



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

др Маја Милошевић (рођ. Чолић)

**ТРАНСПОРТ LDL-А У ИЗОЛОВАНОЈ
КАРОТИДИ КУНИЋА ПРЕ И ТОКОМ РАЗВОЈА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

Докторска дисертација

Ментор: Проф. др Мирко Росић

Крагујевац, 2015.

САДРЖАЈ

1. УВОД	5
1.1. АТЕРОСКЛЕРОЗА	5
1.2. СТРУКТУРА АРТЕРИЈЕ	7
1.3. ТЕОРИЈЕ О РАЗВОЈУ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ	8
1.4. ИСТОРИЈСКИ ОСВРТ	9
1.5. РАЗВОЈ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ	14
1.6. ФАКТОРИ РИЗИКА	18
1.6.1. ПУШЕЊЕ ЦИГАРЕТА	19
1.6.2. ЕСТРОГЕНИ	20
1.6.3. МЕТАБОЛИЧКИ ФАКТОРИ РИЗИКА	20
1.6.3.1. <i>DIABETES MELLITUS</i>	21
1.6.3.2. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ	21
1.6.4 ЛИПИДНИ ФАКТОРИ РИЗИКА	22
1.6.4.1. ТРИГЛИЦЕРИДИ	22
1.6.4.2. ТРИГЛИЦЕРИДИМА БОГАТИ ЛИПОПРОТЕИНСКИ ОСТАЦИ	22
1.6.4.3. ЛИПОПРОТЕИН (А)	23
1.6.5. ХОМОЦИСТЕИН	23
1.6.6. ТРОМБОГЕНИ/ХЕМОТАКСНИ ФАКТОРИ РИЗИКА.....	24
1.6.7. СРР И ДРУГИ ИНФЛАМАТОРНИ ФАКТОРИ РИЗИКА.....	24
2. УЛОГА ХОЛЕСТЕРОЛА И LDL-A	25
3. УЛОГА ЕНДОТЕЛА У ПРОЦЕСУ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ	29
4. ПРИТИСАК (УТИЦАЈ ДИСТЕНЗИЈЕ КРВНОГ СУДА)	32
5. ЛЕУКОЦИТИ	34
6. ГЛАТКЕ МИШИЋНЕ ЋЕЛИЈЕ	35
7. ХЕМОДИНАМСКИ ФАКТОРИ - УТИЦАЈ <i>SHEAR STRESS</i>-А	37
8. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ	44
8.1. ЦИЉЕВИ	44
8.2. ХИПОТЕЗЕ (нулте).....	44

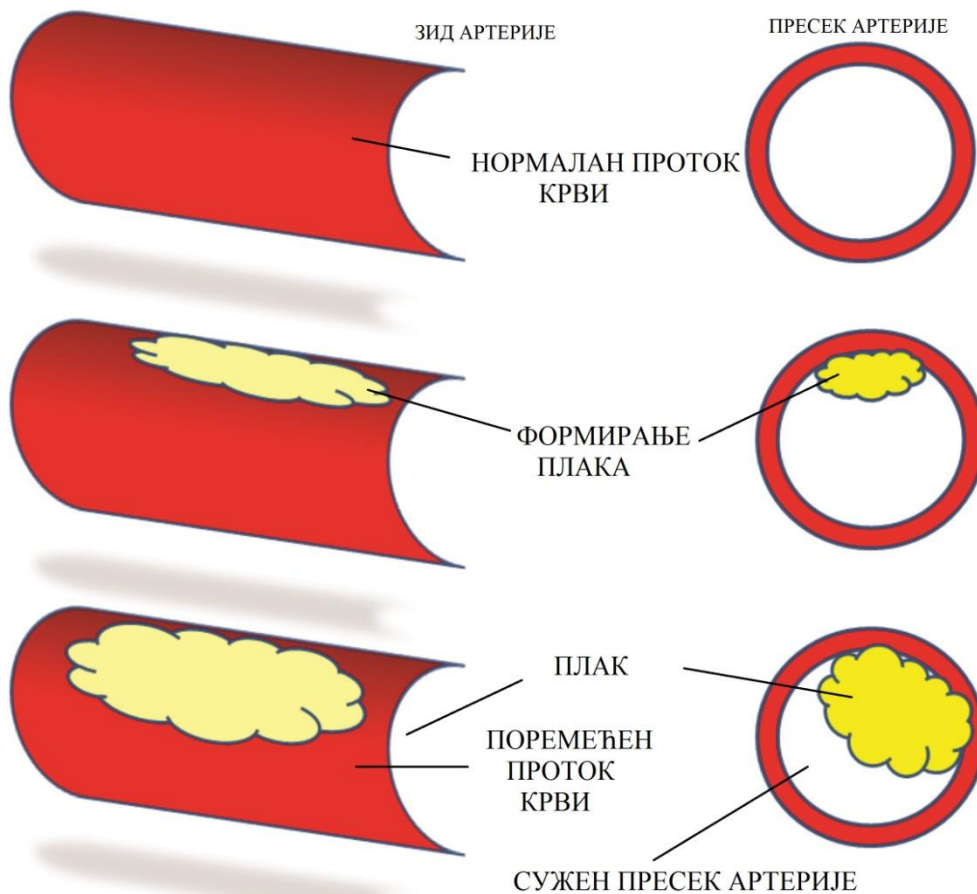
9. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	45
9.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ	45
9.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ	46
9.3. АПАРАТУРА	47
9.4. РЕАГЕНСИ	48
9.5. ПРОТОКОЛ ИСТРАЖИВАЊА	49
9.5.1. СЕРИЈЕ ТЕХНИЧКИХ ЕКСПЕРИМЕНАТА	51
9.5.1.1. КРЕИРАЊЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА (ЕВАНС ПЛАВО (EVD) И ^{99m} Tc-NANOCIS)	51
9.5.1.2. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА	54
9.5.2. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА СА ОЧУВАНИМ ЕНДОТЕЛОМ	55
9.5.2.1. БРЗА ДИЛУЦИОНА МЕТОДА ДВА ИЗОТОПА (<i>RAPID DUAL ISOTOPE DILUTION METHOD</i>)	55
9.5.2.2. <i>STEADY STATE</i> МЕТОДА	59
9.5.2.2.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ ЗА <i>STEADY STATE</i> МЕТОД	59
9.5.2.2.2. КРИВЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА ¹²⁵ I-LDL-A	61
9.5.2.2.3. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА	61
9.5.3. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА КОЈИМА ЈЕ ХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ УКЛАЊАН ЕНДОТЕЛ	63
9.5.3.1. ПРОЦЕДУРА УКЛАЊАЊА ЕНДОТЕЛА	63
9.5.4. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА КУНИЋА КОЈИ СУ БИЛИ НА ПОСЕБНОМ РЕЖИМУ ИСХРАНЕ ХОЛЕСТЕРОЛОМ (АТЕРОГЕНОЈ ДИЈЕТИ)	65
9.5.4.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ <i>STEADY STATE</i> МЕТОДЕ	65
9.5.4.2. ДИЛУЦИОНИ ПРОФИЛИ ¹²⁵ I-LDL-A	67
9.5.4.3. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА	67
10. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА	68
11. РЕЗУЛТАТИ	69
11.1. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА КОНТРОЛНИХ (ТЕХНИЧКИХ) ЕКСПЕРИМЕНАТА И ИЗБОРА РЕФЕРЕНТНОГ ТРАСЕРА	70

11.1.1. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА	70
11.2. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНТАА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА СА ОЧУВАНИМ ЕНДОТЕЛОМ	72
11.2.1. БРЗА ДИЛУЦИОНА МЕТОДА ДВА ИЗОТОПА (<i>RAPID DUAL ISOTOPE DILUTION METHOD</i>)	72
11.2.2. <i>STEADY STATE</i> МЕТОДА	73
11.2.2.1. КРИВЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА ¹²⁵ I-LDL-A	73
11.2.2.2. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА	76
11.3. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА КОЈИМА ЈЕ ХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ УКЛАЊАН ЕНДОТЕЛ	79
11.4. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА КУНИЋА КОЈИ СУ БИЛИ НА ПОСЕБНОМ РЕЖИМУ ИСХРАНЕ ХОЛЕСТЕРОЛОМ (АТЕРОГЕНОЈ ДИЈЕТИ)	80
11.4.1. УТИЦАЈ ТРАЈАЊА АТЕРОГЕНЕ ДИЈЕТЕ НА ПРЕУЗИМАЊЕ LDL-A	82
11.4.2. УТИЦАЈ SHEAR STRESS-A НА ТРАНСПОРТ ¹²⁵ I-LDL-A У ЗИД КРВНОГ СУДА	84
12. ДИСКУСИЈА	89
13. ЗАКЉУЧАК	109
14. ЛИТЕРАТУРА	110

1. УВОД

1.1. АТЕРОСКЛЕРОЗА

Атеросклероза је најраспрострањенија болест у индустријски развијеним земљама и налази се у основи многих болести данашњице као што су инфаркт срца и мозга, а који по подацима Светске здравствене организације представљају 50% свих узрока смрти. Познато је да је водећи узрок смрти коронарна болест чиме је фокус усмерен на атеросклерозу, нарочито због дислипидемије, која представља важан фактор ризика (1). У земљама западне цивилизације па и у нашој земљи атеросклероза је доспела у жижу интересовања када су економски, политички, научни и здравствени разлози доведени у питање услед енормног повећања броја гојазних, оболелих од дијабетеса и хипертензије. Лечење ових пацијената, које укључује операције бај-пасом, уградњу стентова и бројне фармацеутске агенсе представља велики терет за друштво (2). Атеросклероза обично започиње у детињству и представља подлогу за развој свих значајних болести крвних судова. Код неких популација јавља се генетска предиспозиција за развој убрзане атеросклерозе. Сматра се да се у највећем броју случајева ова болест добија због одређеног начина живота, а њене клиничке манифестације се појављују у најкаснијем животном добу. Атеросклероза је заправо подгрупа у оквиру ширег патолошког процеса који се назива артериосклероза. Атеросклероза означава групу болести, па и нормалан процес старења, при коме долази до задебљавања артеријског зида и губитка еластичности артерија (3). Захвата велике еластичне и мишићне артерије средње величине у виду местимичних оштећења интима (4) и дефинише се као имуноинфламаторна фибропролиферативна болест артеријског зида која захвата веће артерије на осетљивим местима.



Слика 1. Схематски приказ пресека крвног суда током развоја атеросклерозе

Промене у зиду крвних судова могу бити присутне током целог живота неке особе. Атеросклероза прогресивно напредује континуираном еволуцијом артеријског зида фокусирана на акумулацију липида који су богати холестеролом и пропратног инфламаторног одговора (5,6). Најважније патоанатомско обележје атеросклерозе јесте атером (atheroma). Реч је о субинтималном задебљању артеријског зида које проминира у лумен и испуњено је житким, кашастим садржајем (7). Развој атеросклерозе је степенаст и углавном прогресиван, уколико се не предузму одговарајуће мере за његово успоравање (8).

1.2. СТРУКТУРА АРТЕРИЈЕ

Формирање функционалног крвног суда током ембриогенезе захтева заједничко дејство ендотелних ћелија и глатких мишићних ћелија. Током стварања нових крвних судова глатке мишићне ћелије мигрирају под дејством молекула који имају улогу медијатора и који су синтетисани од стране ендотелних ћелија као и компонената екстрацелуларног матрикса. Остеопонтин и витронектин су примери адхезивних молекула екстрацелуларног матрикса који имају регулаторну функцију током процеса стварања и ремоделовања крвног суда. Остеопонтин омогућава адхезију глатких мишићних ћелија и ендотелих ћелија помоћу специфичних молекула интегрина, $\alpha_v\beta_3$ (9). Зид крвног суда, нарочито артерија, састоји се из три јасно дефинисана слоја: интима, медије и адвентиције (10). Интима и медија су раздвојене унутрашњом еластичном ламином. Глатке мишићне ћелије су највише заступљене у делу медије, где се могу наћи и понеки макрофаг и фибробласти. Екстрацелуларни матрикс медије је богат колагеном тип I и III, еластином, гликопротеинима, протеогликанима од којих је најчешћи хондроитин сулфат. Глатке мишићне ћелије близу лумена крвног суда примају кисеоник и нутритијенте директном дифузијом из лумена, где се услед пукотина у унутрашњој еластичној ламини дифузија лакше одвија. Делови медије који су дубље смештени као и адвентиција, нутритијенте добијају од крвних судова који потичу из адвентиције (10).

1.3. ТЕОРИЈЕ О РАЗВОЈУ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

И поред многобројних истраживања атеросклерозе због огромног значаја који она има, још увек нису познати сви механизми који доводе до њеног настанка. Са сигурношћу је ипак показано да патогенеза атеросклерозе укључује комплексну интеракцију између ћелија артеријског зида и различитих компонената крви, укључујући липопротеине, протеогликане, минерале, тромбоците, друге крвне ћелије и различите хемијске састојке (11). Ове интеракције резултирају у серији биохемијских промена у субендотелном ткиву зида артерија, које због нагомилавања глатких мишићних ћелија и макрофага уз истовремену акумулацију липида, веома задебља тако да се развија плак (10).

Постоји више теорија о настанку атеросклерозе као што су: липидна теорија, тромбогена теорија, теорија хипоксије, теорија старења, неурогена теорија, имунолошка теорија, структурна теорија, теорија хеморагија у интими (11,12). Ипак, и поред многобројних истраживања није још увек у потпуности разјашњен настанак атеросклерозе, тачније најмање се зна о самом иницијалном процесу.

1.4. ИСТОРИЈСКИ ОСВРТ

За постојање атеросклерозе, тачније болести која доводи до настајања плочастих задебљања артерија знало се још из периода египатских мумија (13,14). Два лекара из античког доба су значајна по својим открићима и далекосежном утицају на оне који су проучавали циркулаторни систем. Први је египатски лекар *Erasistratus*, који је живео око 300. године п.н.е. Он је спровео обимну студију о органима у телу и описао је три путање: вене, артерије и нерве. Његов опис срца и срчаних залистака је био врло прецизан. Међутим, веровао је да артерије садрже супстанцу која се назива пнеума, која би се заменила сваки пут када особа удахне. Пнеума може бити синоним за ваздух или дух (душу). *Erasistratus* је веровао да су вене преносиле крв која садржи пнеуму само током живота. Када би се артерија пресекла, крв би јурнула, а пнеума измакла (15).

120. године н.е. у Пергаму у Азији живео је човек под именом *Claudius Galen* и имао утицаја на медицину више од било ког појединца у наредних 1500 година. Запрепашћујуће је са данашњег становишта колико је *Galen* имао утицаја на медицину. Знање које је стекао сецирањем мајмуна и других животиња које су биле убијене од стране римских гладијатора, омогућило је *Galen*-у да опише срце као орган састављен из мишића а описао је и присуство и кретање крви у артеријама. Умногome је допринео развоју медицине, али неколико његових погрешних поставки су узете као тачне од стране Цркве и прихваћене као догме наредних 1500 година, тако да до доба ренесансе нико није доводио у питање његов ауторитет. Наиме, *Galen* је веровао да је јетра, а не срце, централни орган циркулаторног система.

Знање о медицини брзо је губило на значају од времена *Galena* до ренесансе. Доба ренесансе поново је покренула човекову жељу за открићима и истраживањима. Не само да су у то време постојали храбри истраживачи који су пловили океанима, већ је такође живео и нови сој научника и лекара заинтересованих за проучавање мистерија живота. Дух знатижеље за медицином поново је оживео (16,17).

Током ренесансе, *Leonardo da Vinci*, који је живео у периоду од 1452. до 1519. године, је приказао блиску повезаност између уметности и медицине. Припремио је приближно 750 анатомских цртежа, од којих је око 600 остало у Виндзору. *Leonardo* је

имао проблема да нацрта срчане судове јер су били „окружени масноћом налик воску.“ Ово је можда разлог зашто поједини рани анатоми нису успели да посматрају срчане артерије. *Leonardo* је приказао на својим цртежима промене срчаних судова изазване старењем. На његовом цртежу *The Anatomy of the Old Man*, крвни судови изгледају вијугави. *Leonardo* је написао, „судови код старијих људи кроз задебљање тунике, спречавају пролазак крви...“ и „артерија и вена код остарелих људи које се протежу између слезине и јетре захтевају тако дебео покривач да скупљају пролаз кроз који тече крв...“ Ово је један од најранијих описа атеросклерозних промена. *Leonardo*ове илустрације срчаних артерија су изванредне и врло прецизне, и оне су, уз његове описе, умногоме допринеле увећању ограниченог знања тога доба (16).

Још једна велика збирка медицинских илустрација пронађена је у књизи под називом *De Humani Corporis Fabrica Libri Septem*, коју је *Andreas Vesalius* објавио 1555. године. *Vesalius* је са 18. година отишао у Париз да студира анатомију. Посао анатома је отежавао папа јер је посебним едиктом забранио комадање/сакаћење лешева. Након што је добио медицинску диплому у Паризу 1537., наставио је студије на Универзитету у Падови, где је постао професор и открио више од 200 грешака код *Galena*. Његова предавања у Падови била су јако бурна, јер је био нападнут од стране *Galенових* присталица. Тако је *Vesalius* писао о једном од својих пацијената и објашњавао како „су у левој комори његовог срца пронашли скоро килограм ткива налик жлездама, док се срце надувало попут надимања стомака око овог ткива.“ *Vesalius* је закључио да је „овај осећај туге и бола“ повезан са болешћу срца, а та идеја је била прихваћена тек 200 година касније (17).

17. новембра 1772., *William Heberden* је написао рад о некоме кога је називао "*Doctor Anonymus*" и објавио га 13 година касније, 1785. године. *Doctor Anonymus* био је 52-огодишњи лекар-пацијент који је нагињао ка гојазности. Прве симптоме осетио је са 47 година, када је осетио бол у грудима који се ширио низ леву руку док је ходао. „Приписао сам то застоју у циркулацији, осећајима који су ми изгледали као да указују на изненадну смрт.“ Описао је своје симптоме у писму *Heberdeny*. Након смрти, серум *Doctora Anonymousa* описан је „густ као крем“; и ово је вероватно био најранији опис хиперлипидемије а *Heberden* је описао *anginu pectoris* као манифестацију болести срца (16).

Док је *Heberden angini pectoris* доводио у везу са болешћу срца, на лекару који је открио вакцину за мале богиње а који се звао *Edward Jenner* (1749-1832), било је да повеже *angini pectoris* са болешћу срчаних артерија. *Jenner* је написао писмо *Heberdeny* 1778. у вези са пацијентом који је преминуо услед последица *angine pectoris*. Описао је срчану артерију преминулог лекара као **"окошталу и „меснату цевчицу“ која није изгледала као да је на било који начин повезана са средњом туником артерије, и да је можда показивала знаке реканализованог тромба."** Додао је још да **„је срце било преоптерећено мастима и да су судови били заклоњени у тој супстанци.“** (16).

Први јасан опис артериосклерозе је дао италијански хирург и анатом, *Antonio Scarpa* који је живео од 1752. до 1832. године. У својој књизи, *Sull Aneurisma, Riflession: ed Osservazioni Anatomico-chirurgiche*, он је описао узрок анеуризме као **"спору, улцерисану, липидну, гљивичну, сквамозну дегенерацију унутрашњег прекривача артерије."** Даље је написао, **„ове болести, које понекад омекијају супстанце срца и излажу их улцерацији и руптури, такође су уобичајене и у артеријама.“** Овде је наведен пример масне, улцеризоване лезије, и извештај у коме се каже да је дезорганизација интима одговорна за развој артериосклерозе. Оба концепта, инфилтрација масти и учешће интима, присутна су у опису које је изнео *Scarpa*. *Scarpa* је тачно предвидео да је процес који узрокује артериосклерозу дугорочан, и да има непознате узроке.

Термин „артериосклероза“ први је увео 1833. *Jean-Frederick Lobstein*, патолог који је радио у Стразбуру. Написао је две студије у којима је применио овај термин, а који се односио на задебљавање и очвршћавање артерија односно на задебљали артеријски плак који садржи калцијум. „Атером“ је настао од грчке речи која значи „гриз“ или „каша“, и поново је прешла у употребу 1755., од стране *Albrechta von Hallera*. Термин „атеросклероза“, који се односи на тип артериосклерозе која утиче на тунику интиму артерије, уведен је 1904. од стране *Marchanda*, патолога из Лајпцига (16).

Rudolph Virchow (1821-1902), аутор преко 1000 радова, био је заинтересован за тромбозу и артериосклерозу. Он је сматрао да атером представља хроничну инфламацију тунике интима и веровао да оштећење тог дела представља рану фазу у развоја атерома. *Virchow* је дао назив **"endoarteritis chronica deformans nodosa"** за артеријске промене у атеросклерози (18). Он је описао упалне промене у интими артерије, масне инфилтрације интима, мукоидну дегенерацију зида артерије, фиброзу, калцификацију и атером са

кристалним таложењем. Предложио је концепт по коме измењена пропустљивост артеријске интима доводи до повећане филтрације плазме и таложења масти плазме упоредо са дегенеративним променама на артеријском зиду. Веровао је да се скупљање холестерола догађа касније током тог развоја, и посматрао је желатинасто отицање тунике интима пре формирања атеросклеротичног плака (16).

Најранији описи експерименталне артериосклерозе се приписују руским научницима. 1908. године, *A. I. Ignatovski* демонстрирао је повезаност између исхране и атеросклерозе храњењем кунића млеком и жуманцетом како би се изазвала озбиљна атеросклероза (19). *N. W. Stucke* је 1912. је открио да исхрана кунића жуманцетом изазива артеријске лезије, док она која се састојала из семена сунцокрета и риблиг уља није. 1914. *Ludwig Aschoff* (1866-1942) је описао таложење кристала холестерола у атеромима аорте (20) а *N. Anichkov* и *S. Chalатов* су извели класични експеримент храњења зечева холестеролом у циљу изазивања атеросклерозе. Веома интересантан сажетак њиховог рада и истраживања, које је спроведено у *Anichkovoј* школи патологије у Лењинграду, објављен је 1958. од стране *A. L. Myasnikova* (16).

Двадесети век је донео многа достигнућа у погледу студија о артериосклерози. Она обухватају откриће липопротеина од стране *Macheboeefa*, значајна открића која се тичу исхране и артериосклерозе, опширна разматрања улоге хипотезе о ендотелној повреди, улози тромбоцита и пролиферативној природи развоја плака (21). Такође акценат је стављен на откривање повезаности фактора ризика, укључујући липопротеине плазме, хипертензију, пушење, и дијабетес, на развој и напредовање болести коронарне артерије и настанак атеросклерозе код младих. Колико је атеросклероза распрострањена и подмукла болест говоре у прилог подаци бројних истраживања према којима се ово обољење артерија може јавити у најранијем животном добу, детињству, и да временом може без икаквих симптома толико да напредује да у моменту када до симптома дође лечење буде већ касно или само симптоматско, али без икакве могућности да се процес заустави или трајно излечи. Групе научника испитивале су присуство раних лезија у раном узрасту и пронашли да до прве године живота одређени проценат беба/деце већ има пенастећелије или масне пруге у зиду артерија (22-25). Такође се показало да је аорта била међу првим артеријама које је обољење захватило. Иако је атеросклероза хронична болест са којом

може да се живи, њен развој може да има турбулентнији ток и доведе до леталног исхода у виду тромбоза и инфаркта (26).

1.5. РАЗВОЈ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Атеросклеротске лезије (*atheroma*) су асиметрична фокална задебљања интимае артерије. Најзаступљенија хипотеза је хипотеза "одговор-на-повреду", хипотеза коју брани *Russell Ross* (27), која представља атеросклерозу као хроничну инфламаторну болест артеријског зида изазвану повредом до које доводе хипергликемија, хипертензија, модификовани липопротеини мале густине (LDL), повишен ниво ангиотензина II, и инфективни организми као што су херпес (Herpes) вирус и *Chlamidia pneumoniae* и многи други стимулуси. Најраније промене које се јављају захватају ендотел и доводе до његове дисфункције (10,28).

Атеросклероза се развија постепено кроз континуирану еволуцију лезија артеријског зида усмерених на акумулацију липида богатих холестеролом и пратећег инфламаторног одговора. Како су високе вредности серумског холестерола, нарочито LDL холестерола, од посебног значаја као фактори ризика за настанак атеросклерозе (29) верује се да у основи процеса атерогенезе стоји повећана акумулација липида у артеријски зид (30). Сматра се да је транспорт липида иницијални догађај у настанку атеросклерозе, посебно LDL-а у субендотелни простор (31-33).

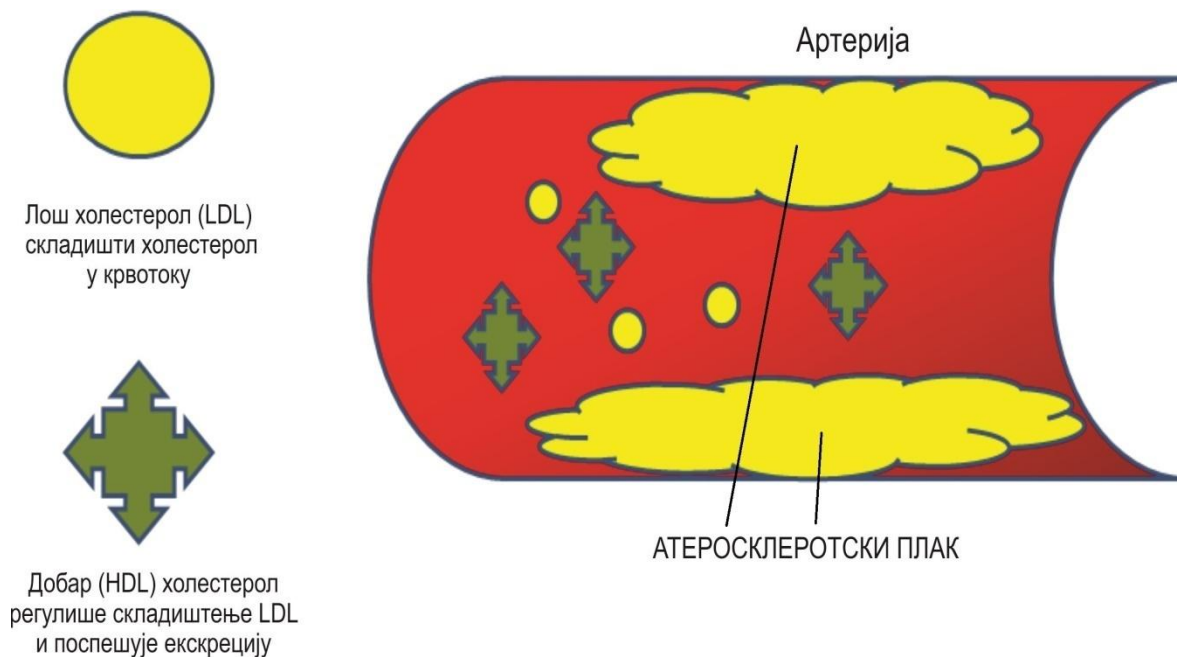


Слика 2. Изглед унутрашње стране (луменске стране) крвног суда оболелог од атеросклерозе; јасно видљиви плакови.

Такође, сматра се да на почетку атеросклеротског процеса ендотелне ћелије почињу да експримирају интраћелијске адхезивне молекуле (ICAM-1) који везују различите типове леукоцита. Васкуларни ћелијски адхезивни молекул (VCAM-1) везује моноците и Т лимфоците. Након што моноцити адхерирају за ендотелне ћелије они мигрирају између ендотелних ћелија и распоређују се у интими и под дејством хемокина трансформишу се у макрофаге. Макрофаги стварају интерлеукин 1 (IL-1) и фактор некрозе тумора (TNF). Такође стварају бројне токсичне агенсе који доводе до оксидације LDL-а (10).

Када LDL честице остану заробљене у зиду крвног суда оне подлежу прогресивној оксидацији, бивају интернализоване унутар ћелије макрофага уз помоћ scavenger рецептора на површини ћелије, затим доводе до стварања липидних пероксида и олакшавају акумулацију холестеролских естара доводећи до стварања пенстих ћелија (34,35). Степен акумулације липида је критичан за дијагностику раних фаза атеросклерозе. Ове ране промене су микроскопске и могу да се развију до већих видљивих промена. Такође, ове промене су реверзibilне (36). Следећи корак је стварање масних пруга. У

почетку масне пруге садрже пенасте ћелије и Т лимфоците а касније им се придружују и глатке мишићне ћелије (27).



Слика 3. Схематски приказ плака унутар артерије.

У центру атерома пенасте ћелије и екстрацелуларни липиди формирају језгро, које је окружено "капом" коју чине глатке мишићне ћелије и матрикс богат колагеном (37). Уколико процеси стварања пенастих ћелија и даље напредују, долази до накупљања нових моноцита, лимфоцита и ствара се миље у ком глатке мишићне ћелије све више мигрирају из медије ка интими и ка атерому, пролиферишу док атером задебљава до тренутка када својом величином може да угрози зид крвног суда а касније и да опструира лумен. Посебна група молекула, тзв. матрикс металопротеиназе (ММП), које могу да разлажу екстрацелуларни матрикс, сматрају се одговорним за миграцију глатких мишићних ћелија, јер могу да разлажу базалну мембрану која окружује глатке мишићне ћелије и на тај начин им омогућавају контакт са интерстицијалним матриксом услед чега глатке мишићне ћелије прелазе из неактивног у активно, синтетичко стање. То активно стање им пружа способност да мигрирају и пролиферишу (38). Сматра се да ММП-2 и мембрански тип

ММП имају важну улогу у миграцији васкуларних глатких мишићних ћелија (39). Васкуларне глатке мишићне ћелије мигрирају из медије у интиму, где пролиферишу и стварају компоненте екстрацелуларног матрикса, претварају масну пругу у фиброатером и доприносе расту и развоју атеросклеротских лезија. Такође се сматра да екстрацелуларни лиганди који подстичу васкуларне глатке мишићне ћелије да мигрирају делују уз помоћ комплекса G протеина и тирозин киназе (10,28).

Инфламација започиње у тренутку када се активирају ендотелне ћелије и када почну да секретују адхезивне молекуле док глатке мишићне ћелије секретују хемокине и хемоатрактанте који заједно привлаче моноците, лимфоците, маст ћелије и неутрофиле у артеријски зид. Глатке мишићне ћелије интима такође секретују протеогликане, колаген и еластична влакна у екстрацелуларни матрикс. Ипак, није сав LDL преузет од стране макрофага, неке количине остану нагомилане екстрацелуларно. Оне се увећавају временом и стварају атером који може да доведе до задебљања артеријског зида. Временом се нагомилава и фиброзно везивно ткиво које заједно са тим липидним језгром формира фиброатером . На тај начин лезије напредују све више док не дође до озбиљних оштећења (оклузија крвног суда са последичним инфарктом, тромбозе, руптуре...) која са друге стране могу да имају и леталан исход (26).

1.6. ФАКТОРИ РИЗИКА

Последњих година све се више пажње придаје откривању фактора ризика не би ли се болест крвних судова на време открила или макар ублажила. Оно што се свакако до сада зна је да већи ризик чине удружени фактори, тј. истовремено присуство више њих него сваки појединачно. Неки фактори ризика су познати већ дужи временски период и учесталост ризика се процењује на основу њиховог присуства/одсуства. Ипак, последњих година се придаје важност новим факторима ризика за које се сматра да имају већу прогностичку вредност. За неке од њих још увек не постоји универзални договор да ли их дефинитивно треба уврстити у неку батерију тестова којом би се процењивали ризици за обољевање особа које још увек немају клинички изражене симптоме и знаке болести (Табела 1) (40). Највише је у употреби Фрамингамска табела „ризик скора“ коју је усвојио Национални едукативни програм за холестерол САД-а (U.S. National Cholesterol Education Program (NCEP)) на експертском панелу „Детекција, евалуација и лечење високих вредности холестерола у одраслих особа“, који се заснива на процени традиционалних („старих“) фактора ризика као што су старост, пол, укупни холестерол, LDL холестерол, HDL холестерол, систолни крвни притисак и пушење (41). Касније су додати још и шећерна болест, триглицериди, фамилијарна историја раних инфаркта миокарда и други фактори (Табела 1) (42).

