog upalnog procesa te vezna funkcija EL nego sama enzimatska funkcija EL.

Potencijalni najznačajniji mehanizmi putem kojih EL djeluje proaterogeno kao i mehanizmi stimulacije ekspresije EL u makrofagu prikazani su na 5.2-1. (str. 80).



Slika 5.2-1. Potencijalni proaterogeni mehanizmi endotelne lipaze. Kratice: HDL – lipoprotein visoke gustoće (eng. high density lipoprotein), SR-BI – receptor čistač BI (eng. scavenger receptor BI), TNF- α – tumor nekrotizirajući faktor- α , IL – interleukin, LDL – lipoprotein niske gustoće (eng. low density lipoprotein), NF- κ B – jezgreni faktori kapaB (eng. nuclear factor κ B), HSPG – heparan-sulfat proteoglikan, HDL-PC – HDL fosfatidilkolin (eng. HDL phosphatidylcholine), VCAM 1 - adhezijska molekula vaskularnih stanica (eng. vascular cell adhesive molecule), MCP – 1 - monocitni kemotaktični protein-1 (eng. monocyte chemotactic protein-1).

5.3. Plazmatska razina endotelne lipaze

Rezultati analize plazmatske razine EL određene ELISA metodom u određenoj mjeri se razlikuju od rezultata imunohistokemije EL u plaku. Zanimljivo je da nije nađena povezanost između ekspresije EL u plaku i plazmatske razine EL (tip A $448,75 \pm 159,9$ ng/mL vs. tip B $442,0 \pm 137,9$ ng/mL, T-test, $p=0,868$). Međutim, nađena je vrlo dobra povezanost između EL u plazmi sa simptomima bolesnika i to bez vremenske i lokalizacijske povezanosti s ciljnom stenozom karotidne arterije. Nije bilo razlike u plazmatskoj razini EL između bolesnika koji su imali simptome izvan perioda od 4 mjeseca te bolesnika koji su imali simptome unutar 4 mjeseca u polju perfuzije karotidne arterije ($p=0,459$), ali su obje skupine imale značajno višu razinu EL u plazmi nego potpuno asimptomatski bolesnici ($p=0,015$).

Ovo je do sada prvi rad koji je uspoređivao EL u plazmi simptomatskih i asimptomatskih bolesnika s aterosklerotskom bolešću karotidne arterije. U radu Badellina na populaciji zdravih pojedinaca s pozitivnom obiteljskom anamnezom preuranjene koronarne bolesti, povećana plazmatska razina EL je bila povezana sa subkliničkom koronarnom bolešću srca.¹⁵⁹ Ispitanici su prema plazmatskoj razini endotelne lipaze bili podjeljeni na kvartile. Kalcifikacije koronarnih arterija mjerene CT–koronarografijom bile su najviše izražene u ispitanika koji su imali EL u najvišoj kvartili ($p=0,003$) čak i nakon prilagodbe za dob, spol, opseg struka, hormonsku nadomjesnu terapiju i poznate čimbenike rizika. U istom radu dokazana je povezanost EL u plazmi s indeksom tjelesne mase ($p=0,001$), pušenjem ($p=0,005$) i čimbenicima metaboličkog sindroma: opsegom struka ($p=0,001$), krvnim tlakom ($p=0,001$), trigliceridima ($p=0,004$) i povišenom glukozom na tašte ($p=0,001$). Nađena je statistički značajna negativna korelacija s razinom HDL-a ($p=0,001$) s time da se ta povezanost prvenstveno odnosi na velike HDL čestice, dok je korelacija s malim HDL česticama pozitivna. Navedena razlika uzrokovana je hidrolizom fosfolipida s površine velikih čestica HDL-a pod utjecajem EL tako da u cirkulaciji ostaju male HDL čestice siromašne fosfolipidima.

U drugom radu, ali na istoj skupini bolesnika, Badelino i suradnici pokazali su korelaciju između koncentracije EL u plazmi i upalnih pokazatelja kao što su topivi tumor-nekrotizirajući faktor receptor II (eng. soluble tumor necrosis factor receptor II), ICAM 1 i leptin. Kod 20 učesnika studije provedena je eksperimentalna endotoksemija pri čemu je 12 do 16 sati nakon primjene bakterijskog lipopolisaharida došlo do porasta EL koncentracije za

2,5 puta.¹⁷⁷ Kod pretilih ljudi s metaboličkim sindromom dokazana je kronična subklinička upala koja može dovesti do porasta CRP-a,¹⁷⁸ a zatim i do pojačane ekspresije EL. Dokazano je da adipociti luče različite citokine uključujući IL-6²³¹ i TNF- α ²³² koji uzrokuju navedenu sistemsku upalu niskog stupnja što se manifestira povećanom plazmatskom razinom CRP-a i IL-6.²³³ Paradis i suradnici pokazali su na skupini od 74 pretilih ljudi (prosječni BMI ispitanika bio je $29,8 \pm 5,2$ kg/m², opseg struka $99,1 \pm 14,8$ cm) da razina EL u plazmi korelira s upalnim pokazateljima CRP-om ($p=0,003$) i IL-6 ($p=0,004$), s plazmatskom sekretornom fosfolipazom tip IIa (sPLA2-IIa) ($p=0,0002$) te s indeksima pretilosti.¹⁷⁶ Kad su ispitanici dogovorno podjeljeni na skupine ovisno o razini CRP-a u plazmi od 1 mg/L nađeno je da je najviša razina EL kod ispitanika s metaboličkim sindromom i CRP-om većim od 1 mg/L, a najmanja kod onih koji nisu imali metabolički sindrom, a imali su CRP manji od 1 mg/L. Također je nađeno da je EL u plazmi čvrsto povezana s upalnim pokazateljima neovisno o visceralnom adipozitetu odnosno da je povišena razina EL u pretilih ljudi povezana prvenstveno s pratećim proupalnim stanjem, a ne sa samim adipozitetom.

U našem istraživanju nije nađena značajna korelacija između plazmatske razine EL i indeksa tjelesne mase ($p=0,684$), opsega struka ($p=0,955$), upalnih pokazatelja hsCRP-a ($p=0,647$) i IL-6 ($p=0,325$), HDL-a ($p=0,175$) i LDL-a ($p=0,687$) što je u suprotnosti s očekivanjem na temelju rezultata Badellina i suradnika.¹⁵⁹ Odgovor moguće leži u činjenici da je naše istraživanje provedeno na drugačijoj populaciji ispitanika, a to su bolesnici koji imaju dokazanu značajnu karotidnu bolest odnosno uznapredovalu aterosklerotsku bolest. Osim toga, velik dio naših ispitanika kod uključivanja u studiju već je koristio različite lijekove koji su direktno ili indirektno mogli utjecati na ekspresiju EL u plaku i plazmatsku razinu EL. Nije zabilježena povezanost sa statinom odnosno ASK, ali je nađena značajno veća razina kod bolesnika koji su bili liječeni ACE inhibitorima ($487,1 \pm 157,6$ ng/mL) u usporedbi s onima koji nisu ($395,35 \pm 120,7$ ng/mL; t-test, $p=0,018$). Bolesnici koji su liječeni kalcijским blokatorim imali su također višu razinu EL u plazmi ($491,0 \pm 158,5$ ng/mL u usporedbi s $412,6 \pm 133,2$ ng/mL), a razlika je bila na granici značajnosti (t-test, $p=0,052$).

U našoj studiji 69% bolesnika liječeno je nekim od statina (atorvastatin 19 bolesnika, simvastatin 23 bolesnika, fluvastatin 3 bolesnika) koji podižu plazmatsku razinu HDL-a na način da reguliraju različite čimbenike koji sudjeluju u reverznom transportu kolesterola kao što su apo-AI, SR-BI, ili ABCA1. Nadalje, dokazano je za statine da smanjuju razinu ekspresije EL¹⁸³ što ukazuje da je za povećanje razine HDL-a tijekom terapije statinom barem jednim dijelom odgovorna snižena ekspresija EL. Uzimajući u obzir da je povećanje HDL-a uz terapiju statinima rezultat pleiotropnih učinaka statina na EL ovisni, ali i EL neovisni

mehanizam, te da su korišteni različiti statini u različitim apsolutnim i ekvipotentnim dozama, logično je zaključiti da je u našem istraživanju nedostatak korelacije između EL ekspresije u plaku i plazmatske razine EL s razinom HDL-a upravo uzrokovan primjenom statina.

Zanimljivo je usporediti rezultate između EL u plazmi i imunohistokemije u plaku. Nije nađena statistički značajna razlika u plazmatskoj razini EL među skupinama s tip A i tip B plakom (tip A $448,75 \pm 159,9$ ng/mL vs tip B $442,0 \pm 137,9$ ng/mL, T-test, $p=0,868$). Kad se određivala povezanost između simptomatologije i ekspresije EL u plaku odnosno plazmatske razine EL primjećene su određene značajne razlike. Ključna razlika prisutna je u skupini bolesnika koji su imali simptome, ali izvan perioda od 4 mjeseca i bez lokalizacijske povezanosti s ciljnom karotidom (skupina *stari simptomi*). U usporedbi s bolesnicima koji su imali simptome unutar 4 mjeseca (skupina *svježi simptomi*), nije bilo značajne razlike u plazmatskoj razini EL u plazmi, ali je nađena razlika u ekspresiji EL u plaku (jaču ekspresiju je imalo 58,3% bolesnika iz skupine *stari simptomi* i 70,8% bolesnika iz skupine *svježi simptomi*). Na temelju toga možemo zaključiti da je EL u plazmi opći marker povećanog rizika za cerebrovaskularne događaje neovisno o dotičnom plaku odnosno da razina EL ovisi o cijeloj endotelnoj površini (i na dotičnom plaku i izvan njega). S druge strane, pozitivna povezanost između ekspresije EL u karotidnom plaku sa simptomima i s histološkim pokazateljima vulnerabilnosti plaka ukazuje na potencijalnu ulogu EL u lokalnom upalnom procesu, koji je ključni mehanizam destabilizacije plaka, na način da sama aktivno sudjeluje, potiče i podržava upalu. Ta lokalno povećana ekspresija ima utjecaja na destabilizaciju plaka i pojavu simptoma, ali očito nema značajnijeg utjecaja na porast EL u plazmi na koju veći utjecaj imaju čimbenici koji djeluju na endotel cijelog arterijskog stabla. Tako smo u našem istraživanju našli značajno povišenu razinu EL u bolesnika s arterijskom hipertenzijom u usporedbi s bolesnicima koji nisu imali hipertenziju ($459,4 \pm 157,7$ vs. $376,4 \pm 38,1$ ng/mL; t-test; $p=0,004$). Bivši i sadašnji pušači imali su također povišenu razinu EL u usporedbi s nepušačima, razlika je gotovo dosegla statističku značajnost ($485,3 \pm 156,5$ vs $409,6 \pm 132,8$, T-test, $p=0,058$).

