



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Весна Ж. Росић

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ
МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА
УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Vesna Ž. Rosić

**FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE GLATKIH MIŠIĆNIH
ĆELIJA U ARTERIJAMA OSOBA SA
UZNAPREDOVALIM FORMAMA ATEROSKLEROZE**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Vesna Ž. Rosić

**PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SMOOTH
MUSCLE CELLS IN THE ARTERIES OF PERSONS WITH
ADVANCED TYPES OF ATHEROSCLEROSIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

Аутор
Име и презиме: Весна Росић
Датум и место рођења: 02.05.1983. Крагујевац
Садашње запослење: Истраживач приправник за ужу научну област Хистологија и ембриологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: „Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са узнапредовалим формама атеросклерозе”
Број страница: 132
Број слика: 128 слика, 17 табеле и 7 графикона
Број библиографских података: 171
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор за ужу научну област Хистологија и ембриологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Проф. др Весна Станковић, ванредни професор за ужу научну област Патолошка анатомија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 22.08.2022. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: број IV-03-651/44 од 13.09.2022. године.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Зоран Милосављевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник; 2. Проф. др Маја Сздановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 3. Проф. др Милица Лабудовић Боровић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 3. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 4. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 5. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета
Датум одбране дисертације:

Identifikaciona stanica doktorske disertacije (latinica)

Autor
Ime i prezime: Vesna Rosić
Datum i mesto rođenja: 02.05.1983., Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: Istraživač pripravnik za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: „Fenotipske karakteristke glatkih mišićnih ćelija u arterijama osoba sa uznapredovalim formama ateroskleroze”
Broj stranica: 132
Broj slika: 128, slike, 17 tabele i 7 grafikona
Broj bibliografski podataka: 171
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK):
Mentor: Prof. dr Irena Tanasković, redovni profesor za užu naučnu oblast Histologija i embriologija Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu Prof. dr Vesna Stanković, vandredni profesor za užu naučnu oblast Patološka anatomija Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Ocena I odbrana
Datum prijave teme:
Broj odluke I datum prihvatanja teme doktorske disertacije: broj IV-03-651/44 od 13.09.2022. godine.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata: 1. Prof. dr Zoran Milosavljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, predsednik; 2. Prof. dr Maja Sazdanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, član; 3. Prof. dr Milica Labudović Borović, vanredni profesor za užu naučnu oblast Histologija i embriologija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacija: 1. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 2. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 3. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 4. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 5. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta
Datum odbrane disertacije

Author
Name and surname: Vesna Rosić
Date and place of birth: 02.05.1983, Kragujevac
Current employment: Trainee researcher for the specialized scientific field of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: 'Phenotypic characteristics of smooth muscle cells in the arteries of persons with advanced types of atherosclerosis'
No. of pages: 132
No. of images: 128 images, 17 tables and 7 graphs
No. of bibliographic data: 171
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Professor Irena Tanaskovic, MD, DSc, MSc, Full Professor for the specialized scientific field of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Professor Vesna Stanković, MD, DSc, MSc, Associate Professor for the specialized scientific field of Pathological Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date:
Decision number and date of acceptance of the doctoral: number IV-03-651/44 dated from 13.09.2022
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Professor Zoran Milosavljević MD, DSc, MSc, Full Professor for the specialized scientific field of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president; 2. Professor Maja Sazdanović, MD, DSc, MSc, Associate Professor for the specialized scientific field of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member; 3. Professor Milica Labudović Borović, MD, DSc, MSc, Associate Professor for the specialized scientific field of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 2. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 3. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 4. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 5. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university
Date of Dissertation Defense:

Захвалница

Посебну захвалност дугујем мом ментору проф. др Ирени Танасковић на свеобухватној помоћи, подршци и разумевању око израде докторске дисертације.

Захваљујем се и мом коментору проф. др Весни Станковић на свестраној помоћи и подршци око израде докторске дисертације.

Неизмерну захвалност дугујем својој породици на несебичној подршци и разумевању коју су ми пружили.

Докторску дисертацију посвећујем својим родитељима.

САЖЕТАК

Предмет овог истраживања је евалуација улоге цитохистолошких фактора који доприносе патогенези атеросклерозе. Истраживање ће обухватити карактеристике различитих фаза атеросклерозе, цитохистолошку и имунохистохемијску анализу атеросклеротичних промена, као и утврђивање могуће повезаности других фактора са клиничком сликом пацијената.

Планирана је ретроспективна клиничко-хистопатолошка студија типа случај-контрола. Студија ће обухватити 21 узорак у групи случајева и 41 узорак у групи контрола. Групу случајева чине узорци коронарних артерија умрлих, са унапредовалим формама атеросклерозе. Групу контрола чине узорци коронарних артерија умрлих, са раним лезијама атеросклерозе.

У студији ће бити анализирани цитохистолошке карактеристике стадијума атеросклерозе према класификацији *American Heart Association Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis*, имунохистохемијске карактеристике коришћењем четири имунохистохемијска маркера – α -глаткомишићни актин, S-100 протеин, дезмин и виментин, као и већи број варијабли добијених из историја болести.

Као најважнији резултат ове студије очекује се утврђивање најзначајнијих цитохистолошких фактора који воде прогресији атеросклерозе коронарних артерија. Осим тога, резултати имунохистохемијске анализе у овој студији могли би да укажу на повезаност клиничке слике коронарне болести и њених цитохистолошких карактеристика, односно, стадијума атеросклерозе.

Кључне речи: атеросклероза коронарних артерија, цитохистолошке карактеристике, симптоматологија

SUMMARY

The subject of this research is the evaluation of the role of cytohistological factors that contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. The research will include the characteristics of different stages of atherosclerosis, cytohistological and immunohistochemical analysis of atherosclerotic changes, as well as determining the possible association of other factors with the clinical picture of patients.

A retrospective clinical-histopathological case-control study has been planned. The study will include 21 samples in the case group and 41 samples in the control group. The case group consists of samples of coronary arteries of deceased persons with advanced types of atherosclerosis. The control group consists of samples of coronary arteries of deceased persons with early lesions of atherosclerosis.

The study will analyze the cytohistological characteristics of the stage of atherosclerosis according to the classification of the *American Heart Association Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis*, immunohistochemical characteristics by using four immunohistochemical markers - α -smooth muscle actin, S-100 protein, desmin and vimentin, as well as a larger number of variables obtained from medical histories.

The determination of the most significant cytohistological factors that lead to the progression of coronary artery atherosclerosis is expected to be the most important result of this study. In addition, the results of the immunohistochemical analysis in this study could indicate the association between the clinical picture of coronary disease and its cytohistological characteristics, that is, the stage of atherosclerosis.

Key words: atherosclerosis of coronary arteries, cytohistological characteristics, symptomatology

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	2
1.1. Васкуларне глатке мишићне ћелије.....	4
1.1. Глатке мишићне ћелије у атеросклерози.....	7
1.1.1. Пенасте ћелије које потичу од глатких мишићних ћелија.....	9
2. ЦИЉ РАДА.....	12
2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	13
2.2. РАДНЕ ХИОТЕЗЕ.....	13
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	14
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ.....	15
3.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ.....	15
3.3. УЗОРКОВАЊЕ.....	15
3.4. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СУ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ.....	15
3.4.1. Зависне варијабле.....	15
3.4.2. Независне варијабле.....	16
3.4.3. "Збуњујуће" варијабле.....	16
3.5. ХИСТОЛОШКА ИСПИТИВАЊА.....	17
3.5.1. Рутинске хистохемијске методе бојења.....	17
3.5.2. Методологија имунохистохемијског бојења.....	17
3.6. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА.....	18
3.7. СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ ОБРАДЕ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА У ИСТРАЖИВАЊУ.....	18
4. РЕЗУЛТАТИ.....	19
4.1. РЕЗУЛТАТИ ХИСТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ СТАДИЈУМА АТЕРОСКЛЕРОЗЕ.....	20
4.1.1. Иницијална лезија - тип I лезија.....	20

4.1.2. Стадијум масне лезија - тип II лезија.....	20
4.1.3. Стадијум преатерома - интермедијарна лезија или тип III лезија.....	20
4.1.4. Стадијум атерома – тип IV лезија.....	21
4.1.5. Стадијум фиброатерома – тип V лезије.....	21
4.1.6. Копликована лезија - VI лезије.....	22
4.2. Резултати статистичке анализе варијабли.....	78
4.2.1. Дескриптивна статистика (обе групе).....	78
5. ДИСКУСИЈА.....	101
5.1. Старост и пол испитаника.....	102
5.2. Присуство виментина.....	103
5.3. Присуство дезмина.....	103
5.4. Присуство S100 протеина.....	107
5.5. Анализа „збуњујућих” варијабли.....	114
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	117
7. ЛИТЕРАТУРА.....	119

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

1. УВОД

Атеросклероза представља комплексну болест чија патогенеза може да се дефинише као ремоделовање артеријског зида у условима повећаног притиска, удружено са хиперхолестеролемијом и последичним запаљењем.

У иницијалној фази ремоделовања, новосинтетисани ткивни фактори утичу на васкуларне глатке мишићне ћелије, промовишу њихову фенотипску модулацију из контрактилног у синтетски фенотип, њихову миграцију у субендотел интима, са последичном синтезом екстрацелуларног матрикса, предоминантно протеогликанског састава, услед чега долази до хипертрофије као следеће фазе васкуларног ремоделовања (Allahverdian, 2018; Humphrey, 2021).

Уколико је хипертензија удружена са хиперхолестеролемијом, упоредо са повећаном синтезом протеогликана, долази до инсудације LDL-а у субендотел. Липидне капљице се високим афинитетом везују за протеогликане у субендотелу, што је предуслов за њихову оксидацију. Оксидисани LDL (ox-LDL) активира ендотелне ћелије које почињу да експримирају адхезионе протеине из породице имуноглобулина и селектина, као и специфичне цитокине-хемокине карактеристичне за иницијалну фазу атеросклерозе или тип I лезије (Stary et al, 1994).

Адхерирани моноцити и Т лимфоцити мигрирају у субендотел. Моноцити се модификују у макрофаге, путем *scavenger* рецептора преузимају ox-LDL и трансформишу се у „пенасте” ћелије (енгл. *foam cells*) које формирају масне пруге (траке), односно тип II лезије (Stary et al, 1994).

У стадијуму преатерома – интермедијарне лезије (тип III лезије), липидне акумулације превазилазе капацитете пенастих ћелија, па се у субендотелном везивном ткиву липиди накупљају и екстрацелуларно у виду малих, изолованих акумулација (Stary et al, 1994).

Тип IV атеросклеротичне лезије или атером карактерише акумулација велике количине липида у субендотелу интима у форми екстензивног липидног језгра, са мало фиброзног везива и без дефеката на површини плака (Stary et al, 1995).

Атеросклеротична лезија која садржи проминентно новостворено фиброзно везивно ткиво класификује се као тип V лезије. Уколико настало фиброзно везиво прекрива липидно језгро, лезија се класификује као фиброатером или тип Va лезије. Тип V лезије код кога липидно језгро садржи калцификате, класификује се као тип Vb лезије. Уколико у лезији није присутно липидно језгро, већ је интима састављена из дебелих колагених влакана, лезија се класификује као тип Vc (Stary et al, 1995).

Као компликована лезија (тип VI лезије), класификује се лезија на стадијуму атерома (тип IV) или фиброатерома (тип V) која је компликована руптуром (подтип VIa), хеморагијом (подтип VIb) или тромбозом (подтип VIc). Уколико су истовремено присутне све три врсте компликација, лезија се класификује као подтип VIa,b,c (Stary et al, 1995).

Међутим, иако је атеросклероза већ деценијама предмет истраживања базичних и клиничких дисциплина, још увек постоје недоумице у савременој литератури. Због тога би предмет овог истраживања био евалуација улоге глатких мишићних ћелија, идентификација њиховог фенотипа (синтетски или контрактилни) и одређивање њиховог потенцијала за фенотипску модификацију у пенасте ћелије, а добијени резултати ове студије би допринели разумевању комплексних механизма у патогенези атеросклеротичних промена (Xiao, 2020).

1.1. Васкуларне глатке мишићне ћелије

Васкуларне глатке мишићне ћелије чине доминантну ћелијску популацију медије крвних судова, док се мањи број ових ћелија налази у субендотелу интима и адвентицији. У васкуларном систему, једини крвни судови који не садрже глатке мишићне ћелије су капилари, посткапиларне и сабирне венуле. Код ових микроваскуларних судова, функцију глатких мишићних ћелија преузимају перицити (Attwell et al, 2016; Ross and Pawlina 2016). Осим што су преобладајуће заступљене у медији крвних судова, васкуларне глатке мишићне ћелије заступљене су и у субендотелу интима артерија еластичног типа и коронарних артерија, где иако релативно малобројне, такође чине главни ћелијски ентитет (око 95%). Од осталих ћелијских популација присутни су макрофаги, лимфоцити, мастоцити и васкуларне дендритске ћелије (Bobryshev and Lord, 1995a,b,c; Bobryshev, 2010; Lačković i sar, 2020).

У субендотелу интима артерија еластичног типа, као и појединим артеријама мишићног типа где су присутне, глатке мишићне ћелије оријентисане су лонгитудинално, док су у медији оријентисане циркуларно или спирално, тако да контракцијом сужавају лумен. Функцијом ових ћелија под утицајем различитих вазоактивних супстанци (азот моноксид, катехоламини, ендотелини, простагландини, неуропептиди) регулише се васкуларни тонус (Davis et al, 1994; Tuna et al, 2012).

Медијалне глатке мишићне ћелије међусобно су повезане цитоплазматским продужецима. Комуникантни спојеви (нексуси) који се формирају на местима њиховог контакта омогућавају пропацију ексцитаторних импулса (Heberlein et al, 2009).

Васкуларне глатке мишићне ћелије могу да експримирају два фенотипска статуса: *контракtilни* и *синтетски* (Berk et al, 1988; Allahverdian et al, 2018).

Глатке мишићне ћелије контрактилног фенотипа су издуженог, вретенастог облика, са једним, издуженим, централно постављеним једром и бројним цитоплазматским продужецима којима су међусобно повезане посредством комуникантних спојева. Око једра су распоређене митохондрије, гранулисани ендоплазматски ретикулум, рибозоми, Голџијев комплекс, грануле гликогена и елементи цитоскелета. Садрже актинске и миозинске филаменте припојене за густа тела (енгл. *dense bodies*) (Wilson, 2011; Ross and Pawlina, 2016). Не садрже тропонин, већ се механизам мишићне контракције остварује посредством калцијум-везујућег протеина калмодулина. Везивањем јона калцијума, калмодулин активира ензим киназу лаких ланаца миозина (енгл. *Myosin Light Chain Kinase – MLCK*), који затим фосфорилише лаки ланац миозина LC20, што доводи до конформационих промена главице миозина, њеног повезивања са молекулима актина што покреће механизам контракције глатке мишићне ћелије (Wilson et al, 2002; Martinsen et al, 2014)

Ћелије контрактилног фенотипа окружене су гликопротеинском базалном ламином и повезане су са ендотелним ћелијама путем њихових продужетака који пролазе кроз фенестре унутрашње еластичне ламине и спајају се са продужецима глатких мишићних ћелија миоендотелним спојевима (Heberlain et al, 2009). Специфични интегрин који се експримира на површини глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа и има функцију адхезионог протеина је $\alpha 1\beta 1$ интегрин. Доказано је да ћелије које експримирају овај адхезиони протеин нису способне да мигрирају (Ross R, 1995; Moiseeva, 2001; Louis and Zahradka, 2010).

Ембрионално порекло глатких мишићних ћелија, које у великој мери одређује њихове карактеристике је различито. У медији асцендентне аорте и аортног лука настају од ћелија нервног гребена, у медији мишићних артерија су мезодермалног порекла, док глатке мишићне ћелије коронарних артерија воде порекло из проепикардног органа (Hill, 2010; Bennett et al, 2016; Basatemur et al, 2019).

Током ембрионалног развоја васкуларне глатке мишићне ћелије у неким случајевима и перицити настају из више локалних прогениторских ћелија распоређених дуж артеријског стабла (Etchevers et al, 2001). Различно порекло ових ћелија последица је анатомске сегментације артеријског стабла током ембрионалног развоја (Jiang et al, 2000; Passman et al, 2008), односно позиционог идентитета дуж кранио-каудалне, дорзо-вентралне и десно-леве осе ембриона (Chang, 2009; Pruett et al, 2012, Sawada et al, 2017) што имплицира важне функционалне ефекте одговора на факторе раста као што су TGF β , PDGF, NF- κ B, ангиотензин, који зависе од лозе и покрећу различите сигналне путеве (Tourozis and Majesky, 1996; Madura, 1996; Owens et al, 2010; Xie, 2013; Trigueros-Motos 2013).

За разлику од попречно-пругастих и срчаних мишићних ћелија глатке мишићне ћелије задржавају високи степен потенцијала дедиференцијације и пластичности. Овај феномен познат је као фенотипска модулација, што је типично за глатке мишићне ћелије које се акумулирају у интими током формирања атеросклеротичног плака, као и код рестенозе после ангиопластике или апликације стента (Basatemur, 2019).

За разлику од глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа, ћелије синтетског фенотипа нису међусобно спојене комуникантним спојевима. У цитоплазми имају развијене синтетске органеле, гранулирани ендоплазматски ретикулум и Голџи апарат, са врло мало миофибрила (Tanasković et al, 2013).

Интима здравог крвног суда садржи мали број глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа. Овај фенотипски статус је карактеристичан за почетне фазе развоја глатких мишићних ћелија, током ембрионалног живота и током раста. Ове слабодиферентоване форме синтетишу колаген, еластин и протеогликане, па подсећају на фибробласте. Одговарају на дејство цитокина и специфичних фактора раста (Sweeny et al, 2006; Wilson, 2011). Специфични интегрини који се експримирају на површини глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа су α 2 β 1 интегрин који везује колаген, као и интегрини α 3 β 1 и α 5 β 1 који везују фибронектин. Ови интегрини имају функцију адхезионих молекула, а ћелије које их експримирају, могу да мигрирају под утицајем тромбоцитног фактора раста (Ross, 1995; Moiseeva, 2001; Louis and Zahradka, 2010).

Временом се глатке мишићне ћелије диференцирају у контрактилни фенотип, који експримира α 1 β 1 интегрин и одговара на дејство вазоактивних супстанци (Sudhir et al, 1993; Louis and Zahradka, 2010). Истраживања су показала да глатке мишићне ћелије и у адултном добу, у неким обољењима васкуларног система, могу да експримирају синтетски фенотип. У процесима атеросклерозе, као и у случајевима конгениталног сужења лумена торакалне аорте, односно стварањем коаркталног ткива, затим у случајевима рестенозе после балон катетеризације или ангиопластике, долази до задебљања интими крвног суда и стварања неоинтими (Shah, 2003). Сматра се да је један од кључних момената у патогенези ових обољења фенотипска модулација глатких мишићних ћелија из контрактилног у синтетски фенотип. Фенотипска модулација омогућава миграцију глатких мишићних ћелија у субендотелно везиво, њихову пролиферацију и синтетску активност (Basatemur et al, 2019).

Под дејством хемотаксичних фактора глатке мишићне ћелије мигрирају кроз отворе унутрашње еластичне мембране. Како на својој површини експримирају специфичне интегрине и еластин везујуће протеине, глатке мишићне ћелије остварују контакт са компонентама везивног ткива и одговарају на дејство фактора раста својом пролиферацијом (Wilson et al, 1993; Louis and Zahradka, 2010). Упоредо са мултипликацијом, ћелије почињу да секретују екстрацелуларни матрикс, повећавајући количину колагена IV и колагена V. Колагена и еластична влакна се уснопљавају и задебљавају. На овај начин се формира неоинтима, састављена преодминантно од екстрацелуларног матрикса и од више слојева глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа. Протеини матрикса (фибронектин, тромбоспондин, остепонтин, тенасцин), као и протеогликани, повећавају адхезију, миграцију и пролиферацију глатких мишићних ћелија. Интима задебљава до дебљине медије (Abe et al, 1994; Wang et al, 2017).

Иако се дуго претпостављало да је процес фенотипске модулације глатких мишићних ћелија из контрактилног у синтетски фенотип иреверзибилан, у неким случајевима експериментално изазване рестенозе, забележена је редиференцијација, односно поновна трансформација глатких мишићних ћелија из синтетског у контрактилни фенотип (Valius and Kazlauskas, 1993; Griessel et al, 2015).

1.2. Глатке мишићне ћелије у атеросклерози

Васкуларне глатке мишићне ћелије су главни тип ћелија присутан у свим фазама развоја и прогресије атеросклеротичног плака. Контракtilне васкуларне глатке мишићне ћелије регрутоване из медије пролазе кроз фенотипску конверзију у пролиферативне дедиференциране, синтетске ћелије које стварају екстрацелуларни матрикс, формирају фиброзу капу и стабилизују плак. Перцепција о њиховом пореклу, улози и трансформацији у настанку и ремоделирању атеросклеротичног плака се Вероватноћа променила последњих деценија. Постигнут је велики напредак у њиховој идентификацији, објашњењу моноклонске и олигоклонске експанзије, фенотипске алтерације и улоге у индукцији развоја и стабилизацији плака. Протеклих деценија студије које мапирају ове ћелије кроз технике праћења лоза откриле су њихову морфолошку, структурну и функционалну хетерогеност и отвориле могућност циљне селекције и комбинације ћелијских типова у спречавању прогресије процеса одговорних за атеросклерозу (Shankaman et al, 2015; Basatemur 2016).

Докази о клоналности ових ћелија потврђују да се регрутују и пролиферишу из локалних васкуларних глатких мишићних ћелија различитих анатомских локализација другачијег ембрионалног порекла, што потврђује предиспозицију одређених локализација за процес атеросклерозе. Ову идеју поткрепљују налази да сегменти аорте након трансплантације задржавају своју подложност за развој плакова (Haimovici, 1991; Majesky 2007). Дефинитивни докази сличне анатомске поделе популације васкуларних глатких мишићних ћелија код људи недостаје, али је концепт делимично подржан студијама које описују клонске ”закрепе” васкуларних глатких мишићних ћелија код артерија (Beneditt 1973; Murry et al, 1997; Chung, 1998).

Резултати испитивања фенотипског статуса глатких мишићних ћелија у атеросклеротичним лезијама показали су да од стадијума масне траке глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа чине највећи део ћелијске популације у лезији. Развој синтетског фенотипа праћен је редукцијом миофиламената (Lačković i Vuković, 2006; Tanasković i sar, 2013). Глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа експримирају α -глаткомишићни актин и виментин, уз изостанак експресије дезмина. Губитак експресије дезмина који је маркер високо диференцираног контракtilног фенотипа представља показатељ фенотипске модулације из контракtilног у синтетски фенотип (Hao et al, 2003; Asanpoga et al, 2010; Gomez and Owens, 2012). Према подацима из литературе, виментин је интермедијарни филамент који се налази и у цитоплазми глатких мишићних ћелија контракtilног фенотипа, али се коекспримира са дезмином. Губитком контракtilног фенотипа и за овај фенотип карактеристичне дезминске експресије (фенотипском модификацијом ћелије из контракtilног у синтетски фенотип), запажа се експресија виментинских филамената (Asanpoga et al, 2010; Allahverdian et al, 2018).

Фенотипска модулација глатких мишићних ћелија из контракtilног у синтетски фенотип представља главну карактеристику васкуларног ремоделовања током развоја атеросклерозе. Васкуларно ремоделовање представља структурну и функционалну адаптацију зида крвног суда у условима повећаног притиска (Ashraf and Zen, 2021). Истраживања су показала да адаптивна интимална пролиферација (“рани одговор зида”) током процеса ремоделовања, нема механизме негативне повратне спреге и прогредира у интималну хиперплазију. У примарном одговору зида на услове повећаног притиска, долази до кломпензаторне дилатације лумена крвног суда, а затим до пролиферације

ендотелних ћелија. Након ендотелне пролиферације, почиње период пролиферације глатких мишићних ћелија тунике медије, њихова миграција у субендотел интимае, синтеза повећане количине екстрацелуларног матрикса састављеног преодминантно од протеогликана, што доводи до последичног задебљања зида. Након периода пролиферације ћелија и задебљања субендотела интимае, долази до активације апоптозе ћелија у васкуларном зиду. Повећана синтеза колагена и еластина током периода пролиферативне активности ћелија, доводи до стварања иреверзибилног задебљања зида које остаје у каснијим фазама атеросклеотичне лезије, упркос активацији апоптозе, којом се само смањује број ћелија, па лезија прогредира у хипоцелуларне задебљале плакове атерома и фиброатерома (Andreeva et al, 1997; Xu et al, 2001;).

У одговору васкуларног зида на хипертензију, већ током иницијалне фазе лезије, упоредо са дисфункцијом ендотела и компензаторном дилатацијом зида, долази до синтезе различитих фактора раста под чијим утицајем глатке мишићне ћелије мигрирају кроз отворе на унутрашњој еластичној ламини у субендотелно везиво. Како на својој површини експримирају специфичне интегрине ($\alpha 2\beta 1$ – путем којег се везују за колагена влакна, као и $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ путем којих се везују за фибронектин), као и еластин-везујуће протеине, глатке мишићне ћелије у субендотелу остварују контакт са компонентама везивног ткива. У одговору на дејство тромбоцитног и фибробластних фактора раста (енгл. *Platelet-Derived Growth Factor* – PDGF; *Fibroblast Growth Factors* – FGFs) глатке мишићне ћелије пролиферишу у субендотелу (Wight, 1995). Упоредо са тим, под утицајем трансформирајућег фактора раста β (енгл. *Transforming Growth Factor β* – TGF- β), глатке мишићне ћелије почињу да синтетишу компоненте екстрацелуларног матрикса, пре свега протеогликане (за које ће се касније везивати холестеролске капљице уколико је уз хипертензију присутна и хиперхолестеролемија), као и колагене типа IV и V (Xu, 2001; Xu, 2002).

Идентификован је велики број различитих стимулатора и инхибитора пролиферације глатких мишићних ћелија, који најчешће делују упоредо и на ендотелне ћелије. У стимулатор пролиферације спадају претходно поменути тромбоцитни и фибробластни фактори раста PDGF и FGFs, затим, васкуларни ендотелни фактор раста VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF), фактори слични епидермалном фактору раста (енгл. *Epidermal Growth Factor*–EGF-like factors), ангиогенин, затим вазоконстрикторни пептиди који индукују пролиферацију глатких мишићних ћелија и експресију TGF- β и PDGF, ангиотензин конвертујући ензим (ACE), који индукује пролиферацију глатких мишићних ћелија у *in vivo* условима, инсулину слични фактори раста (енгл. *Insulin-Like Growth Factors* – IGFs), који су потенцијални митогени глатких мишићних ћелија, интерлеукин-1 (IL1), који индукује експресију FGF у глатким мишићним ћелијама, липопротеин А (стимулише пролиферацију глатких мишићних ћелија) и ендотелин-1 (ET-1) (Moses et al, 1995; Xu et al, 2002).

Бифункционални фактори раста, TGF- β и TNF- α , такође утичу на миграцију и пролиферацију глатких мишићних ћелија. TGF- β је мултифункционални цитокин кога у инактивној форми синтетишу ендотелне и глатке мишићне ћелије. Овај цитокин активира се под утицајем плазмине и индукује диференцијацију ендотелних и глатких мишићних ћелија, али парадоксално, инхибира њихову миграцију и пролиферацију. TNF- α је цитокин који инхибира пролиферацију ендотелних и глатких мишићних ћелија, али стимулише транскрипцију гена за синтезу хепарин-везујућем EGF-сличног фактора раста у глатким мишићним ћелијама. Сваки од ових фактора утиче на раст глатких мишићних

или ендотелних ћелија, било као стимулатор или као инхибитор (Moses et al, 1995; Basatemur, 2019).

Такође, у стадијуму масне траке, адвентицијални фибробласти почињу да експримирају карактеристике контрактилних глатких мишићних ћелија (Lačković i Vuković, 2006). Повећана експресија TGF- β у адвентицији представља сигнал за фибробласте који почињу да експримирају α -глаткомишићни актин и друге маркере глаткомишићног фенотипа, да мигрирају у медију и „преузимају” функцију глатких мишићних ћелија (Siow and Churchman, 2007; Toma and McCaffrey, 2012).

1.2.1. Пенасте ћелије које потичу од глатких мишићних ћелија

Пенасте ћелије у иницијалним стадијумима атеросклерозе потичу од макрофага. Глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа пролиферишу и почињу да акумулирају липиде већ од стадијума масне траке, да би број пенастих ћелија глаткомишићног порекла (услед пролиферације) био највећи у стадијуму интермедијарне лезије преатерома (Xu, 2002, Vuković i sar, 2006; Gu et al, 2019). У узнапредовалим лезијама, упркос активацији апоптозе и некрозе и субсеквентној хипоцелуларности, већина пенастих ћелија потиче од глатких мишићних ћелија (Wang, 2019).

Пенасте ћелије пореклом од моноцитно-макрофагне лозе звездастог су облика, показују CD68-имунореактивност. Применом трансмисионе електронске микроскопије утврђено је да ове пенасте ћелије имају цитоплазматске продужетке, велики број липидних капи у цитоплазми и да не поседују базалну ламину. Пенасте ћелије које потичу од глатких мишићних ћелија показују имунореактивност на виментин и S-100 протеин. Применом трансмисионе електронске микроскопије утврђено је да су ове пенасте ћелије вретенастог облика, са добро диференцираном базалном ламином, да садрже мањи број липидних капи у цитоплазми, кавеоле и густа тела (Tanaskovic et al, 2013).

Мишићне ћелије синтетског фенотипа могу да се трансформишу у пенасте ћелије, захваљујући чињеници да попут макрофага могу да експримирају *scavenger* рецепторе (Sakaguchi et al, 1998; Sorokin et al, 2020). Већина ћелија поседује ћелијски површински рецептор за LDL који је локализован у клатринским везикулама. Када ћелија рецептоном ендцитозом преузме LDL и искористи холестерол за своје метаболичке потребе, активира се механизам контроле транскрипције, којим се гаси експресија рецептора, а тиме и даље преузимање холестерола. Међутим, код макрофага као и васкуларних глатких мишићних ћелија (будућих пенастих ћелија) не постоји описани механизам негативне повратне спреге, односно, холестерол у овом случају преузима преко неке друге врсте рецептора. Утврђено је да уместо „класичног” LDL рецептора, различити молекули познати као *scavenger* рецептори посредују у масивном преузимању липида карактеристичном за формирање пенастих ћелија. Иницијално су рађени експерименти у којима је нативни LDL ацетилисан ацетил анхидридом у *in vitro* условима. У култури макрофага, ћелије су врло брзо преузимале овако модификован LDL, али не преко познатог LDL рецептора, већ преко посебног рецептора који је назван “ацетил-LDL рецептор”. Касније је овај рецептор клониран и назван *scavenger* рецептор А (SR-A). За разлику од LDL рецептора, SR-A није имао „регулацију на доле” своје експресије на мембрани макрофага, као одговор на повећану интрацелуларну концентрацију холестерола (Goldstein et al, 1979; Kodama et al, 1988; Sakaguchi et al, 1998).

Scavenger рецептори обухватају хетерогену групу ћелијских рецептора који се експримирају на ендотелним ћелијама, глатким мишићним ћелијама и фибробластима током атеросклерозе. То су најчешће интегрални мембрански протеини за које се везују различити лиганди укључујући LDL, ох-LDL, ацетилисани LDL, ћелије у апоптози и различити патогени из плазме или васкуларног зида. До данас је описано дванаест класа *scavenger* рецептора, означених од А до L са великим бројем сродних чланова унутар сваке класе који се експримирају на рзличитим ћелијским типовима и под утицајем различитих егзогених и ендогених фактора. За класу А *scavenger* receptora (SR-AI и SR-AII), као и за два рецептора из класе В (CD36 и SR-B) доказано је да учествују *in vivo* у развоју атеросклеротске лезије (Navas-Madroñal et al, 2020). Претежно се експримирају на макрофагима, али и ендотелним и глатким мишићним ћелијама. Осим ових рецептора доказано је и да се неки рецептори класе D, E, F i G, и то CD68, SREC (engl. *Scavenger Receptor Expressed by Endothelial Cells* – SREC), SR-PSOX (engl. *Scavenger Receptor-Phosphatidylserine and Oxidized Lipoprotein*–SR-PSOX) i LOX-1 (engl. *Lectin-Like Oxidized LDL Receptor* – LOX-1), експримирају у атеросклеротичним лезијама i poseduju sposobnost da vezuju modifikovane forme LDL (PrabhuDas et al, 2017). Глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа у атеросклеротској лезији такође преузимају модификоване форме LDL преко LRP1 (engl. *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*- LRP1) из класе L рецептора (Bennet et al, 2016; Doubland and Francis, 2016), као и преко RAGE (engl. *Receptor for Advanced Glycation End-products* - RAGE) (Lim and Park, 2014; Navas-Madroñal et al, 2020). Могуће је да ембрионално порекло глатких мишићних ћелија условљава њихову могућност експресије *scavenger* рецептора (Davis et al, 1994; Allahverdian et al, 2018).

Највећи број васкуларних глатких мишићних ћелија има мезенхимално порекло, док један број глатких мишићних ћелија у великим артеријама у горњим деловима тела има неуроектодермално порекло (као што је то случај са аортом). Васкуларне глатке мишићне ћелије које потичу од мезенхима коекспримирају у својој цитоплазми интрмедијарне филаменте виментин и дезмин. Током ремоделовања васкуларног зида, као што је претходно поменуто, долази до губитка контрактилних карактеристика глатких мишићних ћелија и карактеристичне дезминске експресије, тако да глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа експримирају само виментин. Имунореактивност на виментин код ових пенастих ћелија указује на њихову синтетско-пролиферативну активност, а уједно и на њихово мезенхимално порекло (Basatemur et al, 2019).

Такође, експресија S-100 протеина може указивати на неуроектодермално порекло глатких мишићних ћелија. Код великих артерија у горњем делу тела, током ембриогенезе, велики број глатких мишићних ћелија доспева из нервног гребена, показује експресију S-100 протеина и висок афинитет за везивање масних киселина (Siewers et al, 1991; Siengethaler et al, 1997). Експресија S-100 протеина карактеристична је за ћелије које су пореклом од нервног гребена. Према литературним подацима, један број васкуларних глатких мишићних ћелија такође може да експримира овај антиген (Bisset et al, 2007; Chaabane et al, 2015).

Према досадашњим истраживањима утврђено је да се S100 протеини експримирају у ћелијама пореклом из нервног гребена (Donato et al, 2013). До сада је познато да се суперфамилија S100 протеина састоји од 25 различитих тодтипова. Своју интрацелуларну активност испољавају пролиферацијом, диференцијацијом, миграцијом, инфламацијом, апоптозом. Док своју екстрацелуларну активност испољавају активацијом имунског одговора, репарацијом ткива, експресијом рецептора. S100 протеин је Ca ++ завистан

протеин (Bertheloot et al, 2017). У неким патолошким стањима, S100 се експримира у ћелијама, код којих у нормалним условима се не налази (Donato et al, 2013).

S100 протеини имају улогу у прогресији атеросклерозе. Везивањем S100 протеина за RAGE рецепторе на циљаним ћелијама ова фамилија протеина испољава своје регулаторне ефекте посредством јона Ca^{++} . Подтип S100A4 има утицаја на миграцију, пролиферацију и диференцијацију васкуларних глатких мишићних ћелија (Bertheloot et al, 2017). Подтип S100A4 синтетишу ћелије моноцитно-макрофагне лозе. Овај протеин има утицај на прогресију атеросклерозе, а свој ефекат испољава везивањем за RAGE рецепторе циљних ћелија (Gonzales et al, 2020).

Комплекс протеина S100A8/A9 откривен је код узрадровалих форми атеросклерозе као и код дијабетичара. Експримирају га макрофаги и пенасте ћелије у субендотелу интима. Повећано ослобађање S100A8/A9 протеина из неутрофила и моноцита доводи до прогресије и калцификације атеросклеротског плака (Bertheloot et al, 2017). Комплекс S100A8/S100A9 синтетисан у макрофагима има утицај на прогресију коронарне атеросклерозе, узрокујући оштећење ендотела и пролиферацију глатких мишићних ћелија (Sreejit et al, 2020).

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

2. ЦИЉ РАДА

2. 1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА:

1. Утврђивање фенотипских карактеристика глатких мишићних ћелија у коронарним артеријама са узнатредовалим стадијумима атеросклерозе.
2. Утврђивање клиничких и лабораторијских карактеристика које су чешће удружене са узнатредовалим стадијумима атеросклерозе него са раним лезијама.

2. 2. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ:

- У узнатредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају виментин и S-100 протеин у већој мери него глатке мишићне ћелије у раним стадијумима атеросклерозе.
- У узнатредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије у раним формама атеросклерозе.
- Узнатредовали стадијуми атеросклерозе имају различите клиничке и лабораторијске манифестације у односу на исте карактеристике у раним формама атеросклерозе.
- Одређене комбинације фенотипа глатких мишићних ћелија, клиничких и лабораторијских манифестација су чешће су у узнатредовалим формама атеросклерозе.
- Неуроектодермално порекло глатких мишићних ћелија у зиду коронарних артерија представља предилекциони фактор у развоју коронарне атеросклерозе.