Табела 1. Приказ фактора ризика за развој атеросклерозе

Стари	Стари/Нови	Нови
Пол	Висок-нормалан крвни притисак	Аполипопротеин В, Аполипопротеин А-I
Старост	Метаболички синдром	Триглицериди, триглицеридима богати липопротеински остаци
Породична историја раних кардиоваскуларних болести	Diabetes mellitus, интолеранција на глукозу, висока вредност глукозе "наште"	Мали, густе LDL, оксидисани LDL, антитела на оксидисани LDL
Укупни холестерол, LDL холестерол, HDL холестерол		Липопротеин (а)
Хипертензија		Хомоцистеин
Пушење		Високо сензитивни С-реактивни протеин (CRP)
Прекомерна телесна тежина/Гојазност		
Смањење естрогена		

1.6.1. ПУШЕЊЕ ЦИГАРЕТА

Постоје бројни докази о штетности пушења цигарета као и о њиховом утицају на развој атеросклерозе. Показано је да пушење доводи до дозно-зависног оштећења и дисфункције ендотела као и поремећаја дилатације артерија младих људи (43). Такође доводи до смањене ендотел-зависне дилатације брахијалне артерије (44). Пушење цигарета утиче на активност ендотелне азот-оксид синтетазе и нивое протеина (45). Површне бутне вене кунића које су били изложене диму цигарета показале су значајно смањену ендотел-зависну релаксацију под утицајем ацетилхолина (46). Култивисане ћелије пореклом из пупчане врпце пушача претварају значајно више LDL-а у атерогену

форму него ћелије непушача (47). Пушење повећава оксидацију LDL-а и тако доприноси дисфункцији ендотела код хиперхолестеролемичних пацијената (48). Показано је да пушење повећава ниво укупног холестерола (49) као и ниво LDL-а, док се ниво HDL снижава (50). Такође код пушача је примећен већи број тромбоцита (51) као и виши ниво *von Willebrand*-овог фактора него код непушача (52).

1.6.2. ЕСТРОГЕНИ

Естрогени имају позитивне ефекте на концентрације липида и липопротеина у плазми и смањују обим атеросклерозе у бројним анималним моделима као што су мишеви, кунџи и мајмуни (53,54). Примећено је да је инциденда обољевања већа код мушкараца него у жена. У постменопаузних жена хормонална терапија побољшава концентрацију липопротеина и смањује атеросклерозу (55). Једна студија је показала да је естрогенска терапија смањила калцификацију коронарних артерија у жена старости од 50-59 година (56). Механизми којима естрогени испољавају протективно дејство базирају се на метаболизму холестерола у јетри (57,58). Ефекти егзогеног естрогена на липопротеине плазме варирају у зависности од дозе и начина примене али заправо се карактеришу смањењем укупног холестерола и LDL холестерола а повећањем HDL холестерола и триглицерида. Ово смањење концентрације LDL-а је путем метаболизма „првог пролаза“ кроз јетру (59,60). Атеропротективни ефекти естрогенске терапије могу да буду повезани и са смањеном хепатичном секрецијом холестерил естера пореклом од ацил коензим А: холестерол ацилтрансферазе 2 (ACAT2) (61).

1.6.3. МЕТАБОЛИЧКИ ФАКТОРИ РИЗИКА

Најзаступљенији метаболички фактори ризика су Diabetes mellitus, интолеранција на глукозу, висока вредност глукозе "наште" и метаболички синдром. Обзиром на учесталост описани су посебно шећерна болест (*Diabetes mellitus*) и метаболички синдром.

1.6.3.1. *DIABETES MELLITUS*

Епидемиолошке студије су показале да су пацијенти који имају *Diabetes mellitus* и интолеранцију на глукозу под већим ризиком да оболе од кардиоваскуларних болести. Хипергликемија убрзава атеросклерозу преко више механизма који укључују гликолизацију протеина, HDL-а и фактора згрушавања. Хиперинсулинемија може такође да допринесе атеросклеротичном процесу директним ефектом на пролиферацију глатких мишића крвних судова и индиректно повећањем крвног притиска услед задржавања натријума и воде, као и симпатичке активности. Такође је запажено да је инциденца обољевања међу пацијентима два пута већа код мушкараца у односу на жене. Такође жене које нису боловале од шећерне болести су три пута мање имале кардиоваскуларних проблема (62). Фрамингамска студија је потврдила да дугорочна хипергликемија повећава ризик од микроалбуминурије, као и да особе које већ имају дијагностиковану шећерну болест имају већ развијену субклиничку коронарну атеросклерозу у већој или мањој мери (63,64).

1.6.3.2. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ

Метаболички синдром обухвата мноштво кардиоваскуларних фактора ризика: повишене триглицериде, низак HDL холестерол, повишену глукозу наше, висок крвни притисак, повећан обим струка. У суштини само присуство метаболичког синдрома повећава ризик пацијентима за обољевање од кардиоваскуларних болести без обзира на вредности LDL холестерола. Метаболички синдром је блиско повезан са резистенцијом на инсулин а такође је повезан са великим ризиком за обољевање од кардиоваскуларних болести, нарочито код жена (65).

1.6.4 ЛИПИДНИ ФАКТОРИ РИЗИКА

1.6.4.1. ТРИГЛИЦЕРИДИ

Последњих година су се појавили бројни докази који указују на прогностичку вредност хипертриглицеридемије као фактора ризика за кардиоваскуларне болести. Једна мета-анализа је показала да је хипертриглицеридемија независтан фактор ризика за кардиоваскуларне болести. (66). Ипак, у исто време ниједна студија није показала да смањење само триглицерида може да доведе до бенефита. Као разлог за то наводи се податак да је заправо тешко снизити само триглицериде а не снизити ниједну другу липидну фракцију.

1.6.4.2. ТРИГЛИЦЕРИДИМА БОГАТИ ЛИПОПРОТЕИНСКИ ОСТАЦИ

Липопротеини богати триглицеридима садрже мноштво новостворених и метаболички модификованих липопротеинских партикула. Способност да пређу у васкуларни субендотелни простор зависи од величине честице. Док хиломикрони и велики липопротеини врло мале густине (VLDL) не могу да прођу ендотел, мање честице VLDL-а, липопротеина средње густине (IDL) и липопротеина мале густине (LDL) могу да прођу у субинтимални простор. Клиничка испитивања су показала да је аполипопротеин С-III био повећан у пацијената који су преживели инфаркт миокарда (67), као и да вредности VLDL-холестерола, VLDL-триглицерида, VLDL-аполипопротеина В, аполипопротеина С-III, аполипопротеина Е у VLDL-у и LDL-у, и аполипопротеина Е у HDL-у могу да буду добри предсказатељи коронарних догађаја (68). Липопротеински остаци могу да се изолују из плазме тестом са антителима (40).

1.6.4.3. ЛИПОПРОТЕИН (А)

Липопротеин (а) (Lp(a)) се састоји из липопротеина који је структурно сличан протеинском и липидном делу LDL-а и хидрофилног протеина богатог угљеним хидратима названог апо (а). Lp(a) партикула садржи апоА и апоВ у моларном односу 1:1. Молекулска маса варира од 187 kDa до 662 kDa (40). Иако скоро све ретроспективне студије показују јаку везу између високих вредности Lp(a) и кардиоваскуларних болести, клиничке студије нису показале да снижавање вредности Lp(a) смањује ризик од кардиоваскуларних болести. Али показано је да повећање нивоа Lp(a) повећава ризик за настајање инфаркта миокарда и ангину пекторис нарочито код мушкараца који уједно имају и повишене вредности холестерола (69).

Дуготрајне клиничке студије су показале да је гојазност предуслов за развој атеросклерозе у мушкараца и жена после менопаузе и да повећање тежине (BMI>30) повећава ризик обољевања и фаталног исхода од кардиоваскуларних болести. Такође, исхемијска болест срца је чешћа код људи са централним типом гојазности (70).

1.6.5. ХОМОЦИСТЕИН

Хомоцистеин настаје деметилацијом метионина, а разграђује се реметилацијом и/или транссулфурацијом. Оштећење метаболизма хомоцистеина се сматра фактором ризика за атеросклерозу, цереброваскуларну болест и периферну васкуларну болест. Узроци који могу да доведу до хиперхомоцистеиније укључују генетске узроке, дефицијенције витамина (фолне киселине, витамина В12, В6), оштећену бубрежну функцију... Rinehart и Greenberg (71) су објавили да хронични испрекидани недостатак пиридоксина у исхрани (витамин В6) производи артеросклеротски плак код мајмуна (71). Први доказ који иде у прилог теорији о утицају хомоцистеина на артеросклерозу је настанак атеросклерозе и тромбозе код зечева којима је дат хомоцистеин парентерално или као додатак храни (72,73), што је касније потврђено и код бабуна, свиња и мајмуна (74-76). Бројне студије су указале на везу између хиперхомоцистеиније и ризика за кардиоваскуларне болести (77-79). Једна француска студија је показала да на одржавање нивоа хомоцистеина у крви

утиче смањено конзумирање кафе и алкохола код жена, док је код мушкараца важније повећање физичке активности, унос дијететских влакана у исхрани као и унос фолата (80).

1.6.6. ТРОМБОГЕНИ/ХЕМОТАКСНИ ФАКТОРИ РИЗИКА

Примећено је да становници одређених географских подручја обољевају више од кардиоваскуларних болести али тачан разлог за то није утврђен. Примећене су варијације у вредностима фибриногена и фактора VII коагулације. Постоје епидемиолошки докази да је повећана вредност фибриногена у плазми потенцијални ризик фактор за кардиоваскуларне болести (81). фактори који се такође спомињу као потенцијални фактори ризика су *Von Willebrand*-ов фактор и плазминоген активатор инхибитора-1 (40).

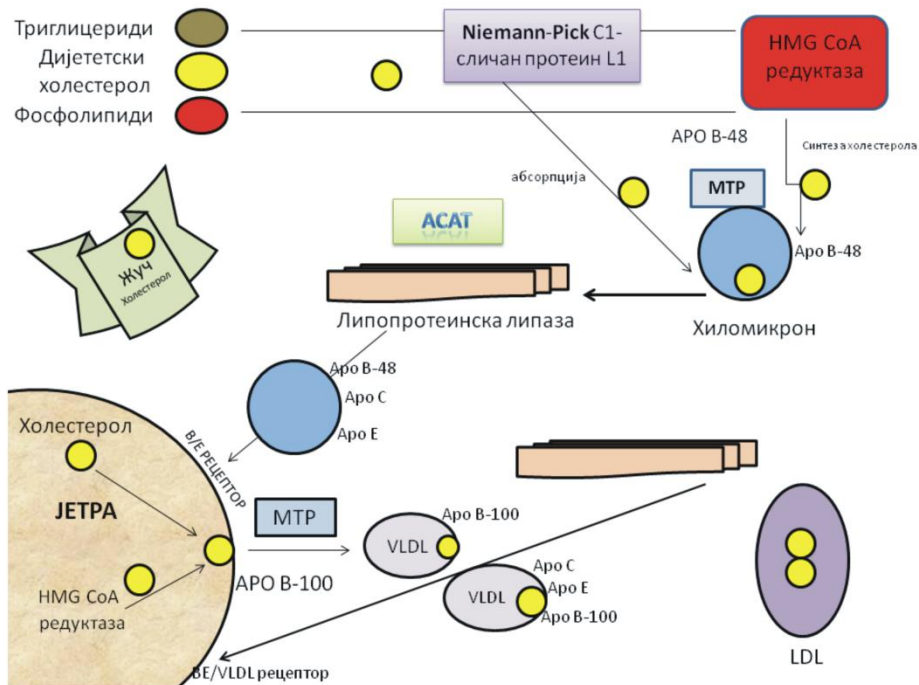
1.6.7. CRP И ДРУГИ ИНФЛАМАТОРНИ ФАКТОРИ

Атеросклероза представља хронично инфламаторно стање а фактори инфламације (IL-6, TNF) имају прогностичку вредност за будуће кардиоваскуларне болести. Бројни подаци указују да "C"-реактивни протеин (CRP) има додатну улогу у предвиђању коронарне болести срца у односу на традиционалне („старе“) (Табела 1) факторе ризика (82). Познато је да повишене базалне вредности "C"-реактивног протеина повећавају ризик од срчаних болести код здравих мушкараца и жена (83), што је навело бројне лекаре да превентивно, према препорукама АНА, одређују вредности CRP-а код пацијената код којих се сумња на неко срчано обољење (84). Осим CRP-а, такође се разматра увођење у батерију тестова и анализа/одређивање нивоа матрикс металопротеиназе 9, у прогнози морталитета у пацијената оболелих од срчаних болести (85), као и анализирање нивоа IL-10, који може да даје повољнију прогнозу у односу на ону коју даје CRP (86).

2. УЛОГА ХОЛЕСТЕРОЛА И LDL-A

У основи атеросклеротског плака налазе се холестерол и масне киселине, а бројни истраживачи неуморно раде на истраживању механизма који доводе до стварања плакова и њихове руптуре. Главни транспортери холестерола и масних киселина су липопротеини. Највише пажње је усмерено притом на липопротеин мале густине (LDL), и то не само због чињенице што су за откриће рецептора за LDL Michael S. Brown и Joseph L. Goldstein 1985. године добили Нобелову награду и показали његов значај у одржавању хомеостазе холестерола (87), већ и због открића дејства лекова статина, који инхибирају ензим 3-хидрокси-3-метилглутарил коензим А (HMG-CoA) који је задужен за синтезу холестерола, и тиме смањују холестерол у крви редукујући кардиоваскуларна обољења за 30% (2,88). Холестерол може да се синтетише већином у јетри али и у гастроинтестиналном тракту, као и да се апсорбује из хране или реапсорбује из жучи.

АБСОРПЦИЈА ХОЛЕСТЕРОЛА И ФОРМИРАЊЕ LDL-а



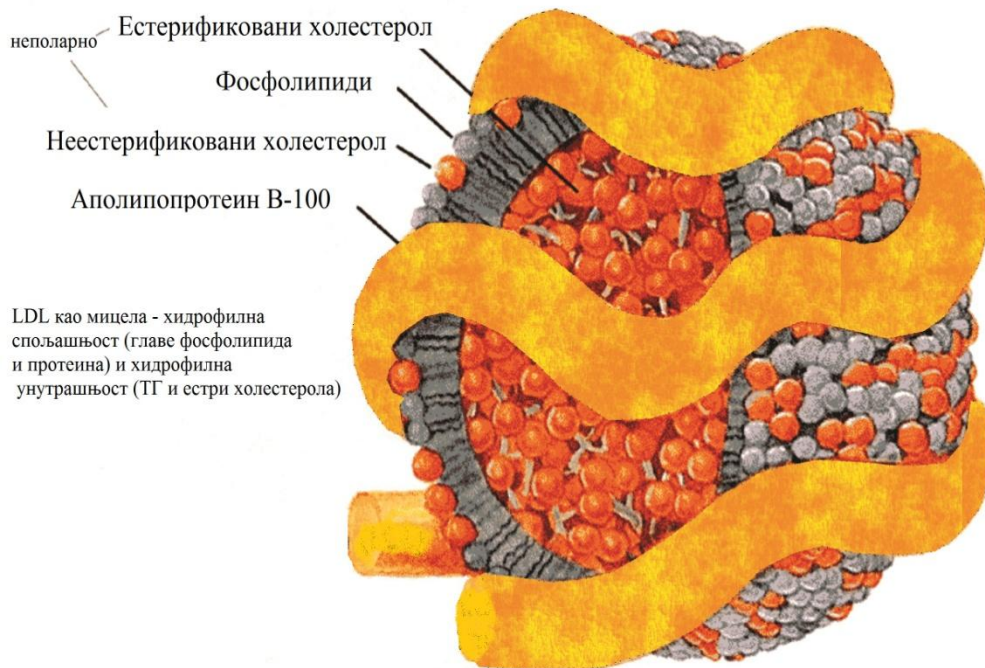
Слика 4. Дијететски холестерол, билијарни холестерол и холестерол синтетизован у цревима уз помоћ ензима HMGCoA, који је транспортован кроз ћелијску мембрану путем NPC 1L1 и, заједно се са триглицеридом, фосфолипидом и цревним протеином ароВ48 скупља под утицајем МТР-а у триглицеридом обогаћени хиломикрон. Део апсорбованог холестерола излучен је у лумен црева под утицајем ABCG5/G8. Хиломикрон је делимично хидролизован у циркулацији путем липазе липопротеина и захтева апо СIII и апо Е. В/Е рецептор у јетри преузима остатак хиломикрона који настаје. Ослобођени холестерол и триглицерид се поново везују за хепатички синтетизован холестерол и апо В100, чиме се ствара VLDL. Липаза липопротеина у артеријском зиду ослобађа триглицерид из VLDL и добија апо СIII и апо Е. Део VLDL преузима јетра, а остатак се хидролизује и губи апо СIII и Е и постаје IDL, а затим LDL.

Из интестиналног тракта холестерол се везује за аполипопротеин В 48 и тако допрема у јетру уз помоћ липопротеинских честица названих хиломикрони. Хиломикрони су велике честице богате липидима са полуживотом од око 90 минута. Хиломикрони захтевају аполипопротеин Е (Апо Е), који добијају од липопротеина велике густине

(HDL), да би могли да отпусте холестерол у јетру. Отпуштени холестерол се затим препакује заједно са *de novo* створеним холестеролом у јетри, триглицеридима и фосфолипидима, раствара помоћу аполипопротеина В 100 и секретује као липопротеин врло мале густине (VLDL) у циркулацију. На зиду капилара налази се липопротеин липаза која хидролизује VLDL, ослобађајући на тај начин триглицериде а честица постаје VLDL остатак. Он касније може додатно да се разгради до LDL честице. Аполипопротеин Е (Апо Е) учествује у уклањању остатака VLDL -а преко LDL В/Е рецептора у јетри, а показано је и да има атеропротективно дејство, тако што утиче на ефлукс холестерола *in vitro* (89). Показано је такође да Апо Е може да се везује и за HDL помоћу ABCA1 протеина и ензима лецитин-холестерол ацилтрансфераза (LCAT) чиме додатно поспешује улогу HDL -а у уклањању липида (90). У нормалним физиолошким условима катаболизам LDL-а зависи од преузимања честица помоћу рецептора за LDL који је присутан у скоро свим ћелијама у организму (2,87). LDL заправо представља молекул који снабдева све ћелије у телу холестеролом да би им се одржала способност за живот/виабилност, као и да се обезбеди холестерол за синтезу стероидних хормона. HDL такође има улогу у реверзном транспорту холестерола и такође штити LDL од оксидације (91).

Регулација LDL-а је фино подешена. Већина ћелија има способност да синтетише холестерол уз помоћ HMGCoA редуктазног пута, сигурносне мреже када је смањена апсорпција холестерола. Смањење ендogene синтезе холестерола стимулише (*up-regulate*) рецептор за LDL и стимулише уклањање LDL-а (92). То са друге стране појачава апсорпцију холестерола из црева (93).

1995. године Austin и Krauss (94) су описали везу између атеросклерозе и LDL-а. LDL је честица богата холестеролом али сиромашна триглицеридима. Састоји се од хидрофилног површинског слоја фосфолипида, слободног холестерола и аполипопротеина В 100, пореклом из јетре који везује молекуле и стабилизује честицу.



Слика 5. Схематски приказ LDL честице

Језгро честице LDL-а садржи естерификовани холестерол и триглицериде и масне киселине везане за фосфолипиде. Као и многи протеини у циркулацији честица може да делује и као носач за друге нерастворљиве партикуле као што су слободне масне киселине (95). Важно је напоменути да је и липопротеинска липаза везана за честицу и тиме је олакшано везивање партикуле за ендотел. Помоћу гел електрофорезе можемо разликовати више поврста LDL честица у односу на њихову величину и раздвојити их на образац А и образац Б (96).

Ипак, оксидација LDL-а представља један од водећих проблема. До сада је описана једна субфракција LDL-а са карактеристикама оксидације и названа електронегативна LDL (LDL^-) односно минимално оксидисана LDL (97). Више оксидисана честица је више електронегативна и обележава се као LDL^{--} . Постоје индикације да фосфолипаза А2 може да ствара електронегативан LDL. Сматра се да честице LDL-а које су веће бивају подложније оксидацији управо због веће контактне површине. Такође, честице богате полинезасићеним масним киселинама су подложније оксидацији као и честице богате линолном киселином (95,98).

3. УЛОГА ЕНДОТЕЛА У ПРОЦЕСУ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Све већи значај се придаје улози ендотела у настанку и развоју атеросклерозе. Ендотелне ћелије чине унутрашњи слој крвних судова и облажу све крвне судове почев од највећих артерија и вена до најситнијих капилара (99). Ендотелне ћелије су полигоналног и нешто издуженог облика (широке приближно 11 μm , дугачке око 50 μm) док је просечна дебљина 0.1-1.0 μm (100). Васкуларни ендотел има у одрасле особе приближну укупну површину од око 300-1000 m^2 и укупну масу од око 1 kg (101). Богате су органелама: митохондријама, Голџи комплексом, ендоплазматским ретикулумом, лизозомима, рибозомима и полизомима, као и најкарактеристичнијим органелама ендотелних ћелија, Вајбел-Паладовим (Weibel-Palade) телашцима. Ове органеле садрже бројне факторе и ензиме нпр. азот моноксид синтазу (NOS), хистамин, vWf, тромбомодулин, ендотелин, IL-8, P селектин... захваљујући којима ендотелне ћелије остварују своје физиолошке улоге (102). Неке од улога ендотела су: улога у хемостази, улога у регулацији протока крви и крвног притиска (краткотрајно компензаторно подешавање васкуларног тонуса), улога у регулацији структуре крвних судова, улога у инфламаторним процесима и улога у процесима ангиогенезе (103).

Последњих година је постало више него очигледно да ендотел није само пасивна баријера, где молекули, ћелије и течности/флуиди из лумена крвног суда пролазе кроз артеријски зид већ се сматра да је ендотел полу-пропустљива мембрана (103). Сматра се да је интактни ендотел одлична баријера за пролазак макромолекула и да спречава њихово евентуално накопљање. Артеријске ендотелне ћелије садрже комплексан систем међућелијских веза, а најзаступљеније су чврсте и пукотинасте везе (104). Контакти између ендотелних ћелија и глатких мишићних ћелија већим делом су посредством пукотинастих веза, где цитоплазматски мостићи пролазе кроз фенестрације унутрашње еластичне ламине (105). Експериментални подаци показују да ендотел има активну улогу у одржавању хомеостазе крвних судова (103). Као важан регулатор васкуларне хомеостазе ендотел успоставља баланс између вазодилатације и вазоконстрикције, инхибира и стимулише пролиферацију и миграцију глатких мишићних ћелија, као и тромбогенезу и фибринолизу (106,107). Када се наруши овај баланс долази до дисфункције ендотела што

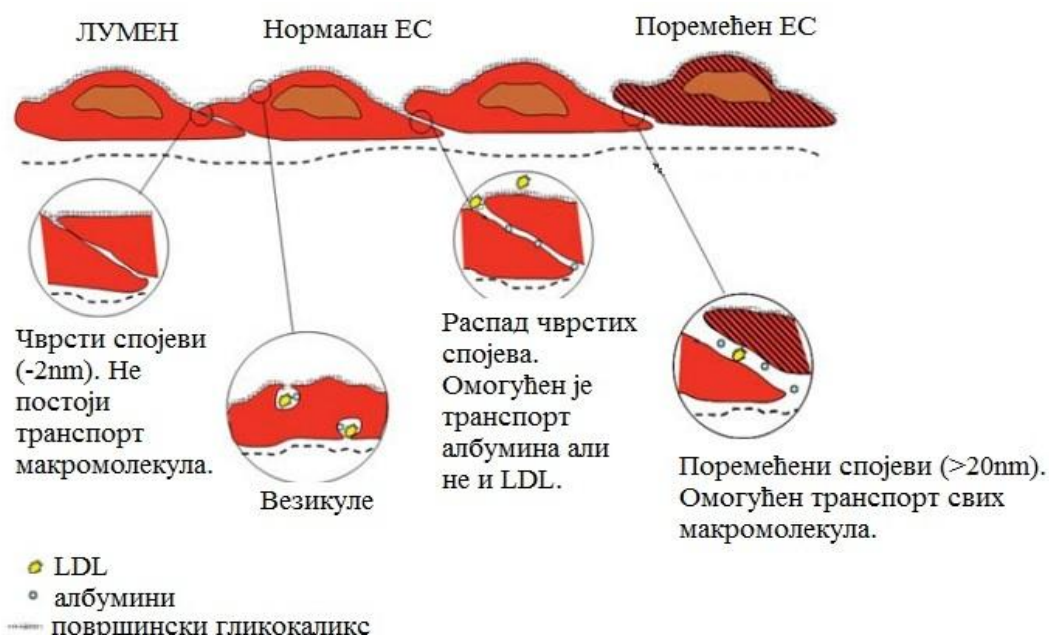
оштећује артеријски зид. Управо је ендотелна дисфункција рани маркер атеросклерозе и када још не постоје ангиографски докази о постојању болести (106).

Нормални, здрави ендотел регулише васкуларни тонус и структуру и испољава антикоагулантна, антитромбоцитна и фибринолитичка својства. Ендотел је велики ендокрини орган јер секретује веома важне биолошки активне супстанце (које делују ендокрино, паракрино, аутокрينو) као што су: азот моноксид (ендотелни релаксирајући фактор), EDHF (ендотелни хиперполаризујући фактор), простагландине (PGI₂, PGH₂), цитокине, ћелијске адхезионе молекуле, факторе раста, хемотаксичне факторе, протеине базалне мембране (интегрини), хепаран сулфат, протеогликани, слободне радикале, ендотелине (ET-1,2,3), тромбоксан А₂, NOS. У физиолошким условима, функционално и структурно очуван ендотел одржава равнотежу између ендотелних релаксацијских (NO, простагландин, брадикинин, EDHF) и контрактилних фактора (тромбоксан А₂, слободни радикали кисеоника, ендотелини, ендотелни контрактилни фактор, ангиотензин II), што обезбеђује оптимални пречник крвног суда и ткивну перфузију сразмерну метаболичким потребама. У равнотежи су, такође пореклом из ендотела, антикоагулантни и прокоагулантни фактори, као и фактори инхибиције и стимулације раста глатких мишићних ћелија крвних судова (102).

Ипак, ендотел који је на било који начин оштећен нема више способност да чува и штити крвне судове. Велики број студија говори о штетности проласка LDL-а и његовог накупљања у субендотелном простору. Иако су механизми одговорни за атерогену модификацију LDL-а још увек непознати свакако се зна да имају везе са оксидацијом честица од стране мијелопероксидаза, 15-липоксигеназа и/или азот оксид синтетазе (NOS) (5). Оштећење ендотела нарушава равнотежу између вазоконстрикције и вазодилатације и иницира бројне процесе који погоршавају атеросклерозу а то се највише односи на повећану пропустљивост ендотела, агрегацију тромбоцита, адхезију леукоцита и стварање цитокина (27). Смањено стварање или активност NO, које се манифестује оштећеном вазодилатацијом, може бити један од најранијих знакова атеросклерозе (108). NO се противи дејствима вазоконстриктора пореклом од ендотела и инхибира оксидацију LDL-а.

Могући узроци ендотелне дисфункције који воде ка атеросклерози односе се на повећање и модификацију LDL-а, слободних радикала изазваних конзумирањем цигарета, хипертензијом и *diabetes mellitus*-ом, генетским променама, повећањем концентрације

хомоцистеина у плазми, инфективном микроорганизмима као што су херпес вируси или *Chlamydia pneumoniae*, као и комбинације ових и других фактора. Без обзира на узрок ендотелне дисфункције атеросклероза је врло карактеристичан одговор посебних артерија. Претходне експерименталне студије су показале да су везикуле (109,110) и везе које настају између тзв. *leaky cells* (LC) (ћелија у фази обнове/митозе или апоптозе) тзв. *leaky junctions* (LJ) (111,112) две путање којима LDL прелази у ендотел. Везикуле преузимају LDL из екстрацелуларне течности помоћу рецептором-посредоване ендоцитозе док су *leaky junctions* (LJ) повезане са ендотелним ћелијама у стању/процесу обнављања или смрти (апоптозе).



Слика 6. Путање транспорта кроз ендотел. Највеће путање транспорта су: чврсти спојеви, прекиди код чврстих спојева, мехурићи и пропустљиви спојеви. Површински гликокаликс прекрива улаз свуда осим код пропустљивих спојева.

Показано је *in vitro* (113) да LDL пролази углавном кроз *leaky junctions* (>90%) а да се ретко транспортује помоћу (рецепторских) везикула (<10%). Ови подаци су потврђени и *in vivo* студијама (114).

4. ПРИТИСАК (УТИЦАЈ ДИСТЕНЗИЈЕ КРВНОГ СУДА)

Интактан ендотел игра улогу механичке баријере али и комуникацијске средине између крви и зида крвног суда, при чему је адекватна пермеабилност од изузетног значаја. Катјонски канали у мембрани ендотелних ћелија, који се активирају приликом истезања и функционишу као механосензори, подлежу у хипертензији "up" регулацији што доводи до хиперполаризације и повећане продукције вазодилаторних молекула а пре свега NO (115). Повећана експресија адхезионих молекула са следственим повећањем адхеренције леукоцита такође је присутна у хипертензији. Штавише, повећање циркулишућих вредности E и P селектина могу представљати врло добар индекс ендотелног оштећења код хипертензије (116). Поред система L- аргинин/NO који је значајан елемент ендотелне дисфункције у хипертензији се јавља и повећана продукција вазоконстрикторних фактора (117). У последње време најинтересантнија су истраживања која се односе на повећану продукцију ендотелина у току есенцијалне хипертензије (117-119). У току хипертензије такође долази до повећане продукције слободних радикала (120). Та повећана продукција слободних радикала током хипертензије може да доведе до читавог низа нежељених ефеката као што су: липидна пероксидација, оксидација тиол група и оштећење ћелијске мембране али и интеракције реактивних форми кисеоника са другим молекулима које синтетише ендотел (121). Постоје индикације да хипертензија мењајући пропустљивост ендотела повећава улазак LDL-а у у интиму (122,123). Бројне *in vitro* студије показале су да је растезање зида артеријског крвног суда изазвано притиском главни фактор акумулације LDL-а у атеросклерози као и других макромолекула нарочито у унутрашње делове зида крвног суда (113,124,125). Притисак доводи до растезања зида и посебно повећава струјање и акумулацију LDL у унутрашњој медији, што би могло да објасни повећану осетљивост зида крвног суда за развој атеросклерозе под утицајем повишеног крвног притиска (124,126,127). Такође је добро познато да хипертензија убрзава атерогенезу повећавајући стопу обнављања и апоптозе ендотелних ћелија, услед чега су поремећени и повећани међућелијски спојеви (цуреће везе (leaky junctions)) (>20nm што доводи до повећања трансендотелног транспорта макромолекула (123). Mahsa Dabagh (128) је у својим истраживањима добио да се концентрација LDL-а унутар слоја

медије смањује током акутног повећања притиска, док са друге стране расте концентрација овог молекула када у условима хипертензије расте број *leaky junctions*. Такође је показано да на просечну концентрацију LDL-а унутар интима не утиче притисак уколико удео *leaky junctions* остане непромењен.

5. ЛЕУКОЦИТИ

Различити типови леукоцита као што су Т и Б лимфоцити, ћелије природне убице, макрофаги и маст ћелије пронађене су унутар аорти склоних атеросклерози. Механизми регрутовања моноцита су делимично расветљени и укључују Р-селектин, Е-селектин, VCAM-1, ICAM-1 и др. (129). Моноцити, прекурсори макрофага у свим ткивима, присутни су у свакој фази атерогенезе. Макрофаги настали из моноцита луче цитокине, хемокине, молекуле за регулисање раста, металопроотеиназе и друге хидролитичке ензиме. Непрекидни унос, опстанак и репликација моноклеарних ћелија у лезијама зависи делимично од фактора као што су фактор стимулације колонија макрофага и фактор стимулације колонија гранулоцита-макрофага за моноците и интерлеукин-2 (IL-2) за лимфоците. Када се непрекидно излаже колонија макрофага фактору стимулације то омогућава да макрофаги преживе *in vitro* и евентуално да се размножавају унутар лезије. С друге стране, инфламаторни цитокини као што су интерферон-гама (IF γ) активирају макрофаге и под неким условима их подстичу да се подвргну програмираној ћелијској смрти (апоптози) (27).