U članku Khera i suradnika nedavno objavljenom u časopisu New England Journal of Medicine (NEJM)¹²⁶ utvrđeno je da je pušenje značajni predskazatelj efluksa kolesterola ($p=0,004$) s time da je nađena obrnuto proporcionalna veza između kapaciteta efluksa kolesterola i zadebljanja karotidne intime. Autori su pripisali negativni učinak pušenja na efluks kolesterola iz makrofaga oksidaciji apolipoproteina A-I, međutim moguće je da se mehanizam odvija i preko pojačane ekspresije EL te posljedičnog blokiranja SR-BI.

Ovisnost plazmatske razine EL o arterijskoj hipertenziji i pušenju nađena je i u ranijim istraživanjima u kojima je nađena i povezanost s drugim klasičnim čimbenicima rizika.¹⁵⁹ Arterijska hipertenzija i pušenje čimbenici su rizika koji mogu dovesti do oštećenja endotela i endotelne disfunkcije s posljedičnim upalnim odgovorom, a time i s pojačanom ekspresijom EL. Teško je objasniti, na temelju mehanizma djelovanja lijeka, zašto smo kod bolesnika liječenih ACE inhibitorima i kalcijским blokatorima našli povećanu razinu EL u plazmi. Jedan od mogućih razloga je da se radi o bolesnicima s težim oblikom arterijske hipertenzije ili s više čimbenika rizika koji su zbog toga imali više antihipertenzivnih lijekova (pretežno blokatore kalcijških kanala i ACE inhibitore).

U našoj studiji nismo našli povezanost između EL ekspresije u plaku i serumskih pokazatelja upale. To se može objasniti profilom bolesnika koji su uključeni u studiju, a to su bolesnici koji dokazano imaju uznapredovalu aterosklerotsku bolest na barem jednom mjestu arterijskog stabla. Difuzna priroda ateroskleroze odnosno pojačano otpuštanje s više različitih mjesta u arterijskom sustavu može kod takvih bolesnika prikriti učinak lokalno pojačane proizvodnje upalnih citokina u dotičnom nestabilnom plaku te na taj način izbrisati razliku između bolesnika sa stabilnim i nestabilnim plakom. Razina hsCRP-a nije se razlikovala između skupina *simptomatski* i *asimptomatski* (Mann-Whitney U test, $p=0,138$ za hsCRP i $p=0,308$ za IL-6), ali je u obje skupine bila viša nego u zdrave populacije. Prema rezultatima velikih populacijskih studija, Centar za kontrolu bolesti i prevenciju američkog kardiološkog društva (American Heart Association - AHA) 2003. godine objavio je kliničke smjernice za CRP prema kojem razina manja od 1 $\mu\text{g/mL}$ predstavlja niski kardiovaskularni rizik, razina od 1 do 3 $\mu\text{g/mL}$ umjereni, a razina veća od 3 $\mu\text{g/mL}$ visoki kardiovaskularni rizik u kontekstu prisutnosti ostalih *klasičnih* čimbenika rizika.⁸¹ U Framinghamskoj studiji, na populaciji od 591 zdravih muškaraca i 871 zdravih žena tijekom 14-godišnjeg praćenja osobe s CRP-om u trećoj i četvrtoj kvartili (razina viša od 3 $\mu\text{g/mL}$) imali su dvostruki relativni rizik za razvoj cerebrovaskularnih događaja. CRP naših ispitanika bio je povišen, svrstavajući ih u kategoriju umjerenog i visokog rizika za razvoj kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja.

Možemo zaključiti da se, kod bolesnika s uznapredovalom aterosklerozom, plazmatska razina EL pokazala kao osjetljiviji upalni pokazatelj povezan sa simptomatologijom u usporedbi s hs-CRP-om i IL-6 i da bi kao takva mogla biti korištena kao dodati pokazatelj (uz klasične čimbenike rizika) u stratifikaciji bolesnika s osobitim rizikom za cerebrovaskularne (a

moguće i kardiovaskularne) događaje. EL bi nam mogla pomoći, poput CRP-a, u identificiranju *vulnerabilnog* bolesnika odnosno onog koji je pod rizikom ne samo za morfološku i kliničku progresiju karotidne bolesti već za neželjene cerebrovaskularne i kardiovaskularne događaje. Pri tome značajnija je njena uloga pokazatelja, dok je za samu patogenezu ateroskleroze i konkretnu kliničku manifestaciju važnija lokalizirana pojačana ekspresija EL u nekom plaku koja ne mora nužno dovesti do značajnijeg povećanja plazmatske EL. Ta činjenica zajedno s gore spomenutim rezultatom da nije nađeno razlike u EL u plazmi između tip A i tip B plakova govori u prilog hipoteze da je EL u plazmi pokazatelj općeg cerebrovaskularnog rizika te da se ipak vjerovatno ne može koristiti u stratifikaciji bolesnika s karotidnom stenozom koji bi imali koristi od CEA. Međutim, bolesnici s uočenom karotidnom stenozom i povišenom plazmatskom razinom EL mogli bi biti prepoznati kao bolesnici s povišenim rizikom ukupnih cerebrovaskularnih događaja i kao takvi biti liječeni s osobito strogim mjerama sekundarne prevencije odnosno agresivnom medicinskom terapijom (npr. visoke doze statina neovisno o lipidogramu, dvojni antiagregaciju terapiju, antihipertenzivna terapija s ciljnim vrijednostima tlaka 120/70 mmHg, liječenje rezidualnog rizika). Naravno da je ovo samo hipoteza za koju su potrebni dokazi temeljeni na većem prospektivnom istraživanju.

Navedeni rezultati pokazuju da je EL u plaku pozitivno povezana s histološkim pokazateljima nestabilnosti plaka, ali i kliničkom prezentacijom bolesnika. EL je u plaku pojačano izražena u makrofazima zahvaljujući lokalnim upalnim procesima. Međutim EL i sama aktivno sudjeluje, podržava i potiče lokalni upalni milje u aterosklerotskom plaku. Obzirom da nam je za određivanje EL u plaku nužna kirurška ekstirpacija cijelog plaka u kojem ekspresija EL može biti lokalizirano povećana i ne mora predstavljati eventualno pojačanu ekspresiju EL u ostalim dijelovima arterijskog sustava, razumljivo je da nam ta metoda ne može poslužiti kao predskazatelj budućih cerebrovaskularnih događaja neovisnih o dotičnom plaku. Međutim, stupanj ekspresije EL u plaku mogao bi biti novi korisni marker u histološkoj odnosno imunohistološkoj klasifikaciji plaka u smislu stabilnosti/vulnerabilnosti, a osobito zato jer je u pozitivnoj vezi i sa simptomima bolesnika koji su surogat nestabilnog plaka.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Rezultati studije potvrdili su hipotezu da je EL jače izražena u karotidnim plakovima simptomatskih bolesnika u usporedbi s karotidnim plakovima asimptomatskih bolesnika. Obzirom da je za pojavu simptoma nužna destabilizacija aterosklerotskog plaka s erozijom ili ulceracijom površine plaka, trombozom na oštećenoj površini ili krvarenjem unutar plaka te da u destabilizaciji plaka ključnu ulogu ima lokalni upalni proces zaključujemo da postoji povezanost između pojačane ekspresije EL i upalnog procesa.
- 2) EL je pojačano izražena upravo na mjestu u plaku gdje se najviše nalaze makrofazi, a to je u području između fibrozne kape i nekrotične srži što je potvrđeno kolokalizacijom imunohistokemijske reakcije za EL i za specifične biljege makrofaga (CD 163). Makrofazi su ključna efektorna stanica u procesu upale i destabilizacije plaka. Oni pojačavaju upalni proces jednim dijelom i vlastitom pojačanom ekspresijom EL na površini. EL dovodi do razgradnje HDL-fosfatidil kolina na slobodne masne kiseline i lizo-fosfatidil kolin koji su sposobni modulirati inflamatorni odgovor mnogih gena uključujući gene za VCAM1, E-selektin, IL-6, dovesti do apoptoze te služiti kao energija za neovaskularizaciju.
- 3) EL izražaj se pojačava sa stupnjem kompleksnosti plaka. Najmanje je izražena u fibroznim (stabilnim) plakovima, nešto jače u ulceriranim, ali nekomplikiranim plakovima (bez tromboze i krvarenja), a najjače u plakovima koji su ulcerirani te imaju znakove tromboze odnosno krvarenja.
- 4) U ovoj studiji nije bilo statistički značajne povezanosti između kliničke slike i histološkog tipa plaka. Međutim, ultrazvučni nalaz karotida bio je u statistički značajnoj povezanosti s kliničkom slikom; simptomatski bolesnici su češće imali visoki stupanj stenozе (95-99%) te su češće imali hipoehogene *meke* zone koji su pokazatelji vulnerabilnosti. Pri tome ipak treba uzeti u obzir potencijalni bias obzirom a su istraživači koji su provodili ultrazvuk karotida imali uvid u kliničke podatke.