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

У овом истраживању урађена је ретроспективна клиничко-хистопатолошка студија типа случај-контрола. Групу случајева чинили су узорци коронарних артерија умрлих, са унапредовалим формама атеросклерозе. Групу контрола чинили су узорци коронарних артерија умрлих, са раним лезијама атеросклерозе.

3.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ

Студија је обухватила узорке коронарних артерија кадавера оба пола добијене током аутопсија рађених у Служби за патолошко-анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2007-2010. године. Студија је спроведена уз одобрење Етичког одбора Клиничког центра Крагујевац.

За сваки анализирани случај коришћена је једна - две контроле истих година.

Из истраживања су искључени сви пацијенти са претходно утврђеним хроничним болестима.

3.3. УЗОРКОВАЊЕ

Студија је обухватила попречне пресеке десних коронарних артерија са тешким атеросклеротичним променама добијене током обдукција урађених у Служби за патолошку анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2007-2010. године. За контроле су коришћени попречни пресеци десних коронарних артерија у раним стадијумима лезије. У случајевима када је постојао већи број адекватних контрола за један случај, контроле су изабране методом случајног узорка (биле су нумерисане, а затим су случајним поступком изабране две контроле за дати случај).

У студији су анализирани цитохистолошке карактеристике стадијума атеросклерозе према класификацији *American Heart Association Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis*, имунохистохемијске карактеристике коришћењем четири имунохистохемијска маркера – α -глаткомишићни актин, S-100 протеин, дезмин и виментин, као и већи број варијабли добијених из историја болести (Stary et al, 1994; Stary et al, 1995).

3.4. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СУ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ

3.4.1. Зависне варијабле

Праћена је следећа зависна варијабла (исход):

1. Тип лезије атеросклерозе:

- за контроле су коришћене ране фазе атеросклерозе (иницијална лезија, стадијум масне траке и стадијум преатерома)

- за случајеве су коришћене узапредовале лезије атеросклерозе (стадијум атерома, стадијум фиброатерома и компликоване лезије).

3.4.2. Независне варијабле

За сваки узорак у студији анализирани су следеће независне варијабле (узроци):

1. Имунохистохемијски профил глатких мишићних ћелија у различитим стадијумима атеросклерозе на основу експресије четири маркера:
 - α -глаткомишићни актин (за глатке мишићне ћелије)
 - S-100 протеин (за глатке мишићне ћелије неуроектодермалног порекла)
 - дезмин (за проучавање оријентације и дистрибуције формираних, диференцираних васкуларних глатких мишићних ћелија)
 - виментин (за испитивање дистрибуције глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа).

Степен експресије имунохистохемијских маркера одређиван је семиквантитативно, методом двоструке контроле, под великим увеличањем, на десет видних поља дуж артеријске циркумференције, узимајући у обзир само популацију глатких мишићних ћелија.

Процент имунореактивних ћелија у популацији глатких мишићних ћелија биће означаван на следећи начин:

- 0 – изостанак имунореактивности
- + до 35% имунореактивних ћелија
- + + до 70% имунореактивних ћелија
- + + + до 100% имунореактивних ћелија

4.4.3. „Збуњујуће“ варијабле

Анализиране су следеће „збуњујуће“ варијабле добијене из историја болести пацијента: Hg, E_r, Le, Ht, Tr, CRP, SE, LDH, D-dimer, Na, Mg, Ca, Fe, K, креатинин, уреа, старост пацијента, наслеђе (породична анамнеза), телесна маса, претходни инфаркт миокарда, ангина пекторис, коронарографија, подаци о ЕКГ-у. Факторском анализом овај број био је редукован на оне које имају највећи значај.

3.5. ХИСТОЛОШКА ИСПИТИВАЊА

Независне и зависне варијабле одређиване су микроскопском евалуацијом имунохистохемијских и Х/Е обојених препарата.

3.5.1. Рутинске хистохемијске методе бојења

У рутинској обради препарата, добијени узорци фиксирани су у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци коронарних артерија дехидратисани су провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни серијски пресеци, дебљине 5 μm , сечени су микротомом *Leica SM 2000R*. Након депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци су бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са *Canada* балзамом (Suvarna, 2018).

3.5.2. Методологија имунохистохемијског бојења

Ткиво је фиксирано у 4 %-тном неутралном пуферованом формалдехиду 24 часа и калупљено у парапласту. Резови дебљине 5 μm , монтирани су на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost* и сушени на температури од 56°C у току 1 сата.

Након депарафинизације и рехидрације ткивних пресека извршено је демаскирање антигена у микроталасној пећници у 0,1 М цитратном пуферу, рН 6,0 на 800W, у трајању 21 минут, а затим блокирање ендogene пероксидазе, 3 %-тним воденим раствором H_2O_2 у трајању од 15 минута.

Након блокирања ендogene пероксидазе, уследило је наносење примарног антитела и инкубација у трајању од 1h на собној температури у влажној комори.

За потребе овог истраживања, примењена су четири примарна антитела: α -глаткомишићни актин, S-100 протеин, виментин и дезмин према стандардном протоколу (Dabb's 2021).

Након инкубације ткивних пресека са примарним антителом уследила је инкубација, прво са биотинизираним везујућим антителом, а затим са стрептавидином обележеним пероксидазом. Поступак је завршен инкубацијом пресека у мешавини супстрат-хромогена (H_2O_2 и 3-амино-9-етил карбазол у N,N-диметилформаиду, АЕС + Substrate-Chromogen kit, Cat. No K 3469, ДАКО-Denmark), 5 минута на собној температури.

Као општи испирач и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења коришћен је 0,1 М фосфатни пуфер рН 7,4. Ђелијска једра бојена су *Mayer*-овим хематоксилином.

3.6. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Величина група одређена је на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 80%, вероватноће грешке првог типа (α) од 0.05 за двосмерно тестирање хипотезе и разлике у вредностима процентуалне заступљености виментина на хистолошким препаратима коронарних артерија; очекивана је разлика од 35%, при чему је заступљеност код особа са раном атеросклерозом око 15%. Уз такве параметре и употребу Хи-квадрат теста, потребно је 21 пацијент за групу случајева и 41 пацијент за групу контрола. Величина група израчуната је на основу програма G power. Узорци су бити дистрибуирани међу групама у односу 1 : 2 (на сваког пацијента који спада у групу случајева долази још два пацијента који су контроле).

3.7. СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ ОБРАДЕ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА У ИСТРАЖИВАЊУ

У статистичкој обради података, континуалне варијабле презентоване су као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) у тексту и табелама, а категоријске као пропорција узорака са одређеним исходом. За поређење средњих вредности континуалних варијабли коришћен је Студентов t -тест за мале независне узорке, односно алтернативни непараметријски тест када резултати не прате нормалну расподелу, што је претходно утврђено помоћу Колмогоров-Смирнов теста. Хи-квадрат (χ^2) тест коришћен је за упоређивање разлика у учесталости категоријских варијабли, односно Фишеров тест када је учесталост појединих категорија била мала. Утицај већег броја независних и збуњујућих варијабли на испитивани дихотомни исход, као и међусобна интеракција предикторских варијабли, испитивани су бинарном логистичком регресијом, а резултати су приказани као кориговани однос могућности (*Adjusted Odds ratio*). Статистички значајним сматрани су сви резултати где је вероватноћа хипотезе била мања од 5% ($p < 0.05$). Добијени резултати истраживања приказани су табеларно и графички. Сви статистички прорачуни урађени су помоћу комерцијалног, стандардног програмског пакета SPSS, верзија 18.0.

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. РЕЗУЛТАТИ ХИСТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ СТАДИЈУМА АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

4.1.1. Иницијална лезија – тип I лезије

На свим препаратима иницијалне лезије уочавају се три јасно издвојена слоја васкуларног зида: туника интима, медија и адвентиција. Континуитет ендотела је очуван. Састоји се из једног реда ендотелних ћелија чија једра проминирају у лумен. Код једног броја узорака раног типа атеросклеротске лезије, запажа се адхезија леукоцита на ендотел, што индиректно указује на ендотелну дисфункцију, односно, повећану експресију адхезионих молекула. Базална мембрана је добро диференцирана. У субендотелу интима једног броја узорака запажају се појединачне пенасте ћелије. Непосредно изнад унутрашње еластичне ламине, запажају се лонгитудинално оријентисани снопови глатких мишићних ћелија. Ове ћелије показују имунореактивност на α -глаткомишићни актин и дезмин, а један број и на виментин. Унутрашња еластична ламина присутна је и очувана, фокално се може запазити редупликација. Медија је састављена из циркуларно расоређених глатких мишићних ћелија, које показују имунореактивност на α -глаткомишићни актин и дезмин. Спољашња еластична ламина је тања од унутрашње. Адвентиција је састављена од предоминантно оријентисаних колагених влакана и основне супстанце у којима су смештени *vasa vasorum*, нерви и лимфни судови. Запажа се S-100-имунореактивно периадвентицијално масно ткиво (сл. 1-7).

4.1.2. Стадијум масне траке – тип II лезије

На узорцима ране фазе атеросклерозе, на стадијуму који се патохистолошки идентификује као масна трака, уочава се велики број пенастих ћелија у субендотелу интима. Ендотел и базална мембрана су очувани. Пенасте ћелије у луминалном делу субендотела груписане су у масне траке. Испод слоја пенастих ћелија, смештен је слој интималних глатких мишићних ћелија које показују имунореактивност α -глаткомишићни актин и виментин. Мањи број лонгитудинално оријентисаних ћелија, смештених непосредно изнад унутрашње еластичне ламине, показује реакцију на дезмин. Унутрашња еластична ламина је очувана, али се фокално запажа њена редупликација. У медији се разликује унутрашњи и спољашњи део са различитом експресијом глатких мишићних ћелија на дезмин и виментин. Унутрашњи део медије садржи глатке миоците претежно циркумферентно или хеликоидно оријентисане, који су предоминантно имунореактивни на виментин. Спољашњи, тањи део медије, садржи више циркумферентних слојева глатких мишићних ћелија које показују имунореакцију на дезмин. Спољашња еластична ламина је танка и фенестрирана. Адвентиција је састављена из колагених влакана, као и растреситог везивног ткива (сл. 8-22).

4.1.3. Стадијум преатерома – интермедијарна лезија или тип III лезије

Ендотел и базална мембрана континуирани. У задебљалом субендотелу интима који не проминира у лумен, налазе се бројне пенасте ћелије и екстрацелуларни липиди.

Лонгитудинално оријентисане глатке мишићне ћелије субендотела експримирају виментин и α -глаткомишићни актин. Запажају се виментин-имунореактивне пенасте ћелије. Унутрашња еластична ламина је редуплицирана са делимичном фрагментацијом. У унутрашњем делу медије, смештене су виментин- и α -глаткомишићни актин-имунореактивне глатке мишићне ћелије. У спољашњем, тањем делу медије, смештено је неколико циркуларно распоређених слојева глатких мишићних ћелија имунореактивних на α -глаткомишићни актин и дезмин. Спољашња еластична ламина је танка, са великим бројем фенестри. Туника адвентиција садржи колагена и еластична влакна, као и фибробласте од којих неки показују имунореактивност на α -глаткомишићни актин. Уочава се задебљање зидова *vasa vasorum*, као и адипоцити имунореактивни на S100 протеин (сл. 23-34).

4.1.4. Стадијум атерома – тип IV лезије

Ендотел је дисконтинуиран, а интима задебљала тако да знатно превазилази дебљину медије. Најдебља је у пределу атерома, па фокално, ексцентрично сужава лумен. Базална мембрана је дисконтинуирана. У субендотелу интима доминира велико липидно језгро са холестеролским кристалима у пукотинама, одвојено од лумена танком капом фиброзног везива. На ободима липидног плака запажа се један број виментин-имунореактивних пенастих ћелија. Око липидног средишта налази се фиброзно измењена интима са виментин и S100 протеин имунореактивним ћелијама. На маргинама атерома уочавају се неоваскуларне формације, око којих се налазе пенасте ћелије. Унутрашња еластична ламина је видно фрагментисана, у области испод атерома фокално недостаје, а фокално је и редуплицирана. Медија је истањена, посебно у области испод атерома. Глатке мишићне ћелије у унутрашњем слоју медије имунореактивне су на α -глаткомишићни актин и виментин, а у танком спољашњем делу, на α -глаткомишићни актин и дезмин. Уочавају се новоформиран крвни судови који су у континуитету са васа васорум адвентиције. Спољашња еластична ламина је присутна, танка, са великим бројем фенестри. У адвентицији се може запазити инфламаторни инфилтрат. *Vasa vasorum* имају задебљале зидове (сл. 39, 40, 46, 49, 50)

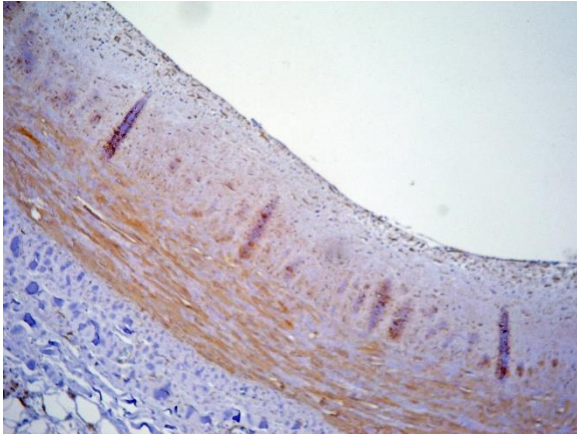
4.1.5. Стадијум фиброатерома – тип V лезије

Ендотел је дисконтинуиран, а базална мембрана фрагментисана. У субендотелу интима доминира ексцентрично задебљање које садржи липидно језгро преко кога је широка фиброзна капа која га стабилизује. Липидно језгро неких узорака садржи калцификате, а код једног броја узорака липидно језгро изостаје, а интима је фиброзно измењена односно, састављена из дебелих колагених влакана. Фиброзни плак настаје као резултат континуиране акумулације везивног ткива, које прекрива лезију. Карактерише га присуство велике количине колагених влакана са пукотинама у којима се налазе пенасте ћелије и ћелијски детритус. На ободима плака, у фиброзном везиву, присутне су пенасте ћелије од којих један број показује имунохистохемијску реакцију на виментин и S100 протеин. Испод фиброатерома и на маргинама лезије уочава се такође и запаљењски инфилтрат. Унутрашња еластична ламина је редуплицирана, фрагментисана и фокално недостаје. Истањена медија садржи α -глаткомишићни актин- и виментин-имунореактивне глатке мишићне ћелије. У спољашњем делу медије према адвентицији, присутне су ретке

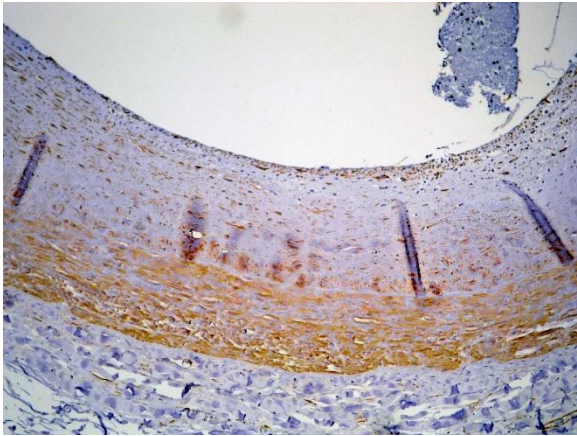
глатке мишићне ћелије имунореактивне на дезмин. Спољашња еластичналамина је танка и фрагментисана. У адвентицији су присутни агрегати леукоцита. Адвентицијални фибробласти чине доминантну ћелијску популацију. Периадвентицијално масно везивно ткиво је S100-имунореактивно (сл. 35-62).

4.1.6. Компликована лезија - тип VI лезије

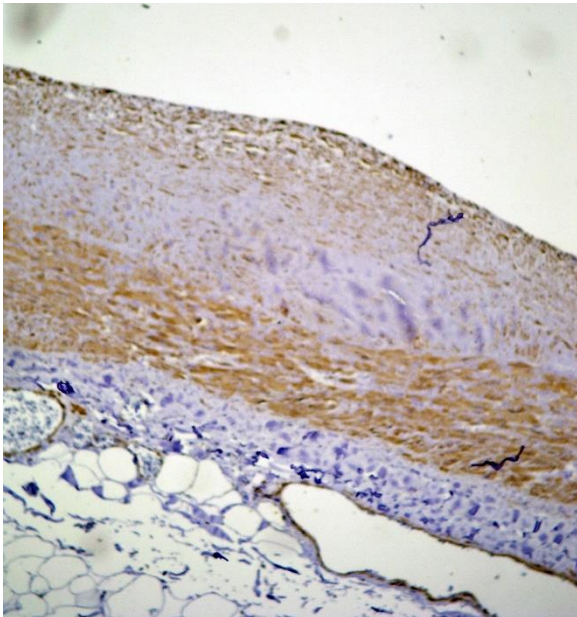
Ендотел и базална мембрана изнад плака су дисконтинуирани. У субендотелу интима налази се компликован плак који заузима широко подручје. У основи плака је атером или фиброатером, накнадно компликован руптуром, хеморагијом или тромбозом. Фокално се унутар компликованих плакова може уочити реканализација, односно новоформирани лумен. Интима је фиброзно измењена. На ободима плака налазе се пукотине са пенастим ћелијама, од којих су неке виментин- и S100 протеин-имунореактивне, као и ћелијски детритус, праћен инфламаторним инфилтратом. На фиброзној капи неких узорака, може се уочити руптура и улцерација са паријеталним тромбом. Унутрашња еластична ламина је на појединим местима редуплицирана, а простор између те две мембране попуњава фиброзно везиво. Туника медија је сасвим истањена. Ћелије показују имунохистохемијску реакцију на α -глаткомишићни актин и виментин. Свуда у медији присутни су новоформирани крвни судови. Спољашња еластична ламина је истањена, фокално недостаје. Адвентиција је задебљала, садржи ћелијски инфилтрат и *vasa vasorum* задебљалих зидова (сл. 63-134)



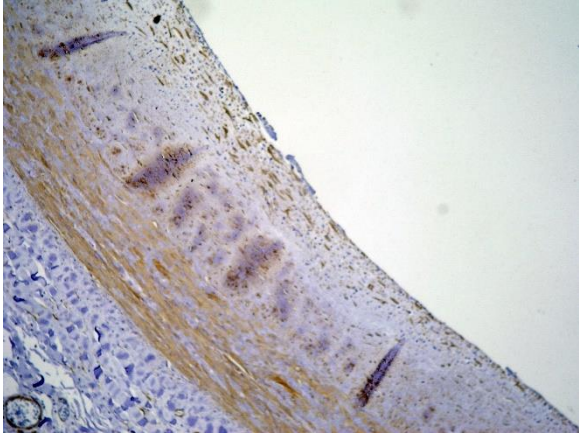
**Сл. 1. Атеросклероза коронарне
артерије - рана фаза лезије**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



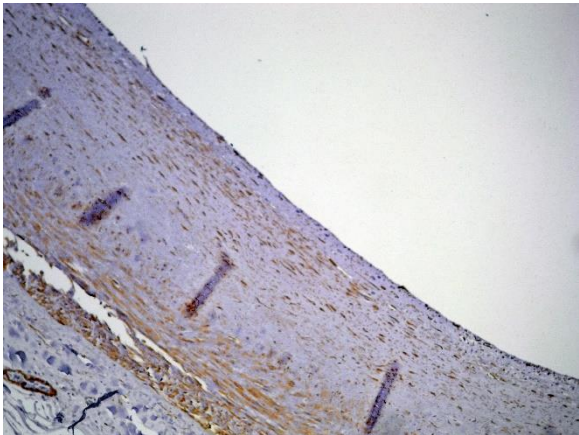
**Сл. 2. Атеросклероза коронарне
артерије – иницијална фаза**
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у
васкуларном зиду
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



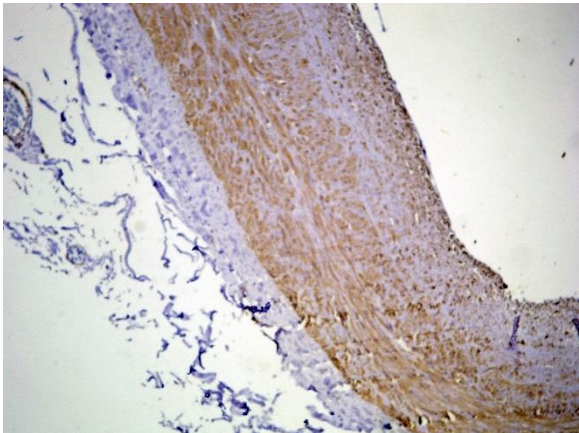
Сл. 3. Рана фаза коронарне атеросклерозе
Глатке мишићне ћелије
интима и медије
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



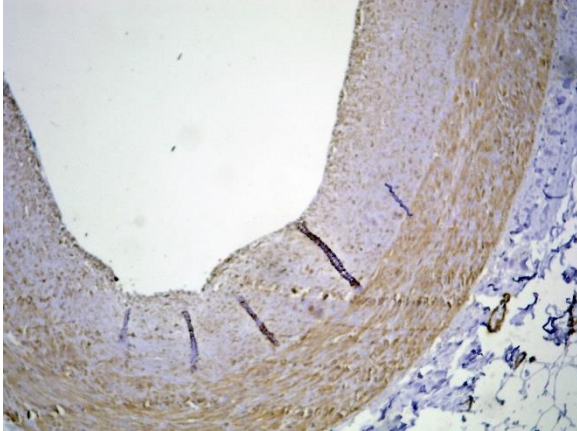
Сл. 4. Рана фаза коронарне атеросклерозе
Интималне и глатке мишићне ћелије
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



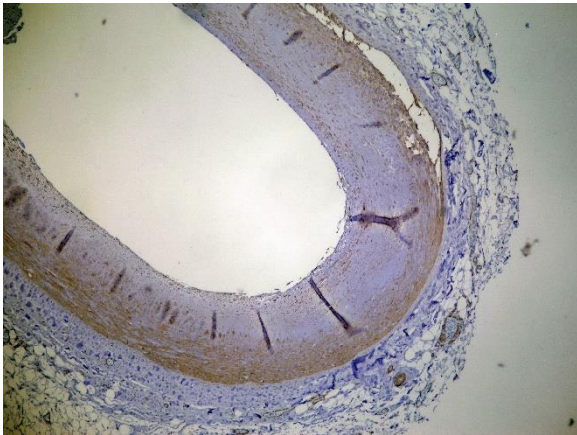
**Сл. 5. Атеросклероза коронарне
артерије - рана фаза лезије**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



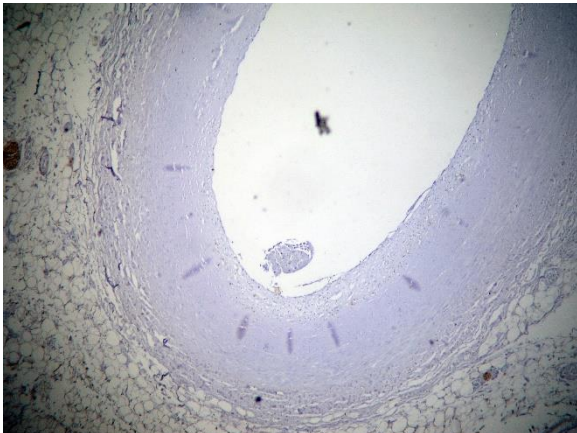
Сл. 6. Рана фаза коронарне атеросклерозе
Запажају се лонгитудинално оријентисане
глатке мишићне ћелије у интими и циркуларно
оријентисане глатке мишићне ћелије медије
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



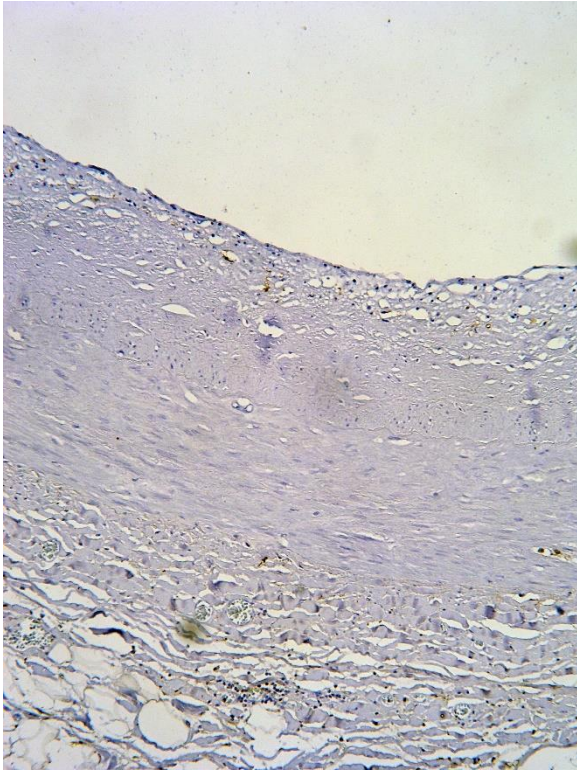
Сл. 7. Рана фаза лезије
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у
васкуларном зиду
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



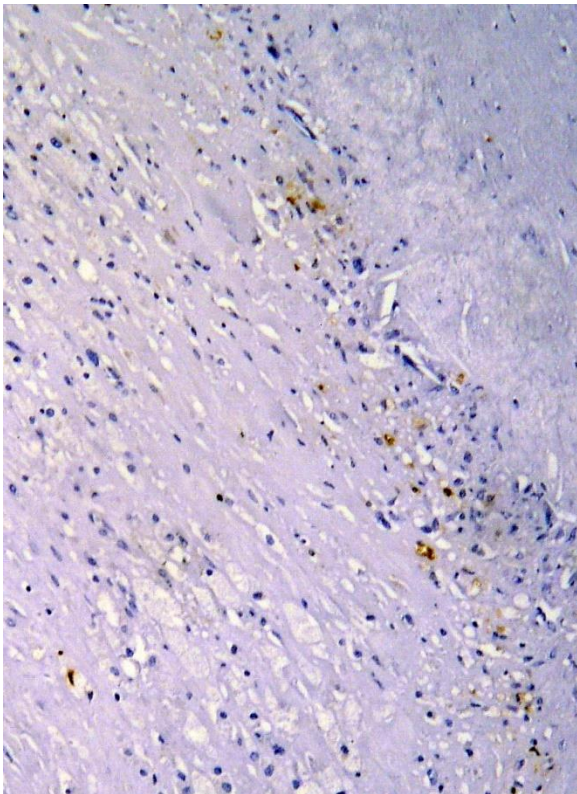
**Сл. 8. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



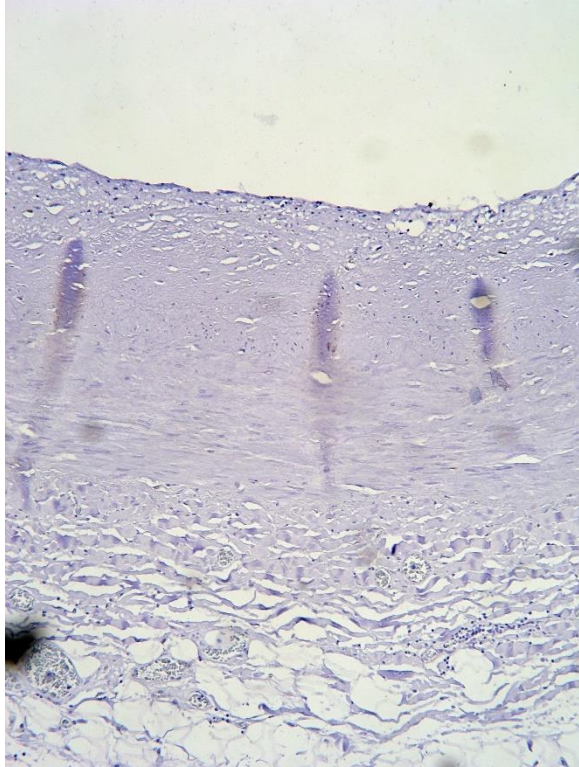
**Сл. 9. Стадијум масне траке коронарне
атеросклерозе**
Пенасте ћелије у субендотелу интимае
(имунохистохемијско бојење
на S100 протеин, $\times 64$)



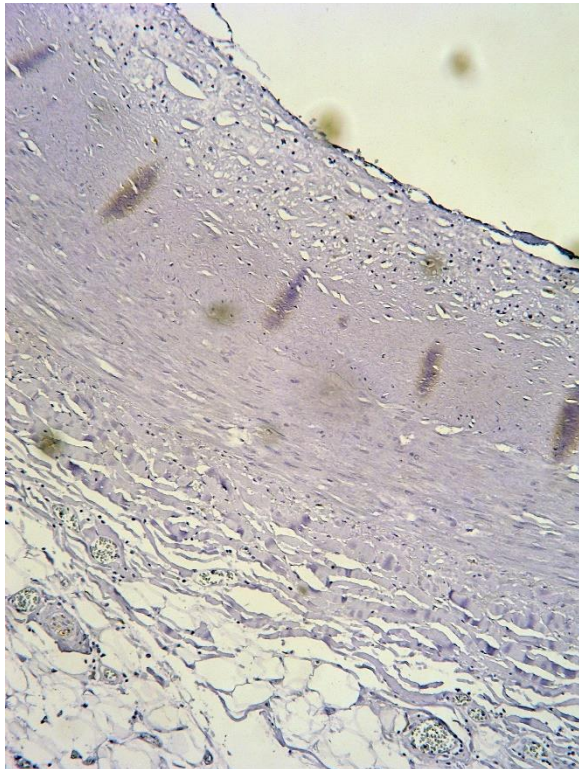
**Сл. 10. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
Пенасте ћелије у субендоелу интима
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин , ×64)



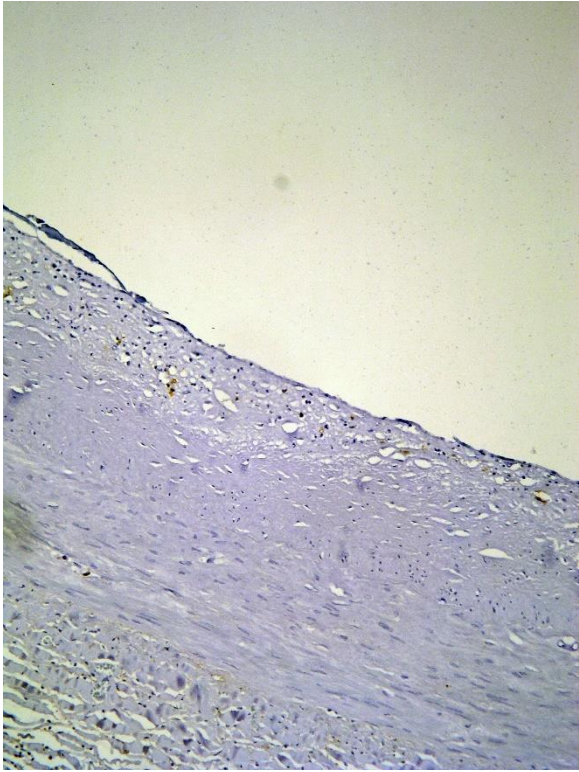
**Сл. 11. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×128)



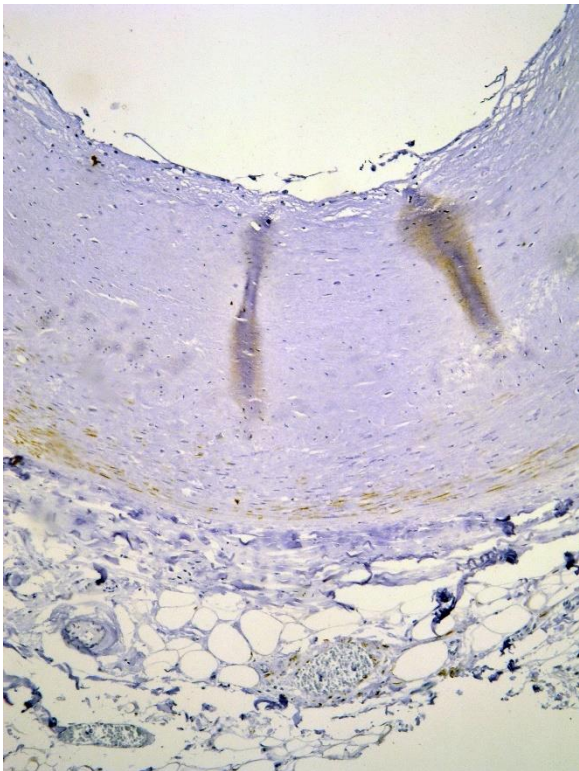
**Сл. 12. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
Изостанак дезминске експресије у интималним
и медијалним глатким мишићним ћелијама
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



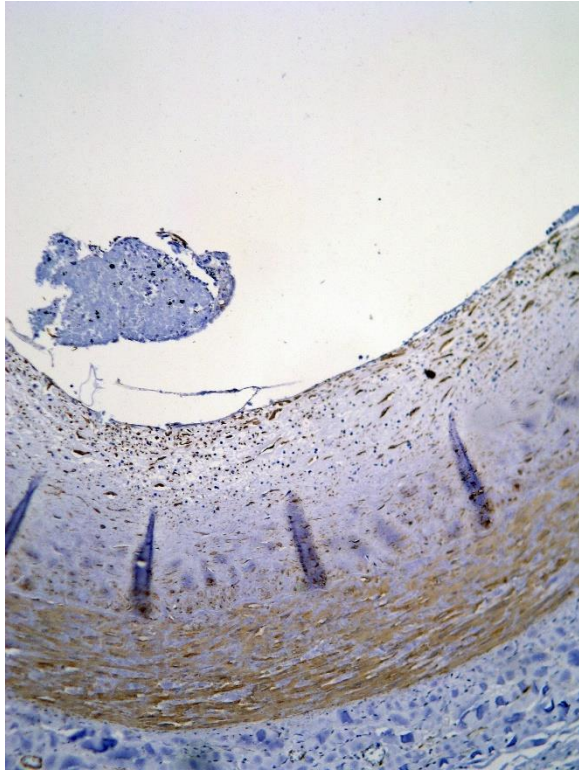
**Сл. 13. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



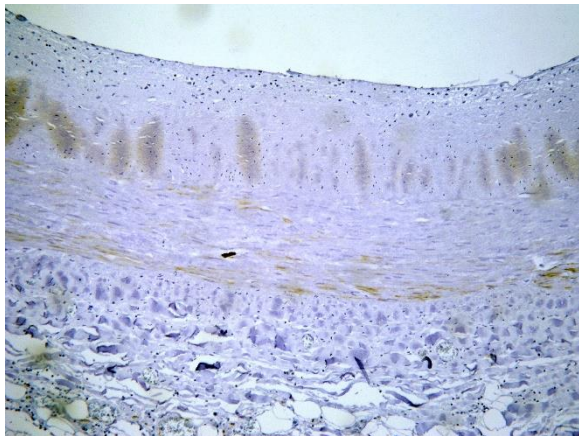
**Сл. 14. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
Појединачне глаткемишићне ћелије
контрактилног фенотипа у васкуларном зиду
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



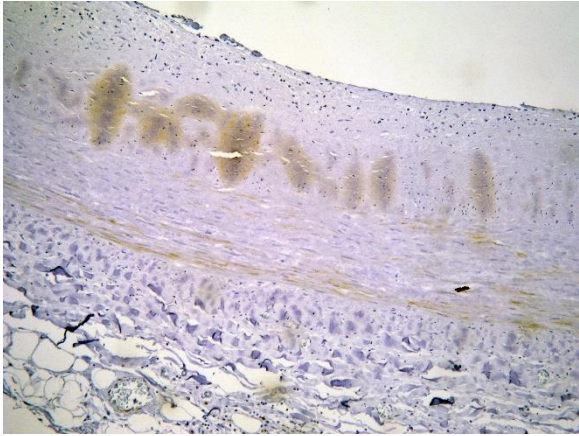
**Сл. 15. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



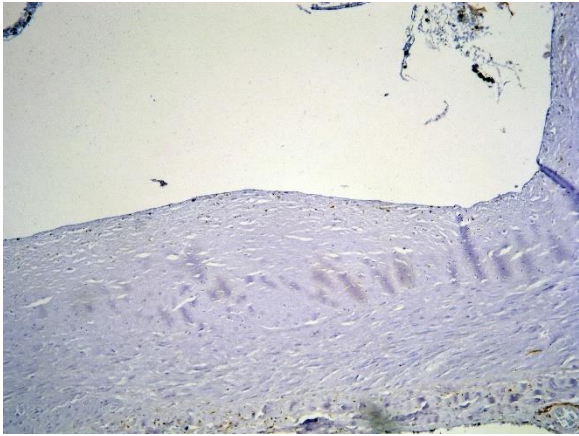
**Сл. 16. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
Пенасте ћелије пореклом од глатких мишићних
ћелија у субендотелу интимае
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 64$)