Испрва, једине ћелије за које се мислило да пролазе кроз процес пролиферације током ширења атеросклеротичних лезија биле су глатке мишићне ћелије. Међутим, репликација макрофага насталих од моноцита и Т ћелија је вероватно од исте важности (130). Могућност макрофага да производе цитокине, протеолитичке ензиме и факторе раста може бити кључно питање о улози ових ћелија у оштећењу и опоравку која следи након што лезије напредују. Фаза у развоју макрофага када садрже огромне количине холестерил естара (тзв. пенасте ћелије) представља обележје раних и касних атеросклеротичних лезија. Макрофаги једу, континуираним снабдевањем атерогеним липопротеинима док не умру, јер, за разлику од нативног LDL рецептора, "scavenger" рецептори, познати као SR-A и CD36, које учествују у интернализацији липопротеина, нису "down"-регулисани ћелијском акумулацијом холестерола. Смрт макрофага апоптозом и некрозом доприноси формирању меког и нестабилног плака (5,131,132).

6. ГЛАТКЕ МИШИЋНЕ ЋЕЛИЈЕ

Васкуларне глатке мишићне ћелије постоје као широка палета фенотипова (133,134). У нормалним зрелим крвним судовима, преобладајући је фенотип "стање мировања" или познатији још као контрактилни или диференцирани тип глатких мишићних ћелија чија је главна улога у регулацији васкуларног дијаметра (вазодилатације и вазоконстрикције) као и протока крви (135-137). Миграторни или пролиферативни фенотип је присутан као одговор на повреду. За време овог патолошког ремоделовања (нпр. артериосклерозе) глатке мишићне ћелије са неконтрактилним или пролиферативним фенотипом доводе до стварања интималне васкуларне лезије (135,136). Такође овај тип глатких мишићних ћелија поседује повећан капацитет за стварање протеина екстрацелуларног матрикса (133,134).

Регулација глатких мишићних ћелија је врло сложен процес, ове ћелије су стимулисане да пролиферишу и мигрирају од стране неких фактора раста као и ангиотензина II (138). Ангиотензин II може допринети атерогенези на тај начин што стимулише раст глатког мишића (139). Он се везује за специфичне рецепторе на глатком мишићу, што доводи до активације фосфолипазе "C", која може довести даље до стварања калцијума интрацелуларно и контракције глатког мишића (139), повећане синтезе протеина и хипертрофије глатког мишића (140). Такође повећава процес липоксигеназе глатког мишића, што може повећати инфламацију и оксидацију LDL-а.

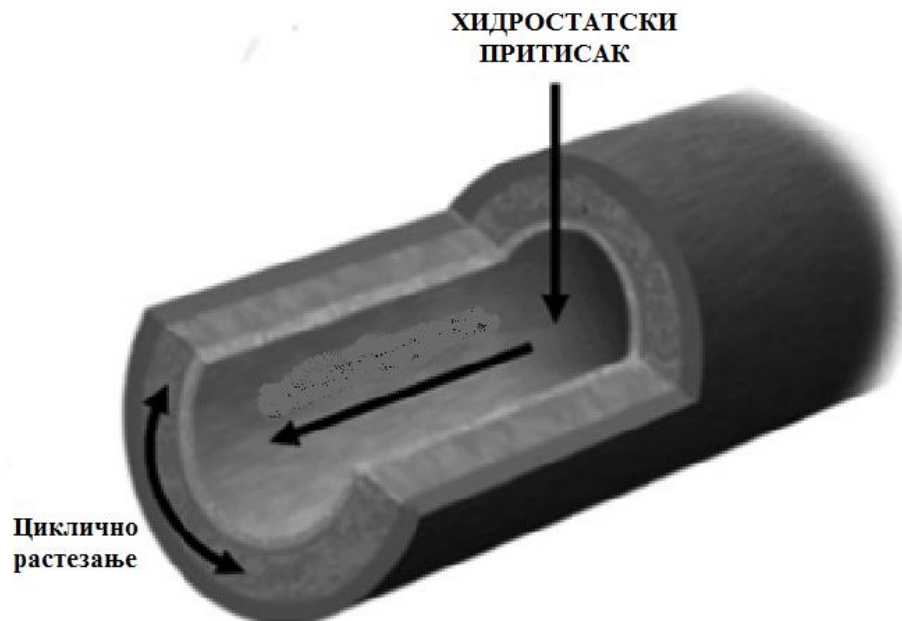
Каскада интрацелуларне сигналне трансдукције, која укључује G протеине и тирозинкиназе, доводи до реорганизације актинских и миозинских филамената, раскидања фокалних адхезија а све у функцији избацивања глатке мишићне ћелије напред, тј. подстичући кретање и миграцију (141,142). Неколико фактора се сматра одговорним за подстицање миграције васкуларних глатких мишићних ћелија као што су фосфатидил-инозитол-3-киназни пут, нуклеарни фактор капа В (NFκ)-В итд. (143-145) док се за пролиферацију васкуларних глатких мишићних ћелија сматрају одговорним PDGF, FGF, TGF-β, протеин киназа В (PKB) (10). Ипак, како ћелије могу да пролиферишу и да се деле тако може да дође и до њихове апоптозе. Наиме, нормалне адултне ћелије артеријског зида показују јако мали потенцијал ка апоптози. С друге стране, у болесном/оштећеном ткиву присутни су бројни фактори, како локално тако и системски. Ови фактори, попут

инфламаторних ћелија, цитокина, модификованог холестерола, хипергликемије, крвног притиска и др., утичу на природни баланс пролиферације и апоптозе, тако да апоптоза може да постане доминирајућа (146), и тако заправо доведе до руптуре плака унапредовалих лезија (147,148).

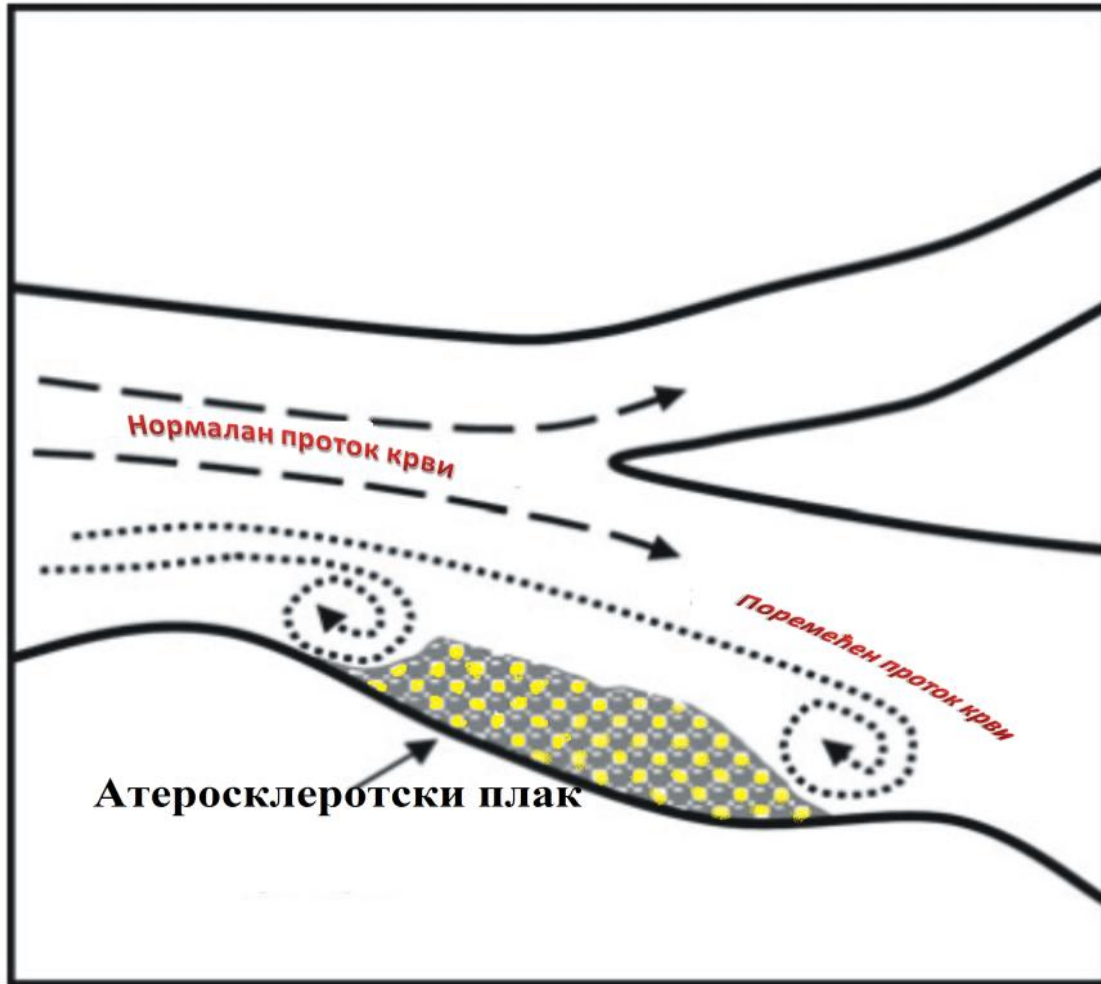
7. ХЕМОДИНАМСКИ ФАКТОРИ - УТИЦАЈ *SHEAR STRESS*-А

Као што је већ претходно описано ендотелне ћелије имају важну улогу у одржавању хомеостазе у организму. Оне "осећају" и интегришу хемодинамске и хормоналне стимулусе и остварују промене у васкуларној функцији путем секреције различитих медијаторских протеина и молекула (149). Такође, ендотелне ћелије реагују не само на хуморалне факторе у циркулацији већ и на механичке промене узроковане протоком и срчаним радом (150). На ендотелне ћелије, због њихове јединствене локализације, делују три механичке силе: притисак, који ствара хидростатска сила крви унутар крвног суда, периферно растезање или тензија, под утицајем интерцелуларних веза које постоје између ендотелних ћелија а коју стварају лонгитудиналне силе током вазомоције и *shear stress*, напон смицања кога ствара проток крви (151-154). Од свих ових сила, сматра се да је *shear stress* нарочито важна хемодинамичка сила јер може да стимулише ослобађање вазоактивних супстанци, као и да мења експресију специфичних гена, ћелијски метаболизам и морфологију (150).

Shear stress се дефинише (155) као „сила која делује на јединицу површине (крвног суда) а која настаје као последица дејства протока крви (тангенцијалне силе) на ендотел“. Јединица којом се изражава *shear stress* је Па (паскал) или dyn/cm^2 (156).



Слика 7. Хемодинамски утицаји на зид крвног суда. Део артерије који приказује како крвоток утиче на покретање три механичке силе: трење (паралелно са зидом суда), хидростатски притисак (вертикално у односу на зид суда) и циркуларно растезање (услед притиска и периферног истежања зида суда).



Слика 8. Васкуларна бифуркација и схема протока у области атеросклеротског плака. Праве регије артерија изложене су s-пролеку (стабилан ламинарни проток крви), и заштићене су од атеросклерозе. Регије бифуркација карактерише d-проток (поремећен (eng. *disturbed*) проток крви) који има предиспозиције за настанак атеросклерозе. Атеросклеротичне лезије мењају брзину протока кроз узак луминални простор и раздвајају ток у регијама непосредно низ плак.

Постоје бројни докази да хемодинамске карактеристике детерминишу локализацију лезија и доприносе патогенези атеросклерозе (157,158). Заправо, атеросклеротске лезије су првенствено локализоване на спољашњим зидовима грана и кривина крвних судова где проток није ламинаран (159,160). Како је ендотел у директном контакту са циркулишућом крви стога трпи и највећи утицај *shear stress*-а али и реагује на њега (161). Та реакција се одвија на више начине међу којима се посебно издваја убрзано "обнављање ћелија" (*turnover*) (162). Овим убрзаним обнављањем се може објаснити повећана "пропустљивост" ћелија јер се не распоређују у правцу тока крви већ имају полигоналан облик и неправилан распоред (163).

Shear stress има веома важан ефекат на цитоскелет ендотела (164,165) посебно актин и на микротубуле скелета, који су од есенцијалног значаја за одржавање васкуларног ендотела и за регулисање обнављања ендотела након денудације услед губитка ћелија (165). Делимично растурање адхезивних комплекса може бити узроковано *shear stress*-ом и праћено је променом облика ендотелних ћелија и реорганизацијом распореда F-актина (166). Дистрибуција и организација актинског цитоскелета је промењена у односу на хемодинамику *shear stress*-а. На пример, низак *shear stress* фаворизује проминарање периферних микрофиламената (167) док повећан *shear stress* доводи до повећања централних филамената. У ћелијама које су изложене условима високог *shear stress*-а централни микрофиламенти постају дебљи и дужи, док се густе периферни снопови оштећују. Ове промене су реверзибилне уколико се *shear stress* врати опет на нормалну вредност (168). Континуирана изложеност протоку такође доводи до ремоделовања цитоскелета при чему се ћелије ендотела оријентишу у правцу протока крви (169). Сматра се да су *стрес влакна*¹ су главне контрактилне структуре код многих узгајаних анималних ћелија. Ови актомиозински снопови су нарочито изражени код фибробласта, глатког мишића, ендотелних и ћелија канцера (170). Недавно је идентификована *перинуклеарна актинска капа*, актинска структура, која се састоји из *стрес влакана* смештених изнад нуклеуса, за коју се сматра да може деловати као

¹ Филаменти актина су поларне, спиралне структуре, (179). Стрес влакна се састоје од снопова, 10-30 актинских филамената, који су повезани а-актинином, обично у биполарном склопу. Ови контрактилни актомиозински снопови често се налазе уз фокалне адхезије, које повезују екстрацелуларни матрикс (ЕЦМ) са цитоскелетом актина (180,181). Међутим, за разлику од стрес влакана немишићних ћелија, где је β-актин главна актинска изоформа, миофибробласт испољава а-актин који је инкорпориран у стрес влакна глатког мишића (182).

механички преносник силе из ћелије до нуклеуса (171). Механичка сила која се преноси на фокалне адхезије стрес влакнима може да промени конформацију механосензитивних фокалних адхезионих протеина, укључујући и p130CAS (такође познат као BCAR1) (172), β-интегрин (173) и *talin* (174-176). Ово сугерише на то да напон *стрес влакана* или њихова контрактилност може претворити биомеханичке стимулусе у биохемијске промене (177,178). Постоји јака корелација између ендотелне дисфункције и области у којима је вредност *shear stress*-а ниска (125,151,160,183). На овим местима је примећено и повишено преузимање (*uptake*) липопротеина (184,185). Низак *shear stress* утиче на адхезију леукоцита за активирани ендотел преко повећане експресије адхезивних молекула попут ICAM-1 (186), VCAM-1 (187), MCP-1 (188) и E-селектина (189). Физиолошки *shear stress* је потребан за обнављање механичких повреда ендотела током времена (167). У оквиру *in vivo* модела механичких повреда, сматра се да ниски протоци доводе до слабих ћелијских контаката и поремећеног усклађивања ћелијског цитоскелета дуж оштећеног ендотела што резултира поремећајем њиховог обнављања (167). Поремећај у обнављању може да промовише не само стварање атерома кроз повећану пропустљивост ендотела за макромолекуле као што је LDL већ може и да доведе до стварања ерозија и руптура нестабилних плакова (190). Бројне студије су показале да *shear stress* утиче на митозу и апоптозу (Слика 6) (191-198). Основна запажања су показала да високе вредности *shear stress*-а супримирају митозу и апоптозу док низак *shear stress* подстиче оба процеса. Све ове студије, заправо сугеришу да ће стопе обнављања и апоптозе ћелија а тиме и учесталост *leaky junctions* бити већа у областима артерија где је низак *shear stress* уједно и где је локализована атеросклероза. Cancel и Tarbell (199) су не тако давно показали јаку позитивну корелацију између стопе апоптозе и пропустљивости LDL-а у културама *in vitro* ендотелних ћелија аорте краве. Недавно је такође показано да је обнављање ендотелних ћелија аорте краве под утицајем *shear stress*-а којем су изложене више од 24 часа потпуно блокирано третирањем ових ћелија хепариназом која оштећује глококаликс (200). Овај податак сугерише да је присуство интактног гликокаликса битно за функционисање порозних веза и пропустљивости LDL-а у циркулацији.

Показано је да *shear stress* активира Rho-ROCK-LIMK-кофилин пут, који затим доводи до модулисања протеина који везују стеролске регулаторне елементе (енг. *sterol*

regulatory element binding proteins (SREBPs)) а који регулише метаболизам липида и холестерола (201).

Сматра се да постоји инверзна везу између експресије VCAM-1 и *shear stress*-а, што сугерише на смањено везивање леукоцита при повишеном *shear stress*-у (202,203,204). Једна група аутора сматра да је ICAM-1 "up"-регулисан при високом *shear stress*-у и да се леукоцити више везују након излагања *shear stress*-у (205,206).

Ипак, намеће се питање "Како ћелије осећају промене *shear stress*-а?". Бројне студије су изнеле своје претпоставке према којима постоје молекули који представљају сигналне молекуле који имају способност да реагују на промене вредности *shear stress*-а и да те промене у виду биохемијских сигнала преносе ендотелним ћелијама. Међу молекулима који се помињу је фамилија протеин киназа тзв. МАП (*енг. MAP*). Ова фамилија протеин киназа има много чланова а заједничко им је да су зависне од *G* протеина, доводе до пораста интрацелуларног Ca^{2+} и утичу на експресију гена. Члан фамилије "*MAP*" киназа је ERK1/2, који се активира уз помоћ сигналних молекула, од којих неки потичу из групе тирозин киназа, а који као трансдјусер има способност да преводи дејство *shear stress*-а на ендотелне ћелије доводећи до повећања нивоа азот оксида, могуће уз помоћ ендотелне конститутивне азот оксид синтазе (eNOS) (207).

У атеросклеротским лезијама запажа се пролиферација глатких мишићних ћелија и има индиција да је процес стимулисан факторима ендотелних ћелија под утицајем *shear stress*-а. Показано је да многи фактори у циркулацији који делују на ендотелне ћелије утичу с друге стране на глатке мишићне ћелије а све под утицајем *shear stress*-а (208,209).

Имајући у виду значај *shear stress*-а циљ овог рада је био да се испита транспорт LDL-а из интраваскуларног простора у зид крвног суда у односу на различите вредности *shear stress*-а као и да се испита могући утицај дужине изложености повишеним вредностима холестерола како на ендотел тако и на транспорт LDL-а унутар зида крвног суда. Због тешкоћа да се процене транспортни путеви LDL-а у артеријски зид у *in vivo* условима, сва досадашња истраживања су се углавном базирала на испитивању транспорта овог молекула у културама ћелија ендотела, у одсуству перфузионог протока а самим тим и без анализе утицаја *shear stress*-а. При томе су се користили крвни судови сечени као траке (210) или сегменти крвних судова, (124,126) или су истраживања рађена на културама ендотелних ћелија *in vitro* (113) или користећи математичке и компјутерске

моделе 2D и 3D симулација крвних судова и транспортних параметара (128,211-220). То је био главни разлог зашто смо ово истраживање извели користећи другачији експериментални приступ помоћу радиоактивно обележеног ^{125}I -LDL при константном перфузионом притиску и перфузионом протоку. Истраживање је спроведено на *ex vivo* изолованим сегментима заједничке каротидне артерије кунића који су храњени дијетом заснованом на високим дозама холестерола.

Циљ овог истраживања је био да се истражи утицај пролонгиране хиперлипидемије (изазване атерогеном дијетом) на транспорт LDL-а у зид крвног суда, леве и десне каротидне артерије кунића (*aa. carotis communis, dextra et sinistra*), као и однос између промене биомеханичких параметара као што је *shear stress* и преузимања овог молекула од стране крвног суда. Поред тога циљ је био и да се испита утицај здравог, очуваног ендотела на транспорт макромолекула, као што је LDL, у зид крвног суда.

Обзиром на све већи број оболелих од атеросклерозе од значаја је да се прецизно утврде механизми који доводе до настанка и развоја ове болести а тиме допринесе и њеној превенцији и лечењу.

8. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

8.1. ЦИЉЕВИ

1. Утврдити да ли постоји транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића
2. Утврдити да ли постоји транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића у условима без ендотела
3. Утврдити да ли постоји транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића током развоја атеросклерозе
4. Испитати да ли на транспортне параметре LDL-а у изолованом крвном суду кунића утиче интраваскуларни притисак
5. Утврдити да ли *shear stress* утиче на транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића

8.2. ХИПОТЕЗЕ (нулте)

1. Не постоји статистички значајан транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића
2. Транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића не зависи од присуства ендотела.
3. Атеросклероза не утиче на транспорт LDL-а у изолованом крвном суду кунића
4. Промена интраваскуларног притиска не утиче на параметре транспорта LDL-а у изолованом крвном суду кунића
5. Не постоји статистички значајан утицај *shear-stress*-а на транспорт LDL-а у изоловани крвни суд кунића

9. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

9.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

Ово истраживање је спроведено као експериментална студија на материјалу анималног порекла *ex vivo*.

У овој студији истраживан је транспорт LDL-а у зид крвног суда леве и десне заједничке каротидне артерије (aa. carotis communis dextra et sinistra) кунића, у условима *ex vivo*. Све експерименталне процедуре су урађене у складу са Директивама Савета Европе (*European Council Directive, 86/609/EEC*) и принципима Добре лабораторијске праксе (2004/9/EC, 2004/10/EC) и одобрене од стране Етичког комитета за добробит експерименталних животиња, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија (заведено по бројем 01-4491, 17.6.2011. године, одобрено 4.11.2011. године).

Експериментална истраживања на изолованим каротидама New Zealand White кунића вршена су модификованом *Steady state* методом у условима константног перфузионог протока и применом апаратуре за испитивања биомеханичких и функционалних испитивања ткива (221,222). Коришћени су оригинално развијени софтвер и хардвер, направљени у сарадњи са Факултетом инжењерских наука и одсеком *Bioengineering Research and Development Center (BioIRC Ltd., Faculty of Mechanical Engineering, Center for Bioengineering, Kragujevac, Serbia)*.

9.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ

Студија је рађена на изолованим заједничким каротидним артеријама (левој и десној) (aa. carotis communis dextra et sinistra) New Zealand White кунића, оба пола. Кунићи из контролне групе (5 укупно) су имали тежину 3.5-4 kg док кунићи који су били на атерогеној дијети су тежили 1.7 ± 0.2 kg пре почетка атерогене дијете. Кунићи су набављени из комерцијалних сојева (Одељење за експерименталну хирургију и узгој лабораторијских животиња, ВМА) у сарадњи са Факултетом инжењерских наука и одсеком Bioengineering Research and Development Center (BioIRC Ltd.) којим руководи проф. др Ненада Филиповић а у оквиру међународног интегралног пројекта »FP7 ARTreat-224297«. Животиње су чуване на температури одржаваној између 17° и 21° С, релативна влажност је била између 30% и 70%. Животиње су храњене мешом за исхрану лабораторијских животиња (кунића) и добијали воду *ad libitum*. Експериментална група кунића (15 укупно) је храњена истом мешом уз додатак 1% холестерола (атерогена дијета) Energon chew (Energon, Austria) (223). Просечан унос хране је био око 150g дневно по кунићу. На крају периода дијете животиње су имале тежину од 3.04 ± 0.12 kg (након осам недеља дијете), 3.66 ± 0.17 kg (након десет недеља дијете) и 4.03 ± 0.32 kg (након дванаест недеља дијете). Свака експериментална подгрупа је имала по 5 животиња.

Експерименталне животиње су у истраживању биле подељене у 2 групе:

1. **Контролна група** - (5 кунића) за испитивање LDL транспорта у зид крвних судова здравих кунића. Коришћена је за упоређивање са експерименталним групама, као и за експерименте у којима се такође испитивао LDL транспорт у зид крвних судова након уклањања ендотела хемијским путем;
2. **Експерименталне групе** - (15 кунића) животињама је у исхрану додаван 1% холестерол (атерогена дијета) (223). Ова експериментална група је имала 3 подгрупе:
 - 2.1 - кунићи који су били на атерогеној дијети 8 недеља,
 - 2.2 - кунићи који су били на атерогеној дијети 10 недеља,
 - 2.3 - кунићи који су били на атерогеној дијети 12 недеља.

9.3. АПАРАТУРА

Апаратура за Биомеханичка и функционална испитивања ткива, која је коришћена у истраживању *ex vivo* крвног суда, се састоји из следећих делова:

1. Аналогно-дигитални (A/D) конвертор за детекцију вредности притиска и температуре (EXP-B, Experimetria LTD Budapest, Hungary)
2. Перисталтичка пумпа (Microperpex ® Peristaltic Pump, LKB Bromma, Sweden)
3. Микроинфузиона пумпа (Syringe pump, Sage Instruments, USA)
4. Термостат за мерење температуре перфузионог раствора
5. Инјектор за давање биолошки активних молекула
6. Аутоматски сакупљач узорака
7. Уређај за подешавања отпора у крвном суду (Resistance changing device)
8. Уређај за контролу инјектора (шприца).
9. Уређај за контролу отпора
10. Сензор за регистровање притиска у систему, односно унутар крвног суда (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA)
11. Кадица за изоловане органе са канилама истоветног дијаметра за постављање изолованог сегмента крвног суда.
12. Водено купатило за грејање физиолошког раствора у систему и кадице за изоловане органе (крвни суд) (MLW, Germany)
13. Камера којом се детектује промена дијаметра крвног суда током истраживања
14. Рачунар, са оригинално развијеним софтвером за регистровање перфузионог притиска и спољашњег дијаметра крвног суда
15. Боца за гасирање перфузионог раствора (смеша гасова у односу O₂:CO₂= 95%:5%).
16. Резервоар са перфузионим раствором (повезан са боцом за гасирање)
17. Грејач перфузионог раствора (t = 37°C)
18. Спектрофотометар (Gilford Instrument)
19. Гама бројач (*Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)*)
20. Светлосни микроскоп (BIM105-T, BTC, UK)

9.4. РЕАГЕНСИ

Кребс-Рингеров раствор (mM на pH 7,4): NaCl 117, KCl 4.7, MgSO₄ x 7H₂O 1.2, NaHCO₃ 24.8, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂x2H₂O 2.5 и D-глюкоза 11.1. (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany).

¹²⁵I-LDL (липопротеин мале густине) (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA, USA); специфичне активности: 0.102μCi/ml; концентрације:525μCi/2ml, обележен радиоактивним јодом [I-125] помоћу Јод-моноклорид методе. ¹²⁵I-LDL је пречишћен помоћу 10ml (dry bed) Sephadex G50 којим се уклања око 99% слободног [I-125]. Крајњи продукт је растворен у 50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl и 0.3mM EDTA при pH 7.4, филтриран кроз мембрану и пакован у асептичним условима. ¹²⁵I-LDL је био изолован центрифугирањем на основу градијента густине, а производ је мешавина свих LDL честица које плутају у раствору на густини од 1.063 KBr, молекулске масе од 2.2 до 2.9 милиона Dalton-а и величине од 180 до 250 Ангстрема (Å). Финална концентрација ¹²⁵I-LDL-а у перфузионом раствору је била 0.0013mg/ml.

Кетамин (Ketamine®, Laboratorio Sanderson, Santiago, Chile) - 500mg/10ml, стерилна солуција за инјекције за интрамускуларну или интравенозну примену. Оригинална ампула садржи 10 ml раствора.

Натријум-пентобарбитал (Carbone Scientific Co. LTD, London, UK) спада у групу барбитурата који имају седативно и хипнотичко дејство на ЦНС. Хемијски назив: 2,4,6(1H,3H,5H)-пиримидинетрион, натријумова со (1:1), C₁₁H₁₈N₂NaO₃. Стерилан је раствор за интрамускуларну и интравенозну примену. Пакује се у бочицама од 20 ml (50mg/ml).

Еванс плаво (EBD), концентрација раствора је 0.33 mg/ml, растварач је дестилована вода.

^{99m}Tc-Nanocis (CIS Bio International, France), је по хемијском саставу наноколоид ренијум сулфида (Re₂S₇). Просечна вредност дијаметра колоидне честице је око 100 nm. Наноколоид је радиоактивно обележен технецијумом (^{99m}Tc) који има полуживот 6 сати.

Сви експерименти су рађени у периоду од 4 сата од времена припреме наноколоида тако да је стабилност радио-обележене супстанце била очувана. ^{99m}Tc -Nanocis је припреман према упутству произвођача (CIS Bio International, France) у лабораторији Одељења за нуклеарну медицину Клиничког центра у Крагујевцу. ^{99m}Tc -Nanocis је имао активност 400 MBq и био разблажен у води (aqua pro injectione) до укупне запремине 2 ml.

Натријум-деоксихолат (Natriumdesoxycholol ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)); (MERCK, Darmstadt, Germany) је апликован континуирано у перфузиони раствор помоћу шприца на самом почетку проксималне каниле (100 $\mu\text{l}/\text{min}$), са финалном концентрацијом у перфузионом раствору од 2.5 mM.

9.5. ПРОТОКОЛ ИСТРАЖИВАЊА

Експерименти транспорта LDL-а вршени су на изолованим сегментима крвних судова, леве и десне заједничке каротиде кунића. Све процедуре током истраживања су урађене у складу са Директивама Европског Савета (*European Council Directive, 86/609/EEC*) и принципима Добре лабораторијске праксе (2004/9/EC, 2004/10/EC) и одобрене од стране Етичког Комитета за добробит експерименталних животиња, Факултета медицинских наука, Универзитета У Крагујевцу, Србија.

Ова експериментална студија је подељена на два дела. Први део истраживања се односи на испитивања на здравој популацији кунића, чији су резултати коришћени као контролне вредности. Тој истој групи кунића је уклањан ендотел хемијским путем натријум деоксихолатом да би се испитао транспорт макромолекула (LDL-а) у зид крвног суда у условима без ендотела као заштитне баријере. Први део студије се такође односи на утврђивање услова који би довели до најадекватнијег експерименталног протокола. Други део студије описује експерименте на кунићима храњеним атерогеном дијетом у различитом временском трајању (осам, десет и дванаест недеља).

Циљ овог истраживања је био да се истражи утицај пролонгиране хиперлипидемије (изазване атерогеном дијетом) на транспорт LDL-а у зид крвног суда, леве и десне каротидне артерије кунића, као и утицај биомеханичких параметара као што је shear stress на преузимање овог молекула из интраваскуларног простора у зид крвног суда. Поред тога циљ је био и да се испита утицај здравог, очуваног ендотела на транспорт макромолекула, као што је LDL, у зид крвног суда.

На почетку истраживања коришћена је *Брза дилуциона метода два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* (224-226). Овом методом једнократне циркулације трасерског пара се истражује релативно преузимање (*uptake*) тест трасера² (¹²⁵I-LDL) од стране зида крвног суда у односу на екстраћелијски референтни трасер³ док пролази кроз интраваскуларни простор (225,226). Као референтни молекули су били процењивани ^{99m}Tc-Nanocis и Боја Еванс плаво (EBD).

Пре испитивања транспорта тест трасера и потенцијалних референтних трасера урађене су серије техничких експеримената при чему су коришћене пластичне цевчице уместо сегмента крвног суда са циљем стандардизације методе и експерименталног протокола.

² Тест трасер је молекул (супстанца) чији се транспорт испитује у односу на транспорт референтног трасера.. У овом случају тест трасер је молекул ¹²⁵I-LDL.

³ Референтни трасер је молекул (супстанца) чије транспорт је познат. У односу на резултате добијене за референтни трасер процењујемо вредности транспорта добијене за тест трасер. Референтни трасер треба да поседује слична физико-хемијска својства као тест трасер, да не пролази кроз мембрану ћелије, да се не задржава у зиду крвног суда. У ефлуенту он се потпуно обнавља, тј. сва количина која се да се врати у интраваскуларни простор без могућности да се веже за било коју структуру (рецептор, носач).