- 5) Uzroci zašto nije bilo povezanosti između histološke slike i kliničke prezentacije mogu biti višestruki. Sadašnji histološki kriteriji za klasifikaciju i određivanje nestabilnosti plaka su manjkavi, nedovoljno određeni, subjektivni odnosno ovisni o istraživaču. Arteficialno (laboratorijsko) oštećenje površine plaka može stvoriti dojam ulceracije. Neki bolesnici imaju nestabilne plakove koji prođu svoju vulnerabilnu fazu subklinički odnosno asimptomatski. Nadalje, neki od ishemičkih događaja su vjerovatno uzrokovani embolijom iz srca i sa stijenke aorte. Nije samo vulnerabilni plak taj koji bolesnika čini vulnerabilnim već i *vulnerabilna krv*, sklona trombozi, što može imati značajnu ulogu u ukupnom ishodu.
- 6) Obzirom na dosadašnje spoznaje o međusobnoj dvosmjernoj povezanosti EL i lokaliziranog upalnog procesa u plaku, te u ovoj studiji dokazanom pojačanoj ekspresiji EL u plakovima simptomatskih bolesnika zaključujemo da bi se EL mogla koristiti kao jedan od pokazatelja nestabilnog plaka, poput npr. metaloproteinaze.
- 7) Plazmatska razina EL povišena je kod bolesnika koji su imali neurološke simptome u usporedbi s asimptomatskim bolesnicima, bez obzira da li se simptomi vremenski odnosno lokalizacijski mogu ili ne mogu povezati uz ciljani karotidni plak. Nadalje, EL u plazmi nije bila u povezanosti s EL u plaku što ukazuje da na razinu EL u plazmi ne utječe povećana ekspresija na jednom lokusu već ona vjerovatno ovisi o ekspresiji na kompletnom vaskularnom stablu. U tom smislu EL je odraz više generalizirane ateroskleroze i mogući opći pokazatelj rizika za neželjene cerebrovaskularne i kardiovaskularne događaje (kao npr. CRP), a ne pokazatelj koji bi ukazao da je dotični aterosklerotski plak rizičan za cerebrovaskularni incident.
- 8) Niti EL u plazmi niti EL u plaku nisu bili u vezi s koncentracijom CRP-a i IL-6 u plazmi što bi se moglo očekivati obzirom na rezultate prijašnjih radova. Također, CRP i IL-6 nisu bili veći kod simptomatskih bolesnika u usporedbi s asimptomatskim što je vjerovatno uzrokovano činjenicom da svi uključeni bolesnici po definiciji već imaju uznapredovalu aterosklerozu. U prilog tome ide činjenica da bolesnici uključeni u studiju imaju prosječno viši CRP i IL-6 u usporedbi sa zdravom populacijom.
- 9) EL u plazmi nije ovisila o terapiji statinom odnosno ASK, ali je nađena značajno veća razina kod bolesnika koji su liječeni ACE inhibitorima i granično značajna kod bolesnika koji su liječeni blokatorima kalcijevih kanala. Te rezultate teško je

interpretirati obzirom na dokazani protuupalni učinak ASK i činjenicu da je za statine dokazano da smanjuju razinu ekspresije EL. Jedan od mogućih odgovora je upitno redovito uzimanje lijekova, subdozirana terapija statinima (bolesnici nisu imali postignute ciljne vrijednosti LDL-a isod 2.5 mmol/L) te mogućnost da su za pleiotropni učinak statina potrebne više doze od njih koji se primjenjuju za reguliranje masnoća. Teško je objasniti, na temelju mehanizma djelovanja, zašto smo kod bolesnika liječenih ACE inhibitorima i blokatorima kalcijevih kanala našli povećanu plazmatsku razinu EL. Jedan od potencijalnih razloga je da se radi o kompleksnijim bolesnicima s težim oblikom arterijske hipertenzije ili s više faktora rizika koji su zbog toga imali više antihipertenziva (pretežno blokatore kalcijevih kanala i ACE inhibitore).

- 10) Plazmatska razina EL povišena je kod bolesnika s arterijskom hipertenzijom i kod pušača. Dokazan negativni učinak pušenja na efluks kolesterola iz makrofaga moguće je uzrokovan pojačanom ekspresijom EL te posljedičnim blokiranjem SR-BI. Arterijska hipertenzija i pušenje čimbenici su rizika koji mogu dovesti do oštećenja endotela i endotelne disfunkcije koja je povezana s upalnim odgovorom, a time potencijalno i s pojačanom ekspresijom EL.
- 11) Razina HDL-a u plazmi nije bila u vezi niti s ekspresijom EL u plaku niti s razinom EL u plazmi što je moguće uzrokovano činjenicom da je više od 2/3 bolesnika bilo na terapiji statinima koji podižu plazmatsku koncentraciju HDL na način da reguliraju različite enzime koji sudjeluju u reverznom transportu kolesterola kao što su apo AI, SR-BI, ili ABCA1. Uzimajući u obzir da je povećanje HDL-a uz terapiju statinima rezultat pleiotropnih učinaka statina na EL ovisni, ali i EL neovisni mehanizam, te da su korišteni različiti statini u različitim apsolutnim i ekvipotentnim dozama, može se zaključiti da je nedostatak veze između EL i HDL-a u našem radu upravo uzrokovan primjenom statina.
- 12) Plazmatska razina EL nije se značajno razlikovala u ovisnosti o indeksu tjelesne mase, opsegu struka kao i prisutnosti tri ili više metabolička čimbenika što se moglo očekivati na temelju ranijih radova gdje je kod pretilih ljudi nađena povišena razina EL što se objasnilo kroničnom upalom niskog stupnja. U ranijim radovima, naime, dokazano je da adipociti luče različite citokine uključujući IL-6 i TNF- α i dovode do povećanja CRP-a i IL-6. Međutim, u radovima gdje je dokazana povezanost EL s metaboličkim sindromom ispitivana populacija bili su zdravi muškarci s čimbenicima

rizika dok su u našoj studiji ispitanici imali dokazanu značajnu karotidnu bolest odnosno uznapredovalu aterosklerotsku bolest. Osim toga, velik dio tih bolesnika kod uključivanja u studiju već su imali uključene različite lijekove koji su mogli direktno ili indirektno mogli utjecati na endotelnu ekspresiju EL i koncentraciju EL u plazmi.

7. SAŽETAK

Ateroskleroza je kronična fibro-proliferativna i imuno-inflamatorna bolest arterija, karakterizirana endotelnom disfunkcijom, lokalnom oksidacijom cirkulirajućih lipoproteina, njihovom akumulacijom u stijenkama i aktivacijom gena za proinflamatorne citokine. Klinička prezentacija ateroskleroze nastaje uslijed destabilizacije plaka pod djelovanjem lokaliziranog upalnog procesa. EL je nova članica skupine lipaza koja zbog svoje povezanosti s upalnim procesom može imati važnu ulogu u destabilizaciji plaka. Njena ekspresija povećana je pod utjecajem upalnih citokina, oksidiranog LDL-a i lipopolisaharida i to u makrofazima, ključnom celularnom elementu destabilizacije plaka. S druge strane, EL ima adhezivnu ulogu za monocite te svojom lipolitičkom aktivnošću oslobađa slobodne masne kiseline i lizofosfatidilkolin koji aktiviraju upalne citokine. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je istražiti povezanost ekspresije EL u karotidnom plaku i plazmatske razine EL s kliničkom slikom bolesnika i s histološkim izgledom plaka. U istraživanje je uključeno 66 bolesnika sa značajnom (>70%) unilateralnom stenozom karotidne arterije hospitaliziranih radi karotidne endarterektomije. Bolesnici su podijeljeni na dvije osnovne skupine: 1) asimptomatski bolesnici (n=42) i 2) simptomatski (n=24). Karotidna stenoza smatrana je simptomatskom ako je bolesnik imao žarišni neurološki simptom (CVI, TIA ili *amaurosis fugax*) unutar perioda od 4 mjeseca koji po karakteru pripadaju području ciljane karotide. Na temelju histološke analize plakovi su prema svojim značajkama nestabilnosti podijeljeni u tri skupine: 1) fibrozni (F) prekriveni glatkom luminalnom površinom, 2) ulcerirani – nekomplikirani (UNC) s ulceriranom i tankom fibroznom kapom i 3) ulcerirani-komplicirani (UC) s ulceriranom i tankom fibroznom kapom, krvarenjem unutar plaka i/ili trombom. Imunohistokemija je učinjena sa zečjim klonskim anti-humanim protutijelima na CD163 (specifičnim za makrofage) i sa zečjim anti-EL protutijelima. Ekspresija EL izražena je semikvantitativno kao: (A) slabije bojanje (0–25% stanica pozitivno) i (B) jače bojanje (>25% stanica pozitivno). Plazmatska razina EL određena je ELISA metodom u 55 bolesnika.

Rezultati: Simptomatski bolesnici češće su imali visoko-signifikantnu (95-99%) stenozu ($p=0,027$) te hipoeohogene (*meke*) zone u plaku ($p=0,039$), međutim nije bilo značajne razlike

u histološkoj slici ($p=0,213$). U F plakovima imunohistokemija za EL bila je slaba (tip A) i smještena u endotelnom sloju i u stanicama unutar fibrozne kape. Kod UC plakova imunohistokemija za EL bila je jača (tip B) i smještena između nekrotične srži i fibrozne kape gdje su se dominantno nalazili makrofazi. Jače EL imunobojanje (tip B) bilo je češće kod UC plakova nego kod UNC, a osobito F plakova (79:50:33%, $p=0,004$). Plazmatska razina EL bila je izraženija kod hipertoničara ($p=0,004$) i pušača ($p=0,058$) te kod bolesnika liječenih ACE inhibitorima ($p=0,018$) i kalcijским blokatorima ($p=0,05$). Nije bilo povezanosti između ekspresije EL u plaku i plazmatske razine EL. Korelacijskim testom nije nađena značajna povezanost plazmatske razine EL s hsCRP-om, IL6, HDL-om i LDL-om. U usporedbi sa skupinom *bez simptoma* skupine *svježi simptomi* (simptomi unutar 4 mjeseca i sa lokalizacijskom povezanošću s ciljnom karotidnom arterijom) i *stari simptomi* (preostali simptomatski bolesnici) imali su značajno veću plazmatsku razinu EL ($p=0,011$), dok između te dvije skupine simptomatskih bolesnika nije bilo razlike ($p=0,459$).