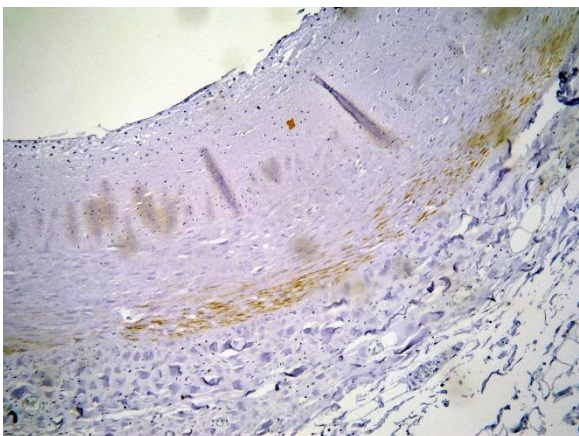
**Сл. 17. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



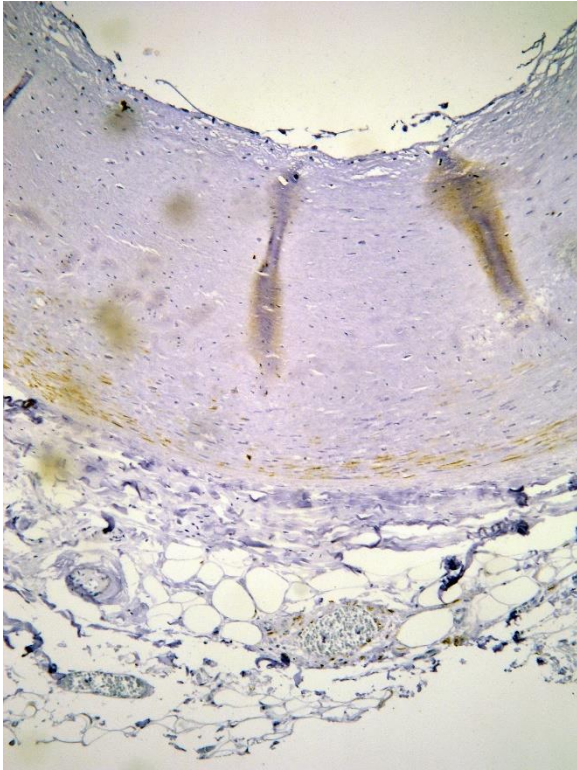
Сл. 18. Атеросклероза коронарне артерије – стадијум масне траке
Запажа се присуство глатких мишићних ћелија контрактилног фенотипа у спољашњем делу медије (имунохистохемијско бојење на дезмин, ×64)



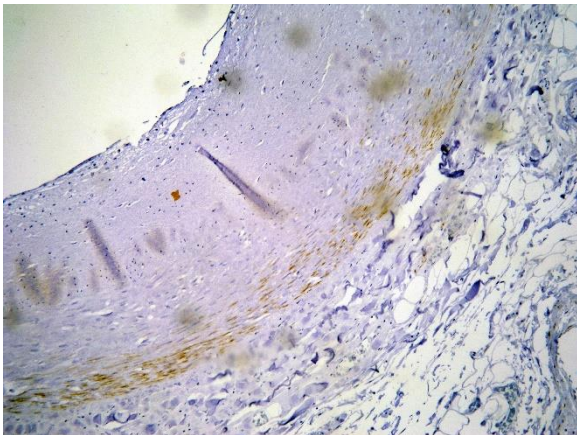
Сл. 19. Атеросклероза коронарне артерије – стадијум масне траке
(имунохистохемијско бојење на S100 протеин, ×64)



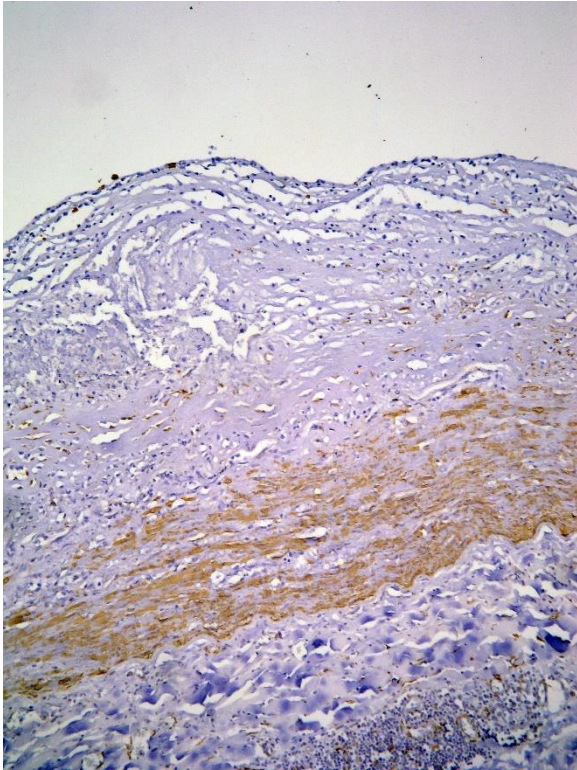
Сл. 20. Атеросклероза коронарне артерије – стадијум масне траке
(имунохистохемијско бојење на S100 протеин, ×64)



Сл. 21. Стадијум масне траке
Глате мишићне ћелије контрактилног фенотипа
у спољашњем делу медије
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)

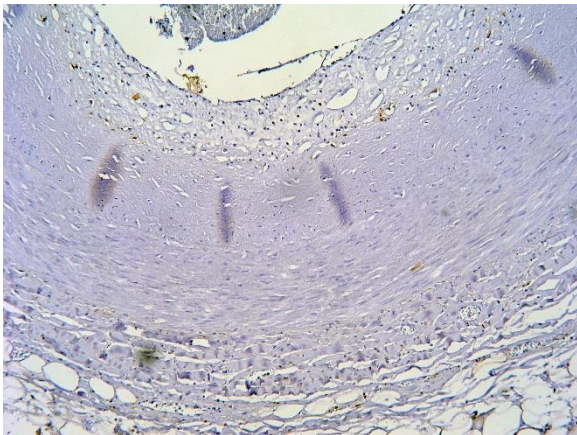


**Сл. 22. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум масне траке**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



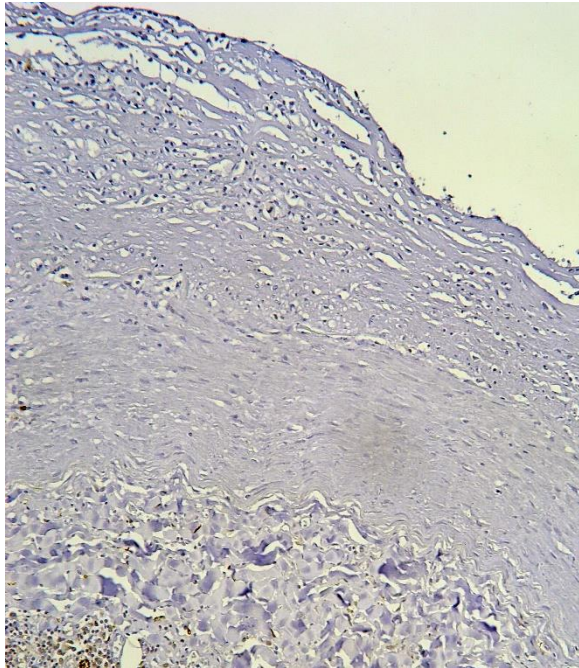
**Сл. 23. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**

Пенасте ћелије пореклом од глатких мишићних
ћелија у субендотелу интимае и глатке мишићне
ћелије синтетског фенотипа у медији
(имунохистохемијско бојење на
виментн, $\times 64$)

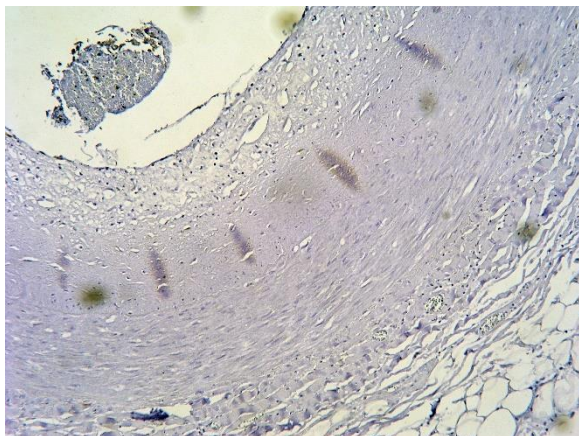


**Сл. 24. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**

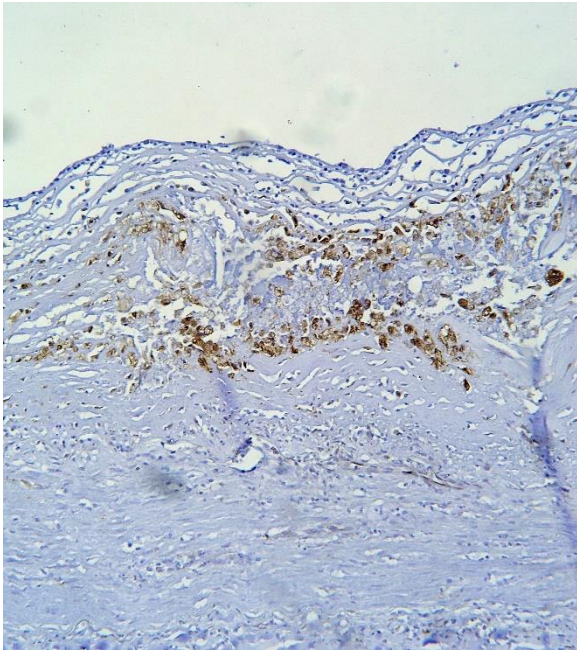
Одсуство контрактилног фенотипа – присутне
су само појединаче глатке мишићне ћелије
контрактивног фенотипа (имунохистохемијско
бојење на дезмин, $\times 64$)



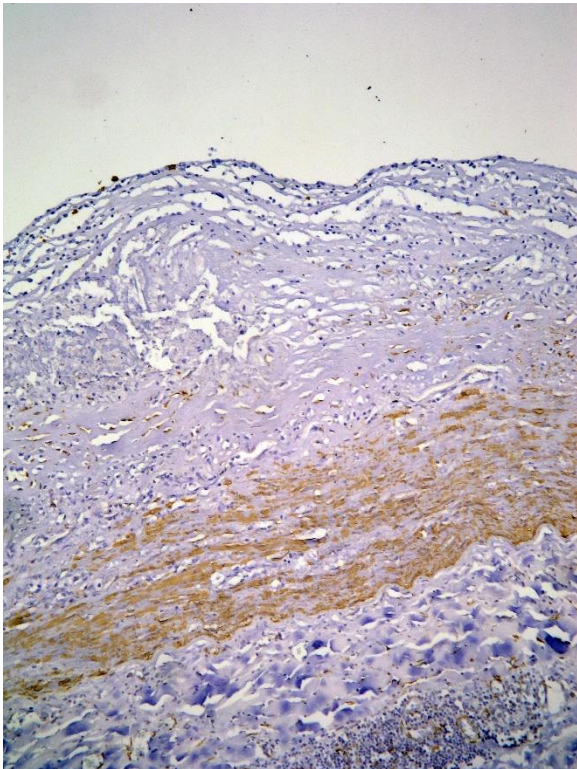
Сл. 25. Стадијум преатерома
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



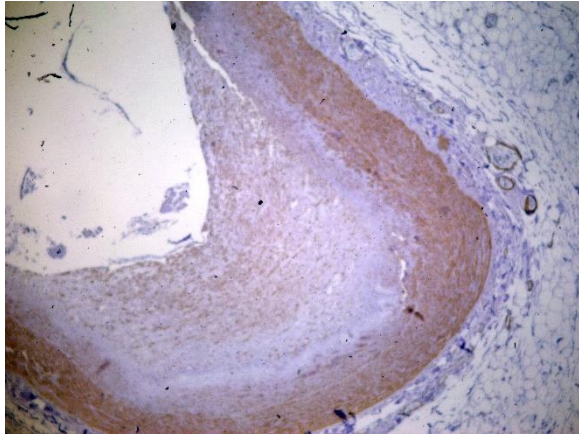
Сл. 26. Преатером
Изостанак имунореактивности на маркере
контрактилног фенотипа
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



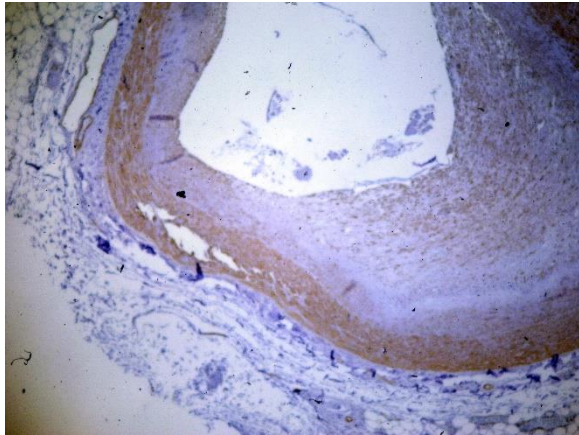
**Сл. 27. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
S 100-имунореактивне пенасте ћелије у
субендотелу интимае
(имунохистохемијско бојење на
S 100 протеин, $\times 64$)



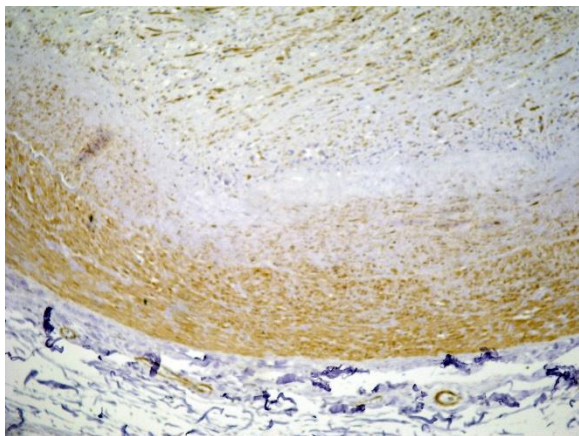
**Сл. 28. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
(имунохистохемијско бојење на
актин, $\times 64$)



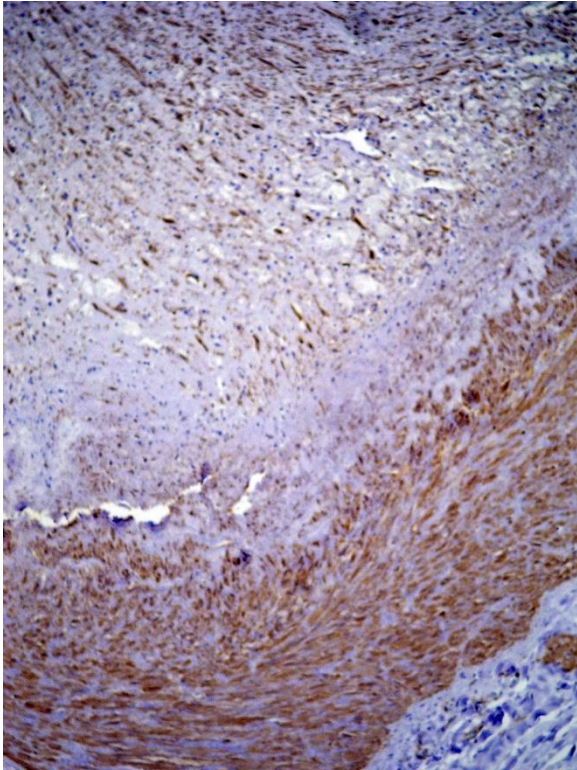
**Сл. 29. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
Пенасте ћелије у субендотелу интимае и глатке
мишићне ћелије синтетског фенотипа у медији
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



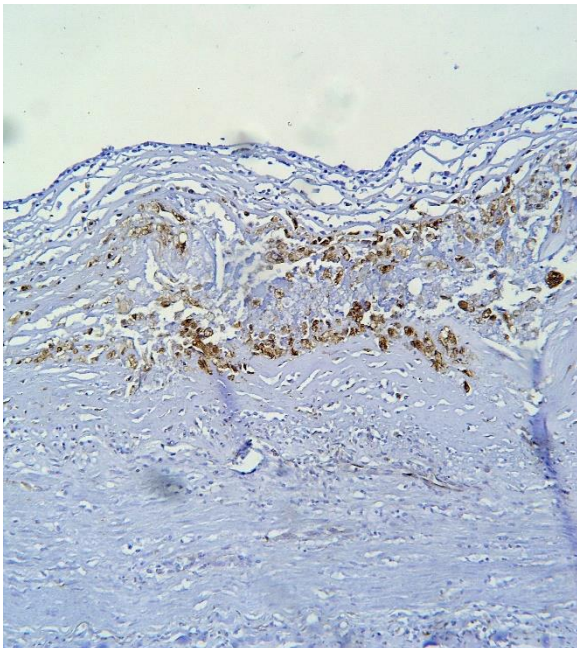
**Сл. 30. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



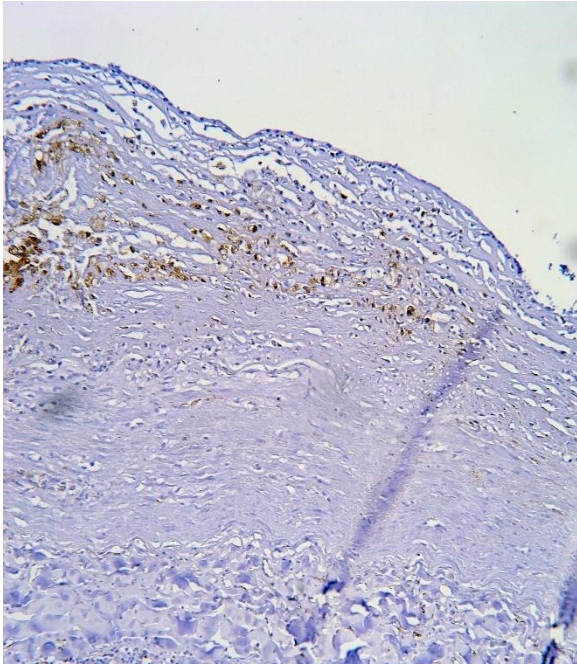
**Сл. 31. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



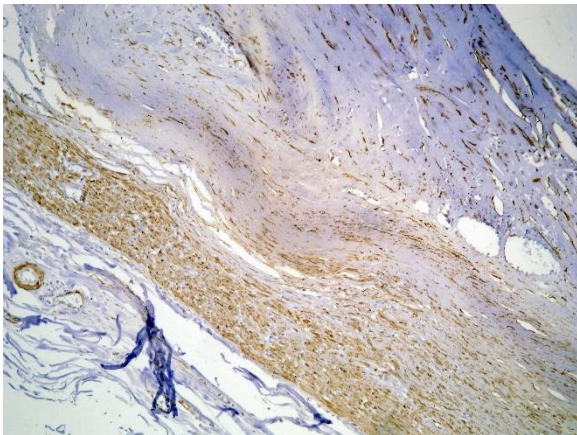
Сл. 32. Преатером
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



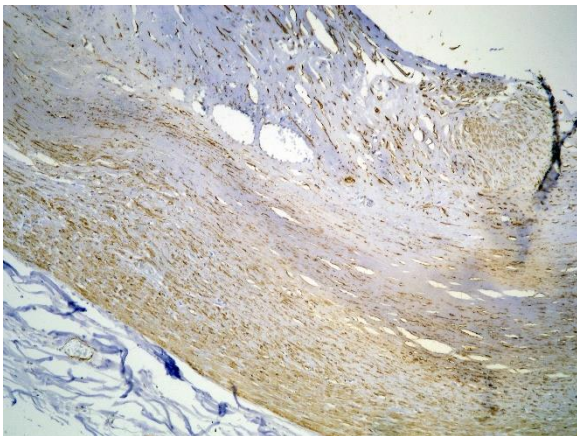
**Сл. 33. Атеросклероза коронарне
артерије – преатером**
Пенасте ћелије у субендотелу интимае
(имунохистохемијско бојење на
S 100 протеин,×64)



Сл. 34. Стадијум преатерома
Пенасте ћелије у субендотелу интимае
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 64$)



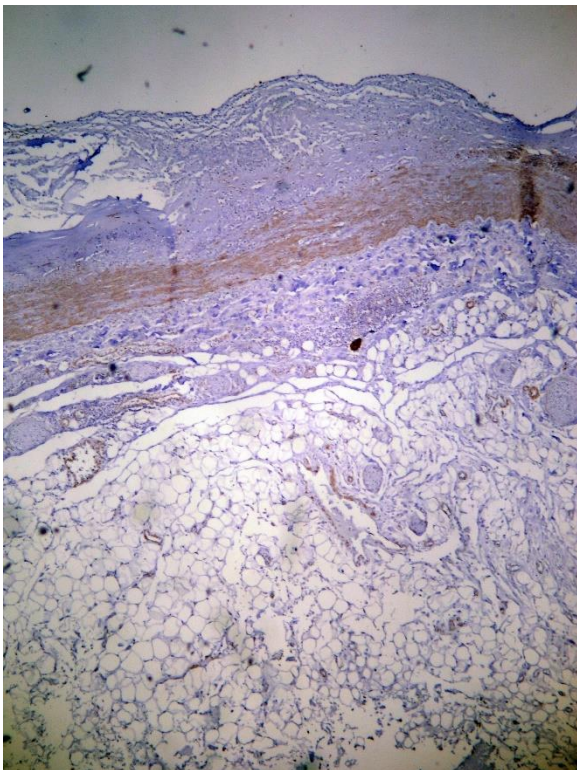
**Сл. 35. Атеросклероза коронарне
артерије –фиброатером**
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у
васкуларном зиду. Запажа се њихово присуство
у интими, медији и зидовима *vasa vasorum*
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



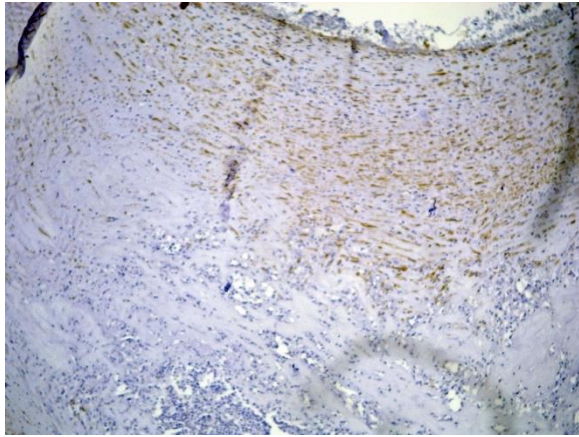
Сл. 36. Фибоатером
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



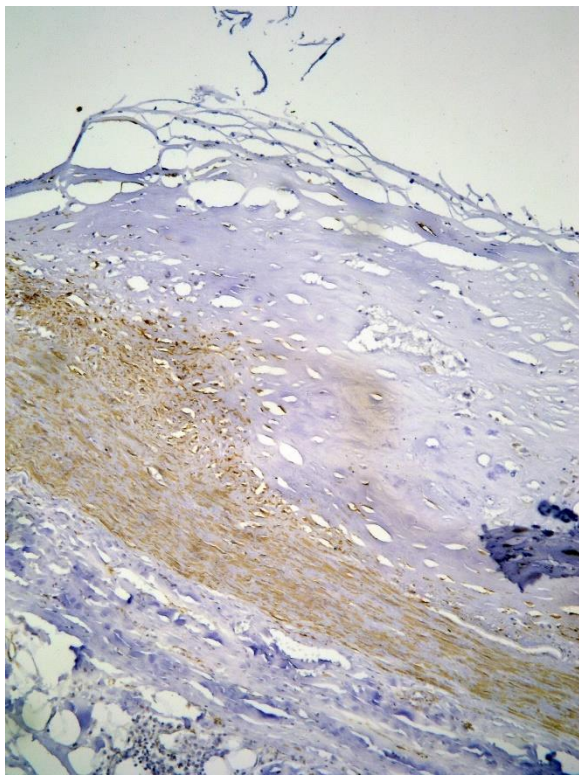
**Сл. 37. Коронарна атеросклероза
– фиброзни плак**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



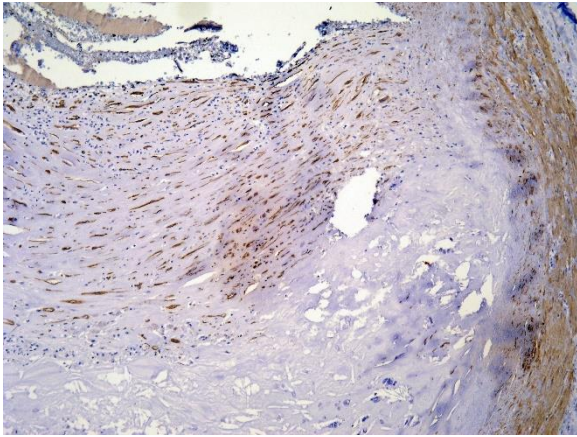
**Сл. 38. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



Сл. 39. Фиброзни плак
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 64$)

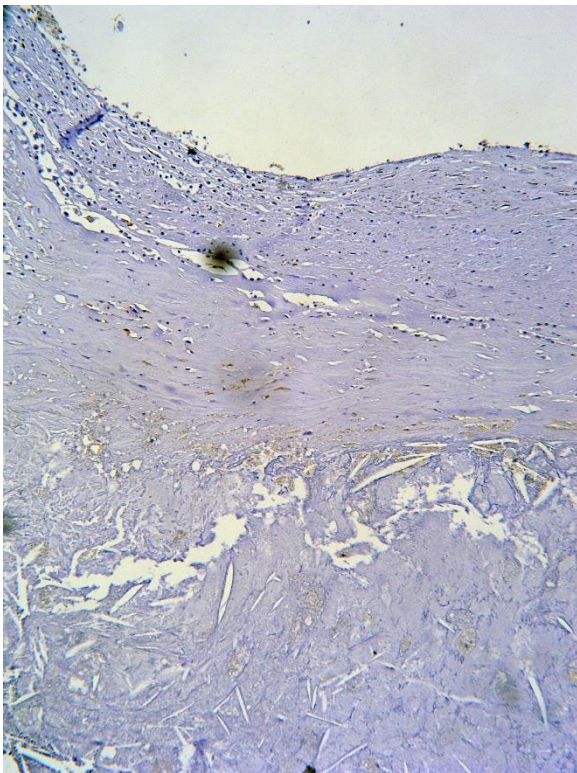


Сл. 40. Стадијум атерома
Хипоцелуларни фиброзно измењени
субендотел интима са ћелијским детритусом
испод липидног језгра и глатке мишићне ћелије
медије (имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



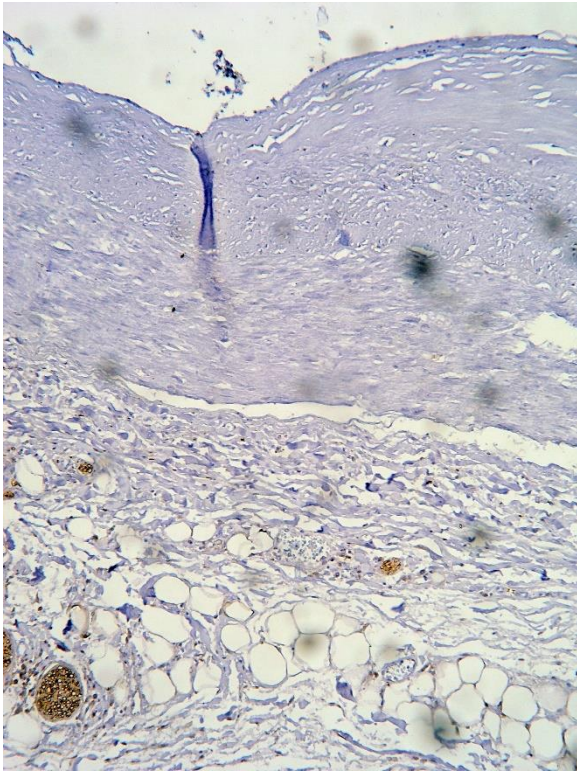
Сл. 41. Фиброзни плак

Фиброзна капа у којој се запажају имунореактивне глатке мишићне ћелије, прекрива хипоцелуларни плак са холестеролским кристалима; запажају се и имунореактивне ћелије у истањеној медији и у зидовима *vasa vasorum* (имунохистохемијско бојење на виментин, ×32)

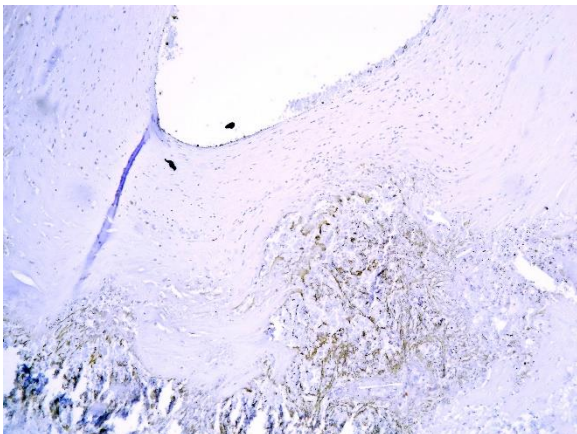


Сл. 42. Атеросклероза коронарне артерије – фиброатером

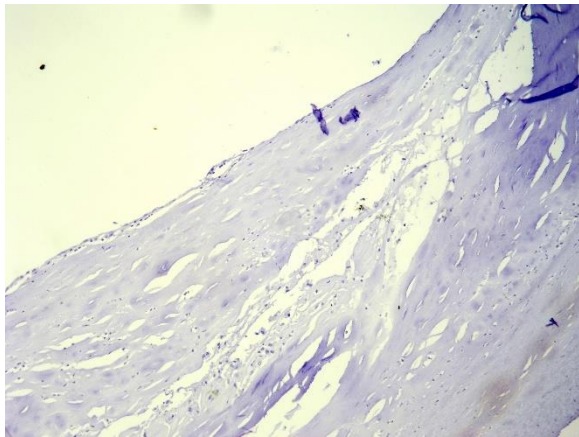
Фиброзна капа са имунореактивним глатким мишићним ћелијама прекрива екстензивно липидно језгро у субендотелу интима (имунохистохемијско бојење на S100 протеин, ×64)



**Сл. 43. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброзни плак**
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)

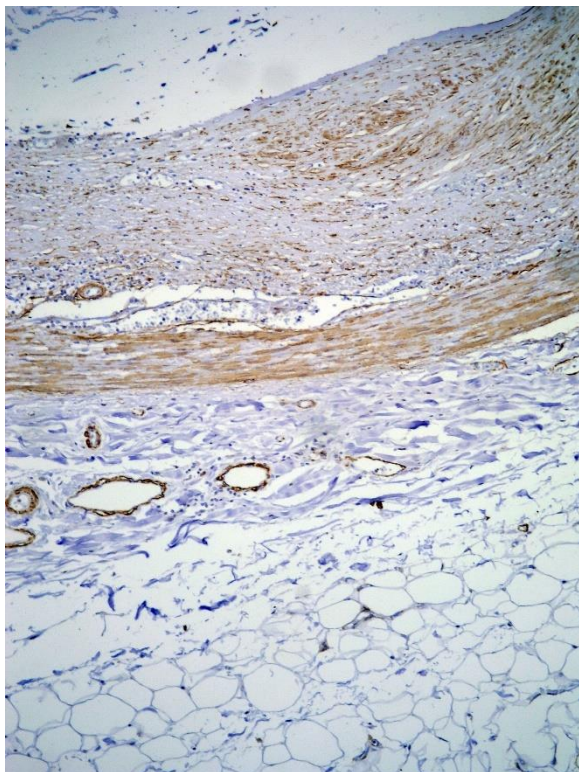


**Сл. 44. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброзни плак**
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



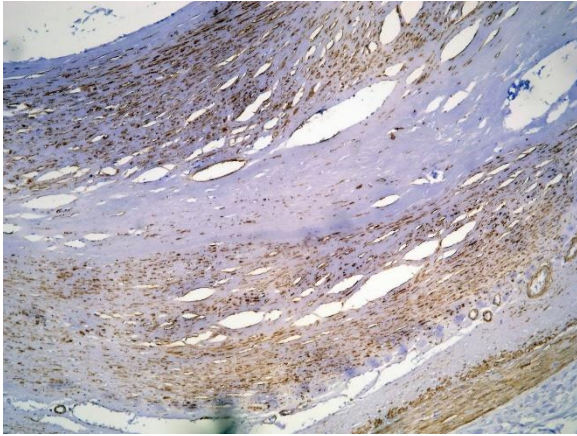
**Сл. 45. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**

Изостанак имунореактивности глатких
мишићних ћелија на маркере контрактилног
фенотипа (имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)

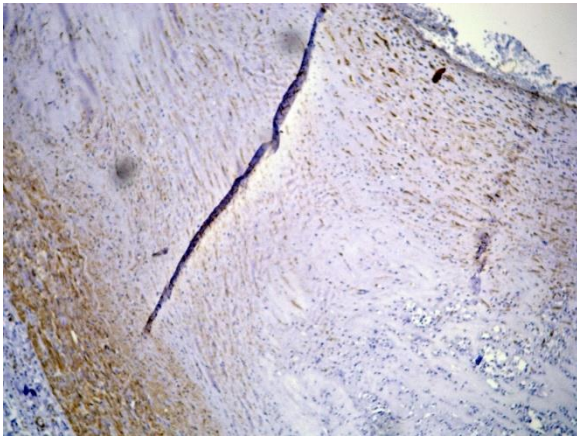


**Сл. 46. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**

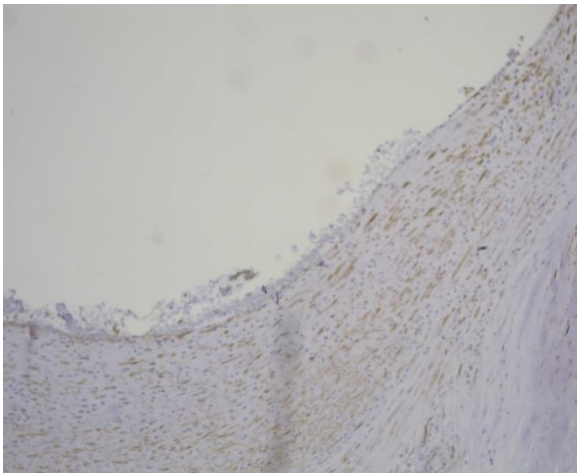
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



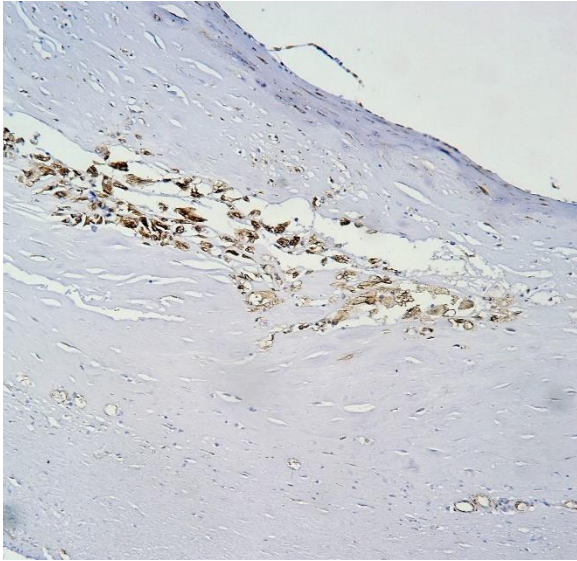
**Сл. 47. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



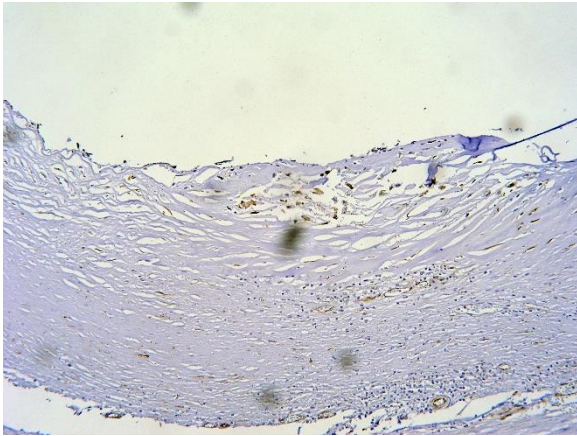
**Сл. 48. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброзни плак**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



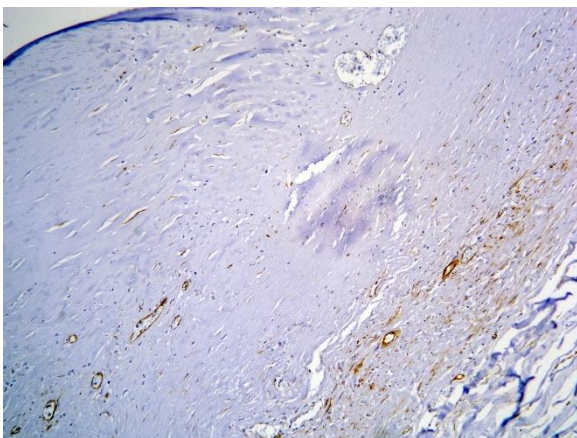
**Сл. 49. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброзни плак**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