9.5.1. СЕРИЈЕ ТЕХНИЧКИХ ЕКСПЕРИМЕНАТА

9.5.1.1. КРЕИРАЊЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА (ЕВАНС ПЛАВО (EBD) И ^{99m}Tc-NANOCIS)

У циљу стандардизације експерименталног дизајна, експерименталног сетинга и протокола, рађени су прво технички експерименти у којима је уместо изолованог крвног суда коришћена пластична цевчица. Пластична цевчица је постављана навлачењем на проксималну и дисталну канилу. Сви остали експериментални услови, параметри и уређаји који су коришћени у истраживању, су били подешени на исти начин као када би се радило са крвним судом. Када је све било постављено за рад (Слика 9) помоћу Перфузионе пумпе је регулисан проток Кребс-Рингеровог раствора (КР раствора) кроз систем и кроз пластичну цевчицу. Такође је унутар кадице у делу који је окруживао цевчицу стављен КР раствор и температура одржавана на 37°C. Еквилибрација система је трајала 20-30 минута. За време еквилибрације помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула пре него што је Инјектор прикључен на систем узети су узорци за стандарде. Након периода еквилибрације на температури од 37°C при перфузионом протоку од 1 ml/min, у перфузиони систем, непосредно испред проксималне каниле, помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула, убризган је болус запремине 100 µl који је садржао референтни трасер (раствор боје Еванс плаво (EBD) или ^{99m}Tc-Nanocis). Током рада прикупљани су узорци помоћу Аутоматског сакупљача узорака. Дистална канила је била повезана са Уређајем за подешавање отпора у крвном суду (Resistance changing device) а перфузиони притисак је мерен помоћу Сензора за регистровање притиска у систему, тј. унутар крвног суда. Експерименти су рађени у условима различитих вредности притисака у систему који је подешаван коришћењем Уређаја за подешавања отпора у крвном суду. Да би испитали који протокол је најпогоднији за рад мењали смо услове тј. параметре рада. Осим што је у техничким експериментима коришћена пластична цевчица уместо крвног суда, мењали смо и друге параметре. Наиме, проток је мењан тако да смо радили експерименте на различитим вредностима константног протока: 1 ml/min, 2 ml/min и 3ml/min. Такође мењан је и перфузиони притисак током експеримената тако да су коришћене вредности 100 mmHg,

130 mmHg, 160 mmHg, 190 mmHg. Вредности притиска у систему су мерене током експерименталног рада помоћу Сензора за регистровање притиска у систему, односно унутар крвног суда (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA). Сви експерименти су рађени на температури 37 °C.

Узорци ефлуената су скупљани на следећи начин: прво је сакупљано 15 узорака (3 капи по узорку) а затим још 9 кумулативних узорака (сваки прикупљан по 3 минута). У тих првих 15 узорака је додаван физиолошки раствор до коначне запремине од 3 ml по узорку да би у свим узорцима била иста запремина. Кумулативни узорци су мерени без дилуције. Посебно су рађени експерименти у којима је референтни трасер био раствор боје Еванс плаво (EBD) а посебно експерименти у којима је референтни трасер био наноколоид $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$.

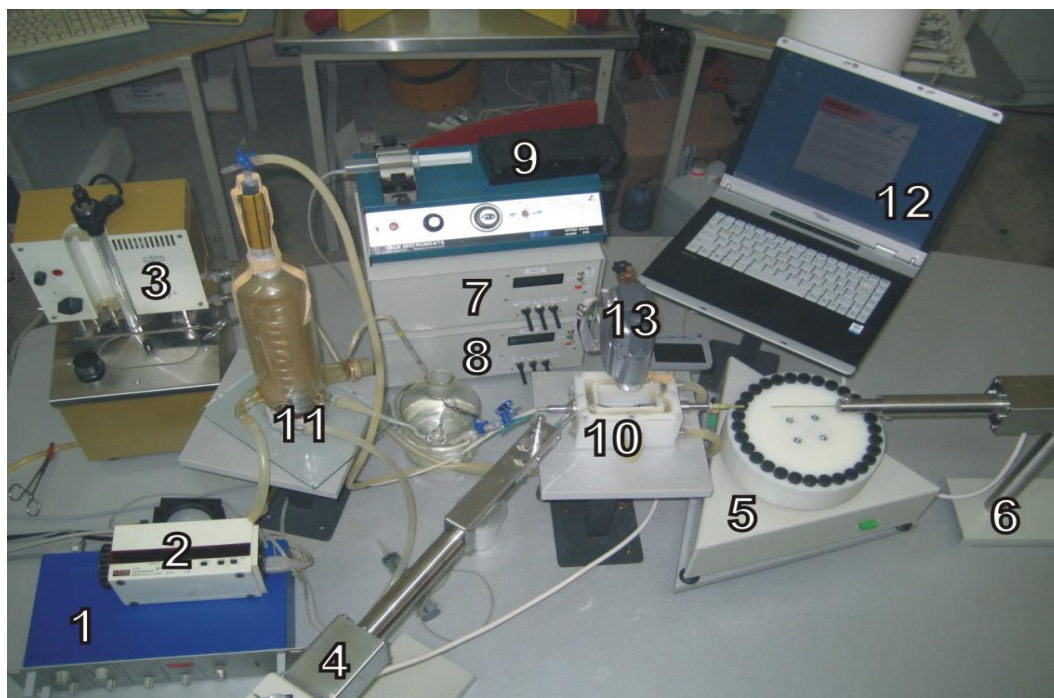
Концентрација EBD раствора у сваком узорку, као и у 3 узорка који су коришћени као стандарди, је одређивана мерењем апсорбанце помоћу спектрофотометра (Gilford Instrument). Интензитет апсорбанце је пропорционалан EBD концентрацији која је коришћена за процену криве концентрација-време, тј. дилуционе профиле за EBD. Приликом мерења и рачунања узето је у обзир разблажење које је прављено у првих 15 узорака.

Перфузиони ефлуенти који су садржали $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$, као и 3 узорка који су коришћени као стандарди, мерени су помоћу Гама бројача (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)) на одељењу за Нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Радиоактивност перфузионих узорака је рачуната помоћу компјутерског програма у односу на време сакупљања да би се добила крива радиоактивност-време, тј. дилуциони профили за испитивани молекул $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$.

Циљ ових експеримената на пластичној цевчици уместо крвном суду је био да се одреде:

- а) Референтни трасер који би био најпогоднији за даљи рад;
- б) Фактори корекције за дилуционе профиле потенцијални референтних трасера (EBD, $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$);

в) Оптимална радиоактивност за тест трасере (^{125}I -LDL) у инфузионом болусу која би била довољна за детекцију дилуционих профила.



Слика 9. Апаратура (Setting) за ex vivo експерименте на крвним судовима: 1. Аналогно-дигитални (A/D) конвертор за детекцију вредности притиска и температуре, 2. Перисталтичка пумпа, 3. Термостат за мерење температуре перфузионог раствора, 4. Инјектор за давање биолошки активних молекула, 5. Аутоматски сакупљач узорака, 6. Уређај за подешавања отпора у крвном суду, 7. Уређај за контролу инјектора (шприца), 8. Уређај за контролу отпора, 9. Микроинфузиона пумпа, 10. Кадица за изоловане органе са канилама истоветног дијаметра за постављање изолованог сегмента крвног суда, 11. Грејач перфузионог раствора, 12. Рачунар, са оригинално развијеним софтвером за регистровање перфузионог притиска и спољашњег дијаметра крвног суда, 13. Камера којом се детектује промена дијаметра крвног суда током истраживања

9.5.1.2. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА

Експериментално добијени резултати након мерења радиоактивности у ефлуентима су фитовани помоћу математичке функције Φ 1. Обе криве (дилуциони профили за EBD и $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$) су представљени на Графикону 1А (видети у одељку Резултати) и фитоване прецизно ($R^2 \geq 0.98$) користећи математичку функцију:

$$y = ae^{-\left[-0.5 \left(\frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{b} \right)^2 \right]} \quad (\Phi 1)$$

где y представља проценат обновљене дозе, а x представља време (у секундама).

Према већ описаној методи урађен је такође технички експеримент са EBD-ом и $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ -ом али на изолованом сегменту крвног суда (детаљнији опис је касније наведен). Након серије контролних (техничких) експеримената урађених на пластичној цевчици и изолованом сегменту крвног суда (један репрезентативни експеримент) и евалуације добијених резултата (видети у одељку Резултати) даљи експериментални рад је настављен коришћењем изолованих сегмената леве и десне каротиде кунића према следећем протоколу а као референтни трасер је узет наноколоид $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$.

9.5.2. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА СА ОЧУВАНИМ ЕНДОТЕЛОМ

9.5.2.1. БРЗА ДИЛУЦИОНА МЕТОДА ДВА ИЗОТОПА (*RAPID DUAL ISOTOPE DILUTION METHOD*)

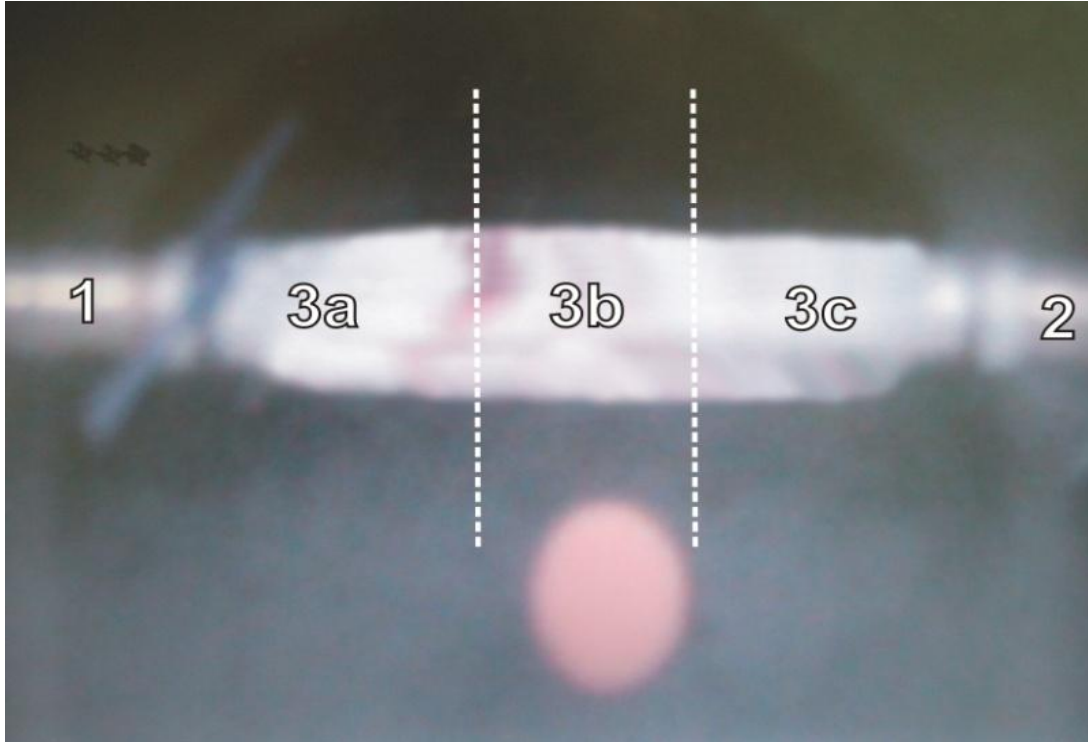
На почетку сваког експеримента мерен је спољашњи дијаметар крвног суда дигиталном камером и оригинално развијеним софтвером. Такође је мерена дебљина зида крвног суда помоћу светлосног микроскопа и микроскопски градуисане мрежице.

Метода брзе једнократне циркулације пара трасера, *Брза дилуциона метода два изотопа (Rapid dual isotope dilution method)* је урађена у истим условима као горепоменути технички експерименти. Сада је уместо пластичне цевчице постављан изоловани сегмент крвног суда, тј. сегмент леве или десне каротиде здравих кунића New Zealand White. Наиме, New Zealand White кунићи, оба пола (5 животиња), су анестезирани натријум-пентобарбиталом (0.5 mg/kgТТ, i.v.) и Кетамином (0.5 mg/kgТТ, i.v.) (227). Апаратура је постављена на већ поменути начин (Слика 9) и помоћу Перфузионе пумпе је регулисан проток Кребс-Рингеровог (КР) раствора кроз систем. Крвни суд је изолован и постављен у Кадницу за изоловане органе (Слика 10). Канилама истоветног дијаметра (2 mm) у кадици био је повезан (проксимално кардијални крај и дистално кранијални крај крвног суда) са системом за перфузију Кребс-Рингеровим физиолошким раствором, са константним перфузионим протоком од 1 ml/min. Такође је унутар кадице у делу који је окруживао крвни суд стављен КР раствор и температура одржавана на 37°C и гасиран мешом гасова 95% O₂ и 5% CO₂ на рН 7.4. Перфузиони раствор (КР) је такође био загрејан на температуру од 37°C и гасиран мешом гасова 95% O₂ и 5% CO₂ на рН 7.4. Изолован крвни суд је био истегнут на његову *in vivo* дужину. Дистална канила је била повезана са Уређајем за подешавање отпора у крвном суду (Resistance changing device) а перфузиони притисак је мерен помоћу Сензора за регистровање притиска у систему, односно унутар крвног суда (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA). Еквилибрација система је трајала 20-30 минута. За време еквилибрације помоћу Инјектора

за давање биолошки активних молекула, пре него што је Инјектор прикључен на систем узети су узорци за стандарде $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ -а. Исти поступак је поновљен при узимању узорака за стандарде $^{125}\text{I-LDL}$ -а. Након еквилибрације крвног суда на температури од 37°C и при перфузионим протоком од 1 ml/min у перфузиони систем, непосредно испред проксималне каниле, помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула, убризган је болус запремине $100\text{ }\mu\text{l}$ који је садржао референтни трасер ($^{99m}\text{Tc-Nanocis}$) и тест трасер ($^{125}\text{I-LDL}$). Током рада прикупљани су узорци помоћу Аутоматског сакупљача узорака.. Прво је сакупљано 15 узорака (3 капи по узорку) а затим још 9 кумулативних узорака (сваки прикупљан по 3 min). У првих 15 узорака је додаван физиолошки раствор до коначне запремине од 3 ml по узорку да би у свим узорцима била иста запремина. Кумулативни узорци су мерени без дилуције. Крвни суд је сматран виабилним уколико се контраховао при додавању 25 mM KCl, док је присуство функционалног ендотела верификовано дилатацијом у присуству Ach ($1\text{ }\mu\text{M}$) на крају експеримента.

Сви експерименти су рађени на изолованим каротидама здравих кунџа а да би утврдили протокол који би био најпогоднији за рад мењали смо услове тј. параметре рада. Експерименти су рађени на константном перфузионом протоку 1 ml/min . Међутим, мењан је перфузиони притисак током експеримента тако да су коришћене вредности 10 mmHg, 80 mmHg и 140 mmHg. Вредности притиска у систему су мерене током рада помоћу Сензора за регистровање притиска у систему, односно унутар крвног суда (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA). Сви експерименти су рађени на температури 37°C .

Радиоактивност у перфузионим ефлуентима у којима су се налазили $^{125}\text{I-LDL}$ и $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ је измерена Гама бројачем на одељењу за Нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Преузимање $^{125}\text{I-LDL}$ -а (*uptake*, U %) је израчунато као разлика вредности за $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ и оне за $^{125}\text{I-LDL}$ за сваки појединачни узорак (Ф2).



Слика 10. Снимак сегмента изолованог крвног суда (каротиде кунџа) који је постављен на каниле у кадици за изоловане органе (снимљено дигиталном камером): 1. Проксимална канила (кардијални део изолованог сегмента крвног суда, део сегмента ближи срцу), 2. Дистална канила (кранијални део изолованог сегмента крвног суда, део сегмента ближи глави), 3а. Кардијални део сегмента крвног суда, 3б. Медијални део сегмента крвног суда, 3с. Кранијални део сегмента крвног суда

На основу обновљене радиоактивности референтног и тест трасера у сваком узорку ефлуента одређивани су дилуциони профили за оба молекула (референтни трасер $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ и тест трасер $^{125}\text{I- LDL}$) у функцији времена прикупљања узорака.

Преузимање $^{125}\text{I- LDL}$ - а за сваку вредност примењеног притиска је процењено из дилуционих кривих а преко формуле:

$$Uptake(\%) = \left(1 - \frac{\text{тест трасер}}{\text{референтни трасер}}\right) \times 100, \quad (\Phi 2)$$

односно
$$Uptake(\%) = \left(1 - \frac{^{125}\text{I- LDL}}{^{99m}\text{Tc- Nanocis}}\right) \times 100$$

Када су експерименти били завршени и сви узорци скупљени за анализу, изоловани сегмент крвног суда је вађен из кадице, сечен на 3 дела (проксимални (кардијални) део, медијални део и дистални (кранијални) део) да би се Гама бројачем (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)) на одељењу за Нуклеарну медицину КЦ Крагујевац мерила радиоактивност ^{125}I -LDL-а у зиду крвног суда у сваком појединачном сегменту. Такође су узимани узорци КР раствора из Кадике за изоловане органе да би се проверило да ли крвни суд можда цури.

Резултати мерења радиоактивности у узорцима ефлуената и сегмената крвног суда добијени *Брзом дилуционом методом два изотона (Rapid dual isotope dilution method)*, (224-226) су након анализирања и математичких прорачуна показали да се криве дилуционих профила ^{125}I -LDL-а и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocis-а након корекције преклапају толико да је *uptake* био изузетно мали, у рангу стандардне грешке (SE). Такође, процењено је да преузимање ^{125}I -LDL-а (*uptake*) од стране крвног суда има изузетно мали капацитет и спору динамику, и да метода једнократне циркулације није погодна за одређивање транспорта ^{125}I -LDL-а па је одлучено да се протокол промени и да се примени дужа континуирана перфузија ^{125}I -LDL-а у трајању од 10 минута (*Steady state* метода).

9.5.2.2. STEADY STATE МЕТОДА

У циљу верификације *Steady state* методе, слично као за већ описану *Брзу дилуциону методу два изотона (Rapid dual isotope dilution method)*, урађена је серија техничких експеримената на пластичној цевчици уместо на крвном суду у експерименталним условима који би били примењени у експериментима са крвним судовима. Добијени резултати су показали да долази до потпуног обнављања убризганог обележеног молекула у функцији времена, при употреби пластичне цевчице уместо крвног суда.

Након тога је урађена серија експеримената у којима су коришћени изоловани сегменти крвних судова, и при томе је примењено на основу обновљене радиоактивности у узорцима ефлуената да је дошло до задржавања убризгане дозе $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а. Ова разлика између дате дозе $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а и обновљене дозе $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а (у узорцима) током периода *Steady state* указује на транспорт/преузимање (*uptake, Us*) $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а из интраваскуларног простора у зид крвног суда.

Експериментални протокол за *Steady state* метод се разликује од *Брзе методе два изотона*, па је зато у целости описан.

9.5.2.2.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ ЗА STEADY STATE МЕТОД

На почетку експеримената мерен је спољашњи дијаметар крвног суда дигиталном камером и оригинално развијеним софтвером. Такође је мерена дебљина зида крвног суда помоћу светлосног микроскопа и микроскопски градуисане мрежице.

Након препаровања изоловани сегмент крвног суда (у овом делу истраживања коришћене су каротиде здравих кунића) је постављен у Кадицу за изоловане органе, повезан преко проксималне и дисталне каниле за систем за перфузију. Дужина и спољашњи дијаметар изолованог сегмента крвног суда мерени су и регистровани помоћу

дигиталне камере и оригинално развијеног софтвера током експеримента. Након периода еквилибрације (20-30 минута) при протоку перфузионог раствора од 1 ml/min постављен је Уређај за подешавања отпора у крвном суду (*Resistance changing device*) који омогућава прецизно мењање и контролу интраваскуларног, перфузионог притиска (70 ± 10 mmHg и 140 ± 10 mmHg). Вредност интраваскуларног, перфузионог притиска се региструје помоћу Сензора/трансдјусера за регистровање притиска (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA) и бележи на рачунару помоћу оригинално развијеног софтвера (BioIRC Ltd., Faculty of Mechanical Engineering, Center for Bioengineering, Kragujevac, Serbia). За време еквилибрације помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула пре него што је Инјектор прикључен на систем узети су узорци за стандарде. Након достизања одговарајућег притиска и након еквилибрације крвног суда у периоду од 15-30 минута вршена је десетоминутна (10 минута) континуирана перфузија обележеним ^{125}I -LDL-ом (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула. Аутоматски сакупљач узорака је континуирано сакупљао прво 12 узорака (кумулативних једноминутних узорака перфузионог ефлуента) а затим наредних 6 кумулативних троминутних узорака. Радиоактивност у сваком узорку представља обновљену радиоактивност обележеног молекула (*outflow dose*) у функцији времена. У првих 12 узорака додаван је физиолошки раствор до укупне запремине 3 ml/узорку и тако је био припремљен за мерење специфичне активности ^{125}I -LDL-а. Специфична активност ^{125}I -LDL-а у троминутним узорцима је одређивана без дилуције. Радиоактивност у ефлуентима је мерена Гама бројачем (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)) на одељењу за Нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Такође су узимани узорци КР раствора из Кадице за изоловане органе да би се проверило да ли крвни суд можда цури.

Након прикупљања узорака крвни суд је сечен на 3 сегмента (проксимални-кардијални крај, медијални и дистални-кранијални део) а радиоактивност ^{125}I -LDL-а у зиду крвног суда је мерена у сваком појединачном сегменту Гама бројачем (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)) на одељењу за Нуклеарну медицину КЦ Крагујевац.

9.5.2.2.2. КРИВЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА ¹²⁵I-LDL-A

Специфична активност ¹²⁵I-LDL-а у сваком узорку ефлуента мерена је на Гама бројачу у Центру за нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Измерена радиоактивност у узорцима ефлуената је искоришћена за добијање криве радиоактивност-време, односно дилуционог профила ¹²⁵I-LDL-а током његовог проласка кроз крвни суд на задатој вредности интраваскуларног притиска (видети одељак РЕЗУЛТАТИ).

9.5.2.2.3. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА

Дилуциони профили у експериментима добијени у току периода ињицирања обележеног молекула (inflow период) су фитовани експоненцијалном математичком функцијом (228):

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (\Phi 3)$$

где је y вредност специфичне радиоактивности (срм) док x представља време (min). Такође, a и b су коефицијенти, при чему се a изражава у јединицама радиоактивности (срм), b се изражава у јединицама времена (min^{-1}). Константа a представља максимално добијену радиоактивност, односно радиоактивност која одговара *Steady state* периоду.

Осим прорачуна вредности транспорта ¹²⁵I-LDL-а у зид крвног суда такође смо хтели да одредимо време (T) које је потребно да се достигне "плато" фаза (*Steady state* период). У математичком смислу то је вредност која одговара пресеку две криве (асимптоте експоненцијалне криве и тангенте експоненцијалне криве у нултој вредности). Функција је представљена на Графикону 4 као крива радиоактивност-време (видети одељак Резултати).

Константа за време (T) може да се израчуна из функције:

$$T=1/b \quad (\Phi 4)$$

Сматра се да је *Steady state* достигнуто када је $t = 5T$ (t = време (time)), јер је у том случају $e^{-t/T} = e^{-5} \approx 0$, и $y \approx a$.

Транспорт ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда тзв. *Steady state uptake (Us)* рачунат је као разлика у радиоактивности између дате и обновљене дозе ^{125}I -LDL-а у узорцима ефлуента током *Steady state* периода.

Након експеримената на каротидама здравих кунића код којих је ендотел био интактан урађена је серија експеримената на истим каротидама којима је хемијским путем уклањан ендотел. Ендотел је уклањан применом натријум деоксихолата да би се испитао транспорт макромолекула (LDL-а) у зид крвног суда у условима без ендотела као заштитне баријере.

9.5.3. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА КОЈИМА ЈЕ ХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ УКЛАЊАН ЕНДОТЕЛ

Након експеримената у којима смо желели да утврдимо најоптималнији протокол за даљи рад и да утврдимо и подесимо параметре рада као и избор методе наставили смо са експериментима на изолованим каротидама здравих кунића. Обзиром да се зна да је ендотел важна структура у крвном суду и да има бројне функције, између осталог да "штити" зид крвног суда и делује као својеврсна "баријера" за пролазак бројних макромолекула (103,104), што потврђују бројни подаци из литературе, одлучили смо да урадимо експерименте на каротидама којима ће хемијским путем бити уклоњен ендотел. На основу података које смо нашли у литератури (229) одлучили смо да за ту процедуру користимо деоксихолну киселину (MERCK, Darmstadt, Germany). Након уклањања ендотела деоксихолном киселином испитиван је транспорт ^{125}I -LDL-а из интраваскуларног простора у крвни суд.

9.5.3.1. ПРОЦЕДУРА УКЛАЊАЊА ЕНДОТЕЛА

Након препаровања крвног суда већ описаном методом, помоћу Уређаја за подешавања отпора у крвном суду (Resistance changing device) постигнута је одговарајућа вредност интраваскуларног притиска (60 ± 10 mmHg) и крвни суд се еквилибрирао на датом притиску 15-30 минута. Помоћу Микроинфузионе пумпе (Syringe pump, Sage Instruments, USA) у периоду од 3 минута извршена је перфузија крвног суда деоксихолном киселином (натријум-деоксихолат (MERCK, Darmstadt, Germany)) брзином 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (229) и на тај начин је хемијским путем уклоњен ендотел. Финална концентрација деоксихолне киселине у перфузионом раствору је била 2.5 mM. Након тога испран је крвни суд перфузионим раствором КР (период опоравка) око 15 минута. Када је то завршено помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула омогућена је континуирана перфузија крвног суда ^{125}I -LDL-ом (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) у току 10 минута. Узорци су

сакупљани и мерени по раније описаном протоколу *Steady state* методе. Такође су узимани узорци КР раствора из Кадице за изоловане органе да би се проверило постојање евентуалне радиоактивности у окружењу изолованог сегмента крвног суда.

Након прикупљања узорака крвни суд није сечен већ је цео сегмент послат заједно са узорцима узетим из Кадице на мерење Гама камером.

9.5.4. ЕКСПЕРИМЕНТИ НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА КУНИЋА КОЈИ СУ БИЛИ НА ПОСЕБНОМ РЕЖИМУ ИСХРАНЕ ХОЛЕСТЕРОЛОМ (АТЕРОГЕНОЈ ДИЈЕТИ)

9.5.4.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ *STEADY STATE* МЕТОДЕ

На почетку експеримената мерен је спољашњи дијаметар крвног суда дигиталном камером и оригинално развијеним софтвером. Такође је мерена дебљина зида крвног суда помоћу светлосног микроскопа и микроскопски градуисане мрежице.

Процедура препаровања, изоловања и постављања сегмента крвног суда је била иста као у експериментима на контролним здравим кунићима. New Zealand White кунићи, оба пола (5 животиња), су анестезирани натријум-пентобарбиталом (0.5 mg/kgТТ, i.v.) и Кетамином (0.5 mg/kgТТ, i.v.) (227). Апаратура је постављена на већ поменути начин (Слика 9) и помоћу Перфузионе пумпе је регулисан проток Кребс-Рингеровог (КР) раствора кроз систем. Крвни суд је изолован и постављен у Кадицу за изоловане органе (Слика 10). Канилама истоветног дијаметра (2 mm) у кадици био је повезан (проксимално кардијални крај и дистално кранијални крај крвног суда) са системом за перфузију Кребс-Рингеровим физиолошким раствором, са константним перфузионим протоком од 1 ml/min. Такође је унутар кадице у делу који је окруживао крвни суд стављен КРС и температура одржавана на 37°C уз гасирање смешом гасова 95% O₂ и 5% CO₂ на рН 7.4. Перфузиони раствор (КР) је такође био загрејан на температуру од 37°C и гасиран смешом гасова 95% O₂ и 5% CO₂ на рН 7.4. Изолован крвни суд је био истегнут на његову *in vivo* дужину. Дистална канила је била повезана са Уређајем за подешавање отпора у крвном суду (Resistance changing device). Након периода еквилибрације (20-30 минута) постављен је Уређај за подешавања отпора у крвном суду (Resistance changing device) на одговарајућу вредност интраваскуларног/перфузионог притиска (0 mmHg и 140 ± 10 mmHg). Наиме, Меуер и сарадници (124) су показали у свом раду да је растезање зида крвног суда узроковано притиском заправо важније него притисак *per se* и да управо ово истезање доводи до повећане пропустљивости за макромолекуле као што је LDL. Због тога смо одлучили да истраживање наставимо користећи пвелику разлику у притисцима (0 mmHg и

140 ± 10 mmHg) (а тиме и различите вредности shear stress-a), како би на најадекватнији начин испитали утицај растезање зида крвног суда на транспорт. Вредност интраваскуларног/перфузионог притиска је регистрована помоћу Сензора за регистровање притиска (Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical Products Inc., USA) и бележена на рачунару помоћу оригинално развијеног софтвера (BioIRC Ltd., Faculty of Mechanical Engineering, Center for Bioengineering, Kragujevac, Serbia). За време еквилибрације помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула пре него што је Инјектор прикључен на систем узети су узорци за стандарде. Након достизања одговарајућег притиска остављено је да се крвни суд еквилибрира у наредних 15-30 минута. Након тога је континуирано убризгаван ¹²⁵I-LDL (100 µl/min) помоћу Инјектора за давање биолошки активних молекула током 10 минута. Аутоматски сакупљач узорака је континуирано прикупљао прво 12 узорака (кумулативних једноминутних узорака перфузионог ефлуента) а затим наредних 6 кумулативних троминутних узорака. Радиоактивност у сваком узорку представља обновљену радиоактивност обележеног молекула (*outflow dose*) у функцији времена. У првих 12 узорака је био додат физиолошки раствор до укупне запремине 3 ml/ узорку и тако је био припремљен за мерење специфичне активности ¹²⁵I-LDL-а. Специфична активност ¹²⁵I-LDL-а у троминутним узорцима је одређивана без дилуције. Радиоактивност у сваком узорку представља обновљену радиоактивност обележеног молекула у функцији времена (*inflow period*). Из Кадице за изоловане органе узимани су узорци КР раствора да би се проверило постојање евентуалне радиоактивности у окружењу изолованог сегмента крвног суда.

9.5.4.2. ДИЛУЦИОНИ ПРОФИЛИ $^{125}\text{I-LDL-A}$

Специфична активност $^{125}\text{I-LDL-a}$ у сваком узорку мерена је на Гама бројачу (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)) у Центру за нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Добијене вредности су коришћене за креирање криве обновљена радиоактивност-време, односно за дилуциони профил $^{125}\text{I-LDL-a}$ током његовог проласка кроз крвни суд на задатом интраваскуларном притиску (Графикон 2 и Графикон 4).

9.5.4.3. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА

Дилуциони профили у експериментима добијени у току периода ињицирања обележеног молекула (*inflow period*) су фитовани експоненцијалном математичком функцијом (228):

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (\Phi 3)$$

где y представља вредност специфичне радиоактивности (срт), док x представља време (min). Такође, a и b су коефицијенти, при чему се a изражава у јединицама радиоактивности (срт), док се b изражава у јединицама времена (min^{-1}). Константа a представља максимално добијену радиоактивност, односно радиоактивност која одговара *Steady state* периоду.

Под претпоставком да зид крвног суда није стишљив, дебљина зида крвног суда (δ) се може одредити математичком функцијом помоћу средње вредности дијаметра R_{mt} :

$$\delta_t = R_{mt} - \sqrt{R_{mt}^2 - (V_0 / \pi L)} \quad (\Phi 5)$$

где L представља дужину изолованог сегмента крвног суда; и V_0 је оригинални/почетни волумен зида крвног суда, где се индекс "0" односи на оригиналне/почетне вредности (230).

$$V_0 = \pi(R_0 - \delta_0)\delta_0 L_0 \quad (\Phi 6)$$

Такође смо рачунали вредност shear stress-а зида крвног суда (изражен у dyn/cm^2) следећом математичком функцијом (231,232):

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi R^3} \quad (\Phi 7)$$

где је τ вредност shear stress-а изражена у dyn/cm^2 , μ је вискозност изражена у Поазејима (Poise), Q је вредност протока изражена у ml/s , а R је вредност унутрашњег дијаметра крвног суда изражена у сантиметрима (cm).