Potvrđena hipoteza da je EL jače izražena u karotidnim plakovima simptomatskih bolesnika i u histološki vulnerabilnim plakovima ukazuje na njenu povezanost s procesom destabilizacije plaka. Tu povezanost dodatno učvršćuje i činjenica da je EL u aterosklerotskom plaku najviše izražena između fibrozne kape i nekrotične srži odnosno na mjestu gdje su najzastupljeniji makrofazi. U ovom radu nije nađena povezanost između histološke slike plaka i simptoma što je prisutno i u ranijim istraživanjima i ukazuje na nedostatak dovoljno specifičnih i senzitivnih kriterija kojima bi se mogla procijeniti vulnerabilnost plaka. Značajna povezanost EL i s histološkom slikom plaka i sa simptomatologijom upućuje da bi se EL potencijalno mogla koristiti kao jedan od histoloških markera vulnerabilnosti plaka. Plazmatska EL bila je povišena kod simptomatskih bolesnika bez obzira na vrijeme i lokalizaciju simptoma, a nije bila povezana s ekspresijom EL u plaku. Navedeno ukazuje da na razinu plazmatske EL ne utječe povećana ekspresija na jednom lokusu već ona moguće ovisi o globalnoj endotelnoj disfunkciji i općenito pojačanoj ekspresiji u svim arterijama. Pušenje i arterijska hipertenzija, čimbenici koji oštećuju endotel na kemijski i mehanički način i na taj način dovode do endotelne disfunkcije, bili su pozitivno povezani s plazmatskom razinom EL. HsCRP i IL-6 bili su iznad razine nađene kod normalne populacije, ali nije bilo očekivane povezanosti s kliničkom prezentacijom što je vjerovatno uzrokovano činjenicom da svi bolesnici već imaju uznapredovalu aterosklerozu. To implicira da je u toj fazi bolesti EL u plazmi osjetljiviji pokazatelj rizika za cerebrovaskularne (a možda i za kardiovaskularne) događaje nego hsCRP.

8. SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic fibro-proliferative and immuno-inflammatory artery disease characterized by the endothelial dysfunction, local oxidation of circulating lipoproteins, their accumulation in the vascular wall and activation of proinflammatory cytokine genes. Clinical presentation of atherosclerosis is initiated by plaque destabilization due to a local inflammatory process. EL is a new member of triglyceride lipase gene family which is likely to have an important role in plaque destabilization by way of local inflammation. EL expression is increased under the influence of proinflammatory cytokines, oxidized LDL and lipopolisaccharides in essential cellular agents of plaque destabilization, macrophages. On the other hand, EL promotes monocytes/macrophages adhesion and cleaves HDL-phosphatidylcholine (HDL-PC) into bioactive molecules, lysophosphatidylcholines (lyso-PC) and free fatty acids (FFA) capable to activate inflammatory cytokines, via its phospholipase A1 activity. The main objective of this study was to evaluate the relationship between the following: the expression of EL in human carotid atherosclerotic plaque and serum level of EL versus clinical presentation and degree of plaque instability. Final study population included 66 patients with proven significant (>70%) unilateral stenosis of carotid artery admitted for carotid endarterectomy (CEA). Patients were grouped as follows: 1) asymptomatic group (42 pts) and 2) symptomatic group (24 pts). The carotid stenosis was considered symptomatic if a patient had suffered a focal neurological symptom (ipsilateral stroke, transient ischemic attack or monocular blindness), sudden in onset and referable to the respective carotid artery within 4 months of CEA. Histological examination was performed in order to find features indicative of plaque vulnerability. Plaques were defined as: 1) fibrous (F) covered by a smooth luminal surface, 2) ulcerated non-complicated (UNC) with thin, fissured or ruptured cap, and 3) ulcerated-complicated (UC) with thin fissured or ruptured cap, intra plaque hemorrhage and/or thrombus. Immunohistochemistry was performed using the rabbit clonal anti-human CD163 (specific for macrophages) and rabbit anti-EL antibody. The expression of EL was evaluated on a semi-quantitative scale as follows: 1) (A) low staining (0–25% positive cells), and 2) (B) high staining (>25% positive cells). EL plasma protein levels were analyzed in 55 patients by ELISA method.

Results: Symptomatic patients more frequently had highly significant (95-99%) stenosis ($p=0,027$) and echolucent zones in plaques ($p=0,039$), but there was no significant difference

between the groups in histological features ($p=0,213$). In F plaques the EL immunostaining was weak (type A) and detected in endothelial layer and in cells within the fibrous cap. In contrary, in UC plaques the EL immunostaining was more pronounced (type B) and localized between the necrotic core and the fibrous cap where macrophages dominated. The intensity of the EL immunostaining type B was most frequently observed in UC plaques, followed by the UNC and F plaques (79:50:33%, $p=0,004$). EL plasma levels were significantly higher in patients with arterial hypertension ($p=0,004$), smokers ($p=0,058$), patients taking ACE inhibitors ($p=0,018$) and Ca blockers ($p=0,05$). EL plasma levels were similar in patients with the EL immunostaining A and B ($p= 0,378$) and were not significantly correlated with hsCRP, IL-6, HDL and LDL plasma levels. Compared to the *no symptoms* group the *new symptoms* group (symptoms present within 4 month referable to carotid artery) and the *old symptoms* group (other symptomatic patients) had significantly higher EL plasma level ($p=0,011$) whereas the two symptomatic groups of patients showed no significant difference.

The confirmation of hypothesis that the EL is more expressed in carotid plaques of symptomatic patients and in vulnerable plaques proves its connection with plaque destabilization. This connection is also supported by the fact that EL is mostly expressed in region between the necrotic core and the fibrous cap of vulnerable plaques where macrophages dominate. In line with some previous studies, there was no correlation between histological type and symptoms, which suggests the lack of sensitive and specific histological criteria to confirm plaque vulnerability. The significant relationship between the EL immunostaining and histologic features as well as the EL immunostaining and symptoms suggests that EL could be used in future as one of the markers of plaque vulnerability. EL plasma levels were increased in symptomatic patients irrespective to time of occurrence and localization of symptoms. Furthermore, EL plasma levels were not associated with the intensity of EL immunostaining within carotid plaques. This suggests that EL plasma level is not significantly influenced by increased focal expression of the EL in one plaque. Rather it is influenced by global endothelial dysfunction and generally increased expression in all arteries. Higher levels of EL plasma levels were found in patients with arterial hypertension and smoking as two risk factors capable of inducing endothel dysfunction, the former mechanically and the latter chemically. HsCRP and IL-6 levels where higher than in healthy population, but there was noconnection to symptoms, probably due to the advanced stage of atherosclerosis. This implicates that EL plasma level is at this stage of disease probably a more sensitive marker of cerebrovascular (and possible cardiovascular) events than hsCRP.

9. REFERENCE

1. Croatian public health institute. Publication for 2007. Zagreb: Croatian public health institute, 2007.
2. Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, Sarti C, Torrent M, Wolfe CD. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke*. 2009;40:1557-1563
3. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Kittner SJ, Bond MG, Wolfson SK, Jr., Bommer W, Price TR, Gardin JM, Savage PJ. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the cardiovascular health study. The CHS collaborative research group. *Stroke*. 1992;23:1752-1760
4. Sacco RL, Kargman DE, Gu Q, Zamanillo MC. Race-ethnicity and determinants of intracranial atherosclerotic cerebral infarction. The northern Manhattan stroke study. *Stroke*. 1995;26:14-20
5. Wityk RJ, Lehman D, Klag M, Coresh J, Ahn H, Litt B. Race and sex differences in the distribution of cerebral atherosclerosis. *Stroke*. 1996;27:1974-1980
6. Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, Koudstaal PJ, Witteman JC, Grobbee DE, Hofman A, Breteler MM. Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: The Rotterdam study. *Circulation*. 2002;105:2872-2877
7. Stork S, van den Beld AW, von Schacky C, Angermann CE, Lamberts SW, Grobbee DE, Bots ML. Carotid artery plaque burden, stiffness, and mortality risk in elderly men: A prospective, population-based cohort study. *Circulation*. 2004;110:344-348
8. Fisher M. Occlusion of the internal carotid artery. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1951;65:346-377
9. Fisher CM. Observations of the fundus oculi in transient monocular blindness. *Neurology*. 1959;9:333-347
10. World Health Organization (1978). Cerebrovascular disorders (offset publications). Geneva.
11. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, Sherman DG. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med*. 2002;347:1713-1716
12. Kleindorfer D, Panagos P, Pancioli A, Khoury J, Kissela B, Woo D, Schneider A, Alwell K, Jauch E, Miller R, Moomaw C, Shukla R, Broderick JP. Incidence and short-term prognosis of transient ischemic attack in a population-based study. *Stroke*. 2005;36:720-723
13. Lovett JK, Dennis MS, Sandercock PA, Bamford J, Warlow CP, Rothwell PM. Very early risk of stroke after a first transient ischemic attack. *Stroke*. 2003;34:e138-140
14. Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 1996;23:755-765; discussion 765-756
15. Clinical alert: Benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of the internal carotid artery. National Institute of Neurological Disorders and Stroke

- stroke and trauma division. North american symptomatic carotid endarterectomy trial (nascet) investigators. *Stroke*. 1991;22:816-817
16. Young B, Moore WS, Robertson JT, Toole JF, Ernst CB, Cohen SN, Broderick JP, Dempsey RJ, Hosking JD. An analysis of perioperative surgical mortality and morbidity in the asymptomatic carotid atherosclerosis study. Acas investigators. Asymptomatic carotid atherosclerosis study. *Stroke*. 1996;27:2216-2224
 17. Halliday AW, Thomas D, Mansfield A. The asymptomatic carotid surgery trial (acst). Rationale and design. Steering committee. *Eur J Vasc Surg*. 1994;8:703-710
 18. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive committee for the asymptomatic carotid atherosclerosis study. *JAMA*. 1995;273:1421-1428
 19. Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, Thomas D. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: Randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363:1491-1502
 20. Goessens BM, Visseren FL, Kappelle LJ, Algra A, van der Graaf Y. Asymptomatic carotid artery stenosis and the risk of new vascular events in patients with manifest arterial disease: The smart study. *Stroke*. 2007;38:1470-1475
 21. Nicolaides AN, Kakkos S, Griffin M, Geroulakos G, Ioannidou E. Severity of asymptomatic carotid stenosis and risk of ipsilateral hemispheric ischaemic events: Results from the acsr study. Nicolaides et al.: *Ejves* 2005; 30: 275-284. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31:336
 22. Carra G, Visona A, Bonanome A, Lusiani L, Pesavento R, Bortolon M, Pagnan A. Carotid plaque morphology and cerebrovascular events. *Int Angiol*. 2003;22:284-289
 23. Prabhakaran S, Rundek T, Ramas R, Elkind MS, Paik MC, Boden-Albala B, Sacco RL. Carotid plaque surface irregularity predicts ischemic stroke: The northern manhattan study. *Stroke*. 2006;37:2696-2701
 24. Nicolaides AN, Kakkos SK, Griffin M, Sabetai M, Dhanjil S, Thomas DJ, Geroulakos G, Georgiou N, Francis S, Ioannidou E, Dore CJ. Effect of image normalization on carotid plaque classification and the risk of ipsilateral hemispheric ischemic events: Results from the asymptomatic carotid stenosis and risk of stroke study. *Vascular*. 2005;13:211-221
 25. Svindland A, Torvik A. Atherosclerotic carotid disease in asymptomatic individuals: An histological study of 53 cases. *Acta Neurol Scand*. 1988;78:506-517
 26. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke*. 2000;31:774-781
 27. Fisher M, Paganini-Hill A, Martin A, Cosgrove M, Toole JF, Barnett HJ, Norris J. Carotid plaque pathology: Thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis. *Stroke*. 2005;36:253-257
 28. Wolpert SM, Caplan LR. Current role of cerebral angiography in the diagnosis of cerebrovascular diseases. *AJR Am J Roentgenol*. 1992;159:191-197
 29. Hankey GJ, Warlow CP, Sellar RJ. Cerebral angiographic risk in mild cerebrovascular disease. *Stroke*. 1990;21:209-222
 30. Mathiesen EB, Bonna KH, Joakimsen O. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: The tromso study. *Circulation*. 2001;103:2171-2175
 31. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler RE. Carotid artery stenosis: Gray-scale and doppler us diagnosis--society of radiologists in ultrasound consensus conference. *Radiology*. 2003;229:340-346