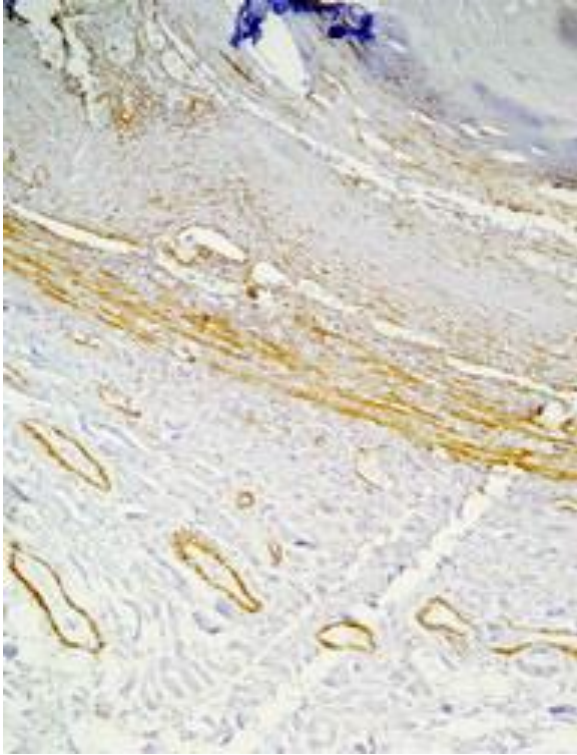
**Сл. 50. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



**Сл. 51. Атеросклероза коронарне
артерије – атером**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



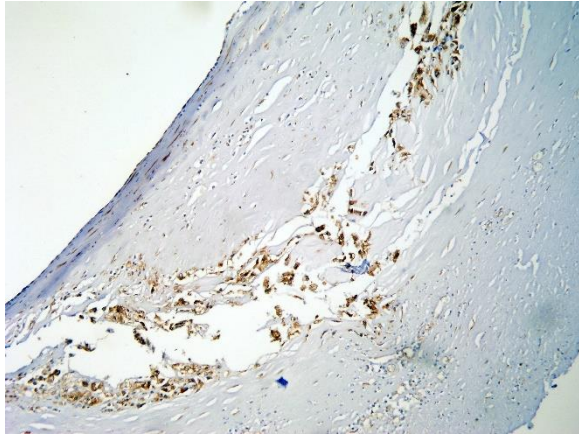
**Сл. 52. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



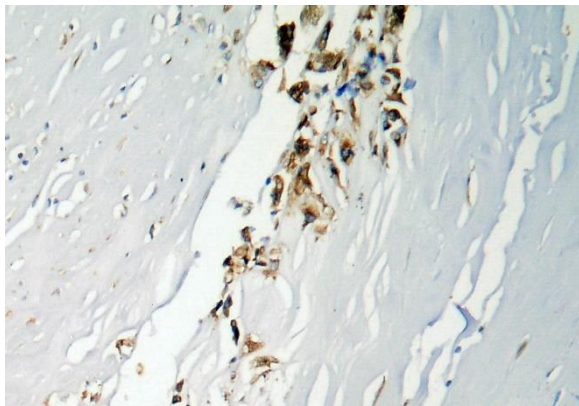
Сл. 53. Фиброатером
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у васкуларном зиду (имунохистохемијско бојење на α -глаткомишићни актин, $\times 128$)



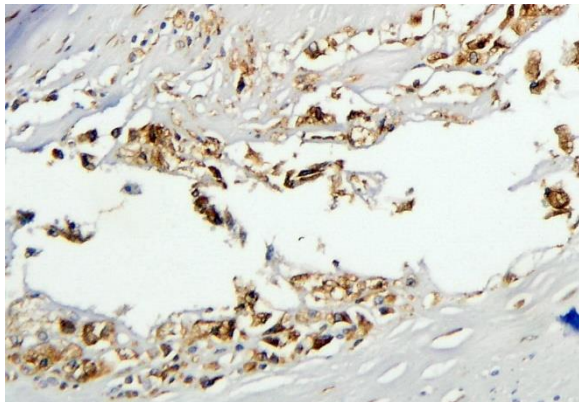
Сл. 54. Фиброзни плак коронарне артерије
Виментин – имунореактивне пенасте и глатке мишићне ћелије у плаку, ендотел *vasa vasorum* испод плака и глатке мишићне ћелије медије (имунохистохемијско бојење на виментин, $\times 64$)



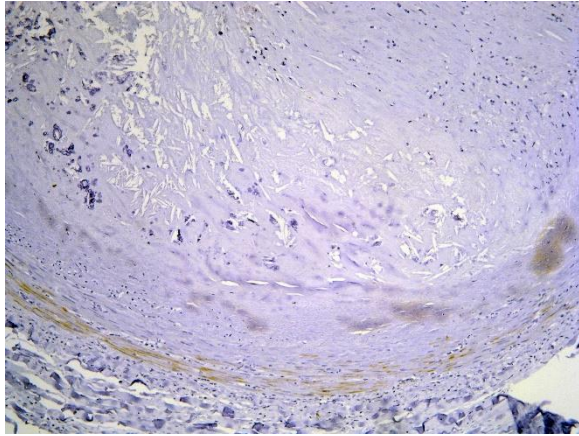
**Сл. 55. Атеросклероза коронарне
артерије – фиброатером**
Пенасте ћелије и ћелијски детритус на
маргинама липидног језгра
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 64$)



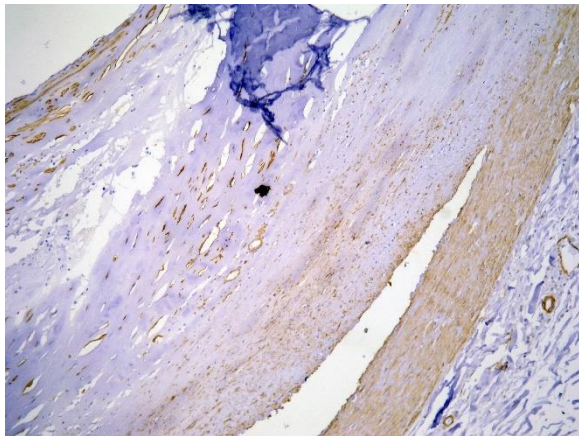
Сл. 56. Фиброатером
Пенасте ћелије у плаку (имунохистохемијско
бојење на S100 протеин, $\times 128$) детаљ са
претходне слике



Сл. 57. Фиброатером
Пенасте ћелије у плаку
(имунохистохемијско бојење на протеин, $\times 128$)
детаљ са претходне слике



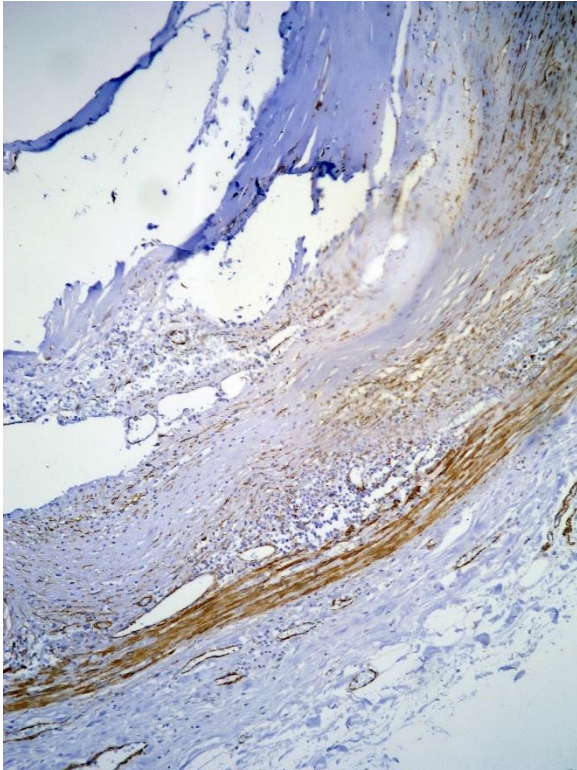
**Сл. 58. Атеросклероза коронарне
артерије –фиброатером**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



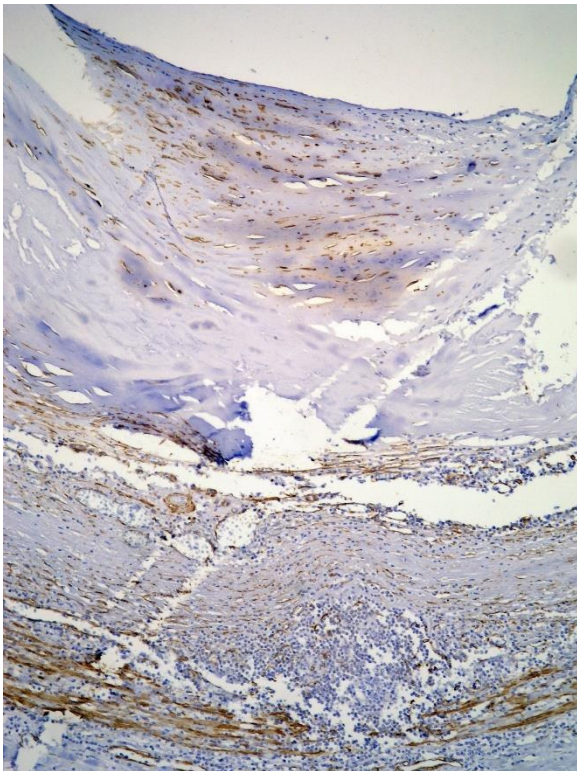
**Сл. 59. Компликована лезија коронарне
атеросклерозе**
Глатке мишићне ћелије у зиду *vasa vasorum* у
плаку и адвентицији, као и спољашњем делу
медије
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, ×64)



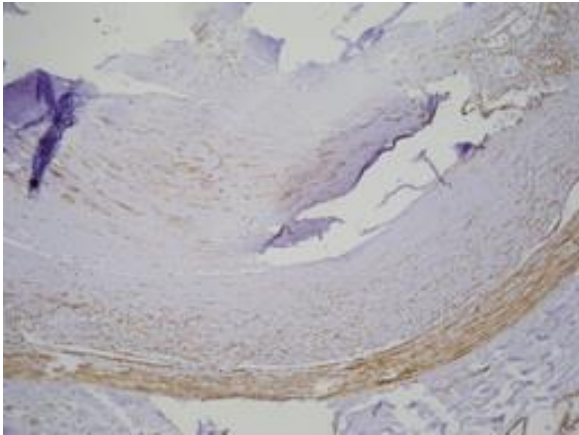
**Сл. 60. Коронарна атеросклероза –
компликована лезија**
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у
васкуларном зиду
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, ×64)



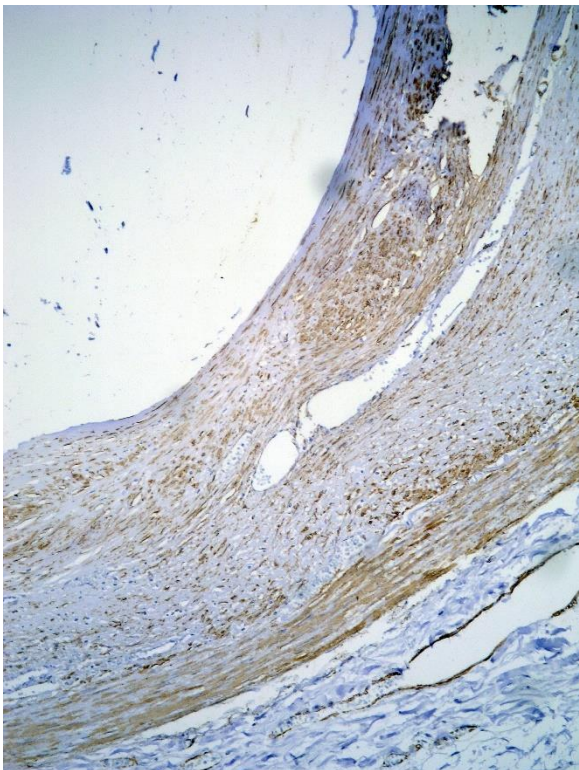
Сл. 61. Стадијум атерома коронарне атеросклерозе
Дистрибуција глатких мишићних ћелија
у делу зида испод плака
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



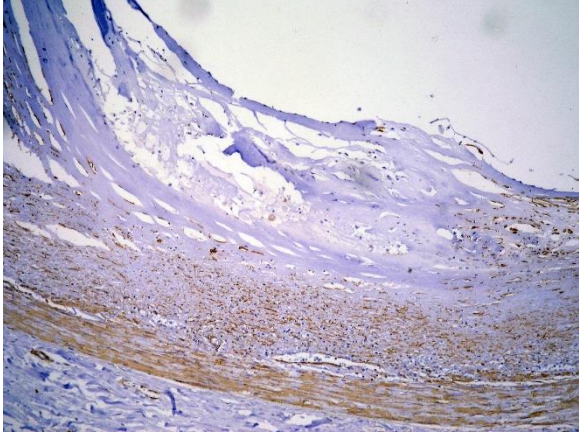
Сл. 62. Атеросклероза коронарне артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



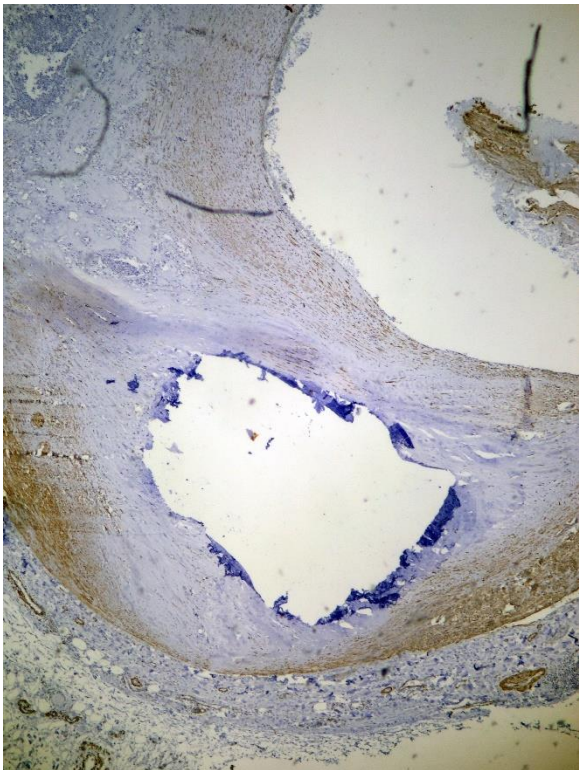
Сл. 63. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



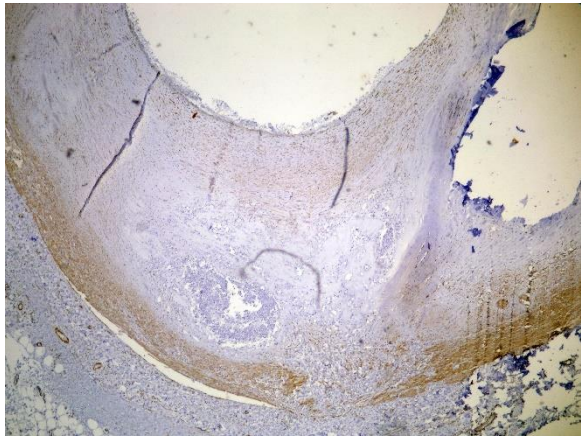
**Сл. 64. Коронарна атеросклероза –
компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



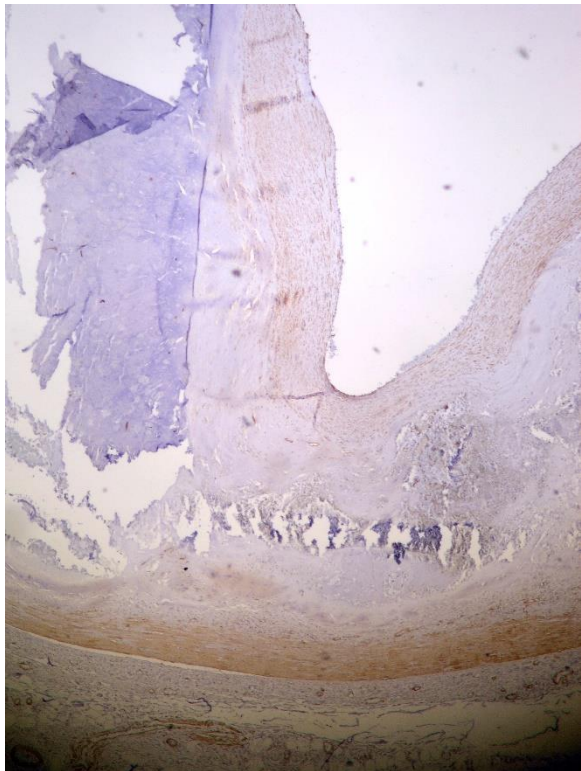
**Сл. 65. Атеросклероза коронарне
артерије – атером**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



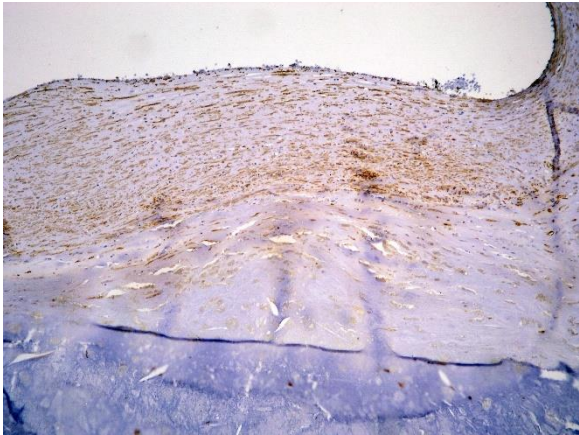
**Сл. 66. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



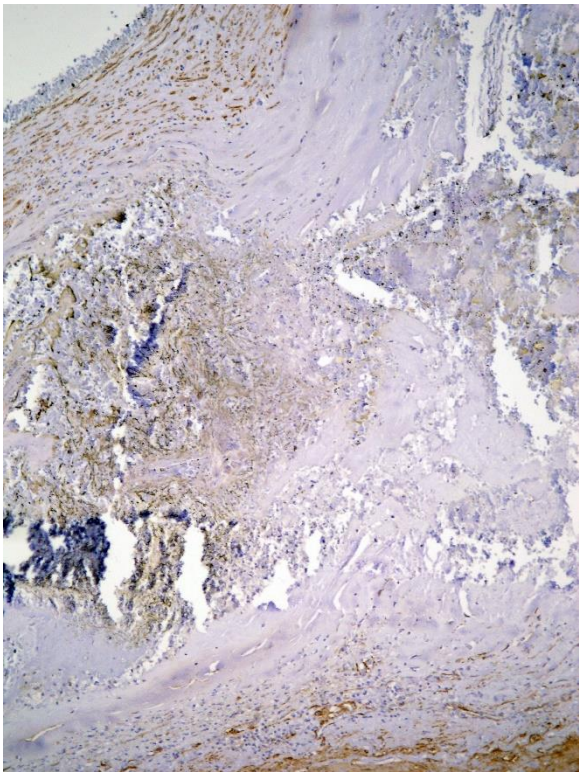
Сл. 67. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 32$)



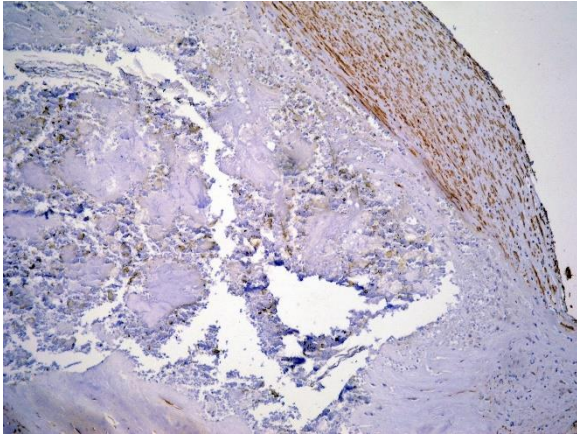
Сл. 68. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 32$)



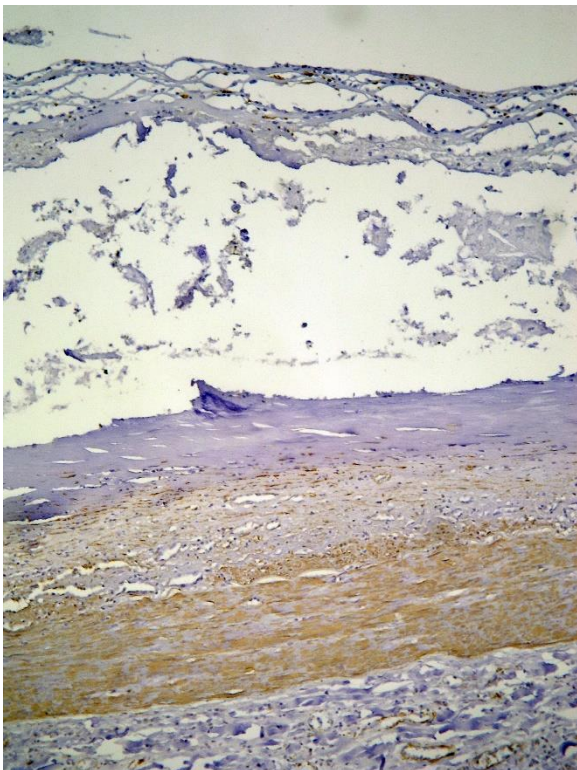
Сл. 69. Фиброзни плак
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



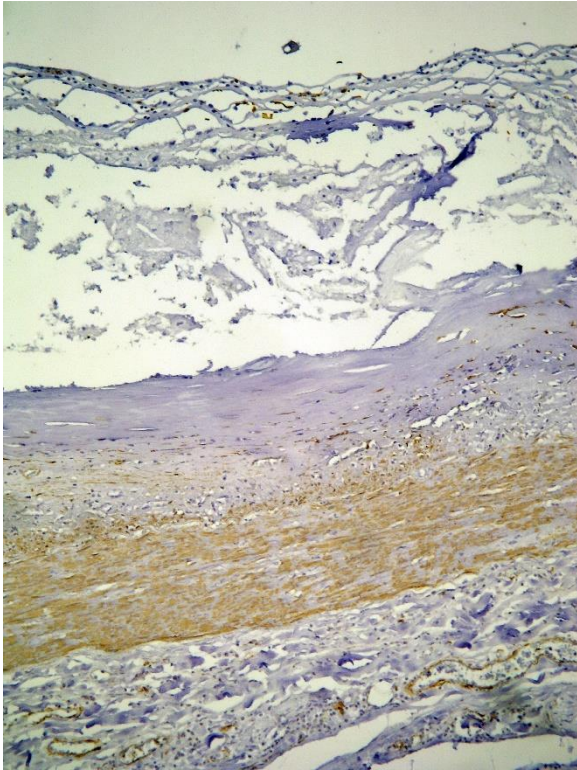
**Сл. 70. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



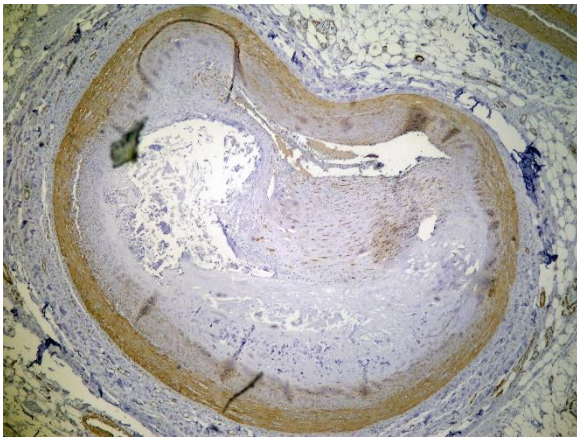
Сл. 71. Атеросклероза коронарне артерије –компликвана лезија
(имунохистохемијско бојење на α -глаткомишићни актин, $\times 32$)



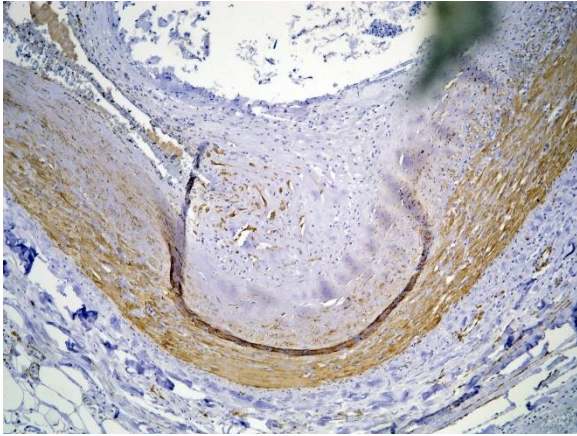
Сл. 72. Коронарна атеросклероза – стадијум атерома
(имунохистохемијско бојење на α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



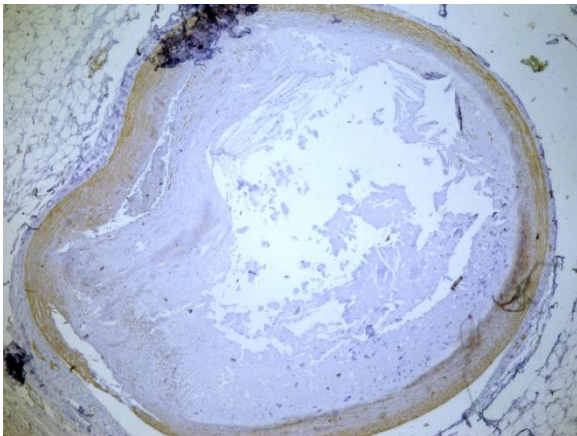
**Сл. 73. Атеросклероза коронарне
артерије – атером**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



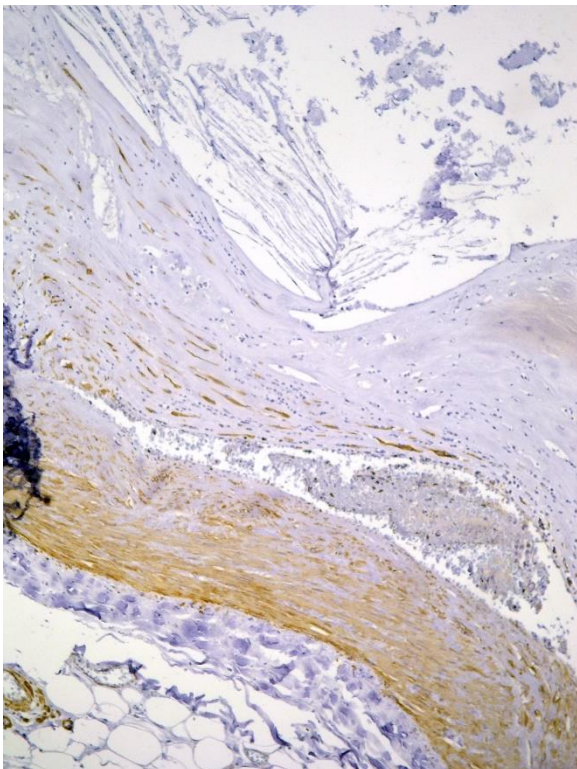
Сл. 74. Компликована лезија
Дистрибуција глатких мишићних ћелија у
васкуларном зиду (имунохистохемијско бојење
на α -глаткомишићни актин, $\times 16$)



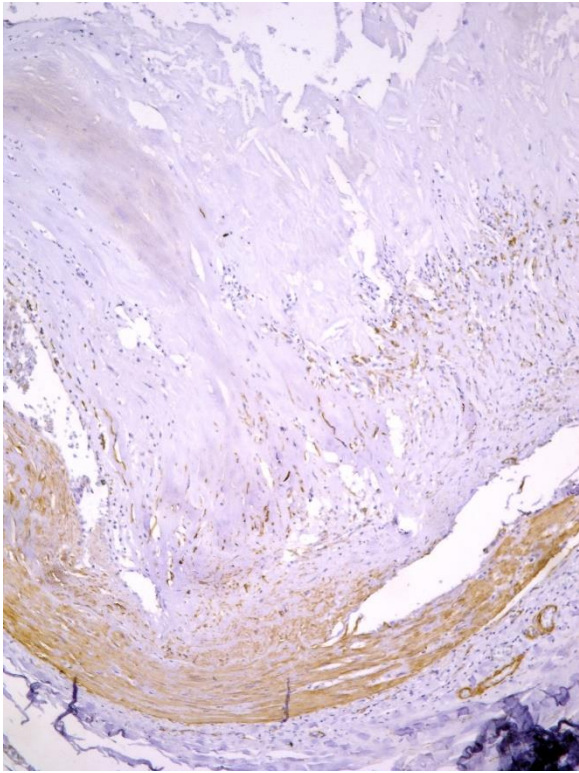
**Сл. 75. Деталъ са претходне
фотомикрографије**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 32$)



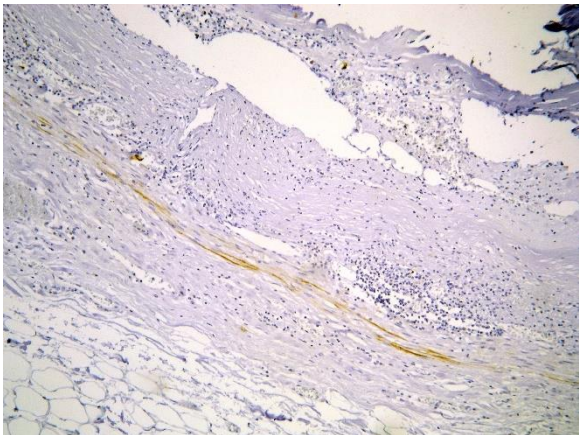
**Сл. 76. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 16$)



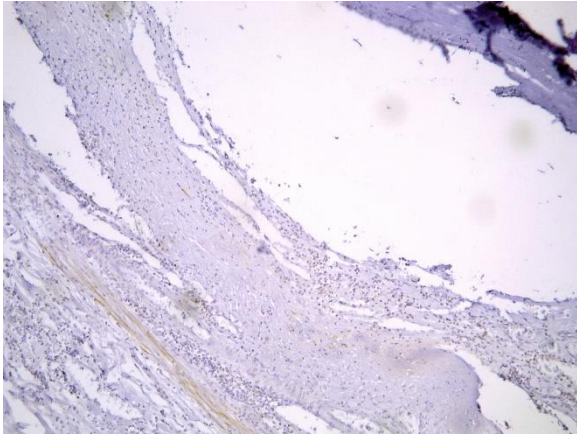
**Сл. 77. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



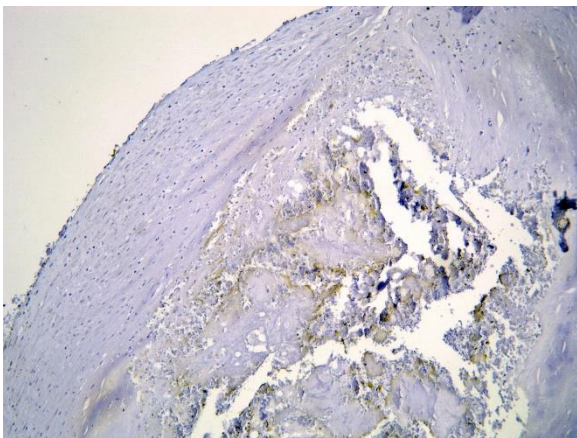
Сл. 78. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



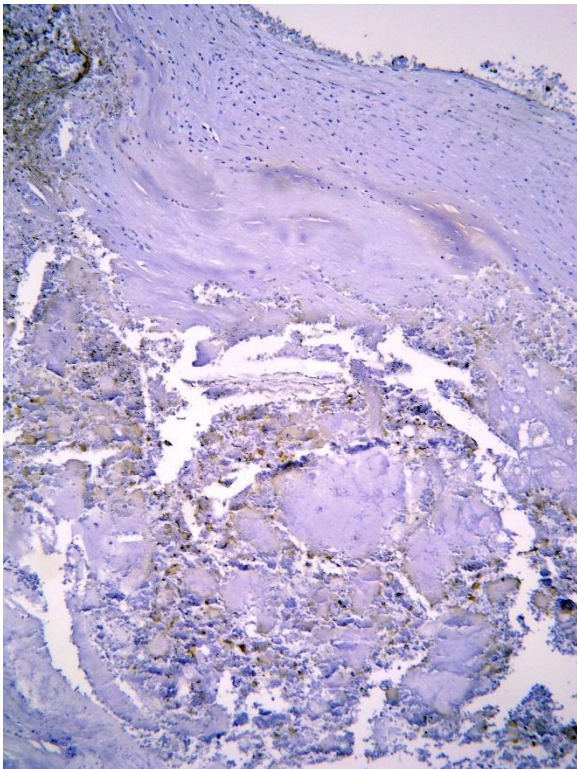
Сл. 79. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
Леукоцитни инфилтрат у плаку и појединачне
глатке мишићне ћелије контрактилног
фенотипа испод плака
(имунохистохемијско бојење на дезмин, $\times 64$)



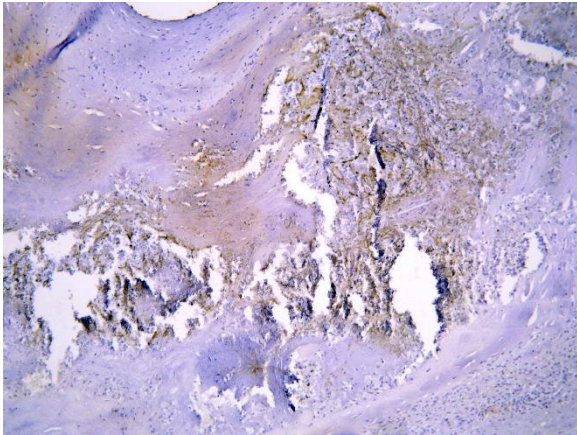
**Сл. 80. Коронарна атеросклероза –
компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
десмин, $\times 64$)



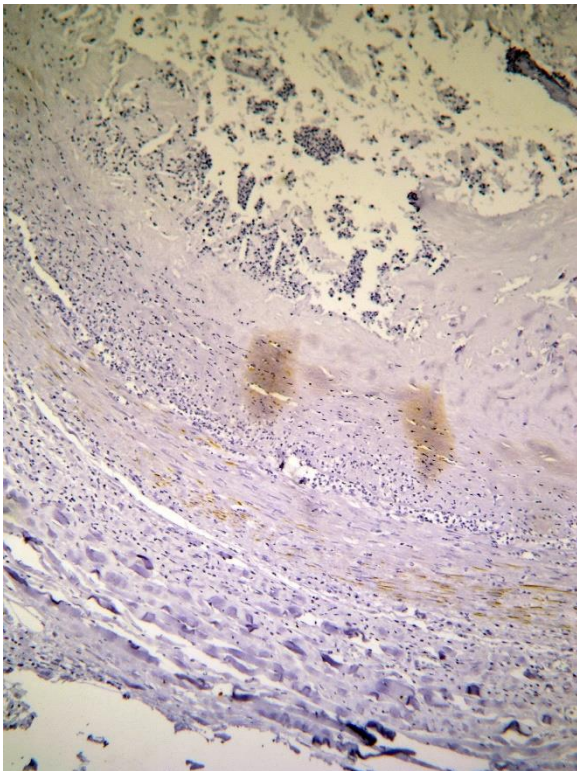
Сл. 81. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
десмин, $\times 32$)



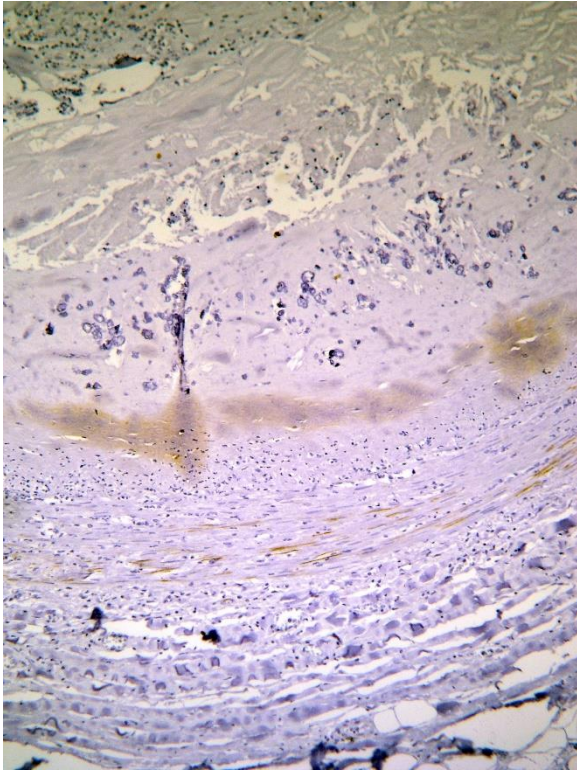
**Сл. 82. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
десмин, $\times 64$)