Промена вредности унутрашњег дијаметра крвног суда је добијена из измерене вредности спољашњег дијаметра крвног суда током експеримента и израчунате дебљине зида крвног суда која је добијена помоћу једначина $\Phi 5$ и $\Phi 6$

10. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

Приликом статистичке обраде података коришћени су упарени т-тест, независни т-тест, Студентов т-тест и тест ANOVA. Pearson-овим коефицијентом корелације је испитан утицај вредности *shear-stress*-а на вредност транспорта LDL-а током развоја атеросклерозе. За праг значајности узет је $p < 0.05$. Сва статистичка израчунавања су урађена помоћу рачунарског програма SPSS, верзија 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Подаци су приказани као аритметичка средина \pm стандардна грешка (SE).

11. РЕЗУЛТАТИ

У овом истраживању коришћене су експерименталне животиње, New Zealand White кунјићи, 20 укупно. Здрави кунјићи (5 укупно) су били контрола, док је 15 кунјића било на посебном режиму исхране, којој је био додат 1% холестерол. Атерогена дијета (исхрана са 1% холестеролом) је била различитог трајања: осам, десет и дванаест недеља, а у свакој групи је било по 5 животиња. Кунјићи из контролне групе (5 укупно) су имали тежину 3.5-4 kg док кунјићи који су били на атерогеној дијети су тежили пре почетка атерогене дијете 1.7 ± 0.2 kg. На крају периода дијете животиње су имале тежину од 3.04 ± 0.12 kg (након осам недеља дијете), 3.66 ± 0.17 kg (након десет недеља дијете) и 4.03 ± 0.32 kg (након дванаест недеља дијете).

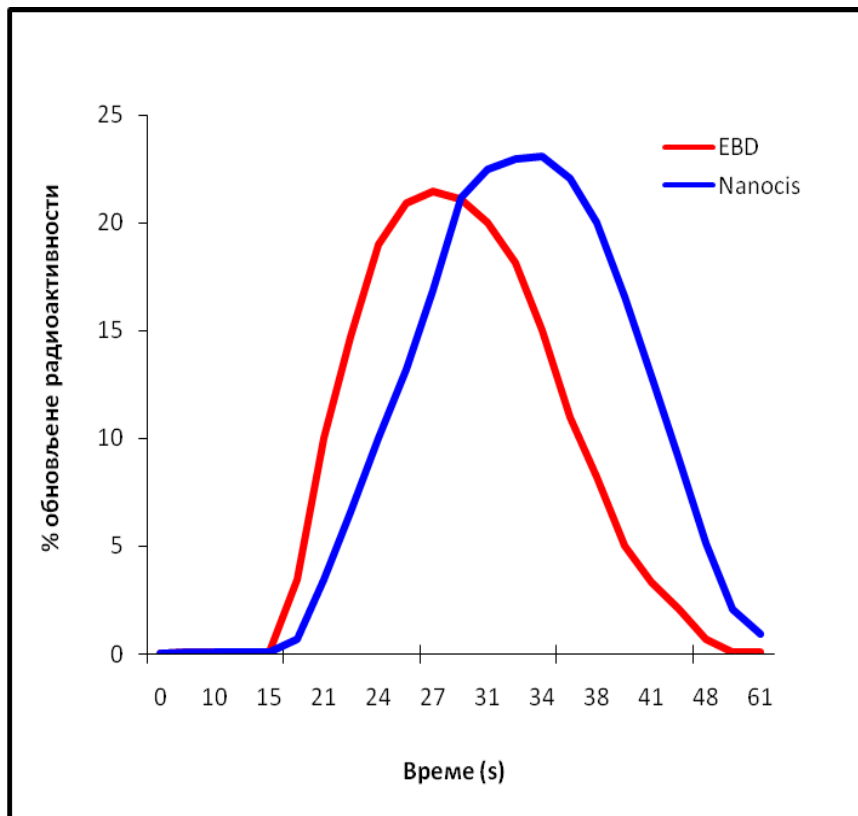
Студија је рађена на изолованим заједничким каротидним артеријама (левој и десној) New Zealand White кунјића, оба пола. Дужина сегмента изолованог крвног суда у експериментима је била у просеку 2.26 ± 0.14 cm (средња вредност \pm SE). Спољашњи дијаметар крвног суда је мерен помоћу дигиталне камере и оригинално развијеног софтвера, као што је описано у одељку МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ, и зависи од примењеног притиска при датом константном протоку. Спољашњи дијаметар изолованих сегмената крвних судова у експериментима је био 1.55 ± 0.095 mm на ниском притиску, односно 2.81 ± 0.14 mm на високом притиску. Унутрашњи (интралуминални) дијаметар крвног суда је био 0.95 ± 0.09 mm на ниском притиску, односно 2.67 ± 0.14 mm на високом притиску.

11.1. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА КОНТРОЛНИХ (ТЕХНИЧКИХ) ЕКСПЕРИМЕНАТА И ИЗБОРА РЕФЕРЕНТНОГ ТРАСЕРА

Пре испитивања транспорта тест трасера и потенцијалних референтних трасера у зид изолованог сегмента крвног суда, урађене су серије техничких експеримената при чему су коришћене пластичне цевчице уместо сегмента крвног суда са циљем стандардизације методе и експерименталног протокола.

11.1.1. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА

На основу обновљене радиоактивности у узорцима ефлуената и математичког прерачунавања применом функције $\Phi 1$, добијени су дилуциони профили за EBD и ^{99m}Tc -Nanocis. Ови експериментално добијени дилуциони профили за EBD и ^{99m}Tc -Nanocis су представљени на Графикону 1.



Графикон 1. Дилуциони профили EBD-а и ^{99m}Tc -Nanocis-а. Обновљене дозе EBD-а и ^{99m}Tc -Nanocis-а се не дешавају у исто време што указује на различите дифузионе карактеристике ова два молекула.

У техничким експериментима смо испитивали карактеристике EBD-а и ^{99m}Tc -Nanocis-а као евентуалних референтних трасера (видети детаљније објашњење на страни 54), док је као тест трасер испитиван молекул ^{125}I -LDL-а. Хтели смо да утврдимо који од ова два молекула (супстанце) може да буде најадекватнији референтни трасер за испитивање транспорта ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда. Са Графикона 1 се јасно види да максималне обновљене дозе EBD-а и ^{99m}Tc -Nanocis-а се не догађају у исто време што указује на различите дифузионе карактеристике ова два молекула.

Обзиром да су технички експерименти урађени на пластичној цевчици очекивано је да се потпуно обнове оба молекула/трасера (EBD и ^{99m}Tc -Nanocis) јер се ниједан молекул не транспортује у зид крвног суда. Крива дилуционог профила за ^{125}I -LDL-а има исти облик као ова два поменута молекула. Међутим, иако су у пластичној цевчици дилуциони профили EBD-а и ^{99m}Tc -Nanocis-а показали скоро потпуно обнављање за даље истраживање на изолованом сегменту крвног суда као референтни трасер је узет ^{99m}Tc -Nanocis зато што Еванс плаво може да прође ендотел уколико овај није апсолутно интактан (крвни суд је у том случају обојен у плаво).

11.2. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА СА ОЧУВАНИМ ЕНДОТЕЛОМ

11.2.1. БРЗА ДИЛУЦИОНА МЕТОДА ДВА ИЗОТОПА (*RAPID DUAL ISOTOPE DILUTION METHOD*)

Помоћу *Брзе дилуционе методе два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* испитиван је транспорт за ^{125}I -LDL и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocis на различитим вредностима перфузионог притиска (10 mmHg, 80 mmHg и 140 mmHg) у сегменту крвног суда током једног проласка тест молекула, датог у виду болус инјекције запремине од 100 μl . Дилуциони профили ова два молекула су показала логаритамска дистрибуцију која је померена у лево (Φ 1 и Φ 2) и то од већих ка мањим вредностима притиска.

Након евалуације добијени резултати су показали да разлике између дилуционих профила ^{125}I -LDL и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocis-а нису статистички значајне и да заправо не може да се одреди прецизно транспорт ^{125}I -LDL-а на овај начин, јер је у рангу грешке (SE). Такође, у циљу евалуације примењеног интраваскуларног, перфузионог притиска на транспорт/преузимање молекула у зид крвног суда, на крају сваког експеримента крвни суд је сечен на 3 сегмента а акумулација обележеног ^{125}I -LDL-а у сваком појединачном сегменту крвног суда је била мерена помоћу Гама бројача (Wallac Wizard 1470 Automatic (Wallac Oy, 2005. Finland)).

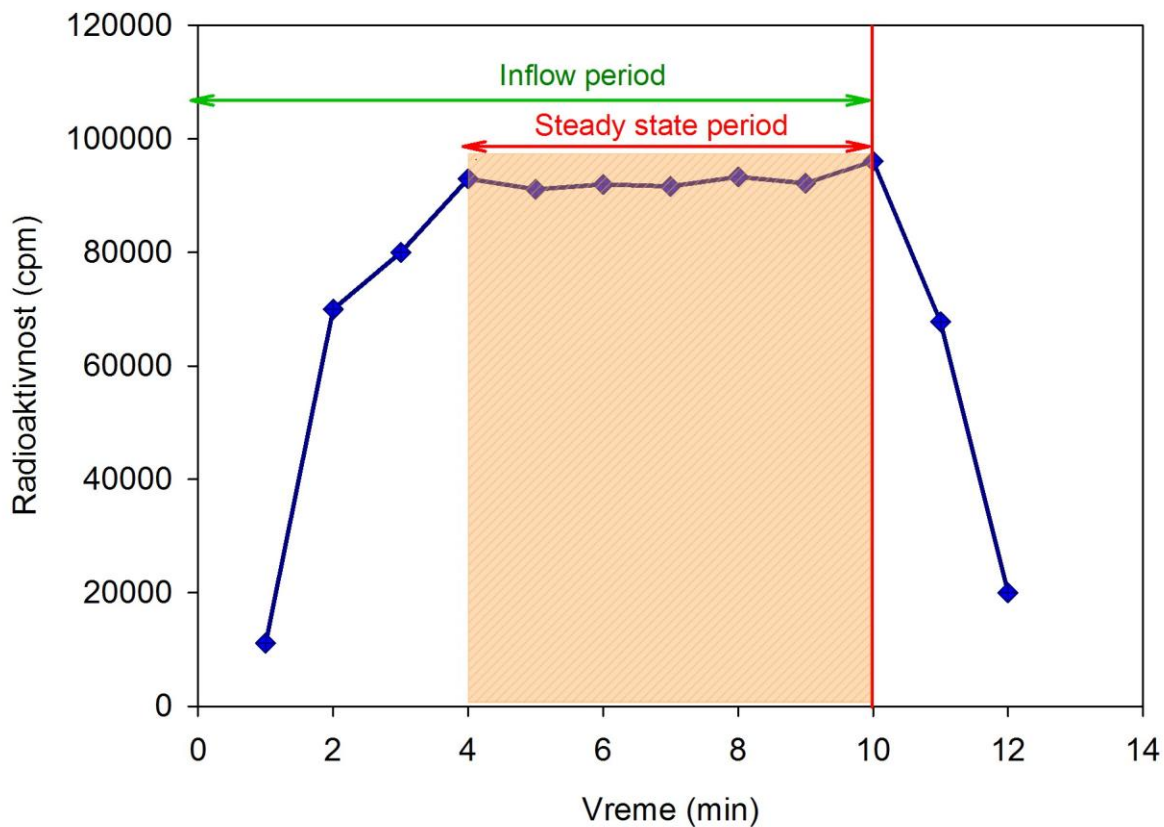
Резултати су показали да на притиску од 10 mmHg није било радиоактивности ни у једном сегменту. На притиску од 80 mmHg, 0.02% радиоактивности је измерено само у кранијалном сегменту, док је на притиску од 140 mmHg, 0.05% од дате/примењене дозе је измерено у кранијалном сегменту, 0.02% у медијалном и 0.01% у кардијалном сегменту. Након ових резултата закључено је да применом *Брзе дилуционе методе два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* тј. да једнократном циркулацијом молекула *uptake* (транспорт) ^{125}I -LDL-а је екстремно спор и има врло мали капацитет. Након оваквих експерименталних резултата одлучено је да се промени протокол и да се примени континуирана 10-томинутна перфузија ^{125}I -LDL-а (*Steady state* метода).

11.2.2. STEADY STATE МЕТОДА

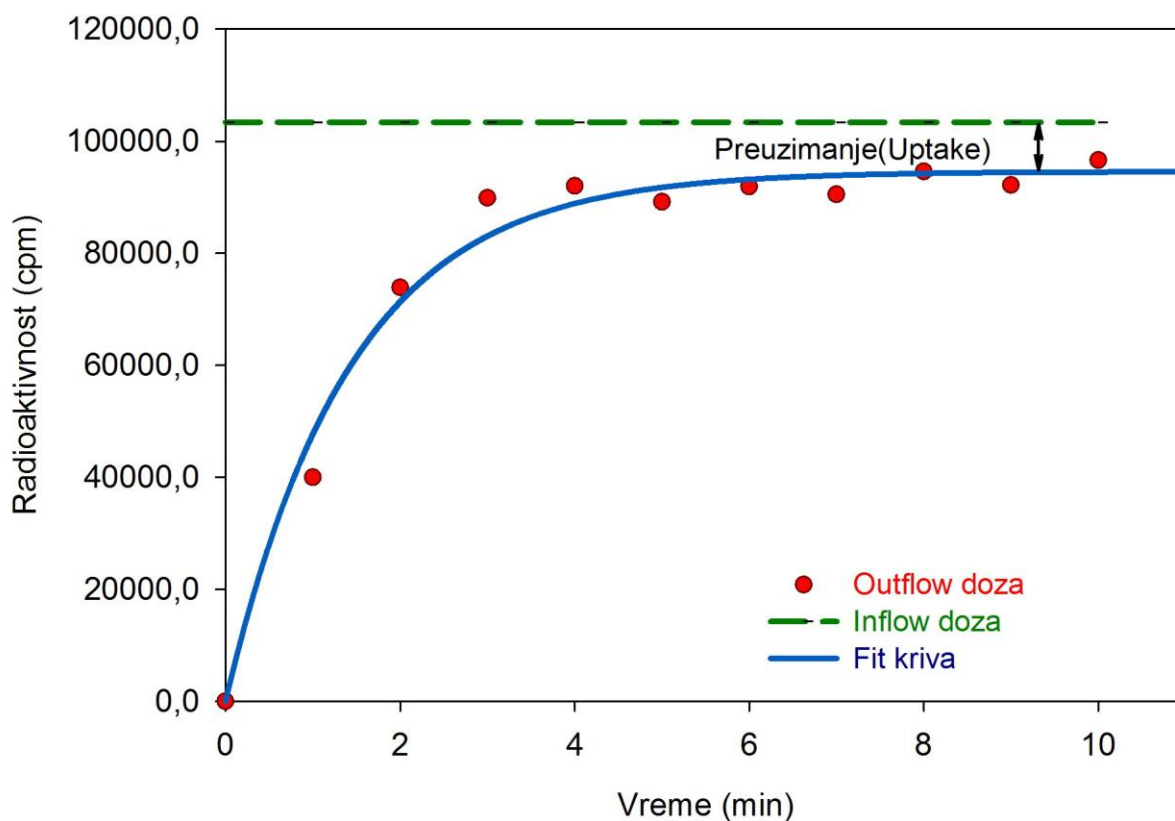
Обзиром да *Брзом дилуционом методом два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* није било могуће испитати транспорт $^{125}\text{I-LDL}$ -а, јер је био спор и било је потребно више времена да би LDL могао да прође у зид крвног суда а овом методом једнократне циркулације то није било довољно, одлучено је да се промени протокол и да се примени дужа перфузија. Даљи рад је настављен коришћењем дуже континуиране перфузије $^{125}\text{I-LDL}$ -а у трајању од 10 минута (*Steady state* методе).

11.2.2.1. КРИВЕ ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА $^{125}\text{I-LDL}$ -А

Специфична активност $^{125}\text{I-LDL}$ -а у сваком узорку ефлуента мерена је на Гама бројачу у Центру за нуклеарну медицину КЦ Крагујевац. Измерена радиоактивност у узорцима ефлуената је искоришћена за добијање криве радиоактивност-време, односно дилуционог профила $^{125}\text{I-LDL}$ -а (Графикон 2 и Графикон 3) током његовог проласка кроз крвни суд на задатој вредности интраваскуларног притиска.



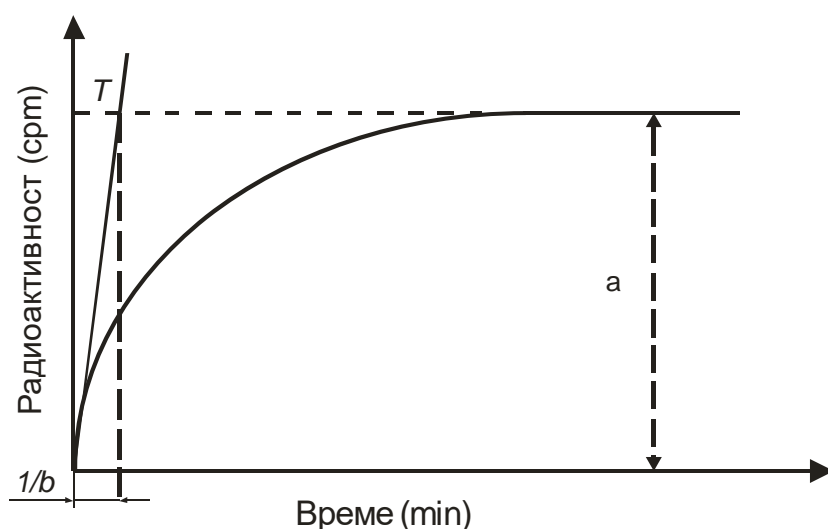
Графикон 2. Експериментално добијена крива дилуционог профила (обновљена радиоактивност обележеног молекула у функцији времена). Измерена радиоактивност у узорцима ефлуената је искоришћена за добијање криве радиоактивност-време ^{125}I -LDL-а током његовог проласка кроз крвни суд на задатој вредности интраваскуларног притиска. Приказан је један репрезентативни експеримент.



Графикон 3. Експериментално добијена дилуциона крива током *inflow* периода. Фитована је помоћу функције: $y = a(1 - e^{-bx})$, где је y вредност специфичне радиоактивности (cpm) док x представља време (min). Такође, a и b су коефицијенти, при чему се a изражава у јединицама радиоактивности (cpm), b се изражава у јединицама времена (min^{-1}). На графикону је такође приказана разлика између дате (*Inflow dose*) и обновљене дозе (*Outflow dose*) ^{125}I -LDL-a током *steady state* периода што указује на транспорт ^{125}I -LDL-a из интраваскуларног простора у зид крвног суда.

11.2.2.2. МАТЕМАТИЧКА АНАЛИЗА ДИЛУЦИОНИХ ПРОФИЛА

Дилуциони профили у експериментима добијени у току периода ињицирања обележеног молекула (inflow период) су фитовани експоненцијалном математичком функцијом Ф 3. Функција је представљена на Графикону 4 као крива радиоактивност-време.



Графикон 4. Крива $y = a(1 - e^{-bx})$ којом се прецизно, математички описује обновљена радиоактивност у функцији времена. Показано је како се може математичким путем израчунати време које је потребно да се достигне плато/*steady state* (преко параметра T , који представља пресек двају асимптота на графику).

Експериментални подаци су анализирани помоћу методе која је објашњена у одељку МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ и резултати су приказани у Табели 2.

Табела 2. Приказане су вредности параметара Us и 5T добијених из експерименталних података на нижем (70 ± 10 mmHg) и вишем (140 ± 10 mmHg) перфузионом притиску. Може се видети да се Steady state uptake (Us %) на вишем (140 ± 10 mmHg) перфузионом притиску дешава касније него на нижем (70 ± 10 mmHg) перфузионом притиску. Такође се може видети да вредности shear stress-а се смањују на већем притиску. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE (стандардна грешка)

Притисак (mmHg)	70 ± 10	140 ± 10
Steady state uptake (Us %)	у рангу SE (1.3)	$3.52 \pm 1.07^*$
5T (min)	3.33 ± 0.4	$4 \pm 0.6^*$
Shear stress (dyn/cm ²)	0.06 ± 0.001	0.038 ± 0.003

*Постоји статистички значајна разлика, $p < 0.05$.

Након прикупљања узорака крвни суд је сечен на 3 сегмента (проксимални-кардијални крај, медијални и дистални-кранијални део) а радиоактивност ¹²⁵I-LDL-а у зиду крвног суда је мерена у сваком појединачном сегменту.

Резултати су показали да је укупна акумулација ¹²⁵I-LDL -а у зид крвног суда након периода испирања била 0.06 ± 0.03 (% обновљене радиоактивности обележеног молекула). Такође, резултати су показали да је највише радиоактивности ¹²⁵I-LDL-а било у кранијалном сегменту а најмање у кардијалном делу (Табела 3)

Табела 3. Приказане су вредности дистрибуције акумулиране радиоактивности ^{125}I -LDL-а у различитим сегментима изолованог крвног суда. Може се видети да је највећа акумулација радиоактивности у кранијалном (дисталном) сегменту. Вредности су приказане као просечна вредност \pm SE (стандардна грешка)

Артеријски сегмент	Дистрибуција (%)
Кранијални сегмент	61.9 \pm 8.7
Медијални сегмент	24.6 \pm 5.9
Кардијални сегмент	13.5 \pm 3.1

Анализа свих добијених резултата показала је да је интактни ендотел заправо добра баријера за пролазак LDL -а у зид крвног суда, дозвољавајући LDL-у јако малу акумулацију. То у суштини значи да се у физиолошким условима не може очекивати нека значајна акумулација LDL-а у зид крвног суда. Због тога је одлучено да се уклони ендотел да би се потврдиле претпоставке да оштећен ендотел доприноси повећаном проласку и накупљању липида / макромолекула у зид крвног суда.

11.3. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА ЗДРАВИХ КУНИЋА КОЈИМА ЈЕ ХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ УКЛАЊАН ЕНДОТЕЛ

Преузимање (*uptake, Us*) LDL-а у зид крвног суда у условима *Steady state* је испитивано на сегменту изолованог крвног суда коме је био уклоњен ендотел. Процедура којом се уклања ендотел је описана у претходном одељку. Резултати који су добијени овом методом указали су да је *Us* LDL-а био је 9.2%, што је било 2-3 пута више него вредност *Us* -а у експериментима који су рађени на сегментима каротида здравих кунџа који нису били третирани раствором натријум деоксихолата.

Након прикупљања узорака крвни суд није сечен већ је цео сегмент послат на мерење Гама камером.

Након мерења резултати су показали да је укупна акумулација ^{125}I -LDL -а у зид крвног суда коме је уклоњен ендотел након периода испирања била 0.1% (% обновљене радиоактивности обележеног молекула). Не само да је у зиду крвног суда измерена већа радиоактивност него у зиду крвног суда коме није био уклоњен ендотел (0.06% у односу на 0.1%), први пут је забележена радиоактивност у раствору који је окруживао сегмент крвног суда у Кадници за изоловане органе. У Кадници је измерена укупна радиоактивност 0.4%. Ово указује да након уклањања ендотела LDL пролази кроз цео крвни суд и не задржава се превише у зиду.

11.4. ЕВАЛУАЦИЈА РЕЗУЛТАТА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА СЕГМЕНТИМА КАРОТИДА КУНИЋА КОЈИ СУ БИЛИ НА ПОСЕБНОМ РЕЖИМУ ИСХРАНЕ ХОЛЕСТЕРОЛОМ (АТЕРОГЕНОЈ ДИЈЕТИ)

У експериментима који су рађени на кунићима који су били на атерогеној дијети мерена је радиоактивност у узорцима ефлуената. Израчунате вредности shear stress-а и резултати преузимања LDL-а су представљени у Табелама 4А И 4Б.

Табела 4А. Приказане су вредности параметара shear stress-а и Steady state ¹²⁵I-LDL uptake-а у функцији трајања атерогене дијете. Може се видети да на вредностима ниског (0 mmHg) перфузионог притиска, вредност ¹²⁵I-LDL uptake-а пада са повећањем shear stress-а током трајања атерогене дијете. Резултати су приказани као средња вредност ± SE (стандардна грешка).

	Дистензија узрокована ниским притиском (0mmHg)			
Недеља дијете (експерименталне групе)	0 (контрола)	VIII (група 1)	X (група 2)	XII (група 3)
Shear stress (dyn/cm²)	0.109 ± 0.0019	0.1778 ± 0.0071	0.436 ± 0.041	0.783 ± 0.141
LDL uptake (%)	Није детектабилно	3.54 ± 0.34	2.55 ± 0.307	0.486 ± 0.095

Табела 4Б. Приказане су вредности параметара shear stress-а и Steady state ^{125}I -LDL uptake-а у функцији трајања атерогене дијете. Може се видети да на вредностима вишег (140 mmHg) перфузионог притиска, вредност ^{125}I -LDL uptake-а расте са повећањем shear stress-а током трајања атерогене дијете. Резултати су приказани као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

	Дистензија узрокована високим притиском (140\pm10mmHg)			
Недеља дијете (експерименталне групе)	0 (контрола)	VIII (група 1)	X (група 2)	XII (група 3)
Shear stress (dyn/cm²)	0.0046 \pm 0.0005	0.0079 \pm 0.0008	0.0107 \pm 0.001	0.014 \pm 0.0016
LDL uptake (%)	3.524 \pm 0.263	8.01 \pm 0.38	11.72 \pm 0.42	12.04 \pm 0.51

У контролној групи експерименталних животиња ^{125}I -LDL uptake није било могуће измерити на ниском притиску (при дистензији зида крвног суда на ниском притиску), тј. био је у рангу стандардне грешке, у поређењу са ^{125}I -LDL uptake-ом од 3.524 ± 0.263 % колико је измерено при дистензији зида крвног суда на високом притиску.

Преузимање ^{125}I -LDL у зид крвног суда у функцији времена приказано је на Графикону 3.

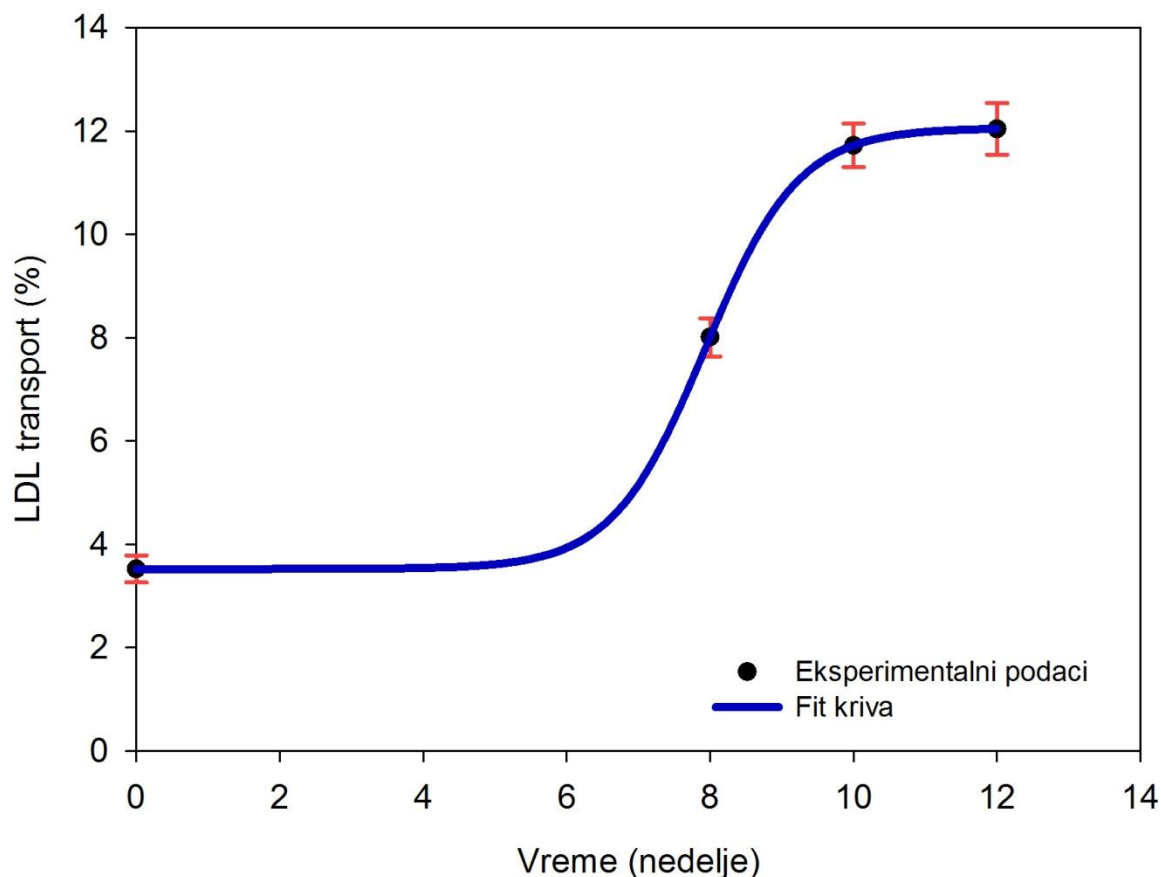
Да би прецизније описали и испитали појединачан утицај било дијете било shear stress-а на транспорт LDL-а у зид крвног суда у даљем тексту су резултати сваког параметра посебно објашњени.

11.4.1. УТИЦАЈ ТРАЈАЊА АТЕРОГЕНЕ ДИЈЕТЕ НА ПРЕУЗИМАЊЕ LDL-A

У циљу испитивања утицаја атерогене дијете на преузимање LDL-a, урађени су експерименти у осмој, десетој и дванаестој (VIII, X и XII) недељи атерогене дијете у условима дистензије зида крвног суда на ниском и високом притиску (0 и 140 mmHg). Резултати (Табела 4А) су показали да се преузимање $^{125}\text{I-LDL}$ -а од стране зида крвног суда смањило током трајања дијете при дистензији зида крвног суда на ниском притиску. Примећена је значајна разлика у преузимању $^{125}\text{I-LDL}$ -а између вредности добијених у VIII и XII недељи дијете ($p < 0.05$). С друге стране при дистензији зида крвног суда на високом притиску дошло је до повећање преузимања $^{125}\text{I-LDL}$ током трајања дијете, а значајна разлика примећена између вредности преузимања $^{125}\text{I-LDL}$ -а у VIII и X, као и између VIII и XII недеље атерогене дијете ($p < 0.05$) (Табела 4Б).