32. Lal BK, Hobson RW, 2nd, Pappas PJ, Kubicka R, Hameed M, Chakhtoura EY, Jamil Z, Padberg FT, Jr., Haser PB, Duran WN. Pixel distribution analysis of b-mode ultrasound scan images predicts histologic features of atherosclerotic carotid plaques. *J Vasc Surg.* 2002;35:1210-1217
33. Redgrave JN, Coutts SB, Schulz UG, Briley D, Rothwell PM. Systematic review of associations between the presence of acute ischemic lesions on diffusion-weighted imaging and clinical predictors of early stroke risk after transient ischemic attack. *Stroke.* 2007;38:1482-1488
34. Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg.* 2004;40:469-475
35. Arthurs ZM, Andersen C, Starnes BW, Sohn VY, Mullenix PS, Perry J. A prospective evaluation of c-reactive protein in the progression of carotid artery stenosis. *J Vasc Surg.* 2008;47:744-750; discussion 751
36. Alvarez Garcia B, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity c-reactive protein in high-grade carotid stenosis: Risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg.* 2003;38:1018-1024
37. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North american symptomatic carotid endarterectomy trial collaborators. *N Engl J Med.* 1998;339:1415-1425
38. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: Final results of the mrc european carotid surgery trial (ecst). *Lancet.* 1998;351:1379-1387
39. Brott TG, Hobson RW, 2nd, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, Mackey A, Hill MD, Leimgruber PP, Sheffet AJ, Howard VJ, Moore WS, Voeks JH, Hopkins LN, Cutlip DE, Cohen DJ, Popma JJ, Ferguson RD, Cohen SN, Blackshear JL, Silver FL, Mohr JP, Lal BK, Meschia JF. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med.* 2010;363:11-23
40. North american symptomatic carotid endarterectomy trial. Methods, patient characteristics, and progress. *Stroke.* 1991;22:711-720
41. Mrc european carotid surgery trial: Interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European carotid surgery trialists' collaborative group. *Lancet.* 1991;337:1235-1243
42. Rothwell PM, Goldstein LB. Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis: Asymptomatic carotid surgery trial. *Stroke.* 2004;35:2425-2427
43. Yadav JS, Wholey MH, Kuntz RE, Fayad P, Katzen BT, Mishkel GJ, Bajwa TK, Whitlow P, Strickman NE, Jaff MR, Popma JJ, Snead DB, Cutlip DE, Firth BG, Ouriel K. Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2004;351:1493-1501
44. Harrod-Kim P, Kadkhodayan Y, Derdeyn CP, Cross DT, 3rd, Moran CJ. Outcomes of carotid angioplasty and stenting for radiation-associated stenosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26:1781-1788
45. Bond R, Rekasem K, Naylor AR. Systematic review of randomized trial of carotid endarterectomy with primary closure and patch angioplasty with saphenous vein, jugular vein, and polytetrafluorethylene: Long-term follow-up. *J Vasc Surg.* 1998;22:222
46. Lewis SC, Warlow CP, Bodenham AR, Colam B, Rothwell PM, Torgerson D, Dellagrammaticas D, Horrocks M, Liapis C, Banning AP, Gough M, Gough MJ.

- General anaesthesia versus local anaesthesia for carotid surgery (gala): A multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372:2132-2142
47. Chaturvedi S, Bruno A, Feasby T, Holloway R, Benavente O, Cohen SN, Cote R, Hess D, Saver J, Spence JD, Stern B, Wilterdink J. Carotid endarterectomy--an evidence-based review: Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the american academy of neurology. *Neurology*. 2005;65:794-801
 48. McGirt MJ, Perler BA, Brooke BS, Woodworth GF, Coon A, Jain S, Buck D, Roseborough GS, Tamargo RJ, Heller J, Freischlag JA, Williams GM. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors reduce the risk of perioperative stroke and mortality after carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. 2005;42:829-836; discussion 836-827
 49. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, Degraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL. Primary prevention of ischemic stroke: A guideline from the american heart association/american stroke association stroke council: Cosponsored by the atherosclerotic peripheral vascular disease interdisciplinary working group; cardiovascular nursing council; clinical cardiology council; nutrition, physical activity, and metabolism council; and the quality of care and outcomes research interdisciplinary working group: The american academy of neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*. 2006;37:1583-1633
 50. Hobson RW, 2nd, Weiss DG, Fields WS, Goldstone J, Moore WS, Towne JB, Wright CB. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. The veterans affairs cooperative study group. *N Engl J Med*. 1993;328:221-227
 51. Abbott AL, Bladin CF, Levi CR, Chambers BR. What should we do with asymptomatic carotid stenosis? *Int J Stroke*. 2007;2:27-39
 52. Abbott AL. Medical (nonsurgical) intervention alone is now best for prevention of stroke associated with asymptomatic severe carotid stenosis: Results of a systematic review and analysis. *Stroke*. 2009;40:e573-583
 53. Lawes CM, Bennett DA, Feigin VL, Rodgers A. Blood pressure and stroke: An overview of published reviews. *Stroke*. 2004;35:776-785
 54. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ace inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: Results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood pressure lowering treatment trialists' collaboration. *Lancet*. 2000;356:1955-1964
 55. Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts. Prospective studies collaboration. *Lancet*. 1995;346:1647-1653
 56. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, Kase CS, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Manson JE. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med*. 2002;162:2557-2562
 57. Sillesen H, Amarenco P, Hennerici MG, Callahan A, Goldstein LB, Zivin J, Messig M, Welch KM. Atorvastatin reduces the risk of cardiovascular events in patients with carotid atherosclerosis: A secondary analysis of the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels (sparcl) trial. *Stroke*. 2008;39:3297-3302
 58. Mrc/bhf heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7-22
 59. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Jr., Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358:2545-2559

60. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the collaborative atorvastatin diabetes study (cards): Multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:685-696
61. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86
62. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 1995;332:286-291
63. Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The atherosclerosis risk in communities study. *Circulation*. 1993;87:1107-1113
64. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J, Jr. Homocysteine lowering with folic acid and b vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 2006;354:1567-1577
65. Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring JE, Manson JE. Effect of folic acid and b vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: A randomized trial. *JAMA*. 2008;299:2027-2036
66. Kawamoto R, Tomita H, Oka Y, Kodama A, Kamitani A. Metabolic syndrome amplifies the ldl-cholesterol associated increases in carotid atherosclerosis. *Intern Med*. 2005;44:1232-1238
67. Kawamoto R, Tomita H, Oka Y, Ohtsuka N, Kamitani A. Metabolic syndrome and carotid atherosclerosis: Role of elevated blood pressure. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12:268-275
68. Irace C, Cortese C, Fiaschi E, Carallo C, Sesti G, Farinaro E, Gnasso A. Components of the metabolic syndrome and carotid atherosclerosis: Role of elevated blood pressure. *Hypertension*. 2005;45:597-601
69. Winter Y, Rohrmann S, Linseisen J, Lanczik O, Ringleb PA, Hebebrand J, Back T. Contribution of obesity and abdominal fat mass to risk of stroke and transient ischemic attacks. *Stroke*. 2008;39:3145-3151
70. A randomized trial of aspirin and sulfipyrazone in threatened stroke. The canadian cooperative study group. *N Engl J Med*. 1978;299:53-59
71. Diener H, Bogousslavsky J, Brass LM. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (match): Randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005;331-337
72. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350:1495-1504
73. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516
74. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of hdl metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96:1221-1232
75. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant apo-a-i milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:2292-2300

76. Reiner Ž. Ateroskleroza. In: Božidar vrhovac et al. Interna medicina. 3 rd ed. Zagreb: Naklada Ljevak. 2003;p:584-588
77. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002;196:887-896
78. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: A possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-1161
79. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 1994;331:417-424
80. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation.* 1996;94:874-877
81. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. *Circulation.* 2003;107:499-511
82. Verma S, Szmitko PE, Yeh ET. C-reactive protein: Structure affects function. *Circulation.* 2004;109:1914-1917
83. Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D. Evaluation of c-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: A statement for health care professionals from the crp pooling project members. *Stroke.* 2005;36:1316-1329
84. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843
85. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of c-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation.* 1998;98:731-733
86. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of c-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565
87. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and hdl cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation.* 1998;97:2007-2011
88. Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH, Polak JF, Sutton-Tyrrell K, Herrington DM, Price TR, Cushman M. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: The cardiovascular health study. *Circulation.* 2003;108:166-170
89. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-979
90. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PW. Plasma concentration of c-reactive protein and risk of