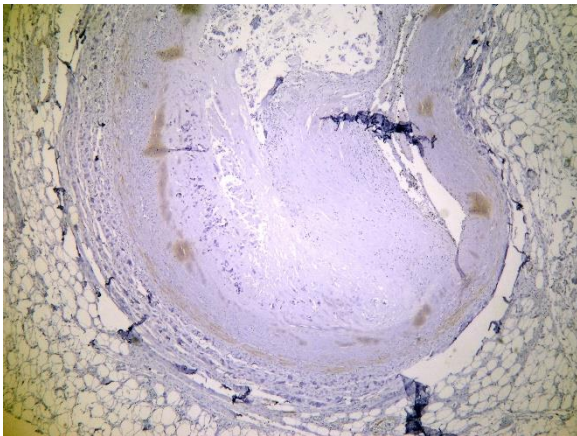
Сл. 83. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
десмин, ×64)



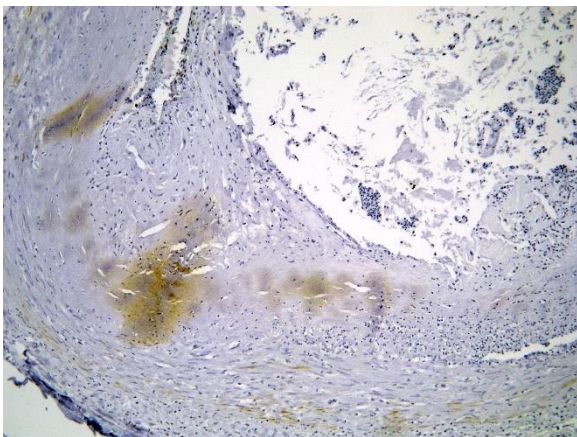
**Сл. 84. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
десмин, ×64)



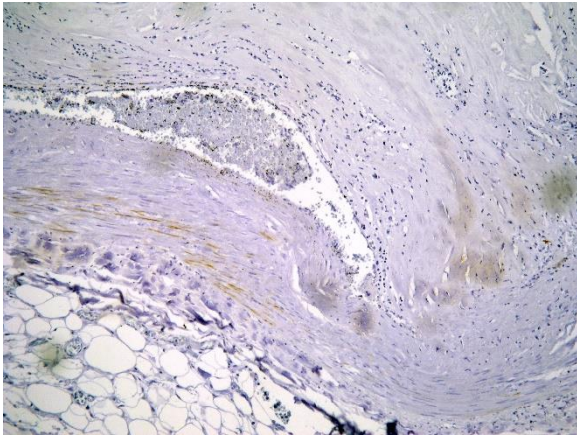
Сл. 85. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



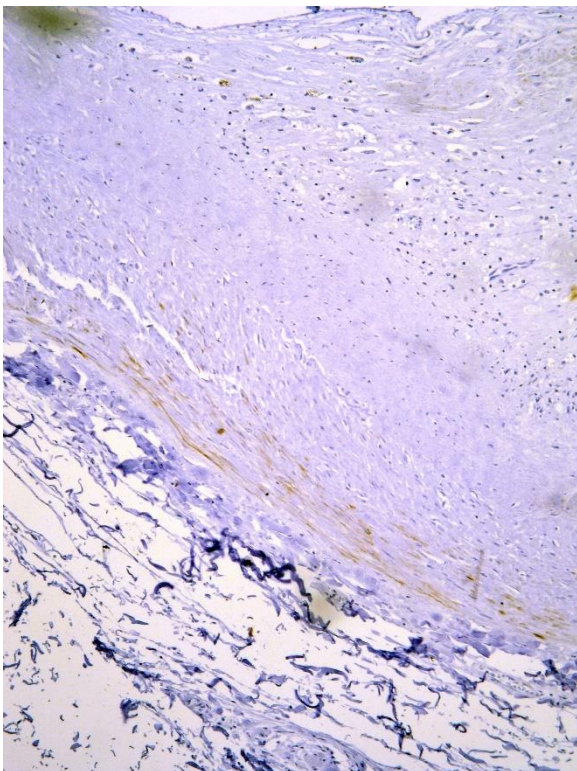
Сл. 86. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 16$)



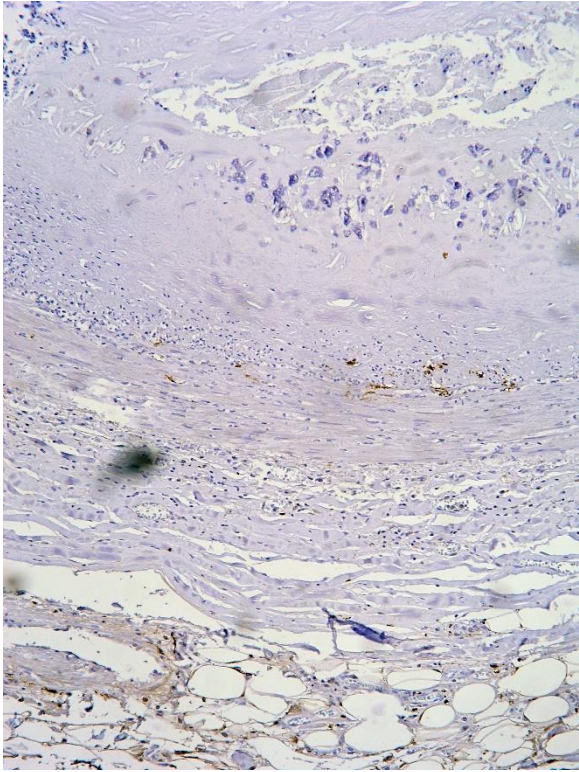
Сл. 87. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 32$)



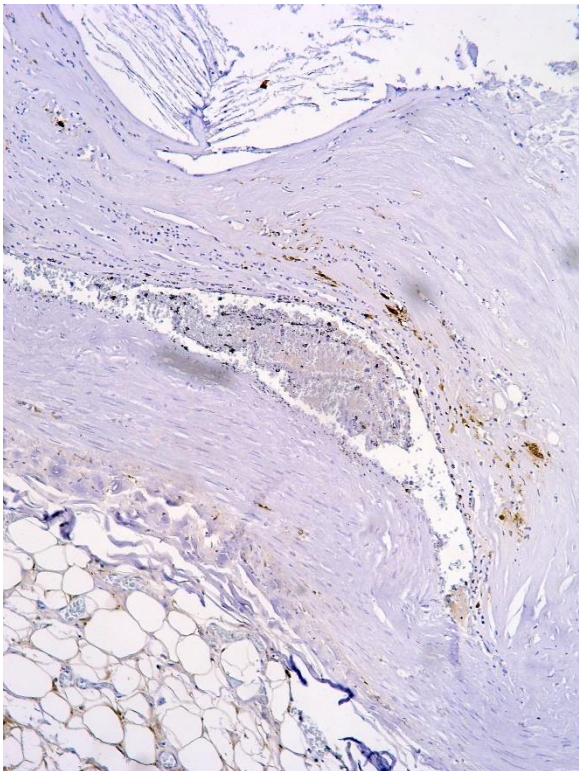
**Сл. 88. Атеросклероза коронарне
артерије –компличована лезија
(имунохистохемијско бојење на
десмин, ×64)**



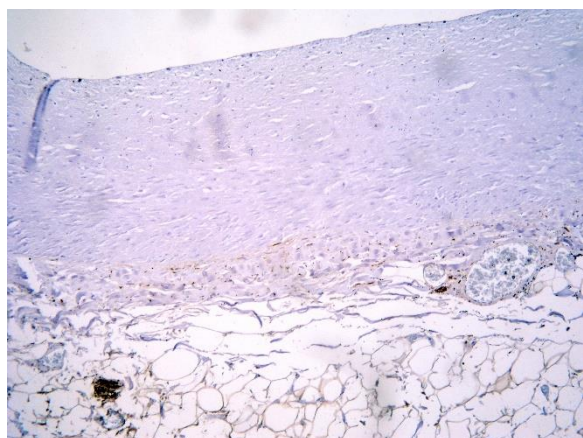
**Сл. 89. Атеросклероза коронарне
артерије –компличована лезија
(имунохистохемијско бојење на
десмин, ×64)**



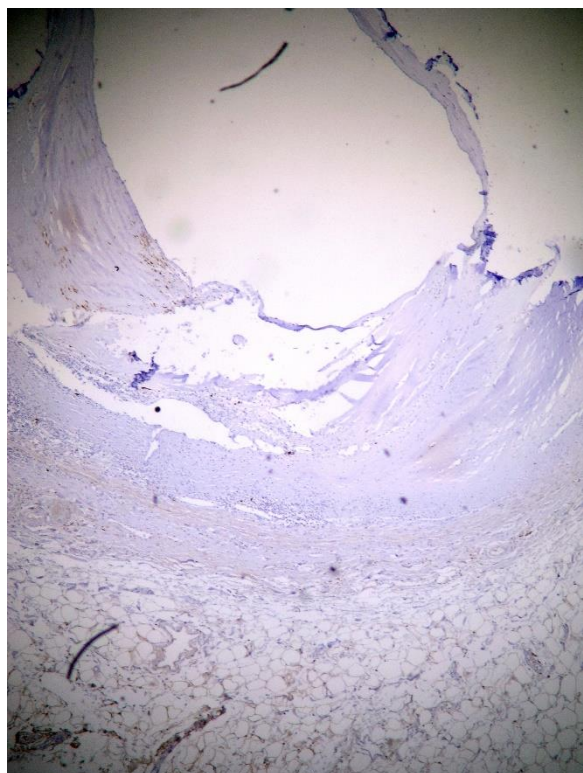
Сл. 90. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



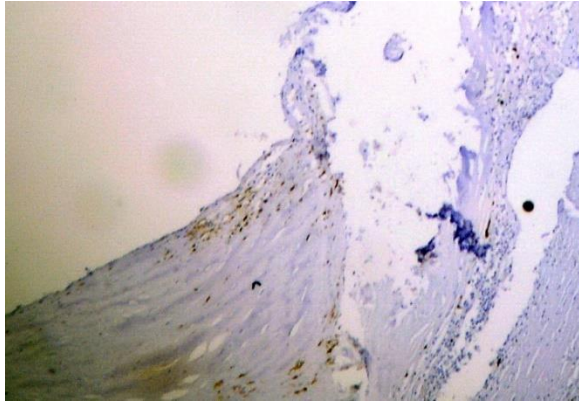
Сл. 91. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



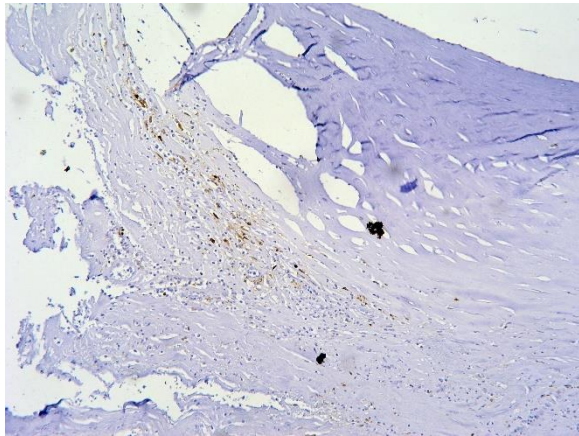
Сл. 92. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 64$)



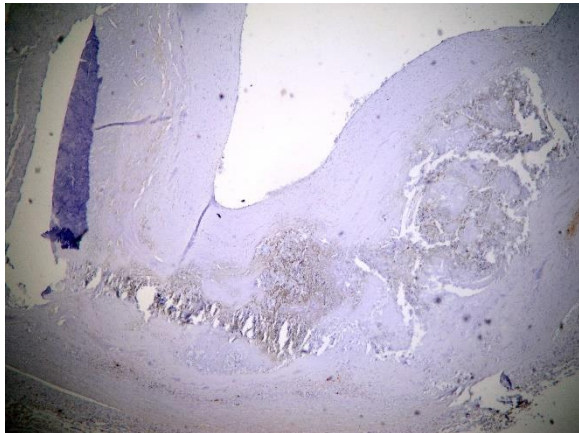
Сл. 93. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезимин, $\times 32$)



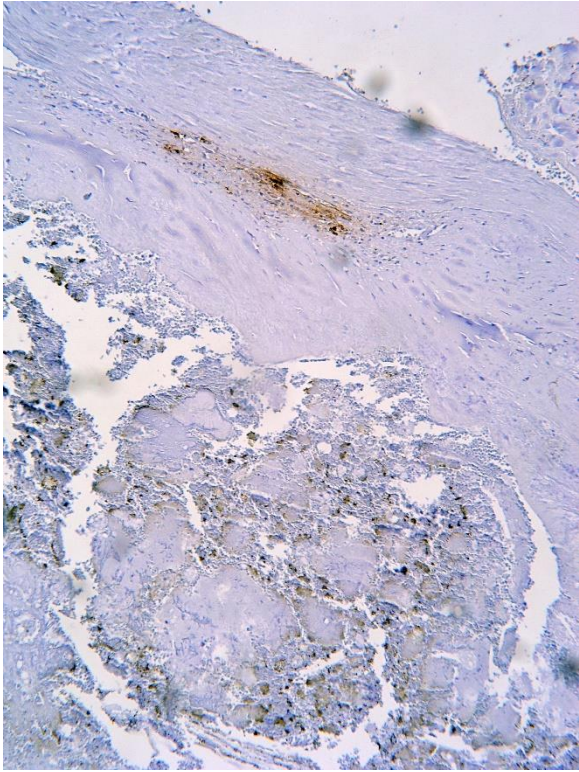
Сл. 94. Компликована лезија
Пенасте ћелије на маргини хипоцелуларног
фиброзног плака
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 32$)



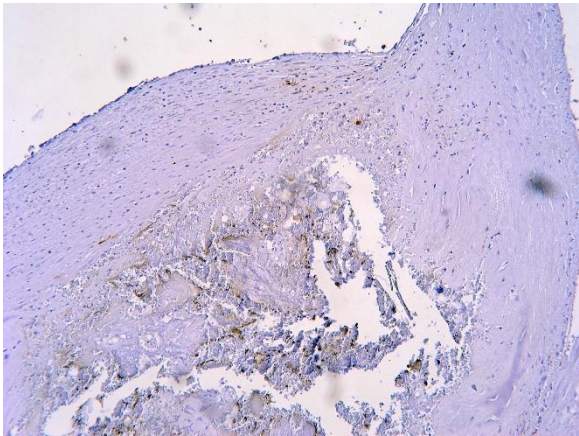
Сл. 95. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 32$)



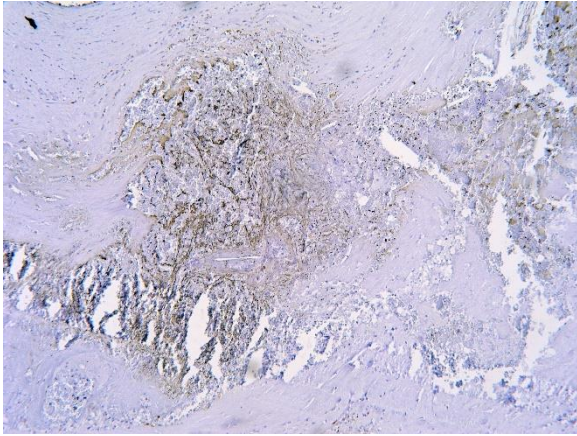
**Сл. 96. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 32$)



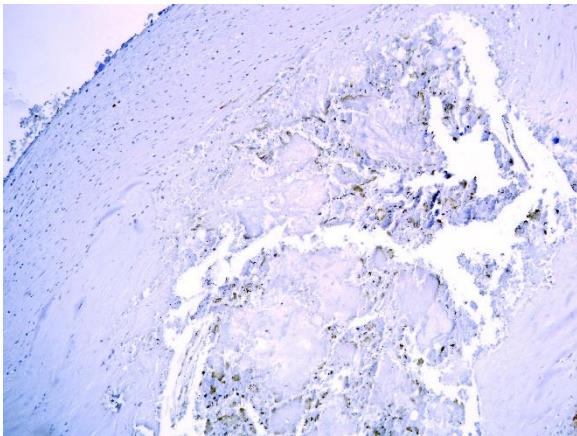
Сл. 97. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



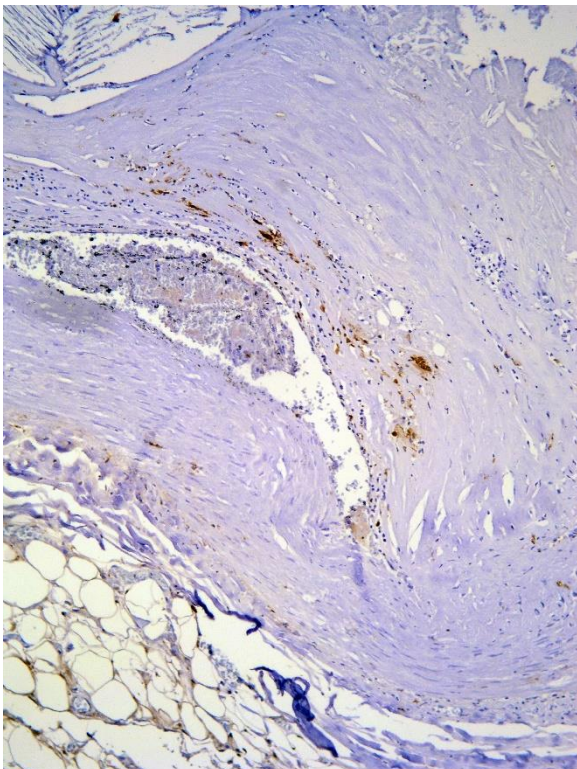
Сл. 98. Атеросклероза коронарне
артерије –компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×32)



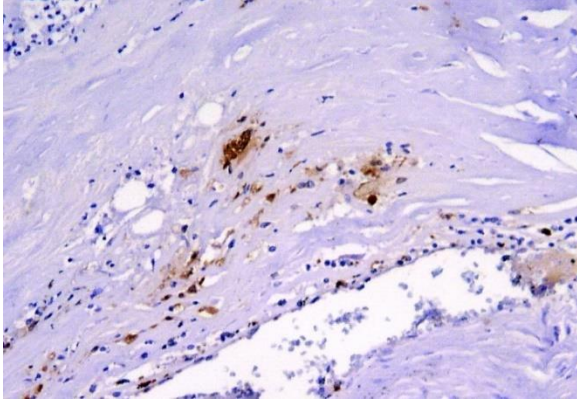
**Сл. 99. Деталъ са претходне
фотомикрографије
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×32)**



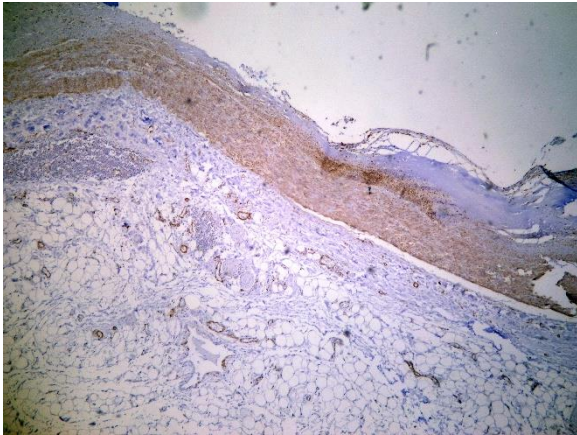
**Сл. 100. Коронарна атеросклероза –
компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×32)**



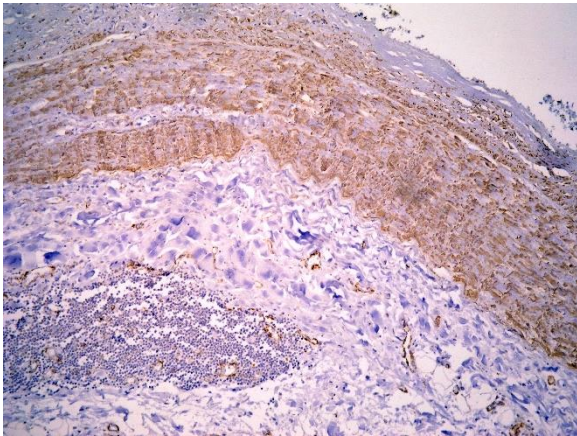
**Сл. 101. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×32)**



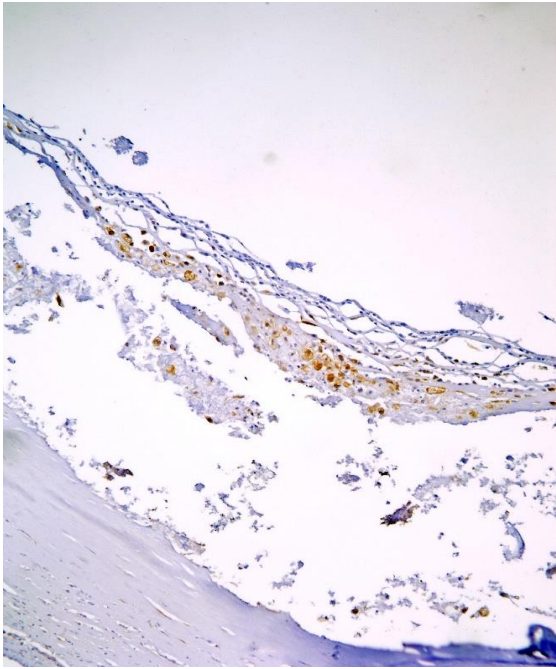
Сл. 102. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, $\times 128$),
деталъ са претходне слике



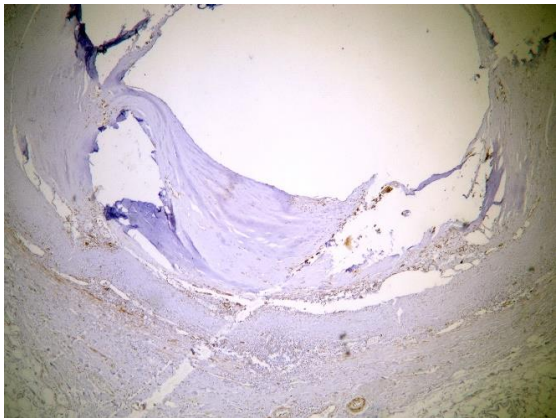
**Сл. 103. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 64$)



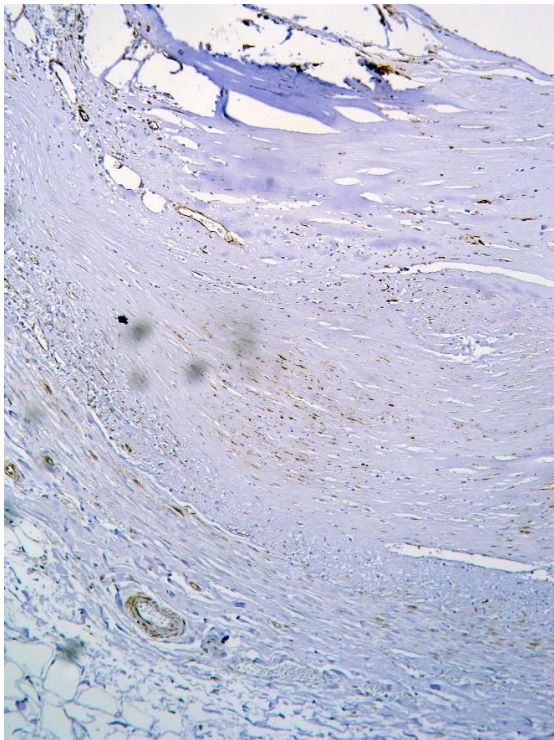
Сл. 104. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 64$)



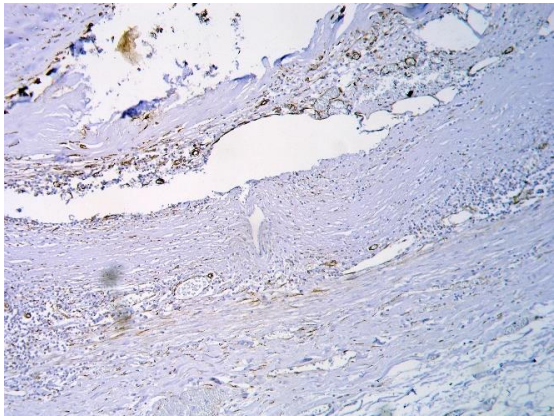
**Сл. 105. Атеросклероза коронарне
артерије – стадијум атерома**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



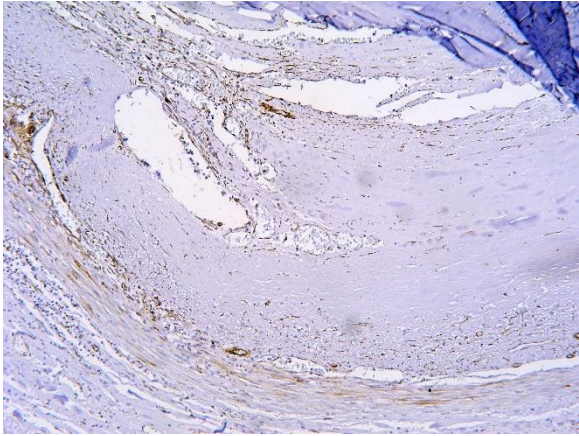
**Сл. 106. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×32)



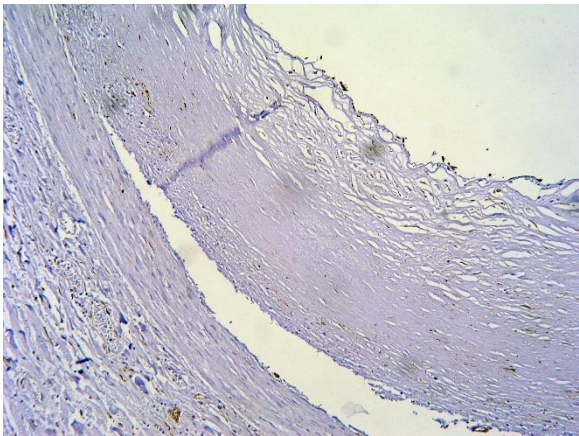
**Сл. 107. Коронарна атеросклероза –
компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



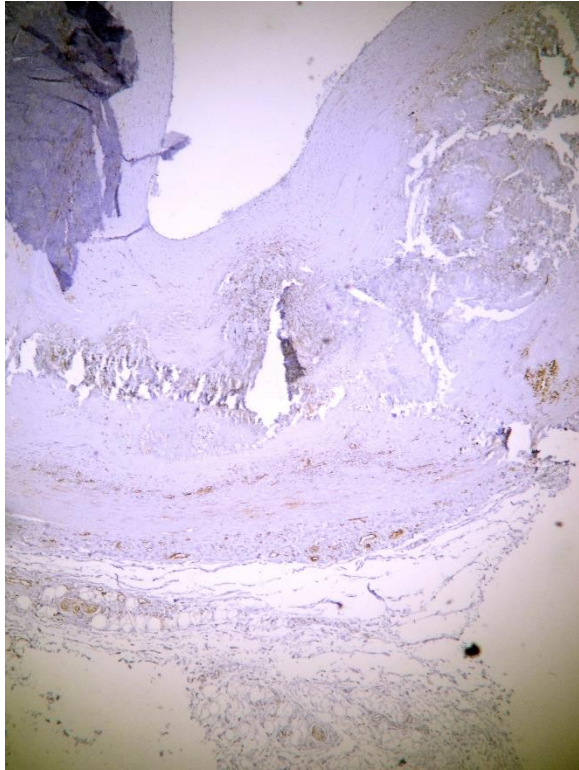
Сл. 108. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



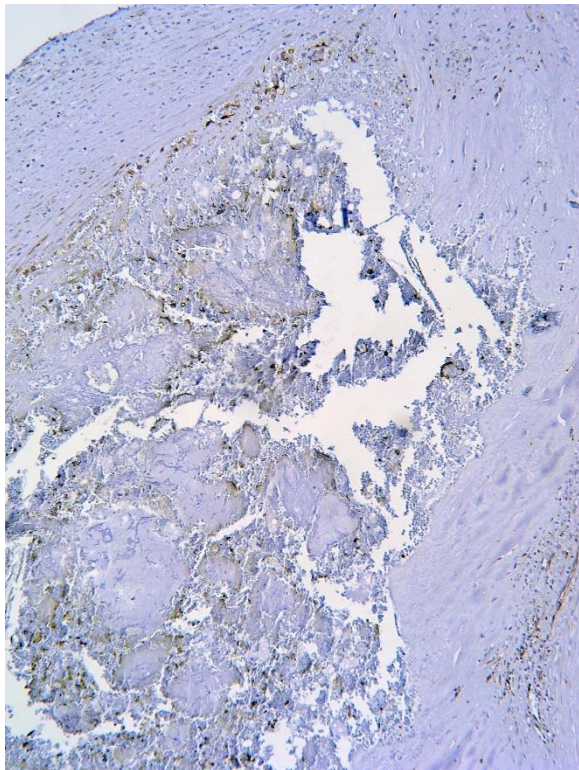
**Сл. 109. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



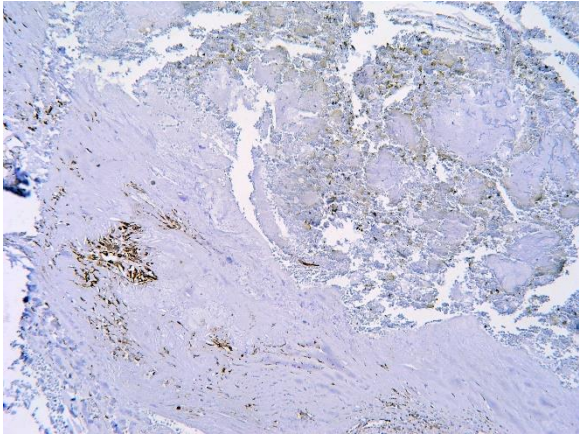
Сл. 110. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



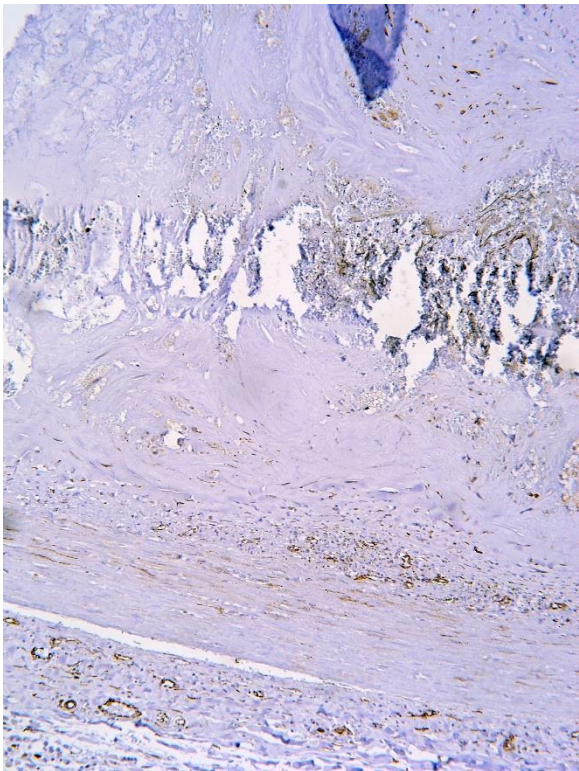
**Сл. 111. Коронарна атеросклероза –
стадијум компликоване лезије
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)**



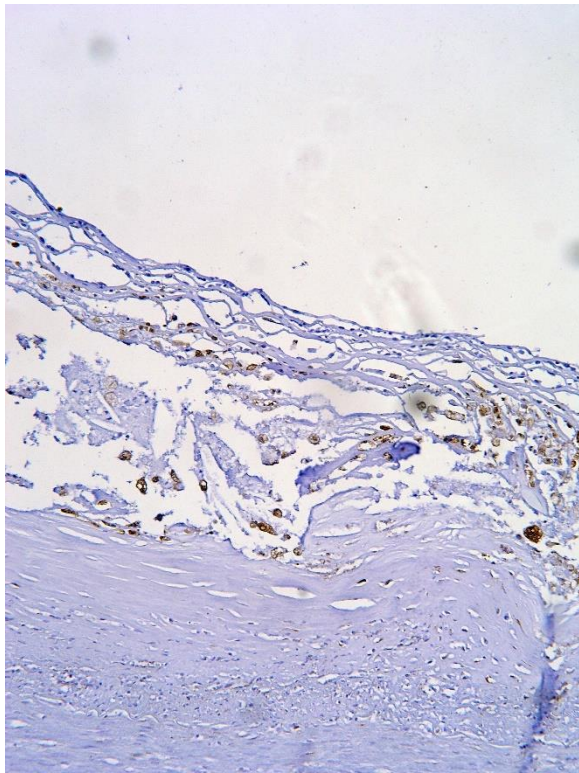
**Сл. 112. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)**



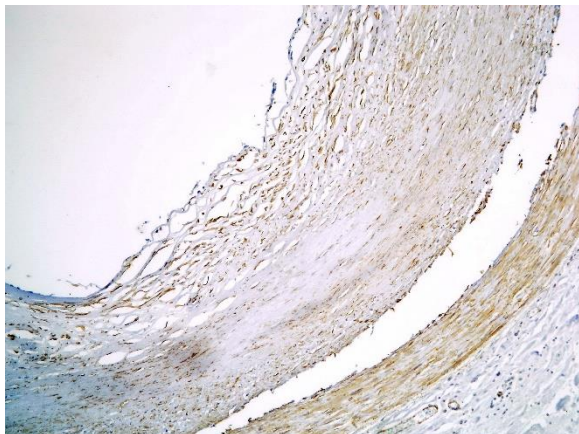
Сл. 113. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



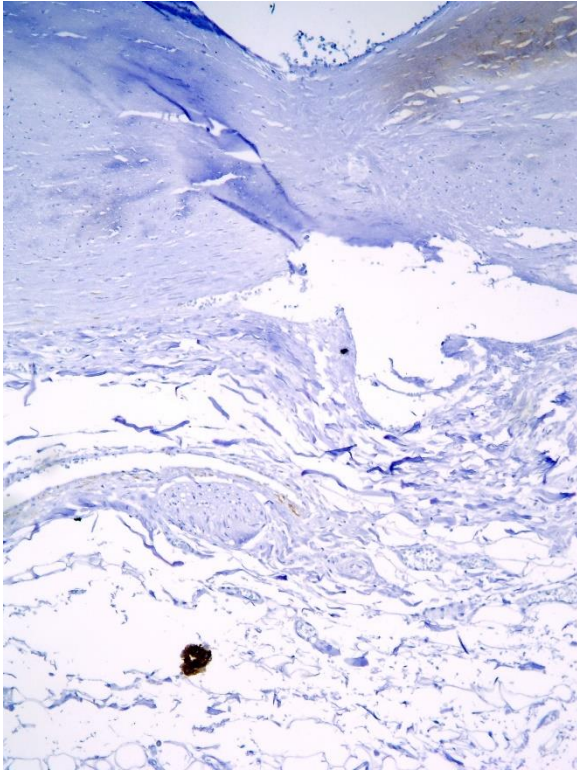
**Сл. 114. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



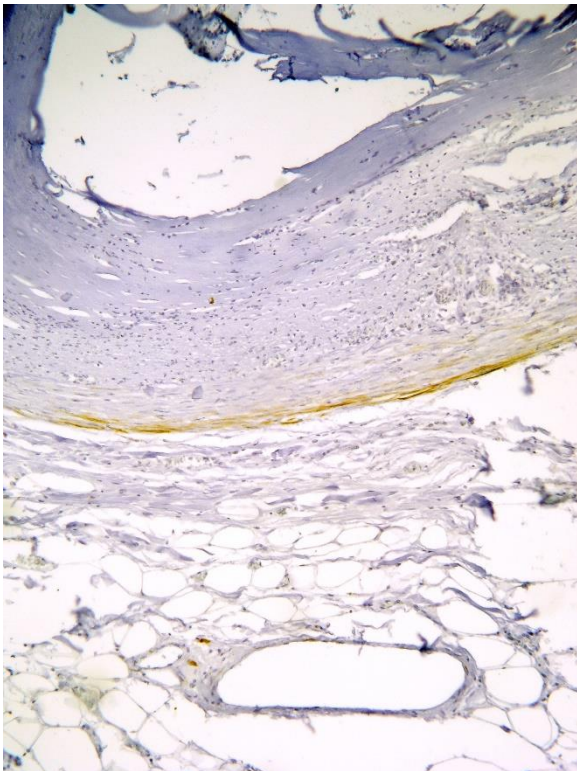
**Сл. 116. Коронарна атеросклероза –
стадијум атерома**
Пенасте ћелије на маргинама липидног језгра
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 64$)