Ефекти трајања атерогене дијете на преузимање $^{125}\text{I-LDL}$ -а у условима дистензије зида крвног суда на високом притиску представљени су на Графикону 5. Ови резултати су фитовани следећом функцијом:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-1\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}} \quad (\Phi 8)$$

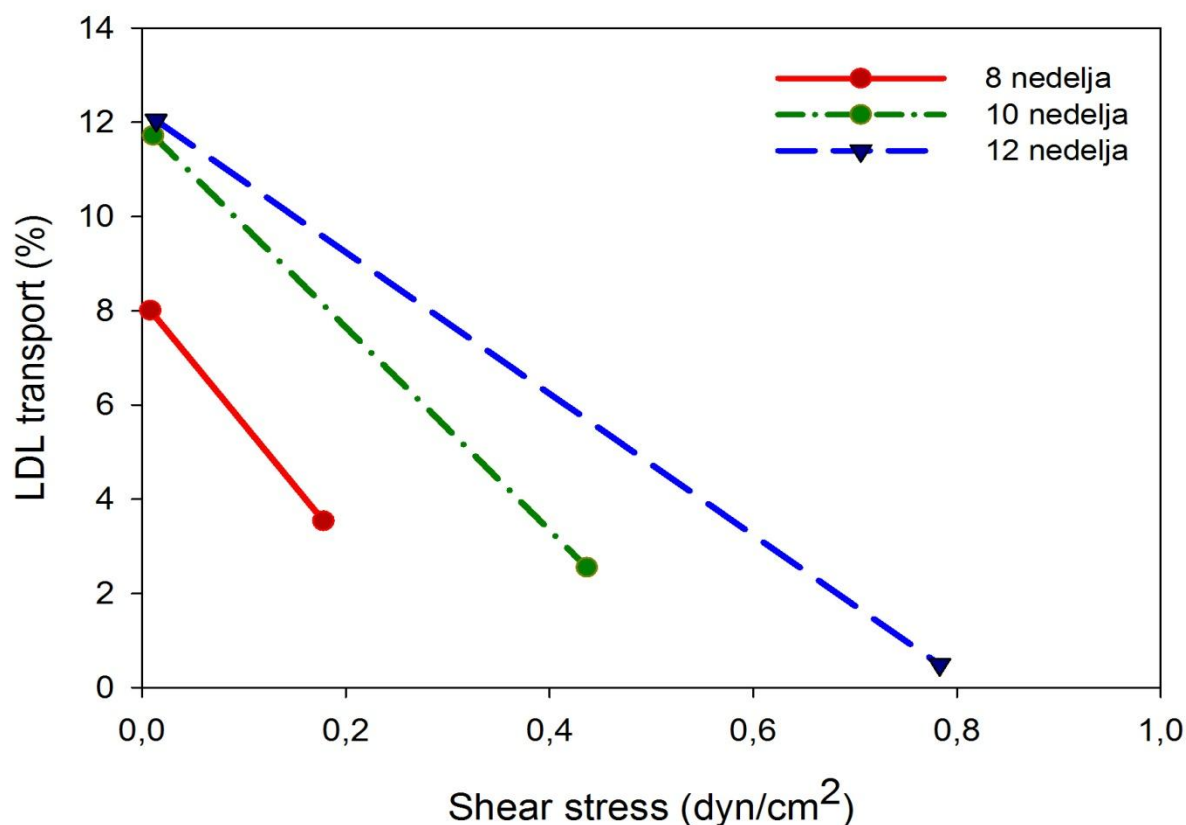


Графикон 5: Ефекти трајања атерогене дијете на транспорт ^{125}I -LDL-а при перфузионом притиску 140 ± 10 mmHg. Добијени подаци су фитовани са Φ 8, где су коефицијенти били $a=8.494$, $b=0.635$, $x_0=7.93$ и $y_0=3.52$. Примећује се пораст преузимања ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда у периоду VI-VII недеље атерогене дијете, док се максимум достиже током X-XII недеље дијете

Према експерименталним подацима значајан пораст преузимања ^{125}I -LDL-а од стране зида крвног суда примећен је у периоду VI-VII недеље након што је започела дијете, достижући свој максимум током X-XII недеље дијете при дистензији зида крвног суда на високом притиску (140 mmHg)

11.4.2. УТИЦАЈ SHEAR STRESS-A НА ТРАНСПОРТ ^{125}I -LDL-A У ЗИД КРВНОГ СУДА

У експериментима на крвним судовима кунића на дијети добили смо резултате који су делом били неочекивани. Резултати ове студије су показали (Табеле 4А и 4Б, Графикон б) да су се средње вредности shear stress-a (добијене на притисцима 0mmHg и 140 ± 10 mmHg) значајно разликовале ($p < 0.05$) и да су вредности shear stress-a добијене на високом притиску, без обзира о којој недељи дијете је реч, биле ниже у односу на одговарајуће вредности измерене на ниском притиску ($p < 0.05$).



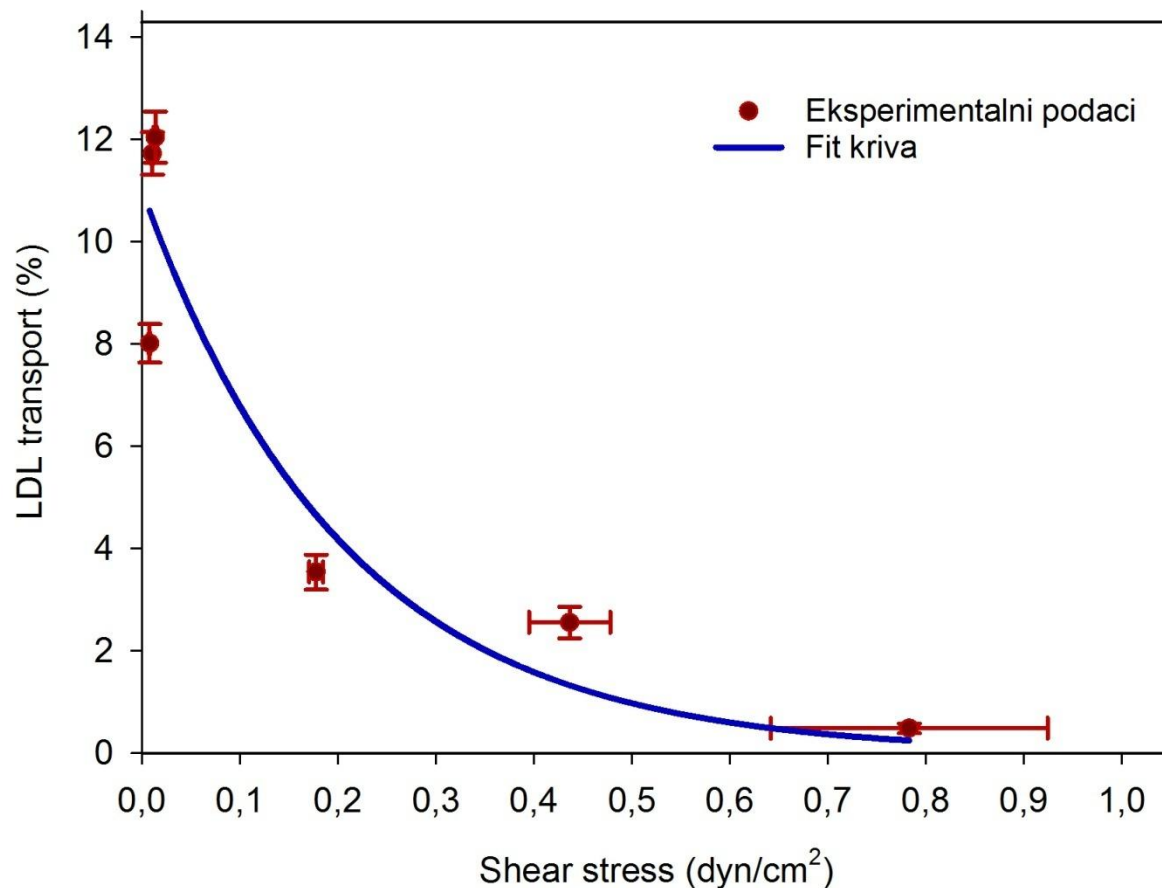
Графикон б: Ефекти shear stress-a на преузимање/uptake ^{125}I -LDL-a у VIII, X и XII недељи атерогене дијете. Може се приметити значајно смањење вредности U_s ^{125}I -LDL-a при порасту shear stress-a (почетак стрелица је на вишем притиску (140 mmHg) а крај на нижем притиску (0 mmHg)).

Штавише, вредности shear stress-a су порасле током трајања дијете (на нижем притиску значајна разлика је примећена између вредности добијених у VIII и X недељи дијете, као и између вредности добијених у VIII и XII недељи дијете ($p < 0.05$), док је на вишем притиску значајна разлика уочена између вредности добијених у VIII и XII недељи дијете ($p < 0.05$)).

Да би се јасније испитао утицај shear stress-a на преузимање $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а урађени су експерименти на одвојеној групи животиња, које су биле дванаест (XII) недеља на атерогеној дијети, тако што су мењани перфузиони проток од 1 до 4 ml/min као и примењени притисак од 0 до 195 mmHg, да би се на тај начин добили различити услови shear stress-a, како је претходно описано. Резултати (Графикон 7), јасно указују на смањење преузимања $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а при повећању shear stress-a. Крива која показује ово смањење (fit-крива) може да се опише следећом једначином:

$$y = ae^{-bx} \quad (\Phi 9)$$

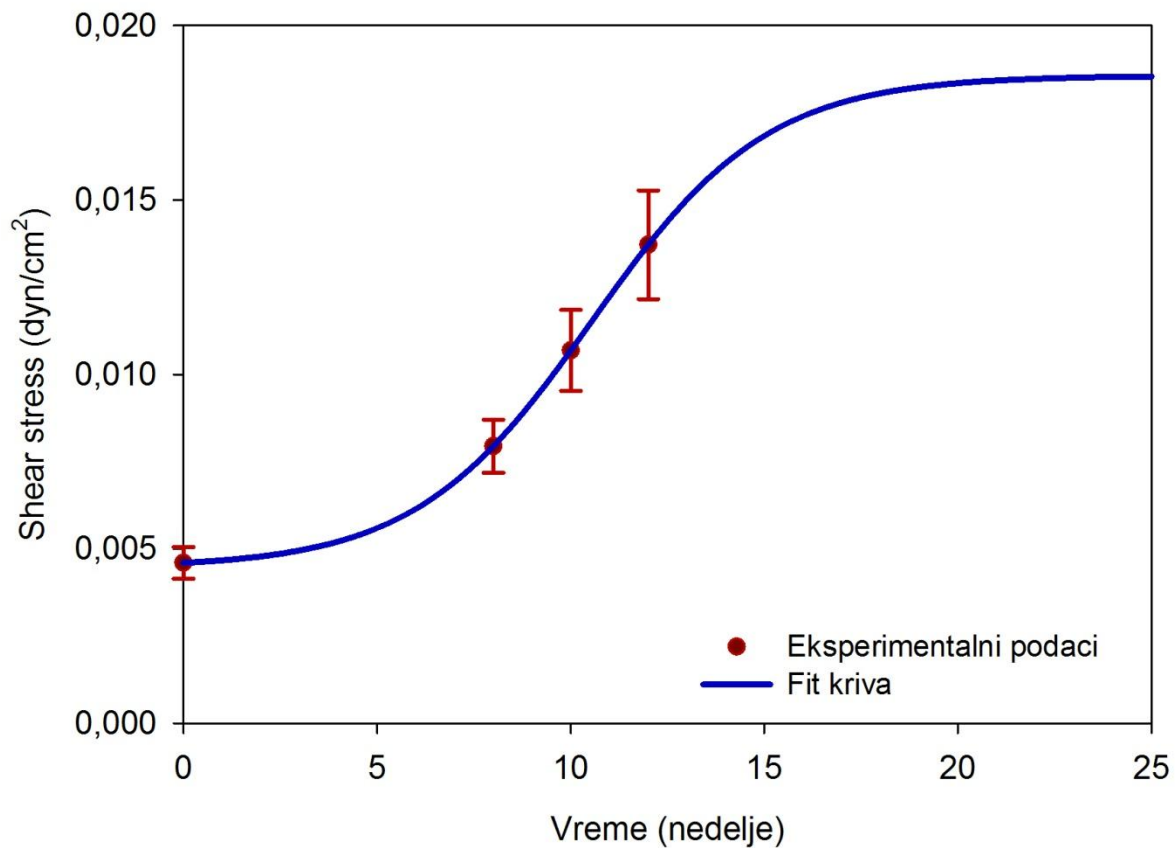
где y представља U_s (%) док x представља вредности за shear stress (dyn/cm^2).



Графикон 7: Ефекти shear stress-а на ¹²⁵I-LDL uptake при перфузионим притисцима од 0 до 195 mmHg (у условима различитих вредности shear stress-а). Добијени резултати су фитовани помоћу Ф 9, где **y оса** представља вредности за uptake (%) а **x оса** представља вредности за shear stress (dyn/cm²), коефицијенти су $a=11.019$ и $b=4.851$. Утицај shear stress-а на преузимање ¹²⁵I-LDL-а испитиван је на одвојеној групи животиња, које су биле дванаест недеља на атерогеној дијети, тако што су мењани перфузиони проток од 1 до 4 ml/min као и примењени притисак од 0 до 195 mmHg, да би се на тај начин добили различити услови shear stress-а. Са графикона се јасно види смањење преузимања ¹²⁵I-LDL-а при повећању shear stress-а.

Претходно описани резултати (Табеле 4А и 4Б) указују да shear stress расте током трајања атерогене дијете. Овај пораст има сигмоидну форму (Графикон 8) и такође се може описати помоћу Ф 8, тачније истом математичком функцијом којом се може приказати пораст преузимања $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а током трајања дијете (видети изнад на страни 82), само са другачијим коефицијентима. Као што је већ напоменуто, значајан пораст вредности shear stress-а примећен је VI-VII недеља након почетка атерогене дијете али, према подацима који се могу добити фитовањем криве, може се претпоставити да би shear stress вероватно достигао свој максимум тек отприлике у XX недељи дијете (Графикон 8), и то након што се достигне максимални uptake $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а (Графикон 5).

Такође је уочено да између вредности shear stress-а и преузимања/ uptake $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а постоји линеарна корелација, када се узму у обзир примењени перфузиони притисак и дужина трајања атерогене дијете, али корелације није била много јака. Наиме при дистензији зида крвног суда на нижем притиску (0 mmHg) Pearson-ов коефицијент је био -0.511 у односу на +0.416 при дистензији зида крвног суда на високом притиску (140 ± 10 mmHg).



Графикон 8: Ефекти трајања атерогене дијете на вредности shear stress-а на притиску 140 mmHg. Резултати указују да повећање/пораст shear stress-а током атерогене дијете има сигмоидну форму (фитовано са Ф 8, где су коефицијенти $a=0.014$, $b=2.268$, $x_0=10.53$ и $y_0=0.0045$). Значајан пораст вредности shear stress-а примећен је VI-VII недеља након почетка атерогене дијете и према подацима који се могу добити фитовањем криве, може се претпоставити да би shear stress вероватно достигао свој максимум тек отприлике у XX недељи дијете и то након што се достигне максимални uptake ¹²⁵I-LDL-a

12. ДИСКУСИЈА

Атеросклероза је најраспрострањенија болест у индустријски развијеним земљама и налази се у основи многих болести данашњице. То је сложен процес мултифакторијалне етиологије чије су најтеже форме (исхемијска болест срца, исхемија моздане циркулације и периферна артеријска инсуфицијенција) најчешћи узрок обољења и умирања у развијеним земљама света. Због тога је фокус научног испитивања усмерен на развој атеросклерозе а у вези са њом и на развој дислипидемије као важног фактора за настанак атеросклеротских промена (1). Показано је такође да су промене у биомеханичким карактеристикама зида крвног суда веома важне за развој атеросклерозе, посебно утицај shear stress-а јер може да допринесе нагомилавању липида у зид крвног суда (99,125,151,183,184) С друге стране, лечење пацијената, које укључује операције бајпасом, уградњу стентова и бројне фармацеутске агенсе, представља велики терет за друштво (2). Многа истраживања су покушала да објасне транспорт LDL-а у зид крвног суда и његову акумулацију јер је тај догађај од изузетне важности за развој атеросклерозе. Те студије су рађене у различитим експерименталним условима који су се разликовали од физиолошких услова. Неке студије су изведене у условима различитих притисака и без перфузионог протока на изолованим крвним судовима сеченим на траке и инкубираним у Уређају за држање ткива (210), или коришћењем инкубираних сегмената крвних судова (124) или коришћењем *in vitro* једнослојних култура ендотелних ћелија у условима где није било промене притиска (113). У неким студијама су артерије биле инкубиране радио-обележеним LDL-ом у дужем временском периоду (5 минута, 30 минута, 60 минута) али без коришћења протока (126,210). Са друге стране, упоредо са бројним експерименталним студијама, рађене су бројне студије засноване на математичким моделима и моделима компјутерских симулација на крвним судовима (128,211,213) чији су модели утемељени управо на резултатима досадашњих експерименталних студија (124). Међутим, ни у једној од ових студија није коришћен перфузиони проток.

То је заправо био један од главних разлога због чега је ова студија рађена. Наиме, у условима константног перфузионог протока и притиска је испитивано преузимање LDL-а у зид изолованог сегмента крвног суда и то у врло кратком временском периоду. Још једна

предност овог дизајна је и та што пружа могућност да се контролишу и прецизно детерминишу експериментални параметри као што су притисак, проток, shear stress, дијаметар крвног суда као и да се испита њихов утицај на преузимање LDL-а.

Током планирања истраживања и дизајнирања експеримената а консултујући светску литературу, одлучили смо да ово истраживање спроведемо на кунџима. Осим кунџа, као експерименталне животиње за испитивање атеросклерозе могу да се користе и мишеви (мање животиње) или свиње и неки примати као веће животиње. Свака од ових врста има своје предности али и недостатке као модел за изучавање експерименталне атеросклерозе.

Мишеви се доста користе као модели за испитивање атеросклерозе. Мишји модели првенствено имају предност у испитивању атеросклерозе и њених компликација због њихове ниске набавне цене и одржавања, лакоће храњења, лакоће генетског манипулисања као и могућности да се атеросклероза испита у кратком временском периоду. Велики број *inbred* сојева мишева са различитом склоношћу ка развићу атеросклерозе има велики потенцијал за идентификацију гена који учествују у одређивању сензитивности или резистентности на атеросклерозу, посебно када се од њих праве генетички манипулисани модели (233-235). Међутим, мишји модели имају и бројне недостатке. Расподела лезија у крвним судовима мишева и људи није идентична. У људи су лезије фреквентније у коронарним артеријама, каротидама и периферним крвним судовима попут илијачне артерије, док су у мишева фреквентније захваћени корен аорте, лук аорте и брахиоцефалична артерија. Претпоставља се да брзи откуцаји срца у мишева доприносе турбулентнијем току крви при изласку из срца, те је зато ова локализација предилекционо место за атеросклерозу. У мишева се, поређења ради, не манифестује нестабилан атеросклеротски плак који може да доведе до настанка тромбозе, лезије која доводи најчешће до акутних кардиоваскуларних епизода. Плакови који се развијају у мишева немају дебелу капу која се виђа у лезијама атеросклерозе у људи. Са друге стране, мала величина мишева отежава анализу крвних судова захваћених атеросклерозом. Такође, HDL у мишева не показује атеропротективно својство у истој мери као у људи (236,237). Са друге стране код неких сојева мишева није детектован холестерил естар трансфер протеин (енг. CETP), који може да има супротно проатерогено дејство (238,239). Иако су истраживања на моделу мишева дала знатан допринос познавању развоја

атеросклерозе, остаје да се дискутује у којој мери ови модели могу бити коришћени за поређење са развојем болести у људској популацији (240).

Насупрот мишевима, веће животиње су скупље за набавку, храњење и одржавање у условима који треба да одговарају модерним хранилиштима. Додатно, развој сложених атеросклеротских лезија углавном се везује за дужи временски период него у мишева. Ипак, модели неких већих животиња имају посебне предности код одређених врста студија (241). На пример, свиње спонтано развијају атеросклерозу која може и да се убрза ако им се даје храна богата липидима у склопу тзв. атерогене дијете (242-244). Свиње су довољно велике животиње па могу да се неинвазивним методама измере артерије као и да се узме довољно артеријског ткива за анализу. Сем тога имају и сличан липоротеински профил као људи и слично развијају атеросклеротске лезије у коронарним крвним судовима. Делом због своје величине, свиње су корисне у испитивањима хемодинамике и одговора артеријског ендотела. Лезије атеросклерозе се јављају на местима рачвања крвних судова, где се проток раздваја и где је низак shear stress (155). Чак и свиње које су биле на дијети са ниским процентом масти су показале да развијају места на аорти која су или сензитивна или насупрот томе резистентна на развој атеросклерозе (што је потврђено употребом раствора боје Еванс плаво) (245). Студије на свињама су показале да се број пенастих ћелија богатих липидима знатно увећава код оних свиња које су храњене мастима (атерогена дијета) (246). Са друге стране велики недостаци ових истраживања су велики трошкови и немогућност генетичких модификација.

Атеросклероза и метаболизам липопротеина су били истраживани и у популацији неких примата. На пример, *Portman* и *Andrus* (247) су испитивали тзв. "Мајмуне Новог света" и указали на постојање различите осетљивости за развој атеросклерозе међу овим врстама. Након исхране мастима мужјаци су више оболевали од атеросклерозе у односу на женке. Друга врста, тзв. "Резус мајмуни" након исхране великом количином масти развијали су болести коронарних крвних судова (248). Код ове врсте је први пут показана регресија болести након враћања на исхрану са мање масти (249). Регресија се односила на смањење садржаја холестерола у лезијама, смањење броја и количине липида пенастих ћелија. Предности у испитивању примата су те што им је метаболизам врло сличан као код човека, имају сличне липопротеине, показују експресију холестерил естар трансфер протеина (СЕТР). Обзиром да се чак и лезије у мајмуна развијају слично као у људи

могуће је поредити резултате добијене истраживањем атеросклерозе код ових примата са резултатима нађеним у људској популацији. Мане коришћења примата у истраживачке сврхе су велики трошкови њихове набавке, чувања и одржавања, као и тешкоће у извођењу генетских студија, што у многоне лимитира њихову употребу у истраживањима атеросклерозе (241).

Обзиром на чињеницу да је кунит веома осетљив на повећање холестерола сматра се да је изузетно погодна животиња за испитивање атеросклерозе (250,251). Употребу кунита први пут је поменуо *A. I. Ignatovski* још давне 1908. године (19). Многи истраживачи, а међу њима највише Руси, су испитивали атеросклерозу користећи куните као лабораторијске животиње. Ове студије су биле дизајниране тако да могу да се пореде експериментално изазване лезије са уобичајеним лезијама атеросклерозе која се јавља у људи. Истраживачи су тестирали више различитих метода којима лезије могу да се изазову, као што су бројне дијете, ињекције адреналина, бактерија или токсина (252). *N. Anichkov* и *S. Chalotov* су открили да кунити који имају атеросклерозу нагомилавају холестерол у јетри (16). Тако је *N. Anichkov* закључио да атеросклероза настаје од холестерола у исхрани. Он је затим експериментисао са храном богатом холестеролом и указао да је обим оштећења узрокован атеросклерозом пропорционалан конзумираној количини холестерола (252). Међу свим животињама које су испитиване утврђено је да једино кунити испољавају тенденцију развоја хиперхолестеролемије само пар дана након уноса велике количине холестерола храном (251). Од тада (1908.) атеросклеротске лезије су углавном изазиване коришћењем специфичних дијета. Међу дијетама највише је коришћена дијета са много холестерола (*high cholesterol diet*). Дијете са различитом количином холестерола (251,253), са или без других уља (253-255) и специфичних протеина (256-258), као и различита дужина експерименталних студија (259,260), коришћени су да би се изазвали различити типови лезија. Међу свим сојевим кунита, сој *New Zealand* бели кунит, чија маса варира од 2-5 kg, се највише користи за лабораторијска истраживања. Сој *New Zealand* постоји и у генетички измењеним врстама од којих су најважнији *Watanabe*, *St Tomas*, и *Houston RT* који се користе највише за испитивања генетичких абнормалности метаболизма липида (*Watanabe* кунити за испитивање наследних хиперлипидемија, тзв. *WHHL* кунити) (261-263).

Кунићи и зечеви генерално дневно унесу хране око 5% од своје телесне масе (ТМ), а воде око 10% своје телесне масе (ТМ). У здравих кунића, ниво холестерола у плазми је јако низак (у просеку 1.3 mmol/l) (252), али може да порасте чак 2-8 пута више након уноса хране обогаћене 0.1–2% холестеролом, током првих 20-ак дана (251). У овим условима, ниво холестерола расте врло брзо а ране лезије које се јављају иако су сличне масним пругама у људи, не развијају се као плакови, који су главно обележје атеросклерозе у људи (253). Дугорочни експерименти, тј. експерименти који дуже трају а заснивају се такође на дијетама са већим уносом холестерола дају врло разочаравајуће податке, зато што је забележена велика хепатотоксичност и животиње не преживе експерименте. Упркос овим ограничењима, велики број истраживача користи моделе кунића да би испитали утицај и ефикасност лекова на развој масних пруга. Такође, постоје студије које указују на сличност касних лезија у људи са лезијама нађеним у кунићима који су се хранили дијетом са мање холестерола али дужи временски период (264). Хиперхолестеролемија која се изазива код кунића узрокована је накупљањем егзогеног холестерола. Кунићи су подложни развоју атеросклерозе путем хране (специфичне дијете) зато што они немају могућност да повећају екскрецију стерола (253). Резултат тога је повећана количина липопротеина богатих естрима холестерола од стране јетре који затим улазе у циркулацију. LDL и VLDL, атерогени липопротеини, главни преносиоци холестерола у плазми, дуже времена остају у циркулацији (253). Студије су показале да LDL остаје у великој количини у крвним судовима кунића који су јели холестерол. Трајање дијете је пропорционално времену колико LDL остаје у крви (265). Електронском микроскопијом је показано да се након 3 недеље дијете са 0.2% холестерола уочавају промене у зиду крвних судова. У кунића је примећено да се морфологија лезија мења у зависности од процента холестерола који се додаје исхрани, као и трајања дијете (251-253). Дијета која кратко траје са заступљеношћу холестерола више од 2% доводи до хиперхолестеролемије а атеросклеротске лезије су богате пенастим ћелијама које воде порекло од макрофага. С друге стране, дијете које имају нижи садржај холестерола и дуже трају доводе до појаве атеросклеротских лезија, које су врло сличне онима нађеним у људи (253).

Размотривши све податке и знања позната до сада о експерименталним животињама а у складу са нашим могућностима, одлучили смо да би ово истраживање

експерименталне атеросклерозе било најпогодније да се изведе на кунићима врсте New Zealand бели.

У овој експерименталној студији истраживан је транспорт LDL-а у зид крвног суда леве и десне заједничке каротидне артерије кунића, у условима *ex vivo*. Експериментална истраживања на изолованим каротидама New Zealand White кунића вршена су модификованом *Steady state* методом у условима константног перфузионог протока и применом апаратуре за испитивања биомеханичких и функционалних испитивања ткива (221,222). Ова експериментална студија је била подељена на два дела. Први део истраживања се односи на испитивања на здравој популацији кунића, а добијени резултати су коришћени као контролне вредности. Тој истој групи кунића је уклањан ендотел хемијским путем помоћу натријум деоксихолата да би се испитао транспорт макромолекула (LDL-а) у зид крвног суда у условима без ендотела као заштитне баријере. Први део студије се такође односи на утврђивање услова који би довели до најадекватнијег експерименталног протокола. Други део студије описује експерименте на кунићима храњеним атерогеном дијетом у различитом временском трајању (осам, десет и дванаест недеља).

Циљ овог истраживања је био да се истражи утицај пролонгиране хиперлипидемије (изазване атерогеном дијетом) на транспорт LDL-а у зид крвног суда, леве и десне каротидне артерије кунића, као и однос између промене биомеханичких параметара као што је shear stress и преузимања овог молекула од стране крвног суда. Поред тога циљ је био и да се испита утицај здравог, очуваног ендотела на транспорт макромолекула, као што је LDL, у зид крвног суда.

На почетку истраживања коришћена је *Брза дилуциона метода два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* (224-226). Овом методом једнократне циркулације трасерског пара се испитује релативно преузимање (*uptake*) тест трасера (^{125}I -LDL) од стране зида крвног суда у односу на референтни трасер (Ф 2) док пролази кроз интраваскуларни простор (225,226). Као референтни молекули су били процењивани $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocis и боја Еванс плаво (EBD).

Пре испитивања транспорта тест трасера и потенцијалних референтних трасера помоћу методе једнократне циркулације трасерског пара тзв. *Брза дилуциона метода два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* (224-226) урађене су серије техничких

експеримената при чему су коришћене пластичне цевчице уместо сегмента крвног суда са циљем стандардизације методе и експерименталног протокола.

Након мерења радиоактивности у узорцима ефлуента и математичког прерачунавања (Φ 1) добијени резултати су омогућили конструисање криве дилуционих профила референтних трасера (Графикон 1, видети одељак РЕЗУЛТАТИ). Како се обнављање доза EBD-а и $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ -а није догодило у исто време то указује на различите дифузионе карактеристике ова два молекула. Када смо радили експерименте на пластичној цевчици, оба референтна трасера су показала потпуно обнављање. Међутим у експериментима на крвном суду примећено је да Еванс плаво може да прође ендотел уколико није апсолутно интактан (крвни суд би у том случају био обојен у плаво) те је због тога одлучено да се за даље истраживање као референтни трасер користи $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$.

Након серије техничких експеримената на пластичној цевчици, исти протокол је коришћен у истраживању транспорта $^{125}\text{I-LDL}$ -а на изолованом сегменту крвног суда кунића. Експерименти су рађени у условима у којима је постојао константан проток али при различитим вредностима перфузионог притиска (10 mmHg, 80 mmHg и 140 mmHg). Међутим, када су утврђени дилуциони профили за тест трасер $^{125}\text{I-LDL}$ и референтни трасер $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ (Φ 2) резултати су показали да разлике између дилуционих профила $^{125}\text{I-LDL}$ и $^{99m}\text{Tc-Nanocis}$ -а нису статистички значајне и да заправо не може да се одреди прецизно транспорт $^{125}\text{I-LDL}$ -а на овај начин, јер је у рангу грешке (SE). На крају експеримента крвни суд је сечен на три дела (кардијални, медијални, кранијални део) да би се испитала акумулација $^{125}\text{I-LDL}$ у зависности од примењеног притиска. Резултати су показали да је било акумулације тест молекула када је примењен највиши перфузиони притисак (140 mmHg) у сва три сегмента. У кранијалном сегменту је измерено 0.05% од примењене дозе радиоактивности, у медијалном сегменту 0.02% а у кардијалном сегменту 0.01%, док је на мањим притисцима акумулирана радиоактивност измерена само у неким деловима. При примењеном перфузионом притиску од 80 mmHg у кранијалном сегменту је било акумулирано само 0.02% радиоактивности, док на најнижем примењеном притиску није било акумулације у зид крвног суда. Како није измерена никаква радиоактивност у раствору у Кадници за изоловане органе који је окруживао сегмент крвног суда на канилама, сматра се да крвни суд није цурео. Добијени резултати су

показали да транспорт ^{125}I -LDL-a помоћу *Брзе дилуционе методе два изотона (Rapid dual isotope dilution method)* тј. једнократна циркулација молекула има врло мали капацитет и да је екстремно спор односно потребно је више времена да би LDL могао да прође у зид крвног суда. Стога је одлучено да се промени протокол на тај начин што би се продужила перфузија изолованог крвног суда испитиваним молекулом ^{125}I -LDL-a. Даљи рад је настављен тако што је примењивана континуирана 10-о минутна перфузија ^{125}I -LDL-a (*Steady state* метода).

У циљу верификације *Steady state* методе, слично као код поменутог *Брзе дилуционе методе два изотона (Rapid dual isotope dilution method)*, урађена је серија техничких експеримената на пластичној цевчици уместо на крвном суду у експерименталним условима који би били примењени у експериментима са крвним судовима. Резултати који су добијени су показали да коришћењем пластичне цевчице долази до потпуног обнављања дате супстанце (^{125}I -LDL-) у систему у функцији времена (нема преузимања ^{125}I -LDL-a). Након тога је урађена серија експеримената у којима су коришћени изоловани сегменти крвних судова, и при томе је примећено да је у узорцима ефлуената дошло до задржавања убризгане дозе ^{125}I -LDL-a. Ова разлика између дате дозе ^{125}I -LDL-a и обновљене дозе ^{125}I -LDL-a у узорцима ефлуента током периода *Steady state* указује на транспорт (*uptake*, Us) ^{125}I -LDL-a из интраваскуларног простора у зид крвног суда. У тим "пилот" експериментима Уређај за подешавање отпора у крвном суду (*Resistance changing device*) (Одељак МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ) је коришћен за постизање промене притиска (70 ± 10 mmHg и 140 ± 10 mmHg) при константном протоку. Када је примењен притисак 70 ± 10 mmHg, дошло је до промене дијаметра крвног суда и при томе је вредност shear stress-a била 0.06 dyn/cm². Тада је израчунати транспорт (*Steady state uptake*, Us %) ^{125}I -LDL-a био у границама вредности стандардне грешке (± 1.3 %). Даље, резултати су показали да при нижем shear stress-у од 0.038 dyn/cm² израчунати Us је био 3.52 ± 1.07 % (Табела 2). Према овим подацима, у овим експерименталним условима, закључили смо да се транспорт/преузимање ^{125}I -LDL-a у зид крвног суда дешава при изузетно ниским вредностима shear stress-a које су испод физиолошких вредности. У вези са тим а у студији коју су објавили Meyer и сарадници (124) показано је да када је потпуно спречено растезање зида крвног суда помоћу неког спољашњег ригидног прстена, преузимање LDL-a се значајно не мења, упркос порасту интралуминалног притиска са 70 на 160 mmHg.