- ischemic stroke and transient ischemic attack: The framingham study. *Stroke*. 2001;32:2575-2579
91. Schumacher H, Kaiser E, Schnabel PA, Sykora J, Eckstein HH, Allenberg JR. Immunophenotypic characterisation of carotid plaque: Increased amount of inflammatory cells as an independent predictor for ischaemic symptoms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;21:494-501
 92. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:981-985
 93. Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Ribo M, Huertas R, Rosell A, Penalba A, Ortega L, Chacon P, Alvarez-Sabin J. Poststroke c-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke*. 2006;37:1205-1210
 94. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase a2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: The rotterdam study. *Circulation*. 2005;111:570-575
 95. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, Myerson M, Wu KK, Sharrett AR, Boerwinkle E. Lipoprotein-associated phospholipase a2, high-sensitivity c-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the atherosclerosis risk in communities (aric) study. *Arch Intern Med*. 2005;165:2479-2484
 96. Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity c-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase a2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med*. 2006;166:2073-2080
 97. Elkind M, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. Lipoprotein-associated phospholipase a2 activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(1):42-50
 98. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on c-reactive protein levels: The pravastatin inflammation/crp evaluation (prince): A randomized trial and cohort study. *JAMA*. 2001;286:64-70
 99. Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in c-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;103:1191-1193
 100. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352:20-28
 101. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Lipoprotein-associated phospholipase a2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the prove it-timi 22 (pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction) trial. *Circulation*. 2006;113:1745-1752
 102. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Szarek M, Waters DD, Libby P, Ganz P. Inflammation, statin therapy, and risk of stroke after an acute coronary syndrome in the miracl study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:142-147
 103. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated c-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195-2207
 104. Oram JF, Vaughan AM. Abca1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to hdl apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:253-260

105. Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 1996;271:29427-29435
106. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. Hdl, hdl2, and hdl3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern finnish men. *Circulation.* 1991;84:129-139
107. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:174-182
108. Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JW, Bainton D, Baker IA, Elwood PC, Miller NE. Associations of the hdl2 and hdl3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in british men. The caerphilly and speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation.* 1994;90:769-774
109. Ruotolo G, Ericsson CG, Tettamanti C, Karpe F, Grip L, Svane B, Nilsson J, de Faire U, Hamsten A. Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (becait). *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:1648-1656
110. Guerin M, Egger P, Soudant C, Le Goff W, van Tol A, Dupuis R, Chapman MJ. Dose-dependent action of atorvastatin in type iib hyperlipidemia: Preferential and progressive reduction of atherogenic apob-containing lipoprotein subclasses (vldl-2, idl, small dense ldl) and stimulation of cellular cholesterol efflux. *Atherosclerosis.* 2002;163:287-296
111. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM, Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: Results of afcaps/texcaps. Air force/texas coronary atherosclerosis prevention study. *JAMA.* 1998;279:1615-1622
112. Mrc/bhf heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002;360:23-33
113. Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: Va-hit: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;285:1585-1591
114. Rubins H, Robins SJ, Collins D. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol *N Engl J Med.* 1999;341:410-418
115. Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marcil M, Roomp K, Zwarts KY, Collins JA, Roelants R, Tamasawa N, Stulc T, Suda T, Ceska R, Boucher B, Rondeau C, DeSouich C, Brooks-Wilson A, Molhuizen HO, Frohlich J, Genest J, Jr., Hayden MR. Age and residual cholesterol efflux affect hdl cholesterol levels and coronary artery disease in abca1 heterozygotes. *J Clin Invest.* 2000;106:1263-1270
116. Wu JH, Lee YT, Hsu HC, Hsieh LL. Influence of cetsp gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease: A survey in taiwan. *Atherosclerosis.* 2001;159:451-458
117. Davidson MH, Maki K, Umporowicz D, Wheeler A, Rittershaus C, Ryan U. The safety and immunogenicity of a cetsp vaccine in healthy adults. *Atherosclerosis.* 2003;169:113-120

118. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:Cholesterol acyltransferase (lcat) deficiency syndromes. *J Lipid Res.* 1997;38:191-205
119. Beulens JW, Sierksma A, van Tol A, Fournier N, van Gent T, Paul JL, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption increases cholesterol efflux mediated by abca1. *J Lipid Res.* 2004;45:1716-1723
120. Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism.* 2004;53:1262-1267
121. Zaratin AC, Quintao EC, Sposito AC, Nunes VS, Lottenberg AM, Morton RE, de Faria EC. Smoking prevents the intravascular remodeling of high-density lipoprotein particles: Implications for reverse cholesterol transport. *Metabolism.* 2004;53:858-862
122. Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the t-cell cytokine interferon-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1995-2002
123. Panousis CG, Evans G, Zuckerman SH. Tgf-beta increases cholesterol efflux and abc-1 expression in macrophage-derived foam cells: Opposing the effects of ifn-gamma. *J Lipid Res.* 2001;42:856-863
124. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, Karanicolas PJ, Akl EA, Wu P, Blechacz B, Bassler D, Wei X, Sharman A, Whitt I, Alves da Silva S, Khalid Z, Nordmann AJ, Zhou Q, Walter SD, Vale N, Bhatnagar N, O'Regan C, Mills EJ, Bucher HC, Montori VM, Guyatt GH. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: Systematic review and meta-regression analysis. *BMJ.* 2009;338:b92
125. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;357:2109-2122
126. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011;364:127-135
127. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The long-term intervention with pravastatin in ischaemic disease (lipid) study group. *N Engl J Med.* 1998;339:1349-1357
128. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The scandinavian simvastatin survival study (4s). *Lancet.* 1994;344:1383-1389
129. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and recurrent events trial investigators. *N Engl J Med.* 1996;335:1001-1009
130. Third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii) final report. *Circulation.* 2002;106(25):3143-3151
131. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, Qin J, Ray KK, Braunwald E. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the prove it-timi 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:724-730

132. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366:1267-1278
133. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol*. 2002;90:22i-29i
134. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (jelis): A randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007;369:1090-1098
135. Davidson MH, Stein EA, Bays HE, Maki KC, Doyle RT, Shalwitz RA, Ballantyne CM, Ginsberg HN. Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: An 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Ther*. 2007;29:1354-1367
136. Mc Kenney J. New perspectives on the use of niacin in the treatment of lipid disorders. *Arch Intern Med*. 2004;164(7):697-705
137. Karas RH, Kashyap ML, Knopp RH, Keller LH, Bajorunas DR, Davidson MH. Long-term safety and efficacy of a combination of niacin extended release and simvastatin in patients with dyslipidemia: The oceans study. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2008;8:69-81
138. Zhao XQ, Morse JS, Dowdy AA, Heise N, DeAngelis D, Frohlich J, Chait A, Albers JJ, Brown BG. Safety and tolerability of simvastatin plus niacin in patients with coronary artery disease and low high-density lipoprotein cholesterol (the hdl atherosclerosis treatment study). *Am J Cardiol*. 2004;93:307-312
139. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesaniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the field study): Randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366:1849-1861
140. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (field study): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370:1687-1697
141. Davidson MH. Combination therapy for dyslipidemia: Safety and regulatory considerations. *Am J Cardiol*. 2002;90:50K-60K
142. Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem*. 1999;274:14170-14175
143. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ. A novel endothelial-derived lipase that modulates hdl metabolism. *Nat Genet*. 1999;21:424-428
144. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res*. 2002;43:921-929
145. Broedl UC, Maugeais C, Millar JS, Jin W, Moore RE, Fuki IV, Marchadier D, Glick JM, Rader DJ. Endothelial lipase promotes the catabolism of apob-containing lipoproteins. *Circ Res*. 2004;94:1554-1561

146. Paradis ME, Rader DJ, Badellino KO. Endothelial lipase is a major determinant of ldl peak particle size. *Circulation*. 2004;110:145
147. Maugeais C, Tietge UJ, Broedl UC, Marchadier D, Cain W, McCoy MG, Lund-Katz S, Glick JM, Rader DJ. Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation*. 2003;108:2121-2126
148. Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin EM, Cooper AD, Quertermous T. Endothelial lipase is a major determinant of hdl level. *J Clin Invest*. 2003;111:347-355
149. Ishida T, Choi SY, Kundu RK, Spin J, Yamashita T, Hirata K, Kojima Y, Yokoyama M, Cooper AD, Quertermous T. Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-e-deficient mice. *J Biol Chem*. 2004;279:45085-45092
150. Jin W, Millar JS, Broedl U, Glick JM, Rader DJ. Inhibition of endothelial lipase causes increased hdl cholesterol levels in vivo. *J Clin Invest*. 2003;111:357-362
151. Broedl UC, Maugeais C, Marchadier D, Glick JM, Rader DJ. Effects of nonlipolytic ligand function of endothelial lipase on high density lipoprotein metabolism in vivo. *J Biol Chem*. 2003;278:40688-40693
152. Smith CE, Arnett DK, Tsai MY, Lai CQ, Parnell LD, Shen J, Laclaustra M, Junyent M, Ordovas JM. Physical inactivity interacts with an endothelial lipase polymorphism to modulate high density lipoprotein cholesterol in the goldn study. *Atherosclerosis*. 2009;206:500-504
153. Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, Rader DJ, Rothblat GH. In vivo modulation of hdl phospholipid has opposing effects on sr-bi- and abca1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2004;45:337-346
154. Qiu G, Hill JS. Endothelial lipase promotes apolipoprotein ai-mediated cholesterol efflux in thp-1 macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:84-91
155. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein a-i. *J Lipid Res*. 2005;46:896-903
156. Fuki IV, Blanchard N, Jin W, Marchadier DH, Millar JS, Glick JM, Rader DJ. Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:34331-34338
157. Strauss JG, Zimmermann R, Hrzenjak A, Zhou Y, Kratky D, Levak-Frank S, Kostner GM, Zechner R, Frank S. Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein (hdl) particles and the selective uptake of hdl-associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *Biochem J*. 2002;368:69-79
158. Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, Yasuda T, Ueyama T, Kojima Y, Kundu RK, Quertermous T, Ishikawa Y, Hirata K. Role of endothelial lipase in plasma hdl levels in a murine model of hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:327-338
159. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Med*. 2006;3:e22
160. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor bi-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem*. 2009;284:6093-6100
161. Wiersma H, Gatti A, Nijstad N, Kuipers F, Tietge UJ. Hepatic sr-bi, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res*. 2009;50:1571-1580
162. Brown RJ, Lagor WR, Sankaranarayanan S, Yasuda T, Quertermous T, Rothblat GH, Rader DJ. Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on