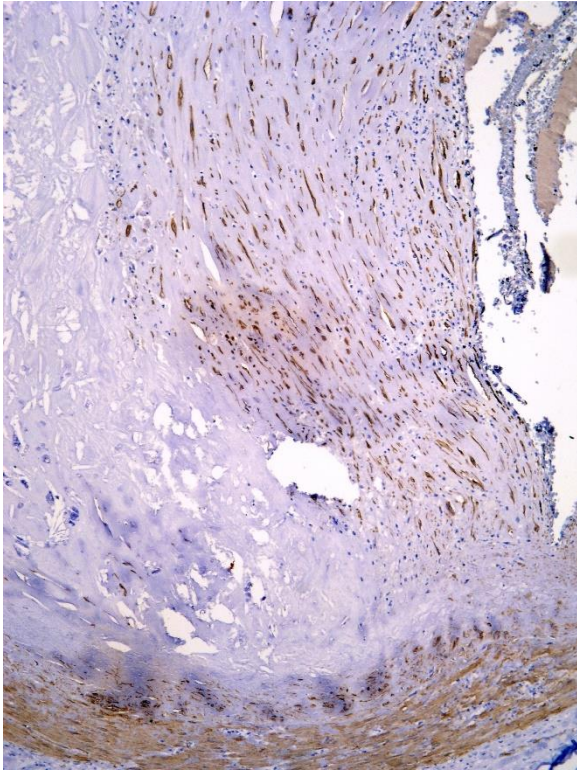
**Сл. 117. Атеросклероза коронарне
артерије –компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, $\times 32$)



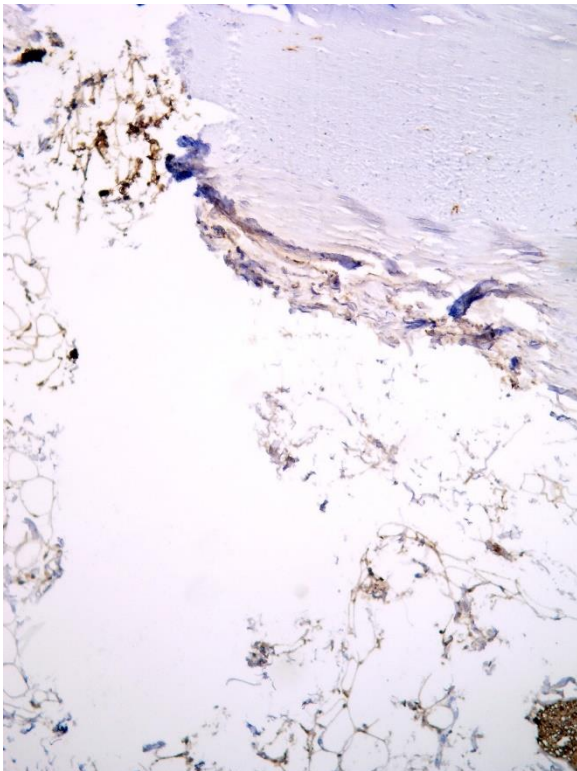
**Сл. 118. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



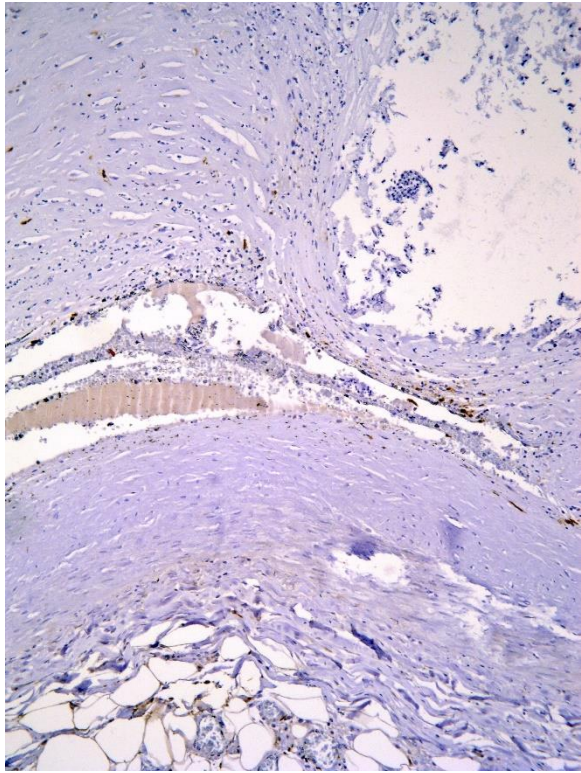
Сл. 119. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)



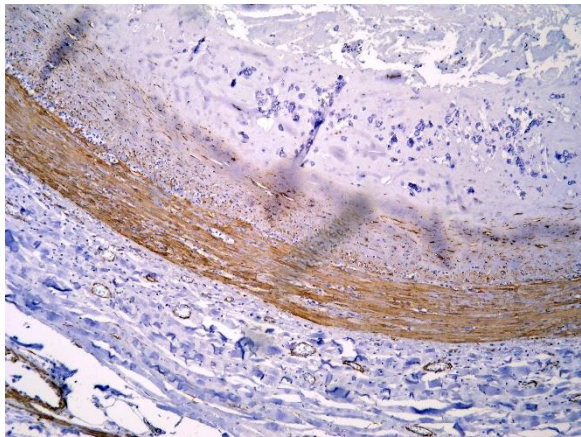
**Сл. 120. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



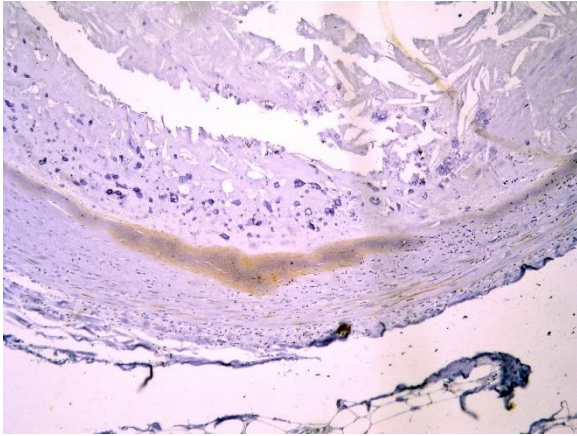
Сл. 121. Компликована лезија
Пенасте ћелије и ћелијски детритус на
маргинама липидног језгра
(имунохистохемијско бојење на
S100 протеин, ×64)



**Сл. 122. Атеросклероза коронарне
артерије –компличована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, ×64)

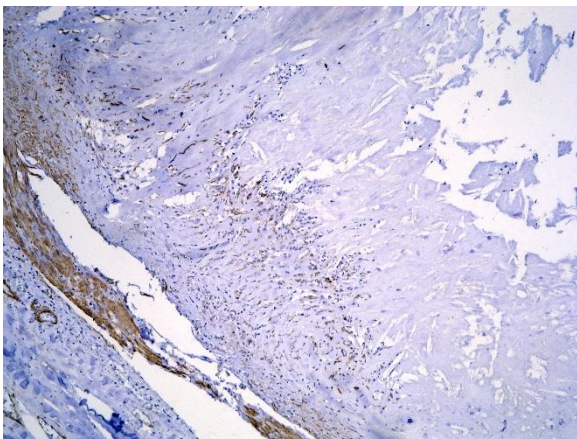


Сл. 123. Компличована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, ×64)

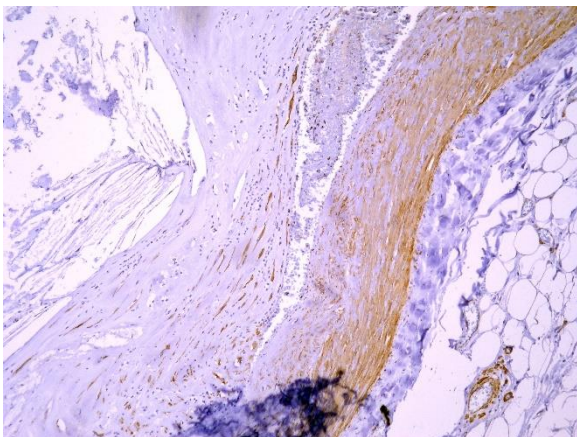


**Сл. 124. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**

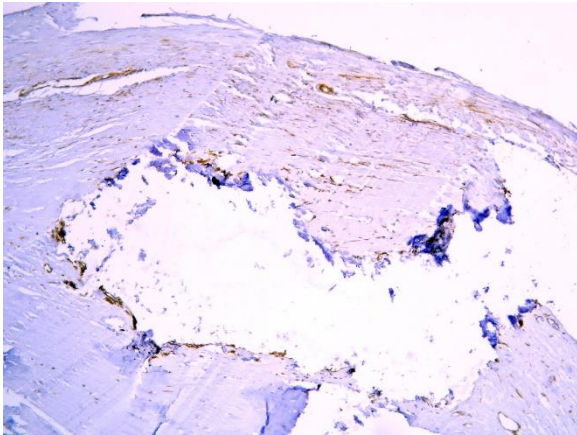
Запазити пенасте ћелије испод липидног језгра
и одсуство имунореактивности на дезмин као
маркер контрактилног фенотипа
(имунохистохемијско бојење на
дезмин, $\times 64$)



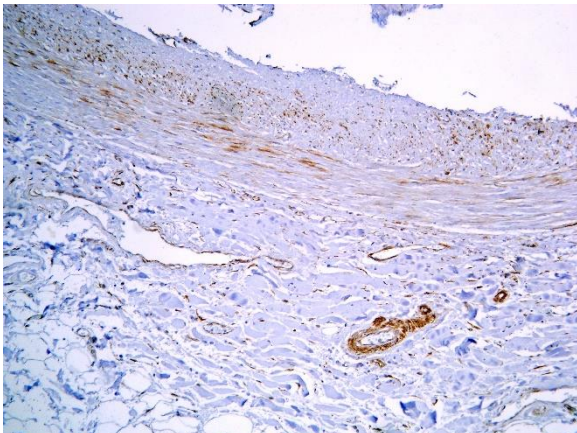
Сл. 125. Компликована лезија
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



**Сл. 126. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
 α -глаткомишићни актин, $\times 64$)



**Сл. 127. Коронарна атеросклероза -
компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)



**Сл. 128. Атеросклероза коронарне
артерије – компликована лезија**
(имунохистохемијско бојење на
виментин, ×64)

4.2. Резултати статистичке анализе варијабли

4.2.1. Дескриптивна статистика (обе групе)

Табела бр. 1. Пол пацијената

Пол пацијента	F	Процент
1,00 (мушки)	31	49,2
2,00 (женски)	31	49,2

Утврђено је да су међу испитаницима подједанко заступљени пацијенти мушког и женског пола, табела 1.

Табела бр. 2. Присуство виментина, дезмина и S100 протеина

Варијабла		F	Процент
Виментин	0,00	7	11,1
	1,00	26	41,3
	2,00	29	46,8
Дезмин	0,00	12	19,0
	1,00	42	66,7
	2,00	8	12,7
S100	0,00	0	0
	1,00	53	84,1
	2,00	9	14,5

За виментин, дезмин, S100 протеин и α -глаткомишићни актин (α -SMA) изостанак имунореактивности је означен са 0, до 35% имунореактивних ћелија је означен са 1, а до 70% имунореактивних ћелија је означен са 2.

Учесталост у подгрупама виментина, дезмина и S100 протеина је приказана у табели 2.

Код 7 узорака утврђено изостанак имунореактивности на виментина, код 26 узорака је нађено до 35% имунореактивних ћелија на виментин, а док код 29 узорака до 70% имунореактивних ћелија на виментин.

Код 12 узорака утврђено је изостанак имунореактивност на дезмин, код 42 узорака је нађено до 35% имунореактивних ћелија на дезмин, а док код 8 узорака до 70% имунореактивних ћелија на дезмин.

Нема узорака без имунореактивности на S100 протеин. Код 53 узорака утврђено је до 35% имунореактивних ћелија на S100 протеин, док код 9 узорака утврђено је до 70% имунореактивних ћелија на S100 протеин.

Графикон бр. 1



На графикону 1 приказано је процентуално присуство категорије виментина. Код 7,11% узорака је утврђено да немају имунореактивности на виментин, код 26,42% узорака је присутно до 35% имунореактивних ћелија на виментин, а код 29,47% узорака је до 70% имунореактивних ћелија на виментин.

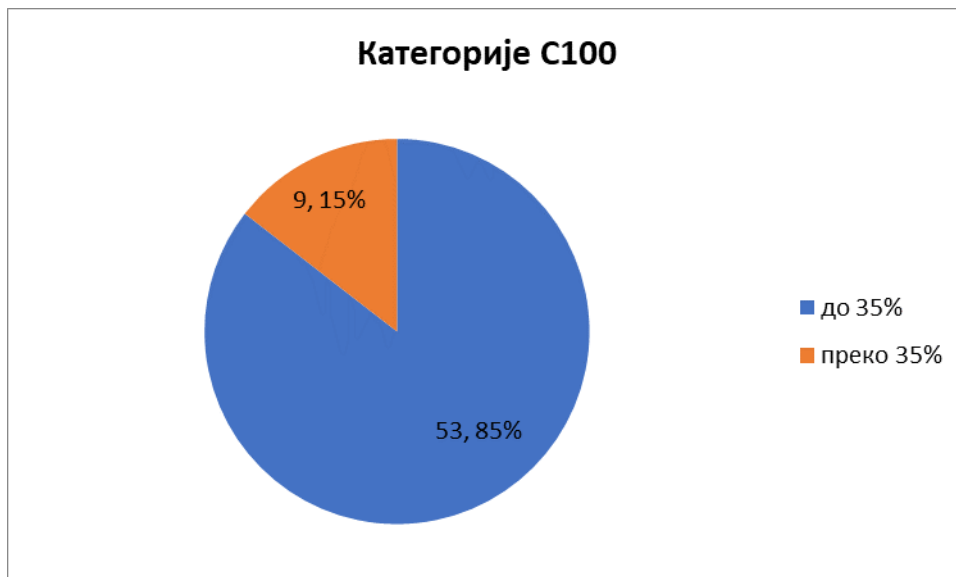
На графикону 2 приказано је да је 12,19% узорака без имунореактивности на дезмин, 42,68% узорака има до 35% имунореактивних ћелија на дезмин, а 8,13% узорака до 70% имунореактивних ћелија на дезмин.

На графикону 3 приказано је да нема узорака без имунореактивности на S100 протеин, да је 53,85% узорака са имунореактивношћу до 35%, а 9,15% узорака до 70% имунореактивности на S100 протеин.

Графикон бр.2



Графикон бр.3



Табела бр. 3 Дескриптивна анализа збуњујућих варијабли

Дескриптивна статистика								
	Број	Аритметичка средина	Стандардна девијација	Минимум	Максимум	Перцентили		
						25th	50th (Медијана)	75th
Године	62	70,4516	14,56436	33,00	93,00	62,7500	72,0000	83,2500
Систолни	62	128,7903	25,45786	50,00	210,00	120,0000	130,0000	140,0000
Дијастолни	62	72,9032	17,40427	,00	110,00	60,0000	75,0000	80,0000
Натријум	62	136,3871	6,10121	118,00	149,00	133,0000	137,0000	141,0000
Калијум	62	4,0355	,80084	2,30	5,70	3,5000	3,8500	4,7250
Креатинин	62	140,0161	74,32306	34,00	352,00	75,5000	136,5000	187,0000
Уреа	62	12,8871	5,71769	2,30	27,60	9,1750	11,8500	16,7250
Хемоглобин	62	130,5968	27,40854	68,00	177,00	107,5000	140,0000	149,5000
Еритроцити	62	4,1782	,70021	2,57	6,01	3,8425	4,1400	4,5225
Леукоцити	62	13,7413	6,34176	1,50	38,80	9,7000	11,4500	16,0250
Хенатокрит	62	,3719	,07405	,20	,54	,3107	,3840	,4210
Тромбоцити	62	243,0484	146,83306	50,00	574,00	143,0000	195,5000	375,2500
CRP	62	96,3015	90,33376	3,28	297,50	34,1250	59,8500	165,5000
Глукоза	62	8,8097	4,59582	3,80	26,80	5,7000	7,6000	10,9000

Код особа са унапредовалом атеросклерозом у интими коронарних артерија су присутне глатке мишићне ћелије које испољавају S-100 протеин у већој мери него глатке мишићне ћелије код особа са раним формама атеросклерозе, табела 4.

Табела бр. 4. Повезаност атеросклерозе и S100 протеина

Варијабла		Сви болесници (N=62)	Рана фаза (N=41)	Узнапредовала (N=21)	Статистика
S100	1,00 до 35%	57(100%)	41(71,9%)	16(28,1%)	$\chi^2 = 10,6;$ $p = 0,01$
	2,00 преко 70%	5	0(0%)	5(100%)	

Од 57 узорака који имају до 35% имунореактивних ћелија њих 16 (28,1%) има узнапредовалу атеросклерозу, а свих 5 узорака (100%) са преко 35% имунореактивних ћелија има узнапредовалу атеросклерозу.

Стадијум атеросклерозе (рана – узнапредовала) и категорија S100 (0, 1, 2) су повезани ($p = 0,003$). У групи са раном формом атеросклерозе сви испитаници имају до 35% имунореактивних ћелија. У групи са узнапредовалом атеросклерозом 16 узорака (76,2%) има до 35% имунореактивних ћелија, а 5 узорака (23,8%) има преко 35% имунореактивних ћелија, табела 4.

Код особа са узнапредовалом атеросклерозом у интими коронарних артерија су присутне глатке мишићне ћелије које испољавају виментин у већој мери него глатке мишићне ћелије код особа са раним формама атеросклерозе, табела 5.

Табела бр. 5. Повезаност атеросклерозе и виментина

Варијабла		Сви болесници (N=62)	Рана фаза (N=41)	Узнапредовала (N=21)	Статистика
Виментин	,00 без имунореактивности	14(22,6%)	14(34,1%)	0(10%)	$\chi^2 = 40,083;$ $p < 0,000$
	1,00 до 35%	33(53,2%)	27(65,9%)	6(28,6%)	
	2,00 преко 70%	15(24,2%)	0(0%)	15(71,4%)	

Врста атеросклерозе (рана – узнапредовала) и категорија виментина (0, 1, 2) су повезани ($p < 0,0005$). У групи са са раном формом атеросклерозе 14 узорака (34,1%) је без имунореактивности, 27 узорака (65,9%) има до 35% имунореактивних ћелија и нема узорака са преко 35% имунореактивних ћелија.

У групи са узнапредовалом атеросклерозом нема узорака без имунореактивности, 6 узорака (28,6%) има до 35% имунореактивних ћелија и 15 узорака (71,4%) има преко 35% имунореактивних ћелија.

Испитаници без имунореактивности немају узнапредовалну атеросклерозу (0%). Од 33 узорака који имају до 35% имунореактивних ћелија њих 6 (18,21%) има узнапредовалу атеросклерозу, а свих 15 узорака (100%) са преко 35% имунореактивних ћелија има узнапредовалу атеросклерозу, табела 5.

Код особа са узнатредовалом атеросклерозом у интими коронарних артерија су присутне глатке мишићне ћелије које испољавају дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије код особа са раним формама атеросклерозе, табела б.

Табела бр.6. Повезаност атеросклероза и дезмина

Варијабла		Сви болесници (N=62)	Рана фаза (N=41)	Узнатредовала (N=21)	Статистика
Дезмин	,00 без имунореактивности	12(19,4%)	8(19,5%)	4(19,0%)	$\chi^2 = 1,096$; $p = 0,578$
	1,00 до 35%	40(64,5%)	25(61,0%)	15(71,4%)	
	2,00 преко 70%	10(16,1%)	8(19,5%)	2(9,5%)	

Атеросклероза и категорија дезмина (0, 1, 2) нису повезани ($p = 0,578$), табела б.

Код особа са узнатредовалом атеросклерозом у интими коронарних артерија су присутне глатке мишићне ћелије које истовремено испољавају S100 протеин и виментин у већој мери, а дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије код особа са раним формама атеросклерозе.

Особе са узнатредовалом атеросклерозом имају различите клиничке и лабораторијске карактеристике у односу на особе сличног пола и старости са раним формама атеросклерозе.

Табела бр. 7. Таблица контингенције пол и атеросклероза

Варијабла		Сви болесници (N=62)	Рана фаза (N=31)	Узнатредовала (N=31)	Статистика
S100	1,00 мушки	41(66,1%)	17(54,8%)	14(45,2%)	$\chi^2 = 3,528$; $p = 0,60$
	2,00 женски	21(33,9%)	24(77,4%)	7(22,6%)	

Врста атеросклерозе (рана – узнатредовала) и пол нису повезани ($p = 0,107$), табела бр.7.

Табела бр.8. Табела групне статистика

Варијабле	Атеросклероза	Број	Средња Вредност	Стандардна Девијација	Средња Вредност Стандардне Грешке	Статистика
Године	1,00 узнапредовала	21	77,1429	10,81335	2,35967	T=2,7; p=0,008
	,00 рана фаза	41	67,0244	15,14841	2,36578	
Натријум	1,00 узнапредовала	21	137,4762	5,08546	1,10974	T=1,006; p=0,318
	,00 рана фаза	41	135,8293	6,54944	1,02285	
Калијум	1,00 узнапредовала	21	3,8333	,77996	,17020	T=1,435; p=0,157
	,00 рана фаза	41	4,1390	,80090	,12508	
Креатинин	1,00 узнапредовала	21	192,9048	76,68762	16,73461	T=4,635; p=0,008
	,00 рана фаза	41	112,9268	57,12066	8,92075	
Уреа	1,00 узнапредовала	21	14,9810	5,98946	1,30701	T=2,122; p=0,38
	,00 рана фаза	41	11,8146	5,33271	,83283	
Хемоглобин	1,00 узнапредовала	21	129,3333	26,63144	5,81146	T=0,258; p=0,797
	,00 рана фаза	41	131,2439	28,10230	4,38884	
Еритроцити	1,00 узнапредовала	21	4,3505	,53813	,11743	T=1,397; p=0,168
	,00 рана фаза	41	4,0900	,76115	,11887	

Разлике средњих вредности варијабле и ране и касне фазе атеросклерозе приказане су у табели 8.

Разлика средњих вредности година старости између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p = 0,008$).

Средња вредност година старости код ране атеросклерозе је $67,02 \pm 15,15$.

Средња вредност година старости код узнапредовале атеросклерозе је $77,14 \pm 10,81$.

Разлика средњих вредности креатинина између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p < 0,0005$).

Средња вредност креатинина код ране атеросклерозе је $112,93 \pm 76,69$.

Средња вредност креатинина код узнапредовале атеросклерозе је $192,90 \pm 76,69$.

Разлика средњих вредности урее између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p = 0,038$).

Средња вредност урее код ране атеросклерозе је $11,81 \pm 5,33$.

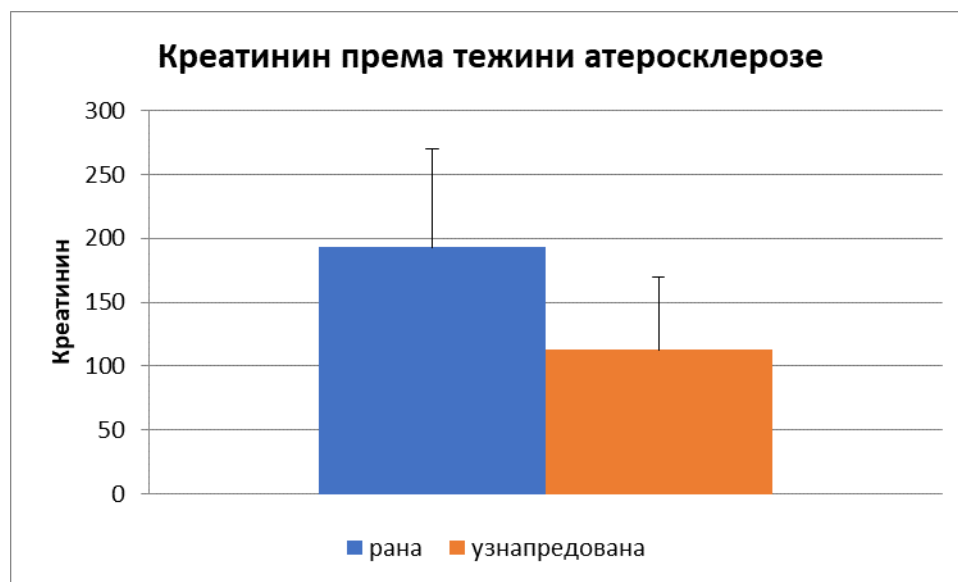
Средња вредност урее код узнапредовале атеросклерозе је $14,98 \pm 5,99$.

Табела бр. 9. Статистички тест збуњујућих варијабли

Варијабле	T	P
Године	-2,494	,013
Натријум	-,641	,522
Калијум	-1,222	,222
Креатинин	-3,935	,000
Уреа	-1,703	,088
Хемоглобин	-,060	,953
Еритроцити	-2,194	,028

Непараметерски тест (Ман-Витни) је показао да разлика вредности урее између ране и узнатредовале атеросклерозе није статистички значајна ($p = 0,088$). Овај тест је поузданији, јер расподела није нормална у обе популације, табела 9.

Графикон бр. 4



Табела бр. 10. Групна статистика збуњујућих варијабли

	Атеросклероза	Број	Средња вредност	Стандардна девијација	Средња Вредност Стандардне Грешке	Статистика
Леукоцити	1,00 узнапредовала	21	16,8671	7,60686	1,65995	T=2,931; p=0,003
	,00 рана фаза	41	12,1402	4,96416	,77527	
Хематокрит	1,00 узнапредовала	21	,3654	,06695	,01461	T=0,305 p=0,760
	,00 рана фаза	41	,3751	,07803	,01219	
Тромбоцити	1,00 узнапреовала	21	301,7619	138,44598	30,21139	T=2,685; p=0,007
	,00 рана фаза	41	212,9756	143,38227	22,39255	
CRP	1,00 узнапредовала	21	72,7995	70,91269	15,47442	T=0,885 p=0,376
	,00 рана фаза	41	108,3390	97,42422	15,21511	
Глукоза	1,00 узнапредовала	21	11,1619	6,32183	1,37954	T=2,209 p=0,027
	,00 рана фаза	41	7,6049	2,79910	,43715	

Разлика средњих вредности леукоцита између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p = 0,005$).

Средња вредност леукоцита код ране атеросклерозе је $12,87 \pm 4,96$.

Средња вредност леукоцита код узнапредовале атеросклерозе је $16,87 \pm 7,61$.

Разлика средњих вредности тромбоцита између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p = 0,023$).

Средња вредност тромбоцита код ране атеросклерозе је $301,76 \pm 138,45$.

Средња вредност тромбоцита код узнапредовале атеросклерозе је $212,96 \pm 143,38$.

Разлика средњих вредности глукозе између ране и узнапредовале атеросклерозе је статистички значајна ($p = 0,003$).

Средња вредност глукозе код ране атеросклерозе је $17,60 \pm 2,80$.

Средња вредност глукозе код узнапредовале атеросклерозе је $11,16 \pm 6,32$, табела 10.

Табела бр. 11. Групна статистика

	Атеросклероза	Број	Средња Вредност	Стандардна Девиијација	Средња Вредност Стандардне Грешке	Статистика
Систолни	1,00	21	134,2857	35,50654	7,74816	T=1,221; p=0,227
	узнапредована ,00 рана фаза	41	125,9756	18,27633	2,85428	
Дијастолни	1,00	21	74,2857	18,25416	3,98338	T=0,445; p=0,658
	узнапредована ,00 рана фаза	41	72,1951	17,14092	2,67696	

Систолни и дијастолни притисак се не разликују код ране и узнапредовале атеросклерозе, табела 11.

Удруженост вредности појединих параметара је испитана у одговарајућим статистичким моделима прилагођавајући за утицај збуњујућих варијабли.

Вредности натријума се не разликују значајно између испитиваних група $F=2,5$ ($df=3$, $p=0,070$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност калијума се не разликује значајно између испитиваних група $F=1,720$ ($df=3$; $p=0,173$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност креатинина се не разликује значајно између испитиваних група $F=6,246$ ($df=3$; $p=0,001$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност урее се не разликује значајно између испитиваних група $F=2,573$ ($df=3$; $p=0,063$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност хемоглобин се не разликује значајно између испитиваних група $F=0,238$ ($df=3$; $p=0,869$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност еритроцита се не разликује значајно између испитиваних група $F=0,922$ ($df=3$; $p=0,436$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност леукоцита се не разликује значајно између испитиваних група $F=2,608$ ($df=3$; $p=0,060$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност хематорита се не разликује значајно између испитиваних група $F=0,297$ ($df=3$; $p=0,828$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

Вредност тромбоцита се не разликује значајно између испитиваних група $F=1,471$ ($df=3$; $p=0,232$) када се модел прилагоди за утицај пола и година.

У претходним статистичким тестовима примењена је анализа коваријанси, која је требало да утврди да ли је разлика средњих вредности датих лабораторијских параметара између ране и узнатредовале атеросклерозе статистички значајна, при чему је отклоњен утицај година, старости и пола. Ово је у вези са хипотезом: Особе са узнатредовалом атеросклерозом имају различите клиничке и лабораторијске карактеристике у односу на особе сличног пола и старости са раним формама атеросклерозе. Може се рећи да су све статистички значајне разлике потврђене, сем за уреу, за коју је и непараметарски тест показао да разлика није значајна.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да су године старости значајно удружене са појавом атеросклерозе (OR=1,065, 95%CI 1,013-1,120, p=0,014), свака додатна година живота повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 6,5%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да пол пацијената не утиче значајно на појаву атеросклерозе (OR=0,354, 95%CI 0,118-1,064, p=0,064).

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да систолни притисак значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,014, 95%CI 0,991-1,036, p=0,229), свака додатни милиметар живиног стуба повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 1,4%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да дијастолни притисак значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,007, 95%CI 0,976-1,039, p=0,653), свака додатни милиметар живиног стуба повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 0,7%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да виментин значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=3,2359, 95%CI 0,013-., p=0,997), свака додатна вредност виментина повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 323,59%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да дезмин не утиче на појаву атеросклерозе (OR=0,763, 95%CI 0,313-1,861, p=0,552).

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да S100 протеин значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=4,140, 95%CI 0,000-., p=0,999), свака додатна вредност S100 протеина повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 414%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да натријум значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,048, 95%CI 0,957-1,148, p=0,315), свака додатна вредност натријума повећава додатни ризик за узнатредовалу атеросклерозу за 4,8%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да калијум не утиче на појаву атеросклерозе (OR=0,606, 95%CI 0,302-1,214, p=0,158).

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да креатинин значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,019, 95% CI 1,008-1,029, p=0,001), свака додатна вредност кратинина повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 1,9%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да уреа значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,107, 95% CI 1,003-1,222, p=0,044), свака додатна вредност урее повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 10,7%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да еритроцити значајно утичу на појаву атеросклерозе (OR=1,744, 95% CI 0,787-3,867, p=0,171), свака додатна вредност еритроцита повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 74,4%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да леукоцити значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,140, 95% CI 1,028-1,263, p=0,013), свака додатна вредност леукоцита повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 14%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да хематокрит не утиче на појаву атеросклерозе (OR=0,165, 95% CI 0,00-215,927, p=0,623).

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да CRP не утиче на појаву атеросклерозе (OR=0,995, 95% CI 0,988-1,002, p=0,148).

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да глукоза значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,213, 95% CI 1,044-1,411, p=0,012), свака додатна вредност глукозе повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 21,3%.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да хемоглобин не утиче на појаву атеросклерозе (OR=0,997, 95% CI 0,978-1,017, p=0,794), ризик се смањио за 0,3% за сваку додату јединицу хемоглобина.

Униварујабилним моделом бинарне логистичке регресије је установљено да тромбоцити значајно утиче на појаву атеросклерозе (OR=1,004, 95% CI 1,000-1,008, p=0,029), свака додатна вредност тромбоцита повећава додатни ризик за узрапредовалу атеросклерозу за 0,4%.

Униваријантна бинарна логистичка регресија је показала да на узрапредовалу атеросклерозу утичу године старости (p = 0,014), креатинин (p = 0,001), уреа (p = 0,044), леукоцити (p = 0,013), тромбоцити (p = 0,029) и глукоза (p = 0,012).

Табела бр. 12. Променљиве у једначини: Креатинин, Уреа, Године, Леукоцити, Глукоза

Варијабле	Вероватноћа	OR	95% интервал поверења за OR	
			Доња	Горња
Креатинин	0,007	1,032	1,009	1,056
Године	0,006	1,260	1,068	1,487
Леукоцити	0,005	1,432	1,117	1,835
Глукоза	0,044	1,586	1,012	2,484

Мултиваријантна бинарна логистичка регресија (која испитује истовремени утицај више варијабли) показала је да на појаву узнапредовале атеросклерозе утичу године старости ($p = 0,006$), креатинин ($p = 0,007$), леукоцити ($p = 0,005$) и глукоза ($p = 0,044$).

Количник ризика (odds ratio) година старости за појаву узнапредовале атеросклерозе је 1,260 (1,068 – 1,487), што значи да свака година старости више повећава ризик од настанка узнапредовале атеросклерозе за 26,0%.

Количник ризика (odds ratio) креатинина за узнапредовалу атеросклерозу је 1,032 (1,009 – 1,056), што указује да креатинин већи за 1, указује на 3,2% већи ризик присуства узнапредовале фазе атеросклерозе.

Количник ризика (odds ratio) леукоцита за узнапредовалу атеросклерозу је 1,432 (1,117 – 1,835), што значи да број леукоцита већи за једну хиљаду, указује на 43,2% већи ризик присуства узнапредовале атеросклерозе.

Количник ризика (odds ratio) глукозе за појаву узнапредовале атеросклерозе је 1,586 (1,012 – 2,484), што значи да глукоза већа за 1 повећава ризик од настанка узнапредовале атеросклерозе за 58,6%, табела 12.

Резултати који нису директно везани за хипотезе. Секундарна анализа.

Табела бр.13. Табела контингенције за пол и виментин, дезмин, S100 протеин

Варијабле		1,00 мушки пол	2,00 женски пол	Укупно	Статистика
Виментин	,00	8,6% (n=3)	14,8% (n=4)	11,3% (n=7)	T=0,970; p=0,616
	1,00	40,0% (n=14)	44,4% (n=12)	41,9% (n=26)	
	2,00	51,4% (n=18)	40,7% (n=11)	46,8% (n=29)	
	Укупно	100% (n=35)	100% (n=27)	100 (n=62)	
Дезмин	,00	22,9% (n=8)	14,8% (n=4)	19,4% (n=12)	T=1,686; p=0,430
	1,00	68,6% (n=24)	66,7% (n=18)	67,7% (n=42)	
	2,00	8,6% (n=3)	18,5% (n=5)	12,9% (n=8)	
	Укупно	100% (n=35)	100% (n=27)	100% (n=62)	
S100	,00	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	T=0,003; p=0,953
	1,00	85,7% (n=30)	85,2% (n= 23)	85,5% (n=53)	
	2,00	14,3% (n=5)	14,8% (n=4)	14,5% (n=9)	
	Укупно	100,0% (n=35)	100% (n=27)	100 (n= 62)	

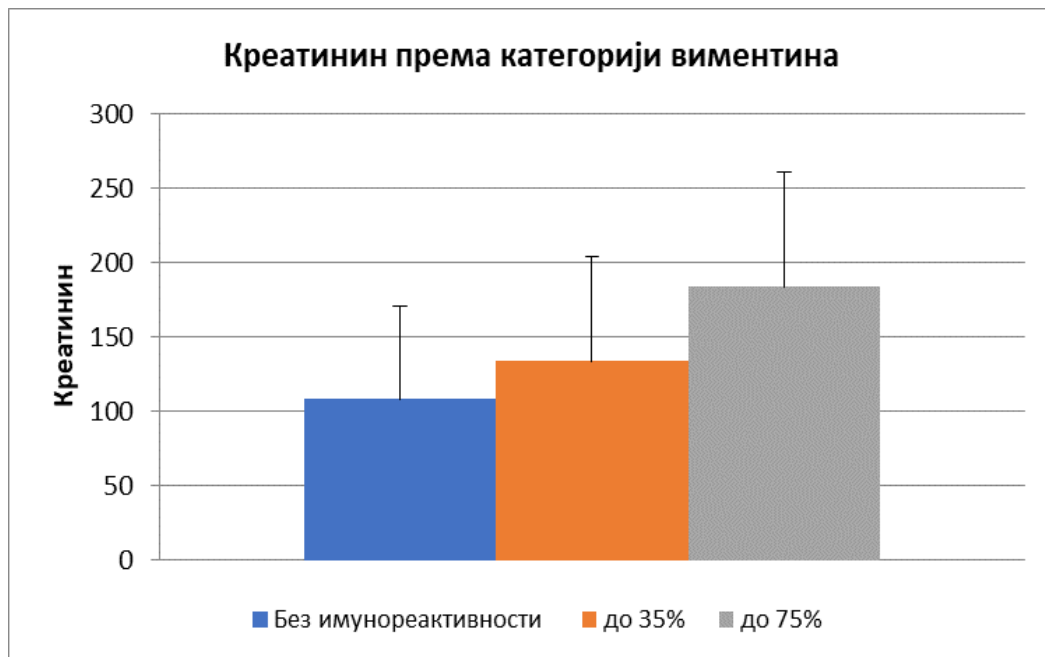
Пол и категорија виментина нису повезани ($p = 0,616$).

Пол и категорија дезмина нису повезани ($p = 0,430$).

Пол и категорија S100 протеина нису повезани ($p = 1,00$), табела 13.