Имајући у виду да растезање зида крвног суда под утицајем притиска има велики утицај на транспорт LDL-а кроз зид артерије (124), као и то да је истраживање које је горе поменуто урађено без перфузионог протока, циљ нашег истраживања је био да се испита транспорт LDL-а унутар зида крвног суда при константном протоку, као и да се испита утицај shear stress-а на транспорт (постојање протока и последично shear stress-а су одлике *in vivo* услова). Како на вредност shear stress-а превасходно утиче дијаметар крвног суда, а дијаметар зависи од примењеног притиска, одлучено је да се даљи експериментални рад настави коришћењем различитих вредности перфузионог притиска (0 mmHg и 140 mmHg). На тај начин је дијаметар крвног суда значајно мењан а самим тим и вредности shear stress-а.

У овом раду је показано такође да се математичким формулама могу објаснити па чак и предвидети неки резултати истраживања. Такође, могуће је математичким путем израчунати време за које се достигне плато/*steady state* (преко параметра T). Резултати су показали да је на већем перфузионом притиску (140 ± 10 mmHg) вредност 5T параметра била већа него на nižем притиску (70 ± 10 mmHg) али без значајније разлике ($p > 0.05$). Непостојање значајне разлике међу овим параметрима који описују време сугерише да је слична брзина проласка $^{125}\text{I-LDL}$ кроз зид крвног суда при задатим притисцима (70 ± 10 mmHg и 140 ± 10 mmHg) (Табела 2).

Даље, Меуер и сарадници (124) су показали у свом раду да је растезање зида крвног суда узроковано притиском заправо важније него притисак *per se* и да управо ово истезање представља главну детерминанту која доводи до повећане пропустљивости зида крвног суда за макромолекуле као што је LDL. Резултати који су добијени у овој експерименталној студији су потврдили да је интактни/очувани ендотел добра баријера, дакле добра заштита проласку макромолекула, као што је LDL, тако да се у физиолошким условима не може очекивати велика акумулација LDL-а у зид крвног суда. Cancel и сарадници (113) су у свом раду указали да LDL може да прође кроз ендотел али углавном преко тзв. порозних веза (*leaky junctions*) и да је тај начин проласка заступљен са 90.9% када је у питању LDL. *Leaky junctions* су заправо везе тј. простори које се јављају у ендотелу између тзв. *leaky* ћелија, а *leaky* ћелије су у суштини ћелије ендотела које су у фази деобе или умирања. Показано је да на оба та процеса утиче хипертензија (111,123).

Последњих година је постало више него очигледно да ендотел није само пасивна баријера, кроз коју молекули, ћелије и течности/флуиди из лумена крвног суда пролазе кроз артеријски зид већ се сматра да је ендотел полу-пропустљива мембрана (103). Сматра се да је интактни ендотел одлична баријера за пролазак макромолекула и да спречава њихово евентуално накупљање. Артеријске ендотелне ћелије садрже комплексан систем међућелијских веза, а најзаступљеније су чврсте и пукотинасте везе (104). У физиолошким условима, функционално и структурно очуван ендотел одржава равнотежу између ендотелних релаксацијских (NO, простаглицин, брадикинин, EDHF) и контрактилних фактора (тромбоксан A₂, слободни радикали кисеоника, ендотелини, ендотелни контрактилни фактор, ангиотензин II), што обезбеђује оптимални пречник крвног суда и ткивну перфузију сразмерну метаболичким захтевима. У равнотежи су, такође пореклом из ендотела антикоагулантни и прокоагулантни фактори, као и фактори инхибиције и стимулације раста глатких мишићних ћелија крвних судова (102).

Ипак, ендотел који је на било који начин оштећен нема више способност да чува и штити крвне судове (27).

У жељи да се испита колико је интактни ендотел добра баријера наставак истраживања је спроведен на сегментима крвног суда коме је уклоњен ендотел. За ту сврху коришћена је деоксихолна киселина. Резултати који су добијени (Табела 5) потврдили су претпоставке и показали да је преузимање (Us) LDL-а од стране крвног суда, након уклањања ендотела било скоро три пута веће него пре уклањања (9.2%) ($p < 0.05$), као и да је накупљање/акумулација LDL-а у зид крвног суда била већа 0.1% (у поређењу са 0.06 % када је ендотел био очуван). Ови резултати су у складу са резултатима других студија (124,210).

Табела 5. Упоредна табела вредности Uptake-а и акумулације LDL-а (%) измерене на крају експеримента у зиду крвног суда у зависности од присуства и одсуства ендотела.

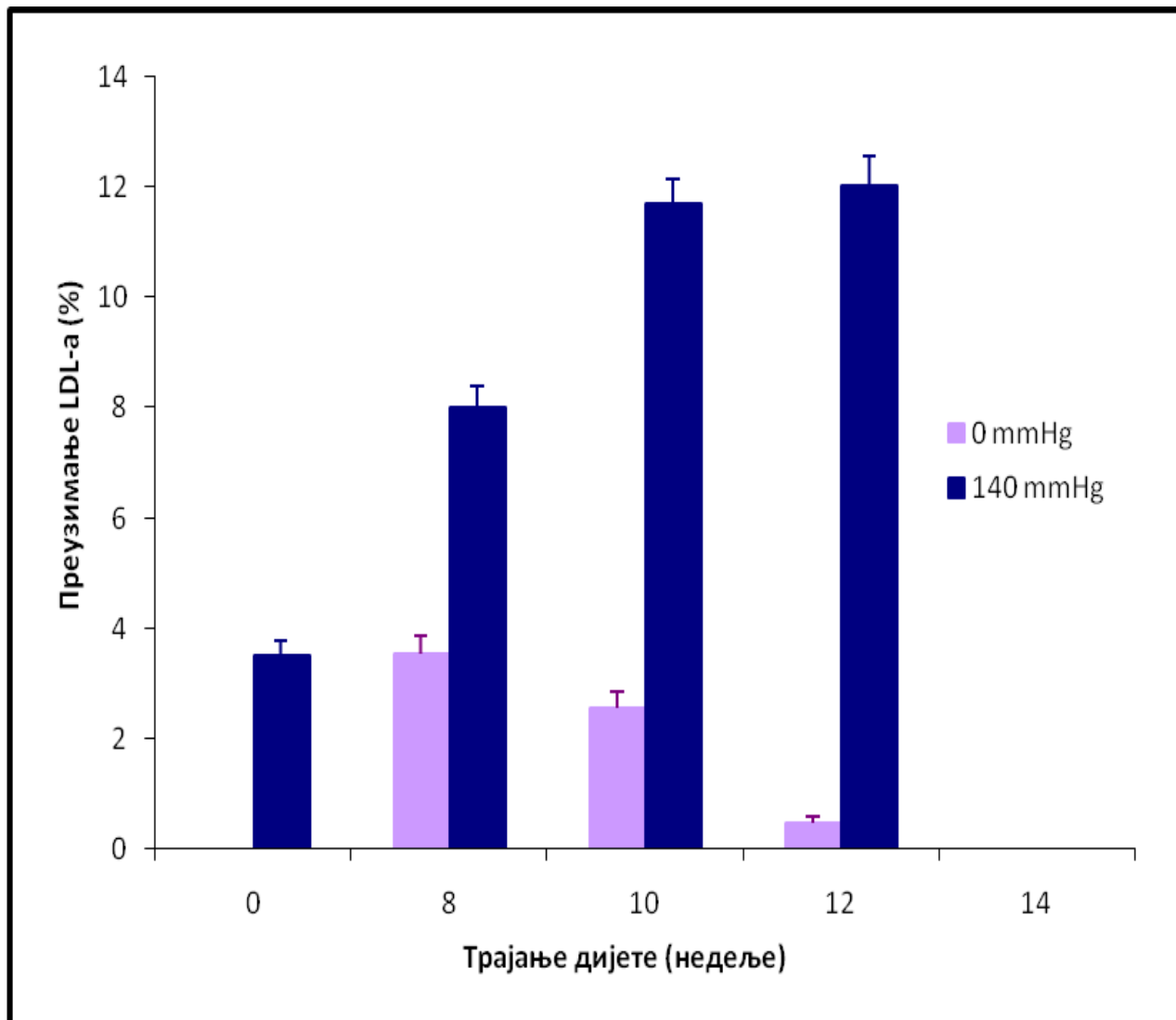
	У присуству ендотела	Без ендотела
Uptake LDL-а (%)	у рангу SE (1.3)¹ 3.52 ± 1.07²	9.2*
Акумулација LDL-а у целом сегменту (%)	0.06	0.1

* Постоји статистички значајна разлика, $p < 0.05$

¹ Измерена вредност на притиску 70 ± 10 mmHg

² Измерена вредност на притиску 140 ± 10 mmHg

У првом делу истраживања добијени су подаци који су показали да је процес преузимања (*uptake-a*) ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда малог капацитета и изузетно спор. Вероватно је то био један од главних разлога зашто у литератури није било студија које су биле засноване на експериментима на изолованом сегменту крвног суда уз коришћење перфузионог протока. Због тога смо ми у нашем истраживању и променили протокол рада па је уместо једнократног проласка радиообележених молекула примењена континуирана перфузија (10 минутна) молекула ^{125}I -LDL тзв. *Steady state* метод. Први део истраживања је спроведен на изолованим сегментима крвних судова здравих кунџа. Други део истраживања описује експерименте и резултате добијене након испитивања транспорта ^{125}I -LDL -а у зид крвног суда кунџа који су били на атерогеној дијети, тј. посебном режиму исхране 1%-тним холестеролом.



Графикон 9. Приказ преузимања ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда у односу на трајање атерогене дијете на притисцима 0 mmHg и 140 mmHg. Може се уочити значајан пораст транспорта ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда када је већа дистензија зида крвног суда (140 mmHg) током трајања атерогене дијете. Такође се може видети да се транспорт (преузимање) ^{125}I -LDL-а у зид крвног суда смањује када је дистензија мања (0 mmHg) током трајања атерогене дијете.

Да би испитали утицај трајања атерогене дијете на преузимање (*uptake*) ^{125}I -LDL-a, урађена је серија експеримената у условима дистензије зида крвног суда на ниском и високом притиску користећи кунџе који су били на атерогеној дијети осам, десет и дванаест недеља (VIII, X и XII). Резултати који су добијени у овим експериментима током VIII, X и XII недеље атерогене дијете у условима дистензије зида крвног суда на ниском и високом притиску (Табеле 4А и 4Б, Графикон 9) су показали благе разлике. Наиме, у условима непостојања дистензије зида крвног суда на ниском притиску (0mmHg), када је висок shear stress, преузимање (*uptake*) ^{125}I -LDL-a се смањивало како је напредовала дијета. Статистички значајна разлика је примећена у вредностима транспорта ^{125}I -LDL-a добијеним у VIII и XII недељи атерогене дијете ($p < 0.05$). У исто време, вредности shear stress-a су расле како је напредовала дијета, при чему је значајна разлика уочена између вредности shear stress-a добијених у VIII и X, као и између вредности shear stress-a добијених у VIII и XII недељи атерогене дијете ($p < 0.05$). У условима дистензије зида крвног суда на високом притиску (140mmHg) (када је низак shear stress) транспорт ^{125}I -LDL-a се повећавао током трајања атерогене дијете, при чему је значајна разлика уочена између вредности транспорта ^{125}I -LDL-a добијених у VIII и X као и између вредности транспорта ^{125}I -LDL-a добијених у VIII и XII недељи атерогене дијете ($p < 0.05$).

Обзиром да постоји одређена веза између преузимања ^{125}I -LDL-a и дужине трајања атерогене дијете покушали смо да ту везу боље објаснимо користећи математичке формуле. Резултате које смо добили фитовали смо математичком функцијом $\Phi 6$ и резултате приказали на Графикону 5. Ови резултати, представљени као S (сигмоидна)-крива указују да се значајан пораст преузимања ^{125}I -LDL-a при дистензији зида крвног суда на високом притиску (140 ± 10 mmHg) догађа раније, негде између VI-VII недеље дијете и да свој врхунац достиже отприлике негде око X-XII недеље дијете. Овај податак је потврдила и студија Камимура и сарадника (266) где је показано да дужина трајања атерогене дијете може да доведе до хистолошких промена унутар зида крвног суда већ након пет (V) недеља од почетка дијете/исхране богате холестеролом као и да напредује током времена док потпуно не захвати целокупан васкуларни систем, и то у периоду од петнаест (XV) недеља од почетка дијете. Наиме, Камимура и сарадници (266) су користили тзв. модел холестеролом индуковане атеросклерозе, који је сличан нашем методу рада, где су заправо индуковали атеросклерозу храњењем New Zealand White

кунића 0.5% холестеролом (267,268,269) и 0.25% дијетим богатом холном киселином. Затим су куниће насумично поделили у 6 група:

- Група 4W (4 недеље на дијети)

- Група 5W (5 недеља на дијети)

- Група 6W (6 недеља на дијети)

- Група 7W (7 недеља на дијети)

- Група 8W (8 недеља на дијети)

- Група 15W (15 недеља на дијети)

Да би описали промене на крвним судовима које су испитивали, а то су биле све веће артерије у телу, направили су табелу Градус-а од 0-5 (Табела 6).

Табела 6. Хистолошки описи артерија

Градус	Хистолошки опис
0	Нормална артерија, без задебљања интима или фиброзе, нормална медија, интактна унутрашња еластична ламина
1	Фокално задебљање интима и пролиферација без оштећења/прекида унутрашње еластичне ламине
2	Задебљање интима до отприлике 50% обима лумена, са или без прекида унутрашње еластичне ламине
3	Концентрично задебљање интима, са или без прекида унутрашње еластичне ламине, без приметне стенозе лумена (процењено <10%)
4	Концентрично обољење артерија: -задебљање интима и пролиферација са прекидом унутрашње еластичне ламине и еластичног ткива медије: -блага или умерена стеноза лумена (процењено <50%)
5	Концентрично обољење артерија са израженом стенозом лумена (процењено >50%)

Према подацима Камимуре и сарадника (266) (Табела 6), до 8. недеље дијете крвни судови су били врло слабо захваћени променама. У Групи **4W** није било промена на крвним судовима. У Групи **5W** уочене су благе промене (Градус 1) само у торакалној аорти. У Групи **6W** уочена је умерена агрегација пенушавих ћелија испод ендотела у торакалној аорти и формирање раних атеросклеротских промена (Градус 1-2), као и благе промене на абдоминалној аорти. У Групи **7W** је било већ изражених атеросклеротских промена и више пролиферације у интими од пенушавих ћелија и глатко-мишићних ћелија (Градус 2-3) у торакалној аорти. Изоловане атеросклерозне промене су примећене у абдоминалној аорти а прве фокалне лезије су примећене у проксималним партијама коронарних артерија.

У Групи **8W** су примећене врло изражене атеросклеротске промене (Градус 3) у торакалној аорти, док промене у абдоминалној аорти нису много напредовале. У овој групи прве ране промене су биле потврђене прво у феморалној, каротидним и бубрежним артеријама а благе лезије (Градус 2-3) су примећене у проксималним деловима коронарних срчаних судова. Све прегледане артерије су имале видљиве промене.

У Групи **15W** атеросклеротске лезије кунића су биле скоро проминентне у торакалној аорти (Градус 3-4) и коронарној артерији. У суштини озбиљна стеноза (Градус 4-5) је запажена у левом и десном главном стаблу коронарне артерије. Торакална аорта је била доста захваћена (Градус 3-4) а абдоминална аорта блаже (Градус 2) (266).

У нашој студији у циљу верификације атеросклеротских промена у зиду крвног суда рађена је хистолошка анализа исечака крвног суда (резултати нису приказани) током целокупног трајања атерогене дијете. Ти резултати су показали да се хистолошке промене које указују на постојање почетних атеросклеротских промена догађају тек у 8. недељи дијете, што је у сагласности са хистолошким налазом Камимуре и његових сарадника (266). С тим у вези, и детектабилан транспорт LDL у зид крвног суда забележен је тек од 8. недеље атерогене дијете (што је приказано на Табелама 4А и 4Б).

Имајући све ово у виду, постоји могућност да математичка функција (Φ 8) буде употребљена као биолошка законитост/правило у циљу предвиђања односа између дужине трајања атерогене дијете и преузимања LDL-а.

Даље, резултати су показали (Табеле 4А и 4Б, Графикон 6) да се просечне вредности shear stress-а (добијене при притисцима 0 mmHg и 140 ± 10 mmHg) значајно

разликују ($p < 0.05$), што је очекивано и логично, када се узме у обзир да shear stress индиректно зависи од дијаметра крвног суда, а дијаметар са друге стране зависи од примењеног притиска (231,232). Примећује се такође да су вредности shear stress-а добијене у условима дистензије зида крвног суда на високом притиску (Табела 4Б), када се узму у обзир недеље дијете биле редом 22, 41 и 56 пута ниже у односу на вредности shear stress-а добијене у условима дистензије зида крвног суда на ниском притиску (Табела 4А). Такође су вредности shear stress-а расле током трајања дијете (Табеле 4А и 4Б).

У циљу да се боље испита и објасни однос између вредности shear stress-а и преузимања (*uptake*) ^{125}I -LDL-а одрађени су експерименти на посебној групи кунића, који су били дванаест (XII) недеља на атерогеној дијети. Мењан је перфузиони проток, од 1 ml/min до 4 ml/min док је перфузиони притисак подешаван на вредности од 0 mmHg до 195 mmHg, са циљем да се постигну различити услови shear stress-а. Ови резултати (Графикон 7) указали су на значајно смањење преузимања (*uptake*) ^{125}I -LDL-а при повећању shear stress-а. Крива (фитована) којом је приказан однос између преузимања ^{125}I -LDL-а и вредности shear stress-а може да се опише математичком функцијом Ф 9, којом такође може да се предвиди транспорт LDL-а. Студије које су урађене до сада се слажу да се липиди пре свега акумулирају на ендотелној површини на местима где су брзина крви и shear stress мали а где је пропустљивост ендотела повећана (125,151,154,183,184,214,270). Постоје подаци да ендотелне ћелије могу да постану ригидније у одговору на повећан shear stress (152) и да управо та ригидност/крутост може да се искористи као важан маркер у процени напредовања атеросклерозе у аорти (271). Шта више, показано је да повећање shear stress-а може да мења везе ендотелних ћелија, структурно и хемијски, у смислу да међућелијске везе ендотелних ћелија постају јаче како расте shear stress (272,273) што са друге стране инхибира транспорт (152).

Када се узме у обзир све претходно наведено, могуће претпоставке о томе зашто се повећава uptake/транспорт ^{125}I -LDL када се смањује shear stress су следеће:

- 1) Када је снижен shear stress могуће је да се повећано преузимање ^{125}I -LDL-а једним делом дешава због тога што у том случају мања тангенцијална сила (јер је нижи shear stress) дозвољава молекулима да остану дужи у непосредној близини зида крвног суда па самим је већа и вероватноћа да више молекула уђе у зид (274);

-
- 2) Када се примени висок перфузиони притисак, расте унутрашњи/интралуминални дијаметар крвног суда (shear stress се тада смањује) а површина ендотелних ћелија се повећава што омогућава молекулима већу контактну површину и/или leaky junctions су доступније молекулима LDL-а да прођу кроз њих. Ове тврдње најбоље могу да се објасне студијом Меуер-а и сарадника (124) по којој главна детерминанта која доводи до повећањог транспорта LDL-а јесте растезање васкуларног зида, а не притисак *per se*;
 - 3) Различите вредности shear stress-а изазивају хемијске и структурне промене на ендотелним ћелијама и њиховим међусобном везама (275-278) што утиче на промену у величини транспорта ¹²⁵I-LDL у зид крвног суда.

Циљ студије Меуер-а и сарадника (124) је био да се утврде релативни ефекти конвекције услед притиска и растезања зида артерије на транспорт LDL-а у зид крвног суда под утицајем високог интралуменског притиска. Да би одвојили ефекте струјања и растезања под дејством притиска Меуер и сарадници (124) извели су експерименте на слободним и на обмотаним сегментима крвних судова, где је величина растезања могла да се контролише. Ови ефекти су испитивани на сегменту свеже исечене аорте кунића растегнуте на своју *in vivo* дужину, док је примењиван притисак од 70 mmHg, 120 mmHg или 160 mmHg по 30 минута. Спољни ригидни прстенови су стављани око сегмената изолованог крвног суда спречавајући тако растезање зида те половине сегмента под дејством притиска. На слободном (необмотаном) артеријском сегменту концентрација LDL-а у зиду крвног суда је значајно расла како је растао притисак у лумену али је концентрација опадала од лумена ка адвентицији. Иако се мењао дијаметар прстена којим су обмотавани сегменти као и интралуминални притисак ипак је за дати дијаметар крвног суда остајао исти интрамурални притисак јер је са друге стране растао спољашњи притисак због прстена. У условима повишеног интрамуралног притиска преузимање LDL-а зависи како од притиском индукованог растезања тако и од конвекције услед притиска. Даље, резултати ове студије су показали да значајна количина LDL-а може да прође дубље у медију само уколико се пређе "праг" растезања зида. Када је дијаметар крвног суда одржаван малим уз коришћење прстена са најмањим дијаметром (4 mm), значи када је истезање крвног суда потпуно спречено, тада је преузимање LDL-а било врло мало и није

се значајно мењало чак и када је повећаван интралуминални притисак. Међутим, више LDL-а уђе у унутрашњост медије када се сегменти рашире под дејством притиска, што се најбоље види на сегментима који су били слободни, необмотани при притисцима од 120 mmHg и 160 mmHg. Када се не шири медија, остаје слабо пропустљива за LDL, без обзира колики се притисак примени у лумен. Али уколико се једном рашири крвни суд, медија постаје пропустљивија, дозвољавајући пролазак LDL-а унутар зида крвног суда због конвекције услед притиска и повећане пропустљивости ендотела. Meyer и сарадници (124) су закључили да растезање зида крвног суда под дејством притиска има важну улогу у транспорту LDL-а кроз зид крвног суда а конвекција када није спречено растезањезида крвног суда посебно олакшава акумулацију LDL-а у унутрашњим слојевима медије, што би могло да објасни повећану склоност ка развоју атеросклерозе у условима хипертензије.

Са друге стране, иако је показано да на вредност shear stress-а утиче промена дијаметра услед промене перфузионог притиска, резултати нашег истраживања на изолованим каротидама кунића указују да се shear stress повећава и током напредовања атерогене дијете (Табеле 4А и 4Б, Графикон 8). Такође је утврђено да се те промене могу описати математичком функцијом Φ 8, и то истом функцијом којом је математички израчунато повећање транспорта $^{125}\text{I-LDL}$ -а током трајања атерогене дијете, само у овом случају су коришћени други коефицијенти. Анализом резултата студије такође се може видети значајан пораст вредности shear stress-а у периоду од VI-VII недеље дијете. Међутим, такође се може приметити и да shear stress достиже доста касније свој максимум, негде у периоду после дванаесте недеље атерогене дијете, највероватније у 20. недељи, што је период који је скоро два пута дужи него период храњења животиња у овој студији (Графикон 8), и то након што је достигнут максимални транспорт/uptake $^{125}\text{I-LDL}$ -а (Графикон 5).

Узимајући у обзир резултате добијене у овој студији могу се предложити 3 фазе болести:

1. Продромална фаза - (у првих пет недеља, механизми нису још познати)
2. Фаза акцелерације - (у периоду од VI до X недеље дијете)
3. Circulus vitiosus - (након XI недеље дијете; када постоји максимално преузимање $^{125}\text{I-LDL}$ -а у зид крвног суда)

Имајући све ово у виду, може се сматрати да структурне и функционалне промене зида крвног суда узрокују, током атерогене дијете, повећање ригидности зида крвног суда што даље води до пораста вредности shear stress-a. На основу хистолошких података наших експеримената урађен је и објављен научни рад заснован на компјутерском моделу под називом *Three-dimensional numerical simulation of plaque formation and development in the arteries* (279). У раду је приказано повећање волумена зида крвног суда каротидне артерије током трајање атерогене дијете, што редукује унутрашњи дијаметар крвног суда и има за последицу повећање вредности shear stress-a.

Међутим, када су експерименти рађени само у једној конкретной недељи дијете у условима у којима се мењала вредност shear stress-a добили смо да су вредности преузимања (Steady state uptake-a (Us)) расле са смањењем вредности shear stress-a, што је у сагласности са вредностима у литератури. Даље, вредности добијене у условима дистензије зида крвног суда на високом притиску узимајући у обзир трајање атерогене дијете су показали да Us расте иако и вредности shear stress-a расту. Чини се да је у условима дистензије зида крвног суда на ниском притиску утицај shear stress-a више доминантан у погледу преузимања (uptake) $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а, док је ситуација сасвим обрнута у условима дистензије зида крвног суда на високом притиску, јер се тада чини да доминантнији утицај на преузимање (uptake) $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а има атерогена дијета из до сада непознатих разлога. Можемо само да претпоставимо да би један од разлога за овакво понашање крвног суда могао бити поремећен проток крви који се дешава у великим артеријама. Наиме, познато је да се турбулентан ток крви јавља само у великим артеријама, посебно на местима са поремећеном геометријом, и то нарочито на местима где долази до гранања крвног суда, док у артеријама у којима је дијаметар мањи влада ламинаран ток крви (280). Хе и сарадници (274) су показали да сметње током протока као последице васкуларне геометрије могу да доведу до концентрацијске поларизације липопротеина уз зид крвног суда и повећају акумулацију LDL-а у крвном суду што потпомаже даљи развој атеросклерозе. Ове промене зида крвног суда изазване атеросклеротском дијетом (279) доводе до поремећаја у протоку и последично томе повећавају преузимање (uptake) $^{125}\text{I-}\text{LDL}$ -а у условима дистензије зида крвног суда на високом притиску (140 mmHg). Ова теорија/претпоставка је у сагласности са резултатима Van den Berg et al. (281), који су показали такође и да поремећен проток оштећује својства

гликокаликса као баријере и води ка повећаном накупљању LDL-а у интими на местима бифуркације каротидних артерија мишева.

13. ЗАКЉУЧАК

Резултати овог експерименталног истраживања су показали да:

- Примењена Steady state метода у условима константног перфузионог протока, са могућношћу промене вредности перфузионог притиска, даје добре, репродуцибилне резултате, па може да се користи за испитивање транспорта макромолекула у зид изолованог сегмента крвног суда.
- Интактни ендотел је одлична "баријера" за пролазак макромолекула и спречава њихово евентуално накупљање у зиду крвног суда, док оштећени ендотел доприноси проласку макромолекула, као што је LDL.
- На ниском притиску (0 mmHg) при мањој дистензији зида крвног суда долази до смањења транспорта LDL-а у зид крвног суда при чему доминантнији утицај имају вредности shear stress-а него трајање атерогене дијете
- На вишем притиску (140 mmHg) при већој дистензији зида крвног суда долази до повећања транспорта LDL-а у зид крвног суда при чему доминантнији утицај има трајање атерогене дијете него вредности shear stress-а
- Описани експериментални дизајн и примењене математичке процедуре су показале да могу да се користе у анализи и чак предвиђању величине транспорта у крвним судовима током атеросклерозе као и да буду користан алат у будућим истраживањима утицаја других супстанци као што су статини (282), HDL (1,283), Evacetrapib® (1), Хомоцистеин (284,285) итд.

14. ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang B, Kawachi E, Miura S, Uehara Y, Matsunaga A, Kuroki M, Saku K. Therapeutic Approaches to the Regulation of Metabolism of High-Density Lipoprotein. *Circulation Journal* 2013;77:2651–2663.
2. Tomkin GH and Owens D. LDL as a Cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal* 2012;5:13-21.
3. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000;72(5 Suppl):1307S-1315S.
4. Weinberg PD. Rate-limiting steps in the development of atherosclerosis: the response-to-influx theory. *Journal of Vascular Research* 2004;41(1):1–17.
5. Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104(4):503–516.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868 –874.
7. Rolland PH, Souchet T, Friggi A, Bodard H, Faye MM, Ghiringhelli O, Garçon D et al. Aorta viscoelasticity and arterial histopathology of atherosclerotic pigs treated by angiotensin converting enzyme inhibition. *Journal of Hypertension Suppl.* 1991;9(6):S178-179.
8. Schreier LE, Sanguinetti S, Mosso H, Lopez GI, Siri L, Wikinski RL. Low-density lipoprotein composition and oxidability in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry* 1996;29(5):479-487.
9. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circulation Research* 1994;74:214-224.
10. Schoen FJ. Blood vessels. Pathologic basis of disease. 7th ed. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 511-554.
11. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91(9):2488-2496.
12. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344 (8925): 793-795.

-
13. Marchand F. Über Atherosclerosis. Verhandlungen der Kongresse für Innere Medizin. 21 Kongresse, 1904.
 14. Shattock SG. A Report upon the Pathological Condition of the Aorta of King Menephtah, traditionally regarded as the Pharaoh of the Exodus. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 1909;2(PATHOL):122–127.
 15. Wilson LG. Erasistratus, Galen, and the pneuma. *Bulletin of the History of Medicine* 1959;33: 293-314.
 16. Leibowitz JO. The history of coronary heart disease. Berkeley, University of California Press, 1970.
 17. Willius FA and Dry TJ. A history of the heart and the circulation. *California Medicine*. 1948 Oct; 69(4): 329.
 18. Virchow R. *Gesammelte Abhandlung zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt: Meidinger, 1856:499–513.
 19. Katz LN and Stamler J. *Experimental atherosclerosis*. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas 1953.
 20. Aschoff L. *Lectures in pathology*. New York: Hoeber, 1924:131–153.
 21. Ross R and Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine* 1976: 295; 369- 377.
 22. Tanaka K, Masuda J, Imamura T, Sueishi K, Nakashima T, Sakurai I, Shozawa T et al. A nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* 1988;72:143-156.
 23. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9(suppl I): I 19-I 32.
 24. Sary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *European Heart Journal* 1990; 11(suppl E): 3-19.
 25. Pesonen E, Norio R, Hirvonen J, Karkola K, Kuusela V, Laaksonen H, Möttönen M et al. Intimal thickening in the coronary arteries of infants and children as an indicator of risk factors for coronary heart disease. *European Heart Journal* 1990; 11(suppl E): 53-60.
 26. Sary HC. *Atlas of Atherosclerosis Progression and Regression*. New York/ London: Parthenon Publishing; 1999.

-
27. Ross R. Atherosclerosis, an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 340:115-126.
 28. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Medica Indonesiana*. 2007;39(2):86-93.
 29. National Cholesterol Education Program. Second Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation*. 1994,89(3):1333-1445.
 30. Insullt W Jr. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine* 2009, 122: S3–S14.
 31. Tabas I, Williams KJ, Borén J: Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. *Circulation* 2007,116:1832-1844.
 32. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212(4495): 628–635.
 33. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10(2): 109–121.
 34. Khoo JC, Miller E, Pio F, Steinberg D, Witztum H. Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1992;12:1258-1266.
 35. Griendhing KK and Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997;96:3264-3265.
 36. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20(5):1177-1178.
 37. Hansson GK. Mechanism of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine* 2005;352(16):1685-1695.
 38. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure function and biochemistry. *Circulation Research* 2003;92:1690-1697.
 39. Cheng L, Mantile G, Pauly R, Nater C, Felici A, Monticone R, Bilato C, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks

vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*. 1998;98:2195-2201.

40. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes E, Kastelein J and Duriez P. New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation*. 2004;109:III 15-III 19.

41. The Expert Panel. 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;106:3143–3421.

42. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105:310–315.

43. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149–2155.

44. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CJ, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. *American Journal of Cardiology* 1997;79:529–531.

45. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GAC, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Letters* 2000;471:45–50.

46. Freischlag JA, Johnson D, Farooq MM, Doty J, Cambria R, Seabrook G, Towne J. Cigarette smoke impairs endothelium-dependent relaxation in rabbit superficial femoral veins. *Journal of Surgical Research* 1999;81:77–80.

47. PechAmsellem MA, Myara I, Strogenko M, Demuth K, Proust A, Moatti N. Enhanced modifications of low-density lipoproteins (LDL) by endothelial cells from smokers: a possible mechanism of smoking-related atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 1996;31:975–983.

48. Heitzer T, YLaherttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia: Role of oxidised LDL. *Circulation*. 1996;93:1346–1353.

-
49. Jorge PAR, Ozaki MR, Almeida EA. Endothelial dysfunction in coronary vessels and thoracic aorta of rats exposed to cigarette smoke. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1995;22:410–413.
 50. Tang J, Muir J, Lancaster T, Jones L, Fowler G. Health profiles of current and former smokers and lifelong abstainers. *Journal of the Royal College of Physicians of London* 1997;31:304–309.
 51. Kario K, Matsuo T, Makao K. Cigarette smoking increases the mean platelet volume in elderly patients with risk factors for atherosclerosis. *Clinical and Laboratory Haematology* 1992;14:281–287.
 52. Blann AD and McCollum CN. Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;70:707–711.
 53. Adams MR, Register TC, Golden DL, Wagner JD, Williams JK. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997;17:217–221.
 54. Wagner JD. Effects of sex steroid treatment on the cardiovascular system. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America*. 2001;12:511–533.
 55. Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH et al. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 2001;135: 939–953.
 56. Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, Kuller LH et al. Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *The New England Journal of Medicine* 2007;356:2591–2602.
 57. Mendelsohn ME and Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308:1583–1587.
 58. Wagner JD, Schwenke DC, Zhang L, Applebaum-Bowden D, Bagdade JD, Adams MR. Effects of short-term hormone replacement therapies on low-density lipoprotein metabolism in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997;17:1128–1134.
 59. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *The New England Journal of Medicine* 1991; 325: 1196–1204.

-
60. Wolfe BM, Barrett PH, Laurier L, Huff MW. Effects of continuous conjugated estrogen and micronized progesterone therapy upon lipoprotein metabolism in postmenopausal women. *The Journal of Lipid Research* 2000;41:368–375.
 61. Kavanagh K, Davis MA, Zhang L, Wilson MD, Register TC, Adams MR, Rudel LL et al. Estrogen Decreases Atherosclerosis in Part by Reducing Hepatic Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase 2 (ACAT2) in Monkeys. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:1471-1477.
 62. Kannel WB and McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham study. *JAMA*. 1979;241:2035–2038.
 63. Rutter MK, Wahid ST, McComb JM, Marshall SM Significance of silent ischemia and microalbuminuria in predicting coronary events in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40:56–61.
 64. Meigs JB, Larson MG, D’Agostino RB, Levy D, Clouse ME, Nathan DM, Wilson PW, O’Donnell CJ. Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002;25:1313–1319.
 65. Knopp RH. Risk factors for coronary artery disease in women. *American Journal of Cardiology* 2002;89(suppl 12A):28E–34E.
 66. Hokanson JE and Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *Journal of Cardiovascular Risk*. 1996;3:213–219.
 67. Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, Fruchart JC et al. Apolipoproteins C-III and E in apoB and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas Temoins sur Infarctus du Myocarde*. *J Lipid Res*. 1996;37:508–517.
 68. Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*. 2000;102:1886–1892.
 69. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Fruchart JC et al. Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2002;163: 377–384.

-
70. Eckel RH and Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation* 1998;97:2099-2100.
 71. Rinehart JF and Greenberg LD. Arteriosclerotic lesions in pyridoxine-deficient monkeys. *American Journal of Pathology* 1949;25:481-491.
 72. McCully KS and Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975;22:215 -227.
 73. McCully KS and Ragsdale BD. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *American Journal of Pathology* 1970;61:1-11.
 74. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis. Role of endothelial cell injury and platelet response to its genesis. *Journal of Clinical Investigation* 1976; 58:731-741.
 75. Smolin LA, Crenshaw TD, Kurtycz, Benevenga NJ. Homocyst(e)ine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B6: relationship to atherosclerosis. *Journal of Nutrition* 1983;113:2122-2133.
 76. Kuzuya F and Yoshimine N. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Japan Atherosclerosis Society* 1978;6:135-139.
 77. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub J, D'Agostino RB, Wolf PA, Jacques PF et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Archives of Internal Medicine* 1999;159:1077-1080.
 78. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1998;98:204-210.
 79. Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Refsum H, Ueland PM. Plasma total homocysteine and hospitalizations for cardiovascular disease: the Hordaland Homocysteine Study. *Archives of Internal Medicine* 2002;162:1374-1381.
 80. Mennen LI, de Courcy GP, Guillard JC, Ducros V, Bertrais S, Nicolas JP, Maurel M et al. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French

Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76:1279–1289.

81. Scarabin PY, Arveiler D, Amouyel P, Dos Santos C, Evans A, Luc G, Ferrières J et al. Plasma fibrinogen explains much of the difference in risk of coronary heart disease between France and Northern Ireland: the PRIME study. *Atherosclerosis* 2003;166:103–109.

82. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *American Journal of Cardiology* 2003;91:133–136.

83. van der Meer I, de Maat MP, Bots ML, Breteler MM, Meijer J, Kiliaan AJ, Hofman A, et al. Inflammatory mediators and cell adhesion molecules as indicators of severity of atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22:838–842.

84. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY et al. 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.

85. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579–1585.

86. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107: 2109–2114.

87. Goldstein JL and Brown MS. The LDL receptor. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2009;29:431-438.

88. 4S Investigators. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet* 1994 ; 344: 1383-9.

89. Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S., Maeda, N. and Assmann, G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with γ mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1994; 91: 1834–1838.

-
90. Kypreos KE and Zannis VI. Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT. *The Biochemical Journal* 2007;403(2):359-367.
 91. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC *et al.* Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine* 2011; 364:127-135.
 92. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *The Journal of Biological Chemistry* 1974;249:789-796.
 93. Tremblay AJ, Lamarche B, Lemelin V, Hoos L, Benjannet S, Seidah NG, Davis HR Jr *et al.* Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men. *The Journal of Lipid Research* 2011;52:558-65.
 94. Austin MA and Kraus RM. LDL density and atherosclerosis. *JAMA* 1995; 273(2):115.
 95. Phillips C, Owens D, Mullan K, Tomkin GH. Low density lipoprotein non-esterified fatty acids and lipoprotein lipase in diabetes. *Atherosclerosis* 2005;181:100-114.
 96. Krauss RM and Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoprotein in normal humans. *The Journal of Lipid Research* 1982;23:97-104.
 97. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988;8:79-87.
 98. Chung M, Lichtenstein AH, Ip S, Lau J, Balk EM. Comparability of methods for LDL subfraction determination: a systematic review. *Atherosclerosis* 2009;20:342-348.
 99. Tarbell JM. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovascular Research* 2010;87(2):320–330.
 100. Levick JR. The endothelial cell. In: *An Introduction to Cardiovascular Physiology*. 5th ed. London: Hodder Arnold; 2010,pp 147–165.
 101. Galley HF and Webster NR. Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia* 2004;93(1):105–113.
 102. Lüscher TF, Wenzel RR, Noll G. Local regulation of the coronary circulation in health and disease: role of nitric oxide and endothelin. *European Heart Journal* 1995; 16 Suppl C:51-58.

-
103. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *Journal of American College of Cardiology* 1997;30:325–333.
 104. Davies PF. Current concepts of vascular endothelial and smooth muscle cell communication. *Survey and Synthesis of Pathology Research* 1985;4:357-373.
 105. Schwartz SM and Benditt EP. Studies on aortic intima: I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. *The American Journal of Pathology* 1972;66:241-264.
 106. Lüscher TF and Barton M. Biology of the endothelium. *Clinical Cardiology* 1997; 20(suppl II):II 3-II 10.
 107. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Current Opinion in Lipidology* 2001;12:383–389.
 108. Davignon J and Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:III 27-III 32.
 109. Snelting-Havinga I, Mommaas M, Van Hinsbergh V, Daha M, Daems W, Vermeer B. Immunoelectron microscopic visualization of the transcytosis of low-density lipoproteins in perfused rat arteries. *European Journal of Cell Biology* 1989;48: 27–36.
 110. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *The Journal of Cell Biology* 1983;96:1677–1689.
 111. Lin SJ, Jan KM, Chien S. Role of dying endothelial cells in transendothelial macromolecular transport. *Arteriosclerosis* 1990;10:703–709.
 112. Lin SJ, Jan KM, Schuessler G, Weinbaum S, Chien S. Enhanced macromolecular permeability of aortic endothelial cells in association with mitosis. *Atherosclerosis* 1988;73:223–232.
 113. Cancel L, Fitting A, Tarbell JM. In vitro study of LDL transport under pressurized (convective) conditions. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H126–132.
 114. Tarbell JM. Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2003;5:79–118.
 115. Hojer J, Köhler R, Haase W, Distler A. Up-regulation of pressure activated Ca(+2) - permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996;93(20):11253-11258.

-
116. Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA, Koomans HA, Fijnheer R, Rabelink TJ. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating P-selectin. *Journal of Hypertension* 1998;16(1):45-50.
117. Januszewicz A, Lapiński M, Symonides B, Dabrowska E, Kuch-Wocial A, Trzepla E, Ignatowska-Switalska H et al. Elevated endothelin-1 plasma concentration in patients with essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Risk*. 1994;1(1):81-85.
118. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):499-504.
119. Rosendorff C. Endothelin, vascular hypertrophy and hypertension. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 1997; 10(6):795-802.
120. Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, Suematsu M et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1998;95(8):4754-9.
121. Munzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of nitric oxide/superoxide system. *Herz* 1997; 22(3):158-172.
122. Bretherton KN, Day AJ, Skinner SL. Effect of hypertension on the entry of I-labeled low density lipoprotein into the aortic intima in normal-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1976; 25: 99–106.
123. Wu CH, Chi JC, Jerng JS, Lin SJ, Jan K, Wang DL, Chein S. Transendothelial macromolecular transport in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 16: 154–161.
124. Meyer G, Merval R, Tedgui A. Effects of pressure induced stretch and convection on low-density lipoprotein and albumin uptake in the rabbit aortic wall. *Circulation Research* 1996;79: 532-540.
125. Cheng C, Tempel D, van Haperen R, van der Baan A, Grosveld F, Daemen M, Krams R et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006;113: 2744-2753.

-
126. Curmi PA, Juan L, Tedgui A. Effect of transmural pressure on low density lipoprotein and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. *Circulation Research* 1990;66: 1692–1702.
 127. Karmakar N. Interaction of transmural pressure and shear stress in the transport of albumin across the rabbit aortic wall. *Atherosclerosis* 2001;156: 321–327.
 128. Dabagh M, Jalali P, Tarbell JM. The transport of LDL across the deformable arterial wall: the effect of endothelial cell turnover and intimal deformation under hypertension. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2009;297: H983–996.
 129. Galkina E and Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Current Drug Targets (Abstract)*. 2007, 8(12):1239-1248.
 130. Rosenfeld ME and Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:680-687.
 131. Lewis GF and Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research* 2005;96:1221–1232.
 132. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290: 2292–2300.
 133. Frid MG, Dempsey EC, Durmowicz AG, Stenmark KR. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels: importance in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997;17:1203-1209.
 134. Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:1589-1594.
 135. Schaper W and Ito WD. Molecular mechanism of coronary collateral vessel growth. *Circulation Research* 1996;79:911-919.
 136. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Kolati S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A et al. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1998;30:2291-2305.
 137. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews* 1995;75:487-517.

-
138. Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:2814-2817.
 139. Chobanian AV and Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:237-242.
 140. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hyper-trophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:456-461.
 141. Horwitz AR and Parsons JT. Cell migration-movin'on. *Science* 1999;286(5442):1102-1103.
 142. Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 1999; 286(5442):1172-1174.
 143. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin like growth factor induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation Research* 2000;86:15-23.
 144. Shigematsu K, Koyama H, Olson EN, Cho A, Reidy MA. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20:2372-2378.
 145. Mehrhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, Scheidereit C. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation role of NFkB revisited. *Circulation Research* 2005;96:958-964.
 146. Bennett MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*. 2002;87:480-487.
 147. Newby AC, Libby P, van der Wal AC. Plaque instability: the real challenge for atherosclerosis research in the next decade? *Cardiovascular Research* 1999;41:321-322.
 148. Bennet MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodeling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular Research* 1999;41:361-368.
 149. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function: State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989;13:658-667.
 150. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews* 1995;75:519-560.

-
151. Deng X, Marois Y, How T, Merhi Y, King M, Guidoin R, Karino T. Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. *Journal of Vascular Surgery* 1995;21(1):135-145.
 152. Sato M, Levesque MJ, Nerem RM. Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis* 1987; 7(3): 276-286.
 153. Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S, Nerem RM. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis* 1986; 6(2): 220-229.
 154. Soulis JV, Farmakis TM, Giannoglou GD, Louridas GE. Wall shear stress in normal left coronary artery tree. *Journal of Biomechanics* 2006; 39(4): 742–749.
 155. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2009;6:16–26.
 156. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2003;81:177–199.
 157. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999;282: 2035–2042.
 158. Wootton DM and Ku DN. Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annual Review of Biomedical Engineering* 1999;1: 299–329.
 159. Asakura T and Karino T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circulation Research* 1990;66:1045–1066.
 160. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 1985;5:293–302.
 161. Barakat A and Lieu D. Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2003;38:323–343.
 162. Chiu JJ, Wang DL, Chien S, Skalak R, Usami S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Journal of Biomechanical Engineering* 1998;120:2–8.
 163. Chien S. Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2003;83:131– 151.

-
164. Helmke BP, Goldman RD, Davies PF. Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circulation Research* 2000;86:745–752.
 165. Lee TYJ, Gotlieb AI. Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microscopy Research and Technique* 2003;60:115–125.
 166. Noria S, Cowan DB, Gotlieb AI, Langille BL. Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions. *Circulation Research* 1999;85:504–514.
 167. Vyalov S, Langille BL, Gotlieb AI. Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *American Journal of Pathology* 1996;149:2107–2118.
 168. Langille BL, Graham JJK, Kim D, Gotlieb AI. Dynamics of shear-induced redistribution of F-actin in endothelial cells in vivo. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1991;11:1814–1820.
 169. Noria S, Xu F, McCue S, Jones M, Gotlieb AI, Langille BL. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. *American Journal of Pathology* 2004;164:1211–1223.
 170. Pellegrin, SP and Mellor H. Actin stress fibres. *Journal of Cell Sciences* 2007;120:3491-3499.
 171. Khatau, SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson, PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D et al. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2009;106:19017-19022.
 172. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, Sheetz MP. Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell* 2006;127:1015-1026.
 173. Puklin-Faucher E, Gao M, Schulten K, Vogel V. How the headpiece hinge angle is opened: new insights into the dynamics of integrin activation. *The Journal of Cell Biology* 2006;175:349-360.
 174. Gingras AR, Vogel KP, Steinhoff HJ, Ziegler WH, Patel B, Emsley J, Critchley DR et al. Structural and dynamic characterization of a vinculin binding site in the talin. *Biochemistry* 2006;45(6):1805-1817.
 175. Papagrigoriou E, Gingras AR, Barsukov IL, Bate N, Fillingham IJ, Patel B, Frank R et al. Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five helix bundle. *EMBO Journal*. 2004;23:2942-2951.

-
176. del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz SMP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 2009;323:638-641.
 177. Johnson CP, Tang HY, Carag C, Speicher DW, Discher DE. Forced unfolding of proteins within cells. *Science* 2007;317:663-666.
 178. Vogel V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: Converting Force into Biochemical Signals. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2006;35:459-488.
 179. Pollard TD and Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 2009;326:1208-1212.
 180. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *The Journal of Cell Biology* 1997;136(6):1287-1305.
 181. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy* 2008;231(3):446-454.
 182. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C. The NH₂-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *The Journal of Cell Biology* 2002;157: 657-663.
 183. Traub O and Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1998; 18(5):677-685.
 184. Sakamoto N, Ohashi T, Sato M. Effects of shear stress on permeability of vascular endothelial monolayer cocultured with smooth muscle cells. *The Japan Society of Mechanical Engineers International Journal* 2004;47(4): 992-999.
 185. Ross R, Bowen PDF, Raines EW. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 1990;327:155-169.
 186. Chiu JJ, Lee PL, Chen CN, Lee CI, Chang SF, Chen LJ, Lien SC et al. Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:73-79.

-
187. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of Icam-1 and Vcam-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear-stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:2–10.
 188. Hsiai TK, Cho SK, Wong PK, Ing M, Salazar A, Sevanian A, Navab M, et al. Monocyte recruitment to endothelial cells in response to oscillatory shear stress. *The FASEB Journal* 2003;17:1648–1657.
 189. Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circulation Research* 1998;82:532–539.
 190. Dickson BC and Gotlieb AI. Endothelial dysfunction and repair in the pathogenesis of stable and unstable fibroinflammatory atheromas. *Canadian Journal of Cardiology* 2004;20:16B–23B.
 191. Gooch KJ, Dangler CA, Frangos JA. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *Journal of Cell Physiology* 1997;171:252–258.
 192. Chien S. Role of shear stress direction in endothelial mechanotransduction. *Molecular and Cellular Biomechanics* 2008;5:1–8.
 193. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circulation Research* 1997;81:328–337.
 194. Freyberg MA, Kaiser D, Graf R, Buttenbender J, Friedl P. Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;286:141–149.
 195. Haidekker MA, White CR, Frangos JA. Analysis of temporal shear stress gradients during the onset phase of flow over a backward-facing step. *Journal of Biomechanical Engineering* 2001;123:455–463.
 196. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, Dimmler S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circulation Research* 2001;89:709–715.
 197. Kadohama T, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio BE. Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *Journal of Cellular Physiology* 2007;212:244–251.

-
198. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000;101:2450–2453.
 199. Cancel LM and Tarbell JM. The role of apoptosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* 2010;208:335–341.
 200. Yao Y, Rabodzey A, Dewey CF Jr. Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H1023–H1030.
 201. Lin T, Seng L, Liu Y, DeFea K, Schwartz MA, Chien S, Shyy JY. Rho-ROCK-CIMK-Cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circulation Research* 2003;92:1296–1304.
 202. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15(1):2–10. Erratum in *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:429.
 203. Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama S-N, Miyasaka M, Kamiya A. Down-regulation of vascular adhesion molecule-1 by fluid shear stress in cultured mouse endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;748:148–156.
 204. Tsao PS, Lewis NP, Alpert S, Cooke JP. Exposure to shear stress alters endothelial adhesiveness: role of nitric oxide. *Circulation*. 1995;92:3513–3519.
 205. Tsuboi H, Ando J, Korenaga R, Takada Y, Kamiya A. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;206:988–996.
 206. Morigi M, Zoja C, Figliuzzi M, Foppolo M, Micheletti G, Bontempelli M, Saronni M et al. Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* 1995;85:1696–1703.
 207. Pelech SL and Sanghera JS. MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 1992;257:1355–1356.
 208. Berk BC, Duff JL, Marrero MB, Bernstein KE. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. In: Sowers JR, ed. *Endocrinology of the Vasculature*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1996:187–204.

-
209. Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA Jr, Greene AS. Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circulation Research*. 1997;80:312–319.
210. Fry DL, Haupt MW, Pap JM. Effect of endothelial integrity, transmural pressure, and time on the intimalmedial uptake of serum 125I-albumin and 125I-LDL in an in vitro porcine arterial organ-support system. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1992;12:1313-1328.
211. Sun N, Wood NB, Hughes AD, Thom SA, Xu XY. Effects of transmural pressure and wall shear stress on LDL accumulation in the arterial wall: a numerical study using a multilayered model. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2007; 292: H3148– H3157.
212. Prosi M, Zunino P, Perktold K, Quarteroni A. Mathematical and numerical models for transfer of low-density lipoproteins through the arterial walls: a new methodology for the model set up with applications to the study of disturbed luminal flow. *Journal of Biomechanics* 2005; 38: 903–917.
213. Olgac U, Kurtcuoglu V, Poulidakos D. Computational modeling of coupled blood-wall mass transport of LDL: effects of local wall shear stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008;294:H909-H919.
214. Soulis J, Giannoglou G, Dimitrakopoulou M, Papaioannou V, Logothetides S and Mikhailidis D. Influence of Oscillating Flow on LDL Transport and Wall Shear Stress in the Normal Aortic Arch. *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 2009;3:128-142.
215. Liu X, Pu F, Fan Y, Deng X, Li D, Li S. A numerical study on the flow of blood and the transport of LDL in the human aorta: the physiological significance of the helical flow in the aortic arch. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2009;297:H163-H 170.
216. Soulis JV, Fytanidis DK, Papaioannou VC, Giannoglou GD. Wall shear stress on LDL accumulation in human RCAs. *Medical Engineering and Physics* 2010;32:867-877.
217. Himburg HA, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack JA, Li XM, Friedman MH. Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2004;286:H1916- H1922.

-
218. Stone PH, Coskun AU, Kinlay S, Clark ME, Sonka M, Wahle A, Ilegbusi OJ et al. Effects of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling and in-stent restenosis in humans: In vivo 6-month follow - up study. *Circulation* 2003;108:438-444.
219. Ai L, Rouhanizadeh M, Wu JC, Takabe W, Yu H, Alavi M, Li R, Chu Y, Miller J, Heistad DD, Hsiai TK. Shear stress influences spatial variations in vascular Mn-SOD expression: implication for LDL nitration. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008;294:C1576–C1585.
220. Sakellarios AI, Fotiadis DI, Michalis LK. Finite Element Modeling of LDL Transport in Carotid Artery Bifurcations. In 4th European conference of the International federation for medical and biological engineering IFMBE proceedings, Volume 22. Edited by Sloten JV. Springer Berlin Heidelberg; 2009:1967-1971.
221. Rosic M, Pantovic S, Obradovic Z. Experimental and mathematical model for the evaluation of dynamic responses of isolated blood vessels. *Medicus* 2006;7(3):98–102.
222. Rosic M, Pantovic S, Rankovic V, Obradovic Z, Filipovic N, Kojic M. Evaluation of dynamic response and biomechanical properties of isolated blood vessels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2008;70:966–972.
223. Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LF, Nagem TJ. Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2010;95(2):272-278.
224. Yudilevich DL and Mann GE. Unidirectional uptake of substrates at the blood side of secretory epithelia: stomach, salivary gland and pancreas. *Federation Proceedings* 1982;41(14):3045–3053.
225. Kostic MM, Rosic GL, Segal MB, Rosic MA. Biphasic L-arginine uptake by the isolated guinea-pig heart. *Experimental Physiology* 1995; 80(6):969-979.
226. Rosic M, Pantovic S, Lucic A, Ribarac-Stepic N, Andjelkovic I. Kinetics of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) transport in the isolated rat heart. *Experimental Physiology* 2001; 86(1):13-18.
227. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996;16:1256-1262.

-
228. Rosic M, Pantovic S, Rankovic V, Obradovic Z, Filipovic N, Kojic M. Evaluation of dynamic response and biomechanical properties of isolated blood vessel. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2008;70(6):966-972.
229. Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, Tano T, Schini-Kerth VB et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart (Açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology* 2007;46:97-104.
230. Fung YC, Fronek K, Patitucci P. Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression. *American Journal of Physiology* 1979;237(5):H620–H631.
231. Madden JA and Christman NJ. Integrin signaling, free radicals and tyrosine kinase mediate flow constriction in isolated cerebral arteries. *American Journal of Physiology* 1999;277(6):H2264-2271.
232. Cunningham KS and Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation* 2005;85(1):9-23.
233. Yang X, Peterson L, Thieringer R, Deignan JL, Wang X, Zhu J, Wang S et al. Identification and validation of genes affecting aortic lesions in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2010;120:2414–2422.
234. Teupser D, Tan M, Persky AD, Breslow JL. Atherosclerosis quantitative trait loci are sex- and lineage-dependent in an intercross of C56BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2006;103:123–128.
235. Smith JD, James D, Dansky HM, Wittkowski KM, Moore KJ, Breslow JL. In silico quantitative trait locus map for atherosclerosis susceptibility in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003;23:117–122.
236. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *American Heart Journal* 1987;113:589–597.
237. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2009;29:870–876.
238. Moghadasian MH, Frolich JJ, McManus BM. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Laboratory Investigation* 2001;81,1173–1183.

-
239. Davidson MH. Update on CETP inhibition. *Journal of Clinical Lipidology* 2010; 4:394–398.
240. Bentzon JF and Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Current Opinion in Lipidology* 2010;5:434–440.
241. Getz GS and Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2012;32(5):1104-1115.
242. Skold BH, Getty R, Ramsey FK. Spontaneous atherosclerosis in the arterial system of aging swine. *American Journal of Veterinary Research* 1966;27:257–273.
243. Reiser R, Sorrels MF, Williams MC. Influence of high levels of dietary fats and cholesterol on atherosclerosis and lipid distribution in swine. *Circulation Research* 1959;7:833–846.
244. Koskinas KC, Feldman CL, Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Maynard C, Baker AB et al. Natural history of experimental coronary atherosclerosis and vascular remodeling in relation to endothelial shear stress: a serial, in vivo intravascular ultrasound study. *Circulation* 2010;19:2092–2101.
245. Gerrity RG, Richardson M, Somer JB, Bell FP, Schwartz CJ. Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *American Journal of Pathology* 1977;89:313–334.
246. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology* 1981;103:191–200.
247. Portman OW and Andrus SB. Comparative evaluation of three species of new world monkeys for studies of dietary factors, tissue lipids, and atherogenesis. *Journal of Nutrition* 1965;87:429–438.
248. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circulation Research* 1988;62:515–523.
249. Armstrong ML and Megan MB. Lipid depletion in atheromatous coronary arteries in rhesus monkeys after regression diets. *Circulation Research* 1972;30:675–680.
250. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals* 2004;38(3):246-256.

-
251. Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and the atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis* 1993;102:9–22.
252. Finking G and Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885–1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135:1–7.
253. Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1996;16:1454–1464.
254. Ramjiganesh T, Roy S, Freake HC, McIntyre JC, Fernandez ML. Corn fiber oil lowers plasma cholesterol by altering hepatic cholesterol metabolism and up-regulating LDL receptors in guinea pigs. *Journal of Nutrition* 2002;132: 335–340.
255. Yanni AE, Yatzidis H, Kavantzas N, Agapitos E, Perrea D, Karayannacos PE. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2003;13:80–86.
256. Kritchevsky D, Tepper SA, Williams DE, Story JA. Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free diets. Part 7. Interaction of animal or vegetable protein with fiber. *Atherosclerosis* 1977;26(4):397–403.
257. West CE, Deuring K, Schutte JB, Terpstra AH. The effect of age on the development of hypercholesterolemia in rabbits fed semipurified diets containing casein. *Journal of Nutrition* 1982;112(7):1287–1295.
258. Terpstra AH, West CE, Fennis JT, Schouten JA, Van der Veen EA. Hypocholesterolemic effect of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) *American Journal of Nutrition* 1984;39:1–7.
259. Hunt CE, Duncan LA. Hyperlipoproteinaemia and atherosclerosis in rabbits fed low-level cholesterol and lecithin. *British Journal of Experimental Pathology* 1985;66:35–46.
260. Rogers KA and Karnovsky MJ. A rapid method for the detection of early stages of atherosclerotic lesion formation. *American Journal of Pathology* 1988;133:451–455.
261. Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980;36:261–268.
262. Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial

hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1981;78:2268–2272.

263. Armstrong ML. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1990;85:15–23.

264. Adams CW, Miller NE, Morgan RS, Rao SN. Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years' cholesterol feeding at a low level. *Atherosclerosis* 1982;44:1–8.

265. Tozer EC and Carew TE. Residence time of low density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circulation Research* 1997;80:208–218.

266. Kamimura R, Suzuki S, Sakamoto H, Miura N, Misumi K, Miyahara K. Development of atherosclerotic lesions in cholesterol-loaded rabbits. *Experimental Animals* 1999;48(1):1-7.

267. Atkinson JB, Hoover RL, Berry KK, Swift LL. Cholesterol-fed heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a new model for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989;78(2-3):123-36.

268. Foegh ML, Khirabadi BS, Chambers E, Amamoo S, Ramwell PW. Inhibition of coronary artery transplant atherosclerosis in rabbits with angiopeptin, an octapeptide. *Atherosclerosis*. 1989;78(2-3):229-236.

269. Kuwahara M, Jacobsson J, Kuwahara M, Kagan E, Ramwell PW, Foegh ML. Coronary artery ultrastructural changes in cardiac transplant atherosclerosis in the rabbit. *Transplantation* 1991;52(5):759-765.

270. Guo ZY, Yan ZQ, Bai L, Zhang ML, Jiang ZL. Flow shear stress affects macromolecular accumulation through modulation of internal elastic lamina fenestrae. *Clinical Biomechanics* 2008;23(1):S104–S111.

271. Hopkins KD, Lehmann ED, Gosling RG. Aortic compliance measurements: a non-invasive indicator of atherosclerosis? *Lancet* 1994;343(8911):1447.

272. Harada N, Masuda M, Fujiwara K. Fluid flow and osmotic stress induce tyrosine phosphorylation of an endothelial cell 128 kDa surface glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;214(1):69–74.

273. Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *The Journal of Cell Biology* 2002;158(4):773–785.

-
274. Xie X, Tan J, Wei D, Lei D, Yin T, Huang J, Zhang X et al. In vitro and in vivo investigations on the effects of low-density lipoprotein concentration polarization and haemodynamics on atherosclerotic localization in rabbit and zebrafish. *Journal of The Royal Society Interface* 2013;10(82):1-11.
275. Gottlieb AI, Langille BL, Wong MK, Kim DW. Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Laboratory Investigations* 1991;65(2):123–137.
276. Oluwole BO, Du W, Mills I, Sumpio BE. Gene regulation by mechanical forces. *Endothelium* 1997;5(2):85–93.
277. Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2003;100(13):7988–7995.
278. Wang J and Widlansky ME. Cytoskeleton, cytoskeletal interactions, and vascular endothelial function. *Cell Health and Cytoskeleton* 2012;4:119–127.
279. Filipovic N, Rosic M, Tanaskovic I, Milosevic Z, Nikolic D, Zdravkovic N, Peulic A et al. ARTreat Project: Three-dimensional numerical simulation of plaque formation and development in the arteries. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine* 2012;16(2):272-278.
280. Munson BR, Young DF, Okiishi TH. *Fundamentals of fluid mechanics*, 4th edn. New York, NY: John Wiley & Sons Inc. 2002.
281. Van den Berg BM, Spaan JA, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflügers Archive: European Journal of Physiology* 2009;457(6):1199-1206.
282. Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 2004;173(1):1-12.
283. Kawachi E, Uehara Y, Hasegawa K, Yahiro E, Ando S, Wada Y, Yano T et al. Novel molecular imaging of atherosclerosis with gallium-68-labeled apolipoprotein A-I mimetic peptide and positron emission tomography. *Circulation Journal* 2013;77(6):1482-1489.
284. Nihei S, Tasaki H, Yamashita K, Ozumi K, Morishita T, Tsutsui M, Okazaki M et al. Hyperhomocysteinemia is associated with human coronary atherosclerosis through the reduction

of the ratio of endothelium-bound to basal extracellular superoxide dismutase. *Circulation Journal* 2004;68(9):822-828.

285. Zhang D, Wen X, Zhang L, Cui W. DNA Methylation of Human Telomerase Reverse Transcriptase Associated With Leukocyte Telomere Length Shortening in Hyperhomocysteinemia-Type Hypertension in Humans and in a Rat Model. *Circulation Journal* 2014;78:1915–1923.