- the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein b-containing lipoproteins. *Circ Res.* 2010;107:357-364
163. Hirata K, Ishida T, Matsushita H, Tsao PS, Quertermous T. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:90-93
 164. Shimokawa Y, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Inoue N, Quertermous T, Yokoyama M. Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2005;66:594-600
 165. Jin W, Sun GS, Marchadier D, Octaviani E, Glick JM, Rader DJ. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. *Circ Res.* 2003;92:644-650
 166. Yasuda T, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, Quertermous T, Yokoyama M. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes ldl uptake in macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 2007;14:192-201
 167. Kruth HS, Huang W, Ishii I, Zhang WY. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2002;277:34573-34580
 168. Inoue T, Hayashi M, Takayanagi K, Morooka S. Lipid-lowering therapy with fluvastatin inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and improves vascular endothelial function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2002;160:369-376
 169. Jin W, Fuki IV, Seidah NG, Benjannet S, Glick JM, Rader DJ. Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem.* 2005;280:36551-36559
 170. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, Shimizugawa T, Ando Y, Koishi R, Kohama T, Sakai N, Kotani K, Komuro R, Ishida T, Hirata K, Yamashita S, Furukawa H, Shimomura I. Angiotensin-like protein3 regulates plasma hdl cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:366-372
 171. Broedl UC, Jin W, Fuki IV, Millar JS, Rader DJ. Endothelial lipase is less effective at influencing hdl metabolism in vivo in mice expressing apoA-II. *J Lipid Res.* 2006;47:2191-2197
 172. Azumi H, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Rikitake Y, Takeuchi S, Inoue N, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Quertermous T, Yokoyama M. Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 2003;58:647-654
 173. Kojima Y, Hirata K, Ishida T, Shimokawa Y, Inoue N, Kawashima S, Quertermous T, Yokoyama M. Endothelial lipase modulates monocyte adhesion to the vessel wall. A potential role in inflammation. *J Biol Chem.* 2004;279:54032-54038
 174. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2748-2753
 175. Liu WY, Yin RX, Zhang L, Cao XL, Miao L, Wu DF, Aung LH, Hu XJ, Lin WX, Yang DZ. Association of the lipg 584c > t polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Bai and Han populations. *Lipids Health Dis.* 2010;9:110
 176. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Deshaies Y, Couture P, Archer WR, Bergeron N, Lamarche B. Endothelial lipase is associated with inflammation in humans. *J Lipid Res.* 2006;47:2808-2813
 177. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. *Circulation.* 2008;117:678-685
 178. Matsuo Y, Hashizume T, Shioji S, Akasaka T. Metabolic syndrome is strongly associated with chronic subclinical inflammation in patients achieving optimal low-

- density lipoprotein-cholesterol levels in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circ J*. 2008;72:2046-2050
179. Gauster M, Hiden U, Blaschitz A, Frank S, Lang U, Alvino G, Cetin I, Desoye G, Wadsack C. Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2256-2263
180. Shiu SW, Tan KC, Huang Y, Wong Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis*. 2008;198:441-447
181. Qiu G, Ho AC, Yu W, Hill JS. Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in thp-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. *J Lipid Res*. 2007;48:385-394
182. Bartels ED, Nielsen JE, Lindegaard ML, Hulten LM, Schroeder TV, Nielsen LB. Endothelial lipase is highly expressed in macrophages in advanced human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2007;195:e42-49
183. Qiu G, Hill JS. Atorvastatin decreases lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in human thp-1 macrophages. *J Lipid Res*. 2007;48:2112-2122
184. Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, Cupples LA, Demissie S, Manning AK, Jensen MK, Rimm EB, Wang J, Rodrigues A, Bamba V, Khetarpal SA, Wolfe ML, Derohannessian S, Li M, Reilly MP, Aberle J, Evans D, Hegele RA, Rader DJ. Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated hdl cholesterol in humans. *J Clin Invest*. 2009;119:1042-1050
185. Ko KW, Paul A, Ma K, Li L, Chan L. Endothelial lipase modulates hdl but has no effect on atherosclerosis development in apoe^{-/-} and ldlr^{-/-} mice. *J Lipid Res*. 2005;46:2586-2594
186. Ahmed W, Orasanu G, Nehra V, Asatryan L, Rader DJ, Ziouzenkova O, Plutzky J. High-density lipoprotein hydrolysis by endothelial lipase activates pparalpha: A candidate mechanism for high-density lipoprotein-mediated repression of leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2006;98:490-498
187. Qiu G, Hill JS. Endothelial lipase enhances low density lipoprotein binding and cell association in thp-1 macrophages. *Cardiovasc Res*. 2007;76:528-538
188. Whitworth JA. 2003 world health organization (who)/international society of hypertension (ish) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003;21:1983-1992
189. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-1062
190. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1512-1531
191. Sutton-Tyrrell K, Alcorn HG, Wolfson SK, Jr., Kelsey SF, Kuller LH. Predictors of carotid stenosis in older adults with and without isolated systolic hypertension. *Stroke*. 1993;24:355-361
192. Wilson PW, Hoeg JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Belanger AM, Poehlmann H, O'Leary D, Wolf PA. Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1997;337:516-522
193. Rodgers A, MacMahon S, Gamble G, Slattery J, Sandercock P, Warlow C. Blood pressure and risk of stroke in patients with cerebrovascular disease. The united kingdom transient ischaemic attack collaborative group. *BMJ*. 1996;313:147
194. Meta-analysis of hypertension treatment trials. *Lancet*. 1990;335:1092-1094

195. Superko HR. Lipid disorders contributing to coronary heart disease: An update. *Curr Probl Cardiol.* 1996;21:736-780
196. Kurth T, Everett BM, Buring JE, Kase CS, Ridker PM, Gaziano JM. Lipid levels and the risk of ischemic stroke in women. *Neurology.* 2007;68:556-562
197. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: A meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet.* 2007;370:1829-1839
198. van der Meer IM, Iglesias del Sol A, Hak AE, Bots ML, Hofman A, Witteman JC. Risk factors for progression of atherosclerosis measured at multiple sites in the arterial tree: The rotterdam study. *Stroke.* 2003;34:2374-2379
199. Wagenknecht LE, D'Agostino R, Jr., Savage PJ, O'Leary DH, Saad MF, Haffner SM. Duration of diabetes and carotid wall thickness. The insulin resistance atherosclerosis study (iras). *Stroke.* 1997;28:999-1005
200. United kingdom transient ischaemic attack (uk-tia) aspirin trial: Interim results. Uk-tia study group. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988;296:316-320
201. Howard G, Wagenknecht LE, Cai J, Cooper L, Kraut MA, Toole JF. Cigarette smoking and other risk factors for silent cerebral infarction in the general population. *Stroke.* 1998;29:913-917
202. Tell GS, Rutan GH, Kronmal RA, Bild DE, Polak JF, Wong ND, Borhani NO. Correlates of blood pressure in community-dwelling older adults. The cardiovascular health study. Cardiovascular health study (chs) collaborative research group. *Hypertension.* 1994;23:59-67
203. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. 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.* 2000;342:145-153
204. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, Gorelick P, Halperin J, Harbaugh R, Johnston SC, Katzan I, Kelly-Hayes M, Kenton EJ, Marks M, Schwamm LH, Tomsick T. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: A statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association council on stroke: Co-sponsored by the council on cardiovascular radiology and intervention: The american academy of neurology affirms the value of this guideline. *Stroke.* 2006;37:577-617
205. Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, Matteis M, Passarelli F, Troisi E, Caltagirone C. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA.* 2000;283:2122-2127
206. Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, Cates CU, Creager MA, Fowler SB, Friday G, Hertzberg VS, McIff EB, Moore WS, Panagos PD, Riles TS, Rosenwasser RH, Taylor AJ. 2011 asa/accf/aha/aann/aans/acr/asnr/cns/saip/scap/sir/snis/svm/svs guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: Executive summary a report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines, and the american stroke association, american association of neuroscience nurses, american association of neurological surgeons, american college of radiology, american society of neuroradiology, congress of neurological surgeons, society of atherosclerosis imaging and prevention, society for cardiovascular angiography and interventions, society of interventional radiology, society of neurointerventional surgery, society for

- vascular medicine, and society for vascular surgery developed in collaboration with the american academy of neurology and society of cardiovascular computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1002-1044
207. Cote R, Battista RN, Abrahamowicz M, Langlois Y, Bourque F, Mackey A. Lack of effect of aspirin in asymptomatic patients with carotid bruits and substantial carotid narrowing. The asymptomatic cervical bruit study group. *Ann Intern Med*. 1995;123:649-655
 208. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. 1999;100:793-798
 209. Woodward M, Lowe GD, Francis LM, Rumley A, Cobbe SM. A randomized comparison of the effects of aspirin and clopidogrel on thrombotic risk factors and c-reactive protein following myocardial infarction: The cadet trial. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1934-1940
 210. Joynt KE, Gattis WA, Hasselblad V, Fuzaylov SY, Serebruany VL, Gurbel PA, Gaulden LH, Felker GM, Whellan DJ, O'Connor CM. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors, beta blockers, statins, and aspirin on c-reactive protein levels in outpatients with heart failure. *Am J Cardiol*. 2004;93:783-785
 211. Maksimovic M, Vlajinac H, Radak D, Maksimovic J, Otasevic P, Marinkovic J, Jorga J. Frequency and characteristics of metabolic syndrome in patients with symptomatic carotid atherosclerosis. *Rev Med Chil*. 2009;137:329-336
 212. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart study): Case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952
 213. Balkau B, Deanfield JE, Despres JP, Bassand JP, Fox KA, Smith SC, Jr., Barter P, Tan CE, Van Gaal L, Wittchen HU, Massien C, Haffner SM. International day for the evaluation of abdominal obesity (idea): A study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation*. 2007;116:1942-1951
 214. Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol*. 1999;84:28J-32J
 215. Holst D, Grimaldi PA. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:241-245
 216. Giannoukas AD, Sfyroeras GS, Griffin M, Saleptsis V, Antoniou GA, Nicolaidis AN. Association of plaque echostructure and cardiovascular risk factors with symptomatic carotid artery disease. *Vasa*. 2009;38:357-364
 217. Ding S, Zhang M, Zhao Y, Chen W, Yao G, Zhang C, Zhang P, Zhang Y. The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke. *Am J Med Sci*. 2008;336:27-31
 218. Kardoulas DG, Katsamouris AN, Gallis PT, Philippides TP, Anagnostakos NK, Gorgoyannis DS, Gourtsoyannis NC. Ultrasonographic and histologic characteristics of symptom-free and symptomatic carotid plaque. *Cardiovasc Surg*. 1996;4:580-590
 219. Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D, Alpers C, Strandness DE, Jr. Carotid plaque morphology and clinical events. *Stroke*. 1997;28:95-100
 220. Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H, Stoll G. Inflammation in high-grade carotid stenosis: A possible role for macrophages and t cells in plaque destabilization. *Stroke*. 1998;29:1625-1630