Вредности студијских параметара су упоређиване између три групе имунореактивности, а разлике су тестиране АНОВА или Крускал Валисовом анализом.

Графикон бр. 5



Табела бр. 14. Дескриптивна статистика

		Број	Средња вредност	Стандардна девијација	Стандарна Грешка	95% интервал поверења за OR		Минимум	Максимум	Статистика
						Доња	Горња			
Еритроцити	,00 без имунореактивности	14	4,2236	,62526	,16711	3,8626	4,5846	3,62	6,01	$\chi^2=4,152$; $p=0,125$
	1,00 до 35%	33	4,0558	,78194	,13612	3,7785	4,3330	2,57	5,95	
	2,00 преко 70%	15	4,4053	,53200	,13736	4,1107	4,6999	3,11	5,40	
	Укупно	62	4,1782	,70021	,08893	4,0004	4,3560	2,57	6,01	
Леукоцити	,00 без имунореактивности	14	12,2464	5,60276	1,49740	9,0115	15,4814	1,50	21,80	$\chi^2=8,571$; $p=0,014$
	1,00 до 35%	33	12,2970	4,38167	,76275	10,7433	13,8506	7,00	23,20	
	2,00 преко 70%	15	18,3140	8,52336	2,20072	13,5939	23,0341	8,38	38,80	
	Укупно	62	13,7413	6,34176	,80540	12,1308	15,3518	1,50	38,80	
Хематокрит	,00 без имунореактивности	14	,3779	,06237	,01667	,3419	,4139	,31	,54	$\chi^2=0,064$; $p=0,969$
	1,00 до 35%	33	,3716	,08330	,01450	,3421	,4012	,20	,53	
	2,00 преко 70%	15	,3667	,06598	,01704	,3301	,4032	,28	,47	
	Укупно	62	,3719	,07405	,00940	,3530	,3907	,20	,54	
Тромбоцити	,00 без имунореактивности	14	227,5714	120,63978	32,24234	157,9161	297,2268	124,00	556,00	$\chi^2=2,366$; $p=0,306$
	1,00 до 35%	33	230,6061	159,28217	27,72747	174,1271	287,0851	55,00	574,00	
	2,00 преко 70%	15	284,8667	141,26867	36,47541	206,6347	363,0987	50,00	485,00	
	Укупно	62	243,0484	146,83306	18,64782	205,7598	280,3370	50,00	574,00	
CRP	,00 без имунореактивности	14	136,7714	103,33029	27,61618	77,1103	196,4326	15,00	297,50	$\chi^2=2,606$; $p=0,272$
	1,00 до 35%	33	84,9600	86,75182	15,10155	54,1991	115,7209	3,34	295,60	
	2,00 преко 70%	15	83,4807	79,50773	20,52881	39,4508	127,5106	3,28	273,00	
	Укупно	62	96,3015	90,33376	11,47240	73,3610	119,2419	3,28	297,50	

Глукоза	,00 без имунореактивности	14	7,5357	2,88567	,77123	5,8696	9,2019	3,80	13,60	$\chi^2=1,162;$ $p=0,559$
	1,00 до 35%	33	9,3333	5,43304	,94577	7,4069	11,2598	3,80	26,80	
	2,00 преко 70%	15	8,8467	3,81536	,98512	6,7338	10,9595	3,80	16,80	
	Укупно	62	8,8097	4,59582	,58367	7,6426	9,9768	3,80	26,80	

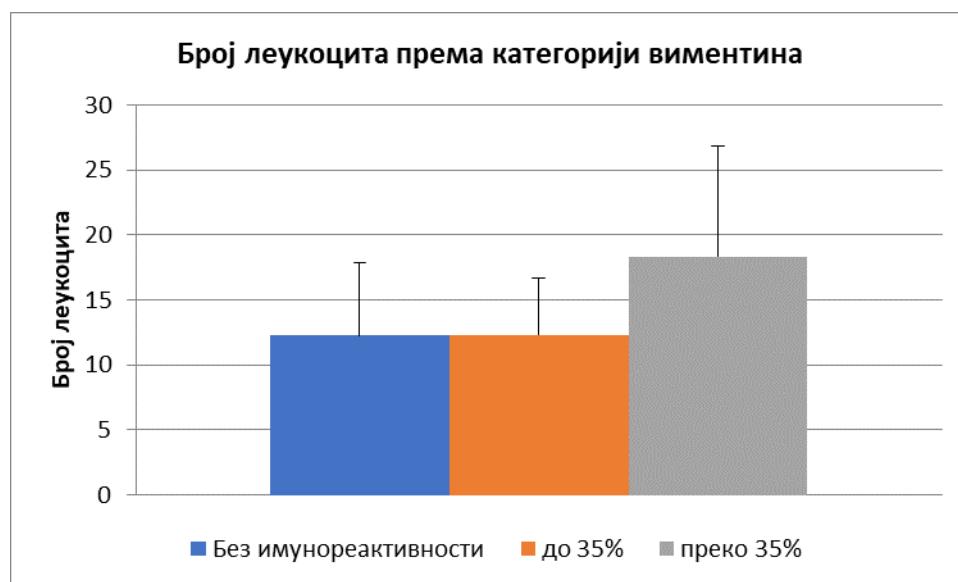
Разлике средњих вредности броја леукоцита између категорија виментина су статистички значајне ($p = 0,004$), табела 14.

Средња вредност броја леукоцита код особа без имунореактивности је $12,25 \pm 5,60$.

Средња вредност броја леукоцита код особа које имају до 35% имунореактивних ћелија је $12,30 \pm 4,38$.

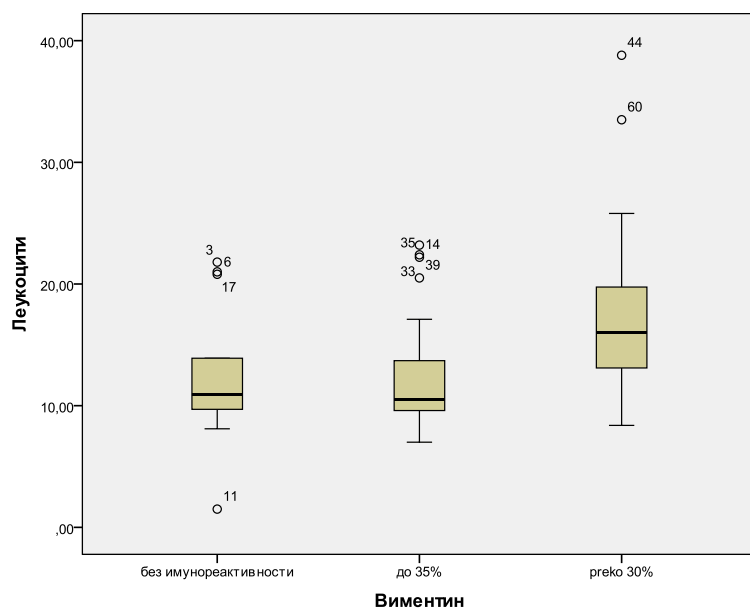
Средња вредност броја леукоцита код особа које имају преко 35% имунореактивних ћелија је $18,31 \pm 8,52$, графикон б.

Графикон бр. 6



Број леукоцита нема нормалну расподелу, табела 14.

Графикон бр. 7



Статистичким тестом је показано да нема статистички значајне разлике између категорија виментина и варијабли година, систолног и дијастолног притиска, добијене вредности за године ($\chi^2=5,715$; $p=0,057$), за систолни притисак ($\chi^2=4,265$; $p=0,119$), а за дијастолни ($\chi^2=4,669$; $p=0,097$).

Табела бр. 15. Корелација

Корелација						
			Виментин	Креатинин	Леукоцити	
Спирманов којефицијент	Виментин	Корелациони којефицијент	1,000	,351**	,288*	
		Асимптотска вероватноћа (двоструко тестирање)	.	,005	,023	
		Број	62	62	62	
	Креатинин	Корелациони којефицијент	,351**	1,000	,415**	
		Асимптотска вероватноћа (двоструко тестирање)	,005	.	,001	
		Број	62	62	62	
	Леукоцити	Корелациони којефицијент	,288*	,415**	1,000	
		Асимптотска вероватноћа (двоструко тестирање)	,023	,001	.	
		Број	62	62	62	
	** . Корелација ја значајна на нивоу 0.01 (двострана).					
	* . Корелација ја значајна на нивоу 0.05 (двострана).					

Процент имунореактивних ћелија (виментин) и креатинин су у позитивној корелацији ($r = 0,3331$ $p = 0,005$) тј. већој категорији виментина одговара већа вредност креатинина, табела 15.

Анализом је показано да нема статистички значајне разлике између категорија дезмина и варијабли: натријум, калијум, креатинин, уреа, хемоглобин, еритроцити, леукоцити, хематокрит, тромбоцити, CRP, глукоза. Добијени су следећи резултати и то за натријум ($\chi^2=0,711$; $p=0,701$), калијум ($\chi^2=0,972$; $p=0,615$), креатинин ($\chi^2=1,156$; $p=0,561$), уреа ($\chi^2=0,209$; $p=0,901$), хемоглобин ($\chi^2=2,445$; $p=0,294$), еритроцити ($\chi^2=3,996$; $p=0,136$), леукоцити ($\chi^2=1,332$; $p=0,514$), хематокрит ($\chi^2=0,671$; $p=0,715$), тромбоцити ($\chi^2=0,909$; $p=0,635$), CRP ($\chi^2=0,015$; $p=0,993$), глукоза ($\chi^2=0,103$; $p=0,950$).

Статистичким тестом је показано да нема статистички значајне разлике између категорија дезмин и варијабли године, систолни и дијастолни притисак. Добијене су следеће вредности и то за године ($\chi^2=0,417$; $p=0,812$), дијастолни притисак ($\chi^2=2,547$; $p=0,280$) и систолни притисак ($\chi^2=0,381$; $p=0,826$).

Статистичким тестом су добијени резултати да нема статистички значајне разлике између категорија S100 протеина и варијабли натријум, калијум, креатинин, уреа, хемоглобин еритроцити, леукоцити, хематокрит, тромбоцити, CRP, глукоза. Добијени су следећи резултати и то за натријум ($\chi^2=0,003$; $p=0,959$), калијум ($\chi^2=0,004$; $p=0,948$), креатинин ($\chi^2=1,415$; $p=0,234$), уреа ($\chi^2=0,150$; $p=0,698$) и хемоглобин ($\chi^2=1,124$; $p=0,289$), еритроцити ($\chi^2=0,338$; $p=0,561$), леукоцити ($\chi^2=0,281$; $p=0,596$), хематокрит ($\chi^2=0,369$; $p=0,543$), тромбоцити ($\chi^2=3,710$; $p=0,054$), CRP ($\chi^2=2,32$; $p=0,127$), глукоза ($\chi^2=3,762$; $p=0,052$).

Табела бр. 16. Дескриптивна статистика

		Број	Средња вредност	Стандардна девијација	Стандардна Грешка	95% интервал поверења за OR		Минимум	Максимум	Статистика
						Доња	Горња			
Еритроцити	1,00 до 35%	57	4,1714	,72928	,09660	3,9779	4,3649	2,57	6,01	$\chi^2=0,338$; $p=0,561$
	2,00 преко 70%	5	4,2560	,15126	,06765	4,0682	4,4438	4,09	4,42	
	Укупно	62	4,1782	,70021	,08893	4,0004	4,3560	2,57	6,01	
Леукоцити	1,00 до 35%	57	13,5882	6,33331	,83887	11,9078	15,2687	1,50	38,80	$\chi^2=0,281$; $p=0,596$
	2,00 преко 70%	5	15,4860	6,90167	3,08652	6,9165	24,0555	9,23	25,80	
	Укупно	62	13,7413	6,34176	,80540	12,1308	15,3518	1,50	38,80	
Хематокрит	1,00 до 35%	57	,3714	,07501	,00993	,3515	,3913	,20	,54	$\chi^2=0,369$; $p=0,543$
	2,00 преко 70%	5	,3770	,06946	,03106	,2908	,4632	,30	,43	
	Укупно	62	,3719	,07405	,00940	,3530	,3907	,20	,54	
Тромбоцити	1,00 до 35%	57	232,5088	143,63099	19,02439	194,3983	270,6192	50,00	574,00	$\chi^2=3,710$; $p=0,054$
	2,00 преко 70%	5	363,2000	142,62784	63,78511	186,1041	540,2959	202,00	490,00	
	Укупно	62	243,0484	146,83306	18,64782	205,7598	280,3370	50,00	574,00	
CRP	1,00 до 35%	57	101,2451	92,17558	12,20895	76,7876	125,7026	3,34	297,50	$\chi^2=2,327$; $p=0,127$
	2,00 преко 70%	5	39,9440	34,28821	15,33415	-2,6304	82,5184	3,28	74,10	
	Укупно	62	96,3015	90,33376	11,47240	73,3610	119,2419	3,28	297,50	
Глукоза	1,00 до 35%	57	8,3649	4,00818	,53090	7,3014	9,4284	3,80	25,30	$\chi^2=3,762$; $p=0,052$
	2,00 преко 70%	5	13,8800	7,88873	3,52795	4,0849	23,6751	7,30	26,80	
	Укупно	62	8,8097	4,59582	,58367	7,6426	9,9768	3,80	26,80	

Разлика средњих вредности глукозе између особа које имају до 35% имунореактивних ћелија (S100) је статистички значајна ($p = 0,009$).

Средња вредност глукозе код особа које имају до 35% имунореактивних ћелија је $8,36 \pm 4,01$. Средња вредност глукозе код особа које имају преко 35% имунореактивних ћелија је $13,88 \pm 7,89$, табела 16.

Статистичким тестом су добијени статистички резултати да не постоји статистички значајна разлика између категорије S100 протеин и варијабли године, систолни и дијастолни притисак. Добијени су следећи резултати, и то за варијаблу године ($\chi^2=2,451$; $p=0,117$), систолни притисак ($\chi^2=0,017$; $p=0,896$) и дијастолни ($\chi^2=0,817$; $p=0,366$).

Табела бр. 17. Корелација

			S100	Леукоцити	Тромбоцити
Спирманов којефицијент	S100	Корелациони којефицијент	1,000	,068	,247
		Вероватноћа двострано	.	,600	,053
		Број	62	62	62
	Леукоцит и	Корелациони којефицијент	,068	1,000	,352**
		Асимптотска вероватноћа (двоструко тестирање)	,600	.	,005
		Број	62	62	62
	Тромбоци ти	Корелациони којефицијент	,247	,352**	1,000
		Вероватноћа двострано	,053	,005	.
		Број	62	62	62

** . Корелација је значајна на нивоу 00.1 (двострана).

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Старост и пол испитаника

Анализом наших узорака утврђено је да није било статистичке значајне разлике међу испитаницима оба пола. Утврђено је да су међу испитаницима подједанко заступљени пацијенти мушког и женског пола. Од укупно 62 испитаника, није било статистички значајне разлике између мушкараца и жена у обољевању и морфолошким манифестацијама атеросклеротичних лезија. Према резултатима наше студије, атеросклероза је била подједнако заступљена код мушкараца и код жена, односно наши резултати су показали да полна дистрибуција није повезана са стадијумом атеросклерозе (рана – узнатрдовала).

С друге стране, показано је да је разлика средњих вредности година старости између ране и узнатрдовале атеросклерозе статистички значајна. Средња вредност година старости код ране атеросклерозе била је $67,02 \pm 15,15$, док је средња вредност година старости код узнатрдовале атеросклерозе била $77,14 \pm 10,81$.

Дакле, наши резултати показали су да пол нема значајну улогу у односу на фазу атеросклерозе, али су године старости статистички значајне односно, узнатрдовала атеросклероза је чешћа у старијем добу пацијената (у нашој студији 71,4 године).

Према литературним подацима о полној дистрибуцији и фазама атеросклерозе, генерално раст плака и маркери запаљења као предиктори нежељених кардиоваскуларних компликација, чешћи су код мушкараца него код жена. Међутим, према новијим епидемиолошким студијама показано је да, иако су млађе жене релативно заштићене од кардиоваскуларне болести, након шездесете године инциденца инфаркта миокарда код жена вероватноћа превазилази инциденцу код мушкараца. Студије на анималним моделима, показале су да животиње мушког пола развијају већи број мањих плакова са интензивнијим запаљењским инфилтратом у поређењу са женкама (Mann et al, 2020; Virani et al, 2020). Наши резултати били би у сагласности са претходно наведеним литературним подацима.

Статистичким методама испитиване су прве две хипотезе наше студије којима смо претпоставили да су у узнатрдовалим лезијама у интими коронарних артерија присутне глатке мишићне ћелије које испољавају виментин и S-100 протеин у већој мери него глатке мишићне ћелије у раним стадијумима атеросклерозе, као и да су у узнатрдовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне глатке мишићне ћелије које испољавају дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије у раним формама атеросклерозе.

Резултати наше студије показали су следеће.

5.2. Присуство виментина

Испитивање имунохистохемијске дистрибуције виментина показало је да је ова дистрибуција значајно већа у узрапредовалим формама атеросклерозе. Резултати наше студије показали су изостанак имунореактивности на виментин у седам узорака, у 26 узорака утврђено је до 35% имунореактивних ћелија, док је код 29 узорака, имунореактивност на виментин била присутна у до 70% имунореактивних ћелија, што виментин ставља у категорију статистички значајне варијабле у атеросклерози.

Хи квадрат тестом утврђена је статистичка повезаност експресија виментина и стадијума лезије, односно да степен експресије виментина (фенотипски статус глатких мишићних ћелија) утиче на патохистолошку манифестацију стадијума атеросклерозе. Већи проценат интималних глатких мишићних ћелија код узрапредовалих стадијума експримира виментин, него што је то случај код раних форми атеросклерозе. У раним лезијама, експресија виментина није прелазила 35% имунореактивних ћелија, а код узрапредовалих лезија, није било узорака без експресије виментина, док 71,4% има експресију преко 35%.

Овакав резултат нам указује да је висока експресија виментина (изнад 35%) искључиво карактеристика узрапредовалих фаза атеросклерозе.

Даљом анализом наших резултата који се односе на експресију виментина закључујемо да су стадијум атеросклерозе и категорија виментина односно степен његове експресије повезани. У групи са раним стадијумима атеросклерозе, 34,1% узорака било је без имунореактивности, 65,9% имало је до 35% имунореактивних ћелија, а није било узорака са преко 35% имунореактивних ћелија.

У групи са узрапредовалом атеросклерозом, сви узорци показали су присуство имунореактивности, при чему је 28,6% имало до 35% имунореактивних ћелија, а 71,4% узорака имало је преко 35% имунореактивних ћелија.

Узорци без имунореактивности хистоморфолошки су одговарали раним стадијумима атеросклерозе. Од 33 узорка са до 35% имунореактивних ћелија, њих 6 (или 18,21%) имало је узрапредовалу фазу и свих 15 узорака (или 100%) са преко 35% имунореактивних ћелија имало је узрапредовалу атеросклерозу.

Овакав резултат сугерише да је експресија преко 35% имунореактивности заступљена код свих узорака (100%) са узрапредовалом формом, што значи да није било узорка узрапредовале фазе без експресије виментина преко 35%.

Овакви резултати такође сугеришу да се током развоја атеросклерозе повећава број виментин-имунореактивних ћелија у субендотелу интимае.

5.3. Присуство дезмина

Испитивањем имунореактивности на дезмин, код 12 узорака утврђен је изостанак имунореактивности, код 42 узорка је потврђено до 35% имунореактивних ћелија, док је код 8 узорака било до 70% имунореактивних ћелија. Свега 8 од 62 узорка показало је имунореактивност на дезмин до 70%, што указује да имунореактивност на дезмин не

представља статистички значајну варијаблу код оболелих од атеросклерозе како у раним, тако и у узрапредовалим лезијама, јер овај маркер високодиференцираног контрактилног фенотипа већ у раним фазама губи своју експресију и то одсуство потврђује синтетски фенотип ћелија.

Овакав резултат сугерише да дезмин није статистички значајна варијабла код пацијената са атеросклерозом, с обзиром на то да глатке мишићне ћелије већ у иницијалним фазама развоја атеросклерозе губе контрактилне карактеристике.

Хи квадрат тестом испитивана је даље повезаност имуноекспресије дезмина и стадијума атеросклерозе. Утврђено је да код узорака са узрапредовалом атеросклерозом, процентуално мањи број интималних глатких мишићних ћелија експримира дезмин него код узорака са раним формама атеросклерозе. Међутим, експресија дезмина, на основу статистичких резултата наше студије, указује да стадијум атеросклерозе и експресија дезмина нису статистички повезани.

Резултати експресије виментина и дезмина добијени у нашој студији у сагласности су са доступним литературним подацима.

Резултати испитивања фенотипског статуса глатких мишићних ћелија у атеросклеротичним лезијама других аутора, показали су да од стадијума масне траке глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа чине највећи део ћелијске популације у лезији, при чему је развој синтетског фенотипа праћен је редукцијом миофиламената (НАО et al, 2003; Лацковић и Вуковић, 2006; Rensen et al, 2007; Gomez and Owens 2012; Tanasković i sar, 2013). Глатке мишићне ћелије синтетског фенотипа експримирају α -глаткомишићни актин и виментин, уз изостанак експресије дезмина. Губитак експресије дезмина који је маркер високо диференцираног контрактилног фенотипа представља показатељ фенотипске модулације из контрактилног у синтетски фенотип (НАО et al, 2003; Asanpoga et al, 2010; Gomez and Owens, 2012).

Према другим студијама, присуство α -глаткомишићног актина, односно, експресија његовог кодирајућег гена АСТА2, представља основну карактеристику васкуларне глаткомишићне ћелијске линије од ембрионалног периода диференцијације глатких мишићних ћелија. Током миграције глатких мишићних ћелија из медије у интиму, њихове пролиферације и фенотипске модулације, долази до делимичног губитка експресије и ове цитоскелетне структуре (Gomez and Owens, 2012). Међутим, упоредо са смањеном експресијом контрактилних филамената интималних и медијалних глатких мишићних ћелија током васкуларног ремоделовања у атеросклерози, адвентицијални фибробласти почињу да синтетишу контрактилне филаменте и подлежу фенотипској модулацији у миофибробласте. Експресију α -глаткомишићног актина и његову уградњу у стрес-влакна уз тропомиозин као везујући протеин, стимулише трансформишући фактор раста $\beta 1$ (енгл. *Transforming Growth Factor $\beta 1$ - TGF $\beta 1$*) (Prunotto et al, 2015).

Резултати студија других аутора показали су да контрактилни и синтетски фенотип карактерише различита експресија цитоскелетних структура карактеристичних за глатке мишићне ћелије. Осим глаткомишићног актина који се интензивно експримира у контрактилном фенотипу, а нешто слабије у синтетском, разлике постоје и у експресији

других цитоскелетних структура. Тешки ланци глаткомишићног миозина (енгл. *Smooth muscle myosin heavy chains* – MYH11) карактеристични су за контрактилни фенотип, док њихова експресија у синтетском фенотипу изостаје (Hao et al, 2003; Rensen et al, 2007; Gomez and Owens, 2012). Контрактилни фенотип карактерише и експресија трансгелина (енгл. *Smooth muscle 22α* – TAGLN), смутелина (енгл. *Smoothelin*), калпонина (енгл. *Calponin* – CNN1), алфа-глаткомишићног тропомиозина (енгл. *Smooth muscle α-tropomyosin*), тешких ланаца калдесмона (енгл. *Heavy-caldesmon chains* – H-caldesmon), метавинкулина (енгл. *Metavinculin*) и лејомодина-1 (енгл. *Leiomodin-1* – LMOD1). Ове цитоскелетне структуре не експримирају се у синтетском фенотипу (Rensen et al, 2007; Choi et al, 2009; Gomez and Owens, 2012; Nanda and Miano, 2012).

Такође, литературни подаци нам указују да је експресија дезмина карактеристична за високодиференцирани контрактилни фенотип. Дезмин је протеински молекул тежине 53,5 кДа кодиран DES геном лоцираним на дугом краку другог хромозома. Представља интермедијарни филамент специфичан за мишићно ткиво, односно, гради интермедијарне филаменате диференцираних глатких, скелетних и срчаних мишићних ћелија. Глатке мишићне ћелије крвних судова „сазревањем“ контрактилног фенотипа током ембриогенезе стичу и експресију овог филамента (Li et al, 1989; Li et al, 1997).

С друге стране, васкуларне глатке мишићне ћелије захваљујући свом мезенхимском пореклу експримирају виментин. Према подацима из литературе, виментин је интермедијарни филамент тип III и његова експресија је уобичајена у свим ћелијама мезенхимског порекла (Mendez et al, 2010). Међутим, ген за виментин (VIM) има усходну регулацију у патолошким процесима, попут метастатског процеса. Тачан механизам којим *Twist* протеин, кодиран *TWIST1* геном остварује усходну регулацију експресије виментина, није сасвим познат. Према истим резултатима, повећана експресија виментина инхибира апоптозу на више нивоа, а између осталог и инхибицијом p53 и подстиче ћелијску миграцију посредством PI3K/Akt (енгл. *Phosphatidyl-Inositol-3-OH-Kinase* - PI3K; *Protein kinase B* - Akt), сигналног пута који у ћелијама регулише метаболизам глукозе, апоптозу, пролиферацију, транскрипцију и ћелијску миграцију (Zhu et al, 2010; Usman et al, 2021).

Виментин у глатким мишићним ћелијама укључен је такође и у транспорт холестерола. С друге стране, oxLDL индукује секрецију виментина у више ћелијских типова. Екстрацелуларни виментин даље активира NF-κβ сигнални пут и подстиче пролиферацију ћелија (Kim et al, 2020). Резултати наше студије који показују виментин-имунореактивне пенасте ћелије у сагласности су са овим литературним подацима.

Поредећи резултате наше студије са литературним подацима, закључујемо да присуство виментин-имунореактивних ћелија указује на губитак њихових контрактилних карактеристика, дедиференцијацију и синтетски фенотип. Губитком контрактилног фенотипа и за овај фенотип карактеристичне дезминске експресије (фенотипском модификацијом ћелије из контрактилног у синтетски фенотип), запажа се експресија виментинских филамената које ћелије поседују захваљујући свом мезенхимском пореклу (Acampora et al, 2010; Allahverdian et al, 2018).

Осим различите експресије виментина и дезмина код синтетског односно, контрактилног фенотипа глатких мишићних ћелија, познато је да разлика постоји и у експресији других цитоскелетних структура. За синтетски фенотип карактеристична експресија цитокератина 8 и 18, протеина зонуле оклуденс 2 и цингулина, док у контрактилном фенотипу експресија ових компоненти цитоскелета изостаје (Ehler et al, 1995; Cao et al, 2022)

Од трансмембранских протеина, за контрактилни фенотип карактеристична је експресија $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ интегрина, док је за синтетски фенотип карактеристична експресија $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ интегрина, ICAM-1, VCAM-1 и конексина 43, рецептора карактеристичних за синтетски фенотип попут *Toll-like* рецептора или RAGE (енгл. *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* - RAGE). Међу цитокинима који прате синтетски фенотип глатких мишићних ћелија аутори који су истраживали ову корелацију издвајају: моноцитни хемоатрактантни протеин-1, интерлеукини 1 β и 6, и туморски фактор некрозе α , од којих су сви карактеристични за иницијалну фазу атеросклерозе, што сугерише на утицај глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа у субендотелу интима на патогенезу атеросклерозе (Pickering et al, 2000; Cheng et al, 2007; Orr et al, 2010; Tabas et al, 2015; Finney et al, 2017).

Фенотипска модулација глатких мишићних ћелија из контрактилног у синтетски фенотип представља главну карактеристику васкуларног ремоделовања током развоја атеросклерозе, али и током развоја рестенозе након ангиопластике или постављања стента или током формирања преатеросклеротског дифузног интималног задебљања (Nakashima et al, 2008). Васкуларно ремоделовање у атеросклерози представља структурну и функционалну адаптацију зида крвног суда у условима повећаног притиска (Ashraf and Zen, 2021).

Истраживања су показала да адаптивна интимална пролиферација (“рани одговор зида”) током процеса ремоделовања, нема механизме негативне повратне спреге и прогредира у интималну хиперплазију. У примарном одговору зида на услове повећаног притиска, долази до компензаторне дилатације лумена крвног суда, а затим до пролиферације ендотелних ћелија. Након ендотелне пролиферације, почиње период пролиферације глатких мишићних ћелија тунике медије, њихова миграција у субендотел интима, синтеза повећане количине екстрацелуларног матрикса састављеног предоминантно од протеогликана, што доводи до последичног задебљања зида (Xu et al, 2001).

Након периода пролиферације ћелија и задебљања субендотела интима, долази до активације апоптозе ћелија у васкуларном зиду. Повећана синтеза колагена и еластина током периода пролиферативне активности ћелија, доводи до стварања иреверзибилног задебљања зида које остаје у каснијим фазама атеросклеротичне лезије, упркос активацији апоптозе, којом се само смањује број ћелија, па лезија прогредира у хипоцелуларне задебљале плакове атерома и фиброатерома (Andreeva et al, 1997; Xu et al, 2001).

Фенотипска модификација интималних и медијалних глатких мишићних ћелија (на коју упућује губитак дезминске експресије уз истовремену појаву експресије виментина), почиње у стадијуму масне траке, док у стадијуму преатерома ћелије синтетског фенотипа чине доминантну ћелијску популацију (Xu, 2002; Gu et al, 2019; Wang, 2019).

Интермедијарну лезију такође карактерише присуство великог броја пенастих ћелија различитог порекла. Према литературним подацима, неке од пенастих ћелија потичу од моноцитно-макрофагне лозе, док друге потичу од глатких мишићних ћелија синтетског фенотипа (Wang, 2019; Sorokin et al, 2020). Пенасте ћелије које потичу од глатких мишићних ћелија показују имунореактивност на виментин или S-100 протеин. Применом трансмисионе електронске микроскопије запажа се да су ове пенасте ћелије вретенастог облика, са добро диференцираном базалном ламином, да садрже мањи број липидних капи у цитоплазми, кавеоле и густа тела, што упућује на њихово глаткомишићно порекло (Tanaskovic et al, 2013).

5.4. Присуство S100 протеина

Од компоненти екстрацелуларног матрикса, синтетски фенотип глатких мишићних ћелија прати експресија следећих протеина: колагена VIII, остеопонтин, матриксних металопротеиназа 2 и 9, плазминоген активатора типа урокиназе, ткивно-специфичних активатора плазминогена, калцијум-везујућих протеина, међу којима су S-протеин и калмодулин (Coen et al, 2013).

Испитивањем дистрибуције S100 протеина, резултати наше студије показали су да нема узорка без имунореактивности на S100 протеин. Имунореактивност ћелија на S100 протеин до 35% била је присутна код 53 узорка, док је код 9 узорака утврђено до 70% имунореактивних ћелија на S100 протеин.

Овакав резултат сугерише да је експресија S100 протеина статистички значајна варијабла како код раних, тако и код узнатредовалих форми атеросклерозе, односно, да овај протеин има јако високу специфичност и представља значајну варијаблу у тумачењу развоја процеса атеросклерозе код испитаника. Такође, код узнатредовалих форми атеросклерозе, у интими коронарних артерија присутан је процентуално већи број глатких мишићних ћелија које испољавају S100 протеин, него што је то случај у раним формама.

Даљом статистичком анализом утврђено је да су стадијум атеросклерозе (рана – узнатредовала) и степен експресије S100 протеина (0, 1, 2) повезани. У групи са раном формом атеросклерозе сви узорци имали су до 35% S100 протеин-имунореактивних ћелија. У групи са узнатредовалом формом, 16 испитаника (76,2%) имало је до 35%, а 5 испитаника (23,8%) преко 35% имунореактивних ћелија. Из овога бисмо могли да закључимо да су сви узорци имали експресију S100 протеина, с тим што је код раних лезија ова експресија била до 35%, док је код узнатредовалих лезија било преко 35% имунореактивних ћелија.

Такође, од педесет седам анализираних узорака који имају до 35% имунореактивних ћелија, код њих 16 (28,1%) утврђена је узнатредовала атеросклероза, а свих 5 испитаника (100%) са преко 35% имунореактивних ћелија, имало је узнатредовалу лезију атеросклерозе.

Овакав резултат би могао да укаже да имунореактивност до 35% није дефинитивни параметар који одређује стадијум атеросклерозе. Чак и група која је имала до 35%

имунореактивних ћелија обухватала је узорке са узнатредовалом формом, док је група са експресијом преко 35%, обухватала само узнатредовале стадијуме атеросклерозе.

Овакви резултати статистичке анализе експресије праћених маркера фенотипских карактеристика атеросклерозе потврђују прве две хипотезе наше студије, по којима глатке мишићне ћелије узнатредовалих лезија експримирају у већој мери виментин и S-100 протеин, а у мањој мери дезмин у поређењу са раним фазама лезије. Овакав резултат такође сугерише да глатке мишићне ћелије прогресијом атеросклерозе губе контрактилне карактеристике.

У сагласности са тим су и други резултати анализе у којима је Хи квадрат тестом утврђено да већи проценат глатких мишићних ћелија интима коронарних артерија узнатредовалих форми атеросклерозе испољава S-100 протеин и виментин, него у раним формама, док је проценат дезмин-имунореактивних глатких мишићних ћелија мањи у узнатредовалим, него у раним формама.

Овакви резултати такође потврђују да глатке мишићне ћелије узнатредовалих лезија које у већем проценту губе контрактилне карактеристике и за њих специфичну дезминску експресију, упоредо, а највероватније услед апоптозе или некрозе, почињу да експримирају S100 протеин. До експресије S100 протеина у раним фазама, с друге стране, највероватније долази услед миграције и пролиферације, карактеристичних за стадијуме иницијалне фазе, масне траке и преатерома.

Такође, резултати испитивања експресије S100 протеина у нашој студији који су нам показали да су стадијум атеросклерозе и експресија овог протеина повезани, као и чињеница да глатке мишићне ћелије без обзира на стадијум, могу да експримирају овај протеин, а да га само неке од њих експримирају, сугерише да ове ћелије као своје иманентно својство поседују потенцијал за експресију S100 протеина, а да ће до те експресије доћи уколико се оне нађу у неком од процеса посредованим Ca⁺⁺.

Познато је наиме, да је експресија интрацелуларних подтипова S100 протеина повезана са процесима који имају Ca⁺⁺ посредовану регулацију, попут диференцијације, пролиферације, инфламације, апоптозе, репарације ткива. Каснија истраживања показала су да се у наведеним ћелијама S-100 протеин се налази и у једру и у цитоплазми, своје регулаторне ефекте испољавају три начина и то интрацелуларно, екстрацелуларно као и интрацелуларно и екстрацелуларно (Donato et al, 2003; 2009; 2013).

До сада је познато да се суперфамилија S100 протеина састоји од 25 различитих подтипова. Иницијално се сматрало да се S-100 протеин експримирају у ћелијама пореклом од нервног гребена (Kuberappa et al, 2016), а њихово присуство је утврђено у глијалним и епендималним ћелијама CNS-а, Швановим ћелијама периферног нервног система, меланоцитима, хондроцитима, адипоцитима, кардиомиоцитима, глатким и срчаним мишићним ћелијама, хистиоцитима и Лангерхансовим ћелијама, као и интердигитантним ретикуларним ћелијама лимфних чворова (Donato et al, 2013; Kuberappa et al, 2016; Bertheloot et al, 2017).

Интрацелуларне функције S100 протеина и њихова корелација са резултатима нашег истраживања. Бројне су студије које нам пружају увид у синтезу, механизме дејства и ткивно/ћелијски специфичне интрацелуларне функције чланова породице S100 протеина, које разматрамо с обзиром да је у нашем истраживању примењено поликлонско примарно антителио на S100 протеин.