221. Seeger JM, Barratt E, Lawson GA, Klingman N. The relationship between carotid plaque composition, plaque morphology, and neurologic symptoms. *J Surg Res.* 1995;58:330-336
222. Gronholt MLM. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2-13
223. Bassiouny HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA, McKinsey JF, Piano G, Gewertz BL, Glagov S. Juxtalumenal location of plaque necrosis and neof ormation in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg.* 1997;26:585-594
224. Wechsler LR. Ulceration and carotid artery disease. *Stroke.* 1988;19:650-653
225. Dirksen MT, van der Wal AC, van den Berg FM, van der Loos CM, Becker AE. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow. *Circulation.* 1998;98:2000-2003
226. Raghunath PN, Tomaszewski JE, Brady ST, Caron RJ, Okada SS, Barnathan ES. Plasminogen activator system in human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1432-1443
227. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2839-2843
228. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145:33-43
229. Gauster M, Rechberger G, Sovic A, Horl G, Steyrer E, Sattler W, Frank S. Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J Lipid Res.* 2005;46:1517-1525
230. Rong JX, Berman JW, Taubman MB, Fisher EA. Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1617-1623
231. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:847-850
232. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-2415
233. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: A potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:972-978

10. POPIS PRILOGA

10.1. Popis slika

Slika 4.1-1. Dijagram toka bolesnika kod uključivanja u studiju

Slika 4.2-1. Imunohistokemija za endotelnu lipazu (primjeri tipa A i B)

Slika 4.2-2. Histologija - fibrozni plak (Hemalaun-Eozin)

Slika 4.2-3. Histologija – ulcerirani komplicirani plak

Slika 4.2-4. Lokalizacija endotelne lipaze u karotidnom plaku

Slika 5.2-1. Potencijali proaterogeni mehanizmi endotelne lipaze

10.2. Popis grafikona

Grafikon 4.1-1. Posebnosti bolesnika s dijabetesom melitusom i intolerancijom glukoze

Grafikon 4.1-2. Utjecaj statina na koncentraciju ukupnog kolesterola i LDL-a

Grafikon 4.2-1. Povezanost metaboličkog sindroma i simptoma

Grafikon 4.2-2. Razina CRP-a i IL-6 u skupinama *simptomatski* i *asimptomatski*

Grafikon 4.2-3. Histološka analiza plakova kod skupina *simptomatski* i *asimptomatski*

Grafikon 4.2-4. Ekspresija endotelne lipaze u ovisnosti o simptomima

Grafikon 4.2-5. Imunohistokemija u ovisnosti o histološkom tipu plaka

Grafikon 4.3-1. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s pušenjem (A) i arterijskom hipertenzijom (B)

Grafikon 4.3-2. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s primjenom ACE inhibitora (A) i blokatora kalcijevih kanala (B)

Grafikon 4.3-3. Povezanost između plazmatske razine endotelne lipaze (ng/ml) i jačine imunohistokemijske reakcija za endotelnu lipazu u plaku

Grafikon 4.3-4. Korelacija plazmatske razine endotelne lipaze i hsCRP-a (A) i HDL-a (B) u serumu bolesnika

Grafikon 4.3-5. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze sa simptomima prema kriterijima kakvi su korišteni kod analize plakova

Grafikon 4.3-6. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze nakon pregrupiranja u skupine *bez simptoma*, *svježi simptomi* i *stari simptomi*

10.3. Popis tablica

Tablica 1.4-1. Kriteriji za utvrđivanje stupnja stenozе karotidne arterije

Tablica 4.1-1. Kliničke karakteristike ukupne populacije uključene u studiju

Tablica 4.2-1. Kliničke karakteristike bolesnika i terapija podijeljene u skupine prema simptomima

Tablica 4.2-2. Laboratorijski pokazatelji bolesnika podijeljenih u skupine prema simptomima

Tablica 4.2-3. Stupanj stenozе, morfološke i histološke karakteristike plakova u skupinama *asimptomatski* i *simptomatski*

Tablica 4.2-4. Imunohistokemija za endotelnu lipazu u ovisnosti o simptomima

Tablica 4.2-5. Kliničke karakteristike bolesnika i terapija nakon podjele plakova prema nalazu histologije (histološka podjela) na fibrozne (F), ulcerirane-nekomplicirane (UNC) i ulcerirane-komplicirane plakove (UC)

Tablica 4.2-6. Laboratorijski pokazatelji nakon podjele plakova na temelju nalaza histologije (histološka podjela)

Tablica 4.3-1. Povezanost kliničkih karakteristika i endotelne lipaze u plazmi

Tablica 4.3-2. Korelacija plazmatske razine endotelne lipaze i kliničkih i laboratorijskih pokazatelja

Tablica 4.3-3. Povezanost plazmatske razine endotelne lipaze s histološkim tipom plaka i simptomima

10.4. Popis kratica

ABCA1	=	adenozin-trifosfat vezajući kasetni protein (eng. adenosine triphosphate – binding membrane cassette transport protein A1)
ACI	=	unutarnja karotidna arterija (lat. arteria carotis interna)
ApoB	=	apolipoprotein B
APTV	=	aktivno parcijalno tromblastinsko vrijeme
CDFI	=	obojeni dopler (eng. color doppler flow imaging)
CEA	=	karotidna endarterektomija (eng. carotid endarterectomy)
CEMRA	=	magnetska angiografija s kontrastom (eng. contrast enhanced magnetic resonance angiography)
CETP	=	kolesterol-ester transferirajući protein (eng. cholesterol ester transfer protein)
CRP	=	C- reaktivni protein
CTA	=	komjuterizirana tomografija angiografija (eng. computed tomography angiography)
CVI	=	moždani udar (eng. cerebrovascular insult)
DSA	=	digitalna subtrakcijska angiografija
EL	=	endotelna lipaza
FFA	=	slobodne masne kiseline (eng. free fatty acid)
HDL	=	lipoprotein visoke gustoće (eng. high-density lipoprotein)
HDL-PC	=	HDL-fosfatidil-kolin (eng. high-density lipoprotein phosphatidylcholine)
HsCRP	=	visoko senzitivni C-reaktivni protein (eng. high sensitiv C-reactiv protein)
HSPG	=	heparin sulfat proteo-glikan
IL-6	=	interleukin-6
IL1-β	=	interleukin 1-β
LDL	=	lipoprotein niske gustoće (eng. low-density lipoprotein)
Lp-PLA2	=	lipoprotein povezana fosfolipaza A2 (eng. lipoprotein associated phospholipase A2)
LCTP	=	lecitin-kolesterol acil-transferaza (eng. lecitin cholesterol acil-transferase)
LPS	=	lipopolisaharid
mRNA	=	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. messenger ribonucleid acid)

PV	=	protrombinsko vrijeme
RTK	=	reverzni transport kolesterola
SE	=	sedimentacija
SR-B1	=	receptor čistač B1 (eng. scavenger receptor B1)
TG	=	trigliceridi
TIA	=	tranzitorna ishemička ataka
TNF- α	=	tumor-nekrotizirajući faktor- α
VCAM	=	adhezijska molekula vaskularnih stanica (eng. vascular cell adhesive molecule)
VLDL	=	lipoprotein izrazito niske gustoće (eng. very low-density lipoprotein)

11. ŽIVOTOPIS

MATIAS TRBUŠIĆ, dr. med., rođen je 1975. godine u Frankfurtu u Njemačkoj. U Zagrebu je završio osnovnu školu i gimnaziju prirodoslovno-matematičkog usmjerenja. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1993. godine, a diplomirao u lipnju 1999. godine s prosječnom ocjenom 4,91. Nakon služenja vojnog roka, obavezni pripravnički staž u trajanju od jedne godine obavio je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. Državni ispit položio je u rujnu 2001. godine. Od 2002. godine bio je znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, prvo na projektu prof.dr.sc. Šime Mihatova *Reperfuzijsko liječenje akutnog infarkta miokarda intervencijskim metodama*, a zatim na projektu prof.dr.sc. Vjeran Heitzler Nikolića *Metabolički sindrom i akutni infarkt miokarda*. Od 2011. godine istraživač je na projektu prof.dr.sc. Marka Duvnjaka *Istraživanje nealkoholne masne bolesti jetre u sklopu metaboličkog sindroma*. Specijalizaciju iz interne medicine započeo je 2004. godine, a završio 2008. godine. Od tada je stalno zaposlen u Zavodu za kardiovaskularne bolesti KBC *Sestre milosrdnice* gdje radi na području neinvazivne i invazivne (interventne) kardiologije. Godine 2009. započeo je užu specijalizaciju iz kardiologije.

Redovito sudjeluje u izvođenju nastave na predmetima Klinička propedeutika, Interna medicina, Modul Hitna stanja, Modul Racionalna primjena lijekova te od 2011. godine Modul Kliničko prosuđivanje. Sudjeluje i u izvođenju nastave predmeta *Emergency medicine* Studija medicine na engleskom jeziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Više godina sudjelovao je kao predavač na EMSA Summer School of Emergency Medicine u Dubrovniku.

Akadske godine 2007. završio je doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno je sudjelovao na više domaćih i međunarodnih stručnih sastanaka i kongresa. Bio je na više međunarodnih tečajeva iz područja intervencijske kardiologije i ehokardiografije (*Treating a Patient with Chronic Total Occlusion*, Univerzitet Vaudois, Lausanne, Švicarska, *Crossroads – Executive Fellowship Program*, Bruxelles, Belgija, *EAE Teaching Course Transthoracic Echocardiography – Diagnostic Methods and*

Clinical Cases, Beč, Austrija). Ima tri članka objavljena u CC-u i dva kongresna priopćenja u CC-u. Sudjelovao je u pisanju knjige doc.dr.sc.Vesne Degoricije *Emergency medicine*.

Oženjen je i ima tri kćeri: Lauru (7), Luciju (3) i Enu (1).