Према датим литературним подацима, први идентификовани члан ове фамилије била је комбинација S100B и S100A1 протеина, названа S100. Протеин S100A1 експримира се у скелетним миоцитима, кардиомиоцитима и појединим неуронима, дифузно у цитоплазми, повезан са елементима цитоскелета и митохондријама (Donato, 2001), док се S100B експримира у астроцитима, Швановим ћелијама, меланоцитима, адипоцитима, сателитским ћелијама, дендритским ћелијама, хондроцитима, у којима промовише пролиферацију и миграцију и инхибира апоптозу и диференцијацију (Donato, 2009). Протеин S100A2 је тумор-супресор који своје дејство остварује највероватније преко унутрашњег пута активације апоптозе, посредством p53, а S100A3 је присутан у фоликулу длаке и астроцитомима (Kizava et al, 2008; Donato et al, 2013). Donato et al нам пружају увид и у функцију других чланова ове породице - S100A4 присутан је у туморским ћелијама где интерреагује са актинским филаментима и тешким ланцима немишићног миозина и тако утиче на миграцију и метастатски процес (Garret et al, 2006; Donato et al, 2013), као и протеини S100A5, S100A6 и S100A7 који су такође присутни у туморским ћелијама где утичу на цитоскелетну динамику и субсеквентну ћелијску пролиферацију, а у случају S100A6 и апоптозу (Hancq et al, 2004; Slomnicki et al, 2009; Deol et al, 2011). И друга истраживања нам указују да неки од подтипова S100 протеина имају утицај на кретање леукоцита, да утичу на неоваскуларизацију и раст туморских ћелија, као и да доприносе метастатском процесу (Fei et al, 2017; Gonzales et al, 2020). Протеини S100A8 и S100A9, као и њихов комплекс S100A8/S100A9 имају значајну улогу у атеросклерози, па ће бити посебно размотрени. Остали чланови породице имају широк дијапазон функција. Протеин S100A10 (или анексин-2 лаки ланац) представља трансмембрански протеин који модулира интрацелуларне циљне протеине (првенствено протеине плазмалеме и протеине мембране раних ендозома) у одговору на интрацелуларне калцијумове сигнале, при чему највероватније има улогу транспортног протеина (Svenningsson et al, 2006; Rescher and Gerke, 2008); S100A11 интрацелуларно учествује у сигналним путевима који инхибирају раст појединих ћелија попут кератиноцита подстакнут било инфлуксом јона калцијума, било под утицајем трансформишућег фактора раста β (енгл. *Transforming Growth Factor Beta* – TGF- β), док екстрацелуларно показује супротно дејство (Sakaguchi et al, 2008; Huang et al, 2016); S100A12 протеин експримира се у васкуларним глатким мишићним ћелијама и његова улога у патогенези атеросклерозе биће посебно размотрена; S100A13 експримира се у различитим ћелијским популацијама, у глатким мишићним ћелијама локализован је и у једру и удружен са актинским филаментима и учествује у ћелијској диференцијацији и сигналној трансдукцији током које у одговору на стрес ћелија секретује фибробластни фактор раста 1 (енгл. *Fibroblast Growth Factor 1* - FGF-1) и интерлеукин 1 α (IL-1 α) (Prudovsky et al, 2009); S100A14 има бифункционалну улогу у туморској патогенези, утичући и као инхибитор и као активатор експресије матриксних металопроотеиназа, али и p53 пута (Sapkota et al, 2011; Chen et al, 2012), док S100A15 делује само екстрацелуларно (Wolf et al, 2010). Протеин S100A16 експримира се у астроцитима и глиобластомима, али и у преадипоцитима где промовише адипогенезу и њихову пролиферацију и

диференцијацију у адипоците, уз истовремену инхибицију ћелијског преузимања глукозе посредством инсулина. Ову функцију остварује као модулатор функције p53 тумор супресор гена који је инхибитор адипогенезе (Sturchler et al, 2006; Liu et al, 2011). Протеин S100G има улогу у трансмембранском транспорту S100 протеина, S100P учествује у трансендотелној миграцији туморских ћелија и стимулацији MAPK пута (енгл. *Mitogen Activated Protein Kinases* – МАКР), као и у регулацији ембрионалног развоја синциотиотрофобласта, док улога S100Z још увек није сасвим разјашњена, сматра се да учествује калцијумом промовисаној супрамолекуларној кристализацији (Gibadulinova et al, 2011; Heil et al, 2011; Donato et al, 2013; Calderone et al, 2019; Katte et al, 2021; Zhou et al, 2022).

Као што је претходно наведено, S100 протеини интрацелуларну активност испољавају током пролиферације, диференцијације, миграције, инфламације и апоптозе ћелија у којима се синтетишу (Donato et al, 2013).

Резултати наше студије показали су експресију S100 протеина у глатким мишићним ћелијама свих стадијума атеросклерозе, а запажа се да ова експресија корелира са губитком контрактилних карактеристика ћелија, њиховом дедиференцијацијом, синтетском активношћу и развојем атеросклеротског плака. Анализирајући узорке у нашој студији, запазили смо и да један број S100 имунореактивних ћелија акумулира липиде. Литературни подаци указују нам на интрацелуларне механизме којима S100 протеини остварују своју функцију у различитим стадијумима атеросклерозе, а наши резултати су у сагласности са овим подацима које ћемо укратко изложити у тексту који следи.

Литературни подаци су показали да у патогенези атеросклерозе од свих чланова фамилије S100 протеина најзначајнију улогу имају протеини S100A8 и S100A9, затим њихов комплекс S100A8/S100A9, као и S100A12 (Averill et al, 2012; Xu et al, 2017; Lin et al, 2021). У комплексу S100A8/S100A9, S100A8 представља активну, а S100A9 регулаторну субјединицу.

Једном од хипотеза наше студије претпостављено је да експресија S100 протеина представља предиспонирајући фактор за акумулацију липида и последични настанак пенстих ћелија. Према литературним подацима, потенцијал за оксидацију LDL (што је предуслов за његово преузимање преко *scavenger* рецептора), зависи од састава холестерола. Присуство полинезасићених масних киселина у саставу LDL, посебно линоленске и арахидонске киселине, повећавају подложност LDL-а оксидацији (Nayeri et al, 2017). Узимајући у обзир и резултате других студија, које су показале да интрацелуларна активност S100A8/S100A9 укључује и транспорт арахидонске киселине (Kerkhoff et al, 2005; Xu et al, 2017) могли бисмо да претпоставимо да експресија овог комплекса доприноси настанку пенстих ћелија. Резултати наше студије показали су присуство S100 имунореактивних пенстих ћелија што би било у сагласности са овим литературним подацима. Чињеница да пенстесте ћелије предоминантно настају у раним фазама атеросклерозе које карактерише изразита пролиферативна активност, као и да услед пролиферације посредоване калцијумом долази до манифестне експресије S100 протеина, сугерише да пролиферишуће глатке мишићне ћелије показују афинитет за акумулацију липида.

Да хетеродимер S100A8/S100A9 доприноси пролиферацији глатких мишићних ћелија које га експримирају потврђују и литературни подаци. Међутим, иако се сматра да своје функције, а међу њима и аутокринно пролиферативно деловање, хетеродимер S100A8/S100A9 остварује посредством NF-κβ сигналног пута (Nemeth et al, 2009; Yang et al, 2018), новија истраживања нам показују да пролиферацију глатких мишићних ћелија регулишу класични митотски сигнални путеви MAPK (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase* – MAPK) и PI3K (енгл. *Phosphatidyl-Inositol-3-OH-Kinase* - PI3K), независно од NF-κβ активације, што би се односило на ране фазе лезије. Уз то, потврђено је и да се сигналним путем NF-κβ одвија фенотипска модулација из контрактилног у синтетски фенотип и њихова миграција у субендотел интимице под дејством PDGF, карактеристична такође за ране фазе лезије (Lu et al, 2018). С друге стране, NF-κβ сигнални пут има улогу у активацији апоптозе и инфламаторног одговора глатких мишићних ћелија, карактеристичним за касније фазе лезије (Li et al, 2022).

Резултати наше студије који показују да је и у узапредовалим лезијама (које карактерише апоптоза и некроза ћелија), заступљено преко 35% ћелија имунореактивних на S100 протеин, били би у сагласности са претходно наведеним литературним подацима, с обзиром да комплекс S100A8/S100A9 учествује у активацији апоптозе васкуларних глатких мишићних ћелија посредством NF-κβ сигналног пута (Nemeth et al, 2009; Li et al, 2022). Активацији овог сигналног пута у узапредовалим фазама атеросклерозе доприносе и ox-LDL, ROS, TNFα и *Toll-like* рецептори као универзални активатори (Li et al, 2022).

S100 протеини као екстрацелуларни сигнални молекули. S100 протеини су Ca⁺⁺ зависни протеини, али за разлику од калмодулина или тропонина C који делују само интрацелуларно, S100 протеини су и интрацелуларни и екстрацелуларни сигнални протеини, при чему своје екстрацелуларно деловање остварују паракрино и аутокринно у низу процеса попут активације имунског одговора, репарације ткива или експресије појединих рецептора (Sorci et al, 2011). Учествујући у овим процесима, S100 протеини могу да делују на ендотелне и глатке мишићне ћелије, али и ћелије моноцитно-макрофагне линије, затим, неутрофиле, мастоците, лимфоците, хондроците, неуроне и астроците, Шванове ћелије, епителне ћелије и кардиомиоците (Donato et al, 2013).

Захваљујући екстрацелуларној активности S100B протеина, тачније, паракрином деловању у ткивима чије ћелије га експримирају, овај протеин представља потенцијални биомаркер за многа обољења попут меланомом, Дауновог синдрома, различитих малигних тумора, možданог удара, али и атеросклерозе (Lu et al, 2011; Bertheloot et al, 2017; Michetti et al, 2019). И друга истраживања показују да екстрацелуларно излучени S100B протеини могу да представљају биомаркере за дијагностиковање, али и потенцијални терапијски приступ у лечењу различитих обољења (Sreejit et al, 2020; Gonzales et al, 2020). С обзиром да се подтип S100B синтетише у астроцитима и да је његова експресија карактеристична за нервно ткиво, екстрацелуларна функција овог протеина истраживана је и циљу унапређења терапије болести централног и периферног нервног система, при чему је утврђено да је ниво S100B протеина повишен код пацијената оболелих од Алцхајмерове и гругих неуродегенеративних болести нервног система, што овај протеин чини потенцијалним маркером датих обољења (Villarreal et al, 2014; Schumberg et al, 2016; Deng et al, 2018;

Elkjaer et al, 2021). Слична испитивања усмерена су на испитивање деловања овог сигналног молекула у кардиомиоцитима (Zhang et al, 2020; Chen et al, 2020; Ion et al, 2021; Sharif et al, 2021).

Испитивањем екстрацелуларне функције S100 протеина, утврђено је да неки чланови суперфамилије имају утицаја на репарацију ткива након прележаног инфаркта миокарда и možданог удара. Протеин S100A1, након акутног инфаркта миокарда, излучује се из оштећених кардиомиоцита што доводи до значајног повећања серумске концентрације овог протеина. Овај протеин делује паракрино на суседне фибробласте преко *Toll-like* рецептора и последичне активације MAP киназа које активирају NF- κ B, а упоредо с тим повећавају ниво матриксних металопротеиназа и промовишу антифиброзни фенотип фибробласта, што све за исход има поспешивање очувања функционалности ткива (Rhode et al, 2014; Yu et al, 2015; Yang et al, 2016). Такође и S100A4 протеин има утицаја на миграцију, пролиферацију и диференцијацију глатких мишићних ћелија. Док комплекс S100A8/A9 утиче на активирање фибробласта и очување функционалности ткива, подтип S100B има утицаја на кардиомиоците да иницирају ћелијску смрт (Rhode et al, 2014; Bertheloot et al, 2017).

Резултати истраживања у доступној литератури потврђују да се одређени подтипови S100 протеина попут S100B, S100A6 и S100P секретују код пацијената са акутним инфарктом миокарда, да је повећана њихова серумска концентрација, као и да имају утицаја на инфламаторни одговор. S100B протеин везује се за рецепторе на кардиомиоцитима активирајући апоптозу и пролиферацију миофибробласта. Након инфаркта миокарда долази и до повећаног лучења S100A8/S100A9 протеина из моноцита и неутрофила. Везивање комплекса протеина S100A8/S100A9 за RAGE рецепторе на кардиомиоцитима проузрокује њихову смањену конгратилност (Brinks et al, 2011; Guo et al, 2016; Sreejit et al, 2020).

Истраживања других аутора нам пружају увид у то да се услед екстрацелуларног излучивања S100 протеина у неким патолошким стањима они могу детектовати у разним телесним течностима, у серуму, урину, пљувачки, цереброспиналној течности, па самим тим потенцијално користити као биомаркери (Yoshida et al, 2009; Castagnola et al, 2013; Turnier et al, 2017; Cristovao and Gomes, 2019; Karna et al, 2019; Gellen et al, 2022). Такође, потенцијална инхибиција подтипова S100 протеина који имају улогу у патогенези атеросклерозе, могла би да допринесе унапређењу терапијских приступа (Oesterle et al, 2013; Yan et al, 2014; Xiao et al, 2020; Singh et al, 2021; Zhang and He, 2023). Утврђено је да неколико чланова суперфамилије S100 протеина утичу на патофизиологију COVID-19, због чега се, а на основу резултата недавних истраживања, као предиктивни показатељ за тежину клиничке слике и исход овог обољења разматра одређивање концентрације S100A6, S100A8, S100A9, S100A11 и S100P из назофарингеалног бриса (Singh and Ali, 2022).

Међу свим S100 протеинима, подгрупа коју чине S100A12, S100A8 и S100A9 који се заједнички називају калгранулини, имају вишеструку улогу у атеросклерози (Goyette et al, 2009).

Екстрацелуларно деловање подтипова S100 протеина остварује се активирањем различитих рецептора на површини ћелија. Могу да доведу до оштећења ендотела, пролиферације глатких мишићних ћелија, до експресије хемотаксичних фактора и оксидативних оштећења ткива (Sreejit et al, 2020).

Према доступним литературним подацима утврђено је да се после ћелијског оштећења S100 протеини ослобађају у екстрацелуларни простор, где иницирају инфламаторни одговор везујући се за рецепторе на имунским ћелијама. Када се екстрацелуларни S100 протеини нађу у субендотелу, везују се за своје рецепторе: *scavenger* рецептор CD36, затим RAGE (енгл. *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* - RAGE) или TLR-4 (енгл. *Toll-Like Receptor 4* – TLR-4) (Ehrchen et al, 2009; Eggers et al, 2011). Своју регулаторну функцију испољавају као DAMPs молекули (енгл. *Damage-Associated Molecular Patterns* - DAMPs) (von Richthofen et al, 2020; Rumpert et al, 2021). Показано је да у атеросклерози, екстрацелуларни S100 протеини посредством овог механизма активирају неутрофиле и макрофаге као и ендотелне ћелије (Gonzales et al, 2020; Rumpert et al, 2021).

Доказано је да комплекс S100A8/S100A9 протеина има регулаторне ефекте у коронарној атеросклерози. Ћелијске популације на које делује комплекс ових протеина обухватају моноцитно/макрофагну линију и неутрофиле, што доводи до повећане инфилтрације у плаку, инфламаторне реакције и могуће последичне руптуре плака.

Комплекс протеина S100A8/A9 је откривен код узнапредовалих форми атеросклерозе и код дијабетичара. Присутан је код макрофага и пенастих ћелија у субендотелу крвног суда где поспешује калцификацију плакова (Bertheloot et al, 2017). Повећано ослобађање S100A8/S100A9 протеина из неутрофила и моноцита доводе до раста атеросклеротичног плака. Такође је утврђено и повећано излучивање S100A8/S100A9 протеина код пацијената са високим BMI (енгл. *Body Mass Index* - BMI) након активације моноцита у масном ткиву (Bertheloot et al, 2017).

Протеин S100A12 везивањем за RAGE рецепторе узрокује повећавају експресију интерћелијског адхезионог молекула-1 (енгл. *Intercellular Adhesion Molecule 1* - ICAM-1) и васкуларног ћелијског адхезионог молекула 1 (енгл. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* - VCAM-1) на ендотелним ћелијама иницирајући атеросклерозу (Gonzales et al, 2020). Повећање експресије VCAM-1 је карактеристично за почетне фазе атеросклерозе. Ћелијски адхезиони молекул VCAM-1 интерреагује са специфичним интегрином VLA-4 (енгл. *Very Late Antigen-4* – VLA-4), који се експримира само на моноцитима и Т лимфоцитима (Cybulsky et al, 2001). С друге стране, ICAM-1 омогућава адхезију више различитих врста леукоцита, јер интерреагује са CD11a (LFA-1) и CD11b (Mac-1) интегринима на њиховим мембранама и има утицаја на касније фазе атеросклерозе (Huo et al, 2001).

На тај начин, након везивања S100A12 за RAGE рецепторе, у почетној фази атеросклерозе долази до адхезије моноцита и Т лимфоцита на површину ендотела, услед експресије за њих селективног VCAM-1. Адхерирани моноцити и Т лимфоцити се под дејством Р-селектина „котрљају” по ендотелу, затим под утицајем MCP-1 мигрирају у субендотел. Моноцити се модификују у макрофаге, путем *scavenger* рецептора преузимају ох-LDL и

трансформишу се у пенасте ћелије (Ramos et al, 1999; Huo and Ley 2001; Cybulsky et al, 2004). Екстрацелуларно дејство S100A12 протеина на тај начин постаје један од фактора (уз оксидисани LDL, инфламаторне цитокине и биомеханичке снаге крвних струја) који иницирају активацију ендотелних ћелија, експресију адхезионих молекула почетак иницијалне фазе атеросклерозе.

Иако се сматрало да овај протеин, због своје проинфламаторне функције у иницијалним фазама лезије доприноси руптури атеросклеротског плака, истраживања су показала да S100A12 не стимулише моноците и макрофаге на синтезу проинфламаторних цитокина у узнапредовалом плаку, а додатно и значајно инхибира матриксне металопроотеиназе MMP-2, MMP-9 и MMP3, чиме превенира руптуру и додатно стабилизује узнапредовали плак (Goyette et al, 2009).

Према истим истраживањима, серумски ниво овог протеина значајно је повећан код пацијената са коронарном атеросклерозом, корелира са CRP (енгл. *C-reactive protein* - CRP) и може се користити као маркер атеросклерозе и као фактор који штити узнапредовалу лезију од руптуре (Goyette et al, 2009).

Овај податак је у сагласности са нашим резултатима узнапредовалих форми атеросклерозе, које карактерише изражена експресија S100 протеина (преко 35%), а упоредо с тим и статистички значајна разлика за вредности леукоцита и фактора запаљења у поређењу са контролом, што ће у наставку бити размотрено.

Наши резултати добијени на основу лабораторијских вредности и упоредног прегледа са стадијумима атеросклерозе, који су показали да је креатинин као мера бубрежне функције значајно повишен у узнапредовалим стадијумима атеросклерозе, што ће у наставку бити анализирано, били би у сагласности са литературним подацима да је серумски ниво S100A12 протеина карактеристичног за узнапредовали плак, повећан и код пацијената са оштећеном бубрежном функцијом и код пацијената са атеросклерозом (Sreejit et al, 2020).

5.5. Анализа „збуњујућих“ варијабли

Трећом и четвртном хипотезом претпоставили смо да особе са узнапредовалом атеросклерозом имају различите клиничке и лабораторијске манифестације у односу на особе сличног пола и старости са раним формама атеросклерозе, као и да су одређене комбинације фенотипа глатких мишићних ћелија, клиничких и лабораторијских манифестација чешће у узнапредовалим формама атеросклерозе.

У циљу испитивања ових хипотеза статистички смо анализирали „збуњујуће“ варијабле добијене из историја болести пацијената (пол и старост пацијента, вредности систолног и дијастолног притиска, еритроцити, леукоцити, тромбоцити, хемоглобин, хематокрит, С-реактивни протеин, Na, K, креатинин, уреа, глукоза), од којих ћемо продискутовати само оне које су показале статистичку значајност у односу на ране и узнапредовале фазе атеросклерозе.

Наши резултати показали су да је разлика средњих вредности креатинина између ране и узнапредовале атеросклерозе статистички је значајна, односно средња вредност

креатинина код ране атеросклерозе била је $112,93 \pm 76,69$, а код узнапредовале атеросклерозе била је $192,90 \pm 76,69$.

Такође, разлика средњих вредности урее између ране и узнапредоване атеросклерозе је статистички значајна. Средња вредност урее код раних форми атеросклерозе била је $11,81 \pm 5,33$, а код узнапредовалих $14,98 \pm 5,99$.

Добијени резултати сугеришу да су од свих анализираних биохемијских параметара, вредности урее и креатинина, као мере бубрежне функције, значајно повишене код пацијената са узнапредовалом атеросклерозом, што се клинички повезује са степеном хроничне бубрежне инсуфицијенције код ових пацијената, с обзиром да је перфузија бубрега значајно оштећена.

Треба напоменути да је вредност креатинина као мере бубрежне функције значајно сензитивнија, што се може закључити на основу резултата добијених анализом вредности урее у испитиваним групама. С обзиром да расподела није нормална у обе групе узорака код статистичке обраде биохемијских вредности урее, већу снагу има непараметарски Ман Витнијев тест, којим је показано да разлика вредности урее између ране и узнапредовале атеросклерозе није значајна.

Даљом анализом установили смо да је од свих параметара крвне слике, статистички значајна разлика између ране и узнапредовале фазе атеросклерозе карактеристична за вредности леукоцита и тромбоцита.

Наиме, резултати наше студије показали су да је разлика средњих вредности леукоцита између ране и узнапредоване фазе статистички значајна. Средња вредност леукоцита код ране фазе била је $12,87 \pm 4,96$, а код узнапредовале била је $16,87 \pm 7,61$. Уз то, разлика средњих вредности тромбоцита између ране и узнапредовале фазе такође је статистички значајна. Средња вредност тромбоцита код ране фазе атеросклерозе била је $301,76 \pm 138,45$, док је средња вредност тромбоцита код узнапредовале фазе била $212,96 \pm 143,38$.

Овакав резултат који показује статистички значајну разлику између ране и узнапредовале фазе атеросклерозе за вредности леукоцита и тромбоцита, потврђује да је у основи узнапредовале атеросклерозе хронични инфламаторни одговор, па отуд и физиолошки одговор на инфекцију.

Најзад, разлика средњих вредности глукозе између ране и узнапредовале фазе атеросклерозе такође је статистички значајна. Средња вредност глукозе код ране фазе била је $17,60 \pm 2,80$, а код узнапредовале фазе била је $11,16 \pm 6,32$.

Овакав резултат за вредности глукозе, чије су средње вредности у раним фазама статистички значајно више од средњих вредности у касним фазама, занимљив је зато што указује да би нерегулисани дијабетес могао да има кључну улогу у иницијалним фазама атеросклерозе.

Применом анализе коваријанси, такође је испитивана трећа хипотеза наше студије, по којој узнапредовали стадијуми атеросклерозе имају различите клиничке и лабораторијске манифестације у односу на исте карактеристике у раним формама атеросклерозе. Анализом коваријанси требало је да се утврди да ли је разлика средњих вредности

лабораторијских параметара између ране и узрапредовале атеросклерозе статистички значајна, при чему је отклоњен утицај година, старости и пола.

Може се рећи да су све претходно побројане статистички значајне разлике потврђене, осим за уреу, за коју је и непараметарски тест показао да разлика није значајна.

Дакле, и анализом коваријанси разлика између узрапредовалих и раних форми атеросклерозе утврђена је за године старости, вредности глукозе, креатинина, леукоцита и тромбоцита, док уреа није била толико значајна, као ни хематокрит.

Униваријантном бинарном логистичком регресијом потврђена је разлика између узрапредовале и ране фазе атеросклерозе у односу на године старости, вредности креатинина, урее, леукоцита, тромбоцита и глукозе.

Мултиваријантна бинарна логистичка регресија која испитује истовремени утицај више варијабли, показала је разлику између узрапредовале и ране фазе атеросклерозе у погледу година старости, вредности креатинина, леукоцита и глукозе. Количник ризика за ове вредности представља повећање ризика за настанак узрапредовале атеросклерозе. С обзиром да од наведених параметара године старости и дијабетес представљају предиспонирајући фактор ризика за настанак атеросклерозе, од значаја би био резултат количника ризика за године старости и вредности глукозе.

Наш резултат испитивања количника ризика (*odds ratio*) година старости за појаву узрапредовале атеросклерозе био је 1,260 (1,068 – 1,487), а испитивања количника ризика глукозе за појаву узрапредовале атеросклерозе био је 1,586 (1,012 – 2,484). Овакав резултат показује да свака година старости, повећава ризик од настанка узрапредовале атеросклерозе за 26%. Упоредо с тим, вредност гликемије већа за 1, повећава ризик од настанка узрапредовале атеросклерозе за 58,6%.

Према литературним подацима и вредности серумских концентрација протеина који су хистолошки/имунохистохемијски испитивани у нашој студији, актуелни су предмет истраживања бројних лабораторија и истраживача, у циљу проналажења нових предиктивних фактора и потенцијалних терапијских приступа. Осим S100 протеина чије се серумске концентрације већ користе као предиктивни показатељи за тежину клиничке слике и исход различитих обољења, у новијим студијама показано је и да су високе серумске концентрације виментина заступљене код пацијената са коронарном атеросклерозом, као и да су те концентрације у корелацији са циркулишућим ox-LDL, што овај протеин чини потенцијалним биомаркером коронарне болести (Sreejit et al, 2020; Kim et al, 2020).

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

6. ЗАКЉУЧЦИ

- У узнапредовалим лезијама коронарне атеросклерозе интималне глатке мишићне ћелије експримирају синтетски фенотип.
- Синтетски фенотип карактерише експресија виментина уз одсуство дезминске имунореактивности.
- Интималне глатке мишићне ћелије узнапредовалих лезија могу да експримирају и S-100 протеин.
- Експресија S100 протеина би могла да сугерише на неуроектодермално порекло и/или чињеницу да се интималне глатке мишићне ћелије узнапредовалих лезија налазе у процесима посредованим калцијумом попут пролиферације, диференцијације, миграције, инфламације или апоптозе.
- И виментин- и S100 протеин-имунореактивне глатке мишићне ћелије акумулирају липиде и подлежу фенотипској модулацији у пенасте ћелије.
- У узнапредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају виментин и S-100 протеин у већој мери него глатке мишићне ћелије у раним стадијумима атеросклерозе.
- У узнапредовалим лезијама атеросклерозе у интими коронарних артерија присутне су глатке мишићне ћелије које испољавају дезмин у мањој мери него глатке мишићне ћелије у раним формама атеросклерозе.
- Узнапредовали стадијуми атеросклерозе имају различите клиничке и лабораторијске манифестације у односу на исте карактеристике у раним формама атеросклерозе.
- Вредности урее и креатинина, као мере бубрежне функције, Вероватноћа су повишене код пацијената са узнапредовалом атеросклерозом, с тим што је вредност креатинина као мере бубрежне функције значајно сензитивнија
- Количник ризика година старости за појаву узнапредовале атеросклерозе је 1,260 што значи да свака година старости, повећава ризик од настанка узнапредовале атеросклерозе за 26%.
- Количник ризика глукозе за појаву узнапредовале атеросклерозе је 1,586 што значи да глукоза већа за 1 повећава ризик од настанка узнапредовале атеросклерозе за 58,6%.

**ФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ГЛАТКИХ МИШИЋНИХ ЋЕЛИЈА У
КОРОНАРНИМ АРТЕРИЈАМА ОСОБА СА УЗНАПРЕДОВАЛИМ ФОРМАМА
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

7. ЛИТЕРАТУРА

ЛИТЕРАТУРА

1. Abe J, Zhou W, Taguchi J, Takuwa N, Miki K, Okazaki H, Kurokawa K, Kumada M and Takuwa Y. Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198:16-24.
2. Acampora KB, Nagatomi J, Langan EM, LaBerge M. Increased synthetic phenotype behavior of smooth muscle cells in response to in vitro balloon angioplasty injury model. *AnnVascSurg* 2010; 24(1):116-126.
3. Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, Francis G, Bochaton Piallat ML. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2018; 114(14): 540-550.
4. Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 1997; 130: 133-142.
5. Ashraf JV, Zen AA. Role of vascular smooth muscle cell phenotype switching in arteriogenesis. *Int J Mol* 2021; 22(19): 10585.
6. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(2):451–455.
7. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Feb;32(2):223-9.
8. Basatemur BL, Jorgensen HF, Clarke MCH, Bennet MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16: 727-744.
9. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 ;118(4):692–702.
10. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, Il-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol* 2017; 14:43-64.
11. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1988; 13:305-314.
12. Brinks H, Rohde D, Voelkers M, Qiu G, Pleger ST, Herzog N, Rabinowitz J, Ruhparwar A, Silvestry S, Lerchenmüller C, Mather PJ, Eckhart AD, Katus HA, Carrel T, Koch WJ, Most P. S100A1 genetically targeted therapy reverses dysfunction of human failing cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Aug 23;58(9):966-73.
13. Brisset AC, Hao H, Camenzind E, Bacchetta M, Geinoz A, Sanchez JC, Chaponnier C, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. *Circ Res* 2007;100:1055–1062.

14. Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 1995a;29(5):689-696.
15. Bobryshev YV, Lord RS. Structural heterogeneity and contacting interactions of vascular dendritic cells in early atherosclerotic lesions of the human aorta. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996b;28(1):49-60.
16. Bobryshev YV, Lord RS. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol*. 1995c;58(3):307-322.
17. Bobryshev YV. Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Lab Invest*. 2010;90(7):970-984.
18. Calderone V, Fragai M, Luchinat C. Reviewing the Crystal Structure of S100Z and Other Members of the S100 Family: Implications in Calcium-Regulated Quaternary Structure. *Methods Mol Biol*. 2019;1929:487-499.
19. Cao G, Xuan X, Hu J, Zhang R, Jin H, Dong H. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Commun Signal*. 2022 Nov 21;20(1):180.
20. Castagnola M, Cabras T, Iavarone F, Fanali C, Messana I. Detection of Ca²⁺-binding S100 proteins in human saliva by HPLC-ESI-MS. *Methods Mol Biol*. 2013;963:357-71.
21. Chaabane C, Heizmann CW, Bochaton-Piallat ML Extracellular S100A4 induces smooth muscle cell phenotypic transition mediated by RAGE. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:2144-2157.
22. Chang HY Anatomic demarcation of cells: genes to patterns. *Science* 2009; 326: 1206-1207.
23. Chen H, Yuan Y, Zhang C, et al. Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 *via* p53-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2012;287:17109-19.
24. Chen Y, Chen X, Yao M, Chen L, Chen W, Liu X. Association of S100B 3'UTR polymorphism with risk of chronic heart failure in a Chinese Han population. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jun 26;99(26):e21018.
25. Cheng J, Zhang J, Merched A, Zhang L, Zhang P, Truong L, Boriek AM, Du J.. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin α v β 3 and stabilization of PINCH-1. *J Biol Chem* 2007;282:34268-34275.
26. Choi HY, Rahmani M, Wong BW, Allahverdian S, McManus BM, Pickering JG, Chan T, Francis GA.. ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation* 2009;119:3223-3231.
27. Coen M, Burkhardt K, Bijlenga P, Gabbiani G, Schaller K, Kovari E, Rufenacht DA, Ruiz DS, Pizzolato G, Bochaton-Piallat ML.. Smooth muscle cells of human intracranial

- aneurysms assume phenotypic features similar to those of the atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol* 2013;22:339–344.
28. Cristóvão JS, Gomes CM. S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2019 May 16;13:463.
 29. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1255-62.
 30. Cybulsky MI, Won D, Haidari M. Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol.* 2004 Aug;20 Suppl B:24B-28B.
 31. Dabb's D. Diagnostic immunohistochemistry – theranostic and genomic applications. Elsevier 2021.
 32. Davis MG, Ali S, Leikauf GD and Dorn GW II. Tyrosine kinase inhibition prevents deformation-stimulated vascular smooth muscle growth. *Hypertension* 1994; 24:706-713.
 33. Deng H, Kahlon RS, Mohite S, Amin PA, Zunta-Soares G, Colpo GD, Stertz L, Fries GR, Walss-Bass C, Soares JC, Okusaga OO. Elevated Plasma S100B, Psychotic Symptoms, and Cognition in Schizophrenia. *Psychiatr Q.* 2018 Mar;89(1):53-60
 34. Deol YS, Nasser MW, Yu L, Zou X, Ganju RK. Tumor-suppressive effects of psoriasis (S100A7) are mediated through the β -catenin/T cell factor 4 protein pathway in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2011;286:44845–54.
 35. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jul;33(7):637-68.
 36. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60(6):540-551.
 37. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:1008–22.
 38. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13(1):24-57.
 39. Dubland JA, Francis GA. So Much Cholesterol: the unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* 2016; 27:155–61.
 40. Eggers K, Sikora K, Lorenz M, et al. RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011;119:353–7.
 41. Ehler E, Jat PS, Noble MD, Citi S, Draeger A.. Vascular smooth muscle cells of H-2Kb-tsA58 transgenic mice. Characterization of cell lines with distinct properties. *Circulation* 1995;92:3289–3296.
 42. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009;86:557–66.

43. Elkjaer Greenwood Ormerod MB, Ueland T, Frogner Werner MC, Hjell G, Rødevand L, Sæther LS, Lunding SH, Johansen IT, Ueland T, Lagerberg TV, Melle I, Djurovic S, Andreassen OA, Steen NE. Composite immune marker scores associated with severe mental disorders and illness course. *Brain Behav Immun Health*. 2022 Jul 2;24:100483.
44. Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 2001; 128: 1059–1068.
45. Finney AC, Stokes KY, Pattillo CB, Orr AW.. Integrin signaling in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:2263–2282.
46. Gellen B, Thorin-Trescases N, Thorin E, Gand E, Ragot S, Montaigne D, Pucheu Y, Mohammedi K, Gatault P, Potier L, Liuu E, Hadjadj S, Saulnier PJ; SURDIAGENE Study group. Increased serum S100A12 levels are associated with higher risk of acute heart failure in patients with type 2 diabetes. *ESC Heart Fail*. 2022 Dec;9(6):3909-3919
47. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*. 2006;281:677–80.
48. Gibadulinova A, Tothova V, Pastorek J, Pastorekova S. Transcriptional regulation and functional implication of S100P in cancer. *Amino Acids*. 2011 Oct;41(4):885-92.
49. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:333–337.
50. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012;95:156–164.
51. Gonzales LL, Garrie K, Turner MD: Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 2020; 1864(6): 118677.
52. Goyette J, Yan WX, Yamen E, Chung YM, Lim SY, Hsu K, Rahimi F, Di Girolamo N, Song C, Jessup W, Kockx M, Bobryshev YV, Freedman SB, Geczy CL. Pleiotropic roles of S100A12 in coronary atherosclerotic plaque formation and rupture. *J Immunol*. 2009 Jul 1;183(1):593-603.
53. Greissel A. et al. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 2015; 114: 390–402.
54. Gu X, Xie S, Hong D, Ding Y. An in vitro model of foam cell formation induced by a stretchable microfluidic device. *Sci Rep* 2019; 9:7461.
55. Guo Y, Cui L, Jiang S, Wang D, Jiang S, Xie C, Jia Y. S100A1 transgenic treatment of acute heart failure causes proteomic changes in rats. *Mol Med Rep*. 2016 Aug;14(2):1538-52.
56. Hancq S, Salmon I, Brotchi J, De Witte O, Gabius HJ, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C. S100A5: a marker of recurrence in WHO grade I meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004 Apr;30(2):178-87.
57. Haimovici H. The role of arterial tissue susceptibility in atherogenesis. *Texas Heart Inst. J*. 1991; 18: 81–83

- 58.Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML.. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1510–1520.
- 59.Heberlein KR, Straub AC, Isakson BE. The myoendothelial junction: breaking through the matrix? *Microcirculation*. 2009;16(4):307–322.
- 60.Heil A, Nazmi AR, Koltzsch M, Poeter M, Austermann J, Assard N, Baudier J, Kaibuchi K, Gerke V. S100P is a novel interaction partner and regulator of IQGAP1. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4;286(9):7227-38.
- 61.Huang YK, Chou RH, Yu C. Tranilast Blocks the Interaction between the Protein S100A11 and Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) V Domain and Inhibits Cell Proliferation. *J Biol Chem*. 2016 Jul 1;291(27):14300-14310
- 62.Humphrey J. Mechanisms of vascular remodeling in hypertension. *Am J Hyper* 2021; 34(5): 432-441.
- 63.Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2001 Sep;173(1):35-43.
- 64.Ion A, Stafie C, Mitu O, Ciobanu CE, Halitchi DI, Costache AD, Bobric C, Troase R, Mitu I, Huzum B, Duca ST, Costache II. Biomarkers Utility: At the Borderline between Cardiology and Neurology. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021 Oct 25;8(11):139.
- 65.Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 2000; 127: 1607–1616.
- 66.Karna S, Shin YJ, Kim S, Kim HD. Salivary S100 proteins screen periodontitis among Korean adults. *J Clin Periodontol*. 2019 Feb;46(2):181-188.
- 67.Katte RH, Dowarha D, Chou RH, Yu C. S100P Interacts with p53 while Pentamidine Inhibits This Interaction. *Biomolecules*. 2021 Apr 24;11(5):634.
- 68.Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J*. 2005;19(3):467–469
- 69.Kim S, Cho W, Kim I, Lee SH, Oh GT, Park YM. Oxidized LDL induces vimentin secretion by macrophages and contributes to atherosclerotic inflammation. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Jul;98(7):973-983.
- 70.Kizawa K, Takahara H, Troxler H, Kleinert P, Mochida U, Heizmann CW. Specific citrullination causes assembly of a globular S100A3 homotetramer: a putative Ca²⁺ modulator matures human hair cuticle. *J Biol Chem*. 2008 Feb 22;283(8):5004-13.
- 71.Kodama T, Reddy P, Kishimoto C, Krieger M. Purification and characterization of bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9238-9242.
- 72.Kuberappa PH, Bagalad BS, Ananthaneni A, Kiresur MA, Srinivas GV. Certainty of S100 from Physiology to Pathology. *J Clin Diagn Res*. 2016 Jun;10(6):ZE10-5.
- 73.Lacolley P, Regnault V, Avolio AP. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovasc. Res* 2018; 114(4): 513–528.

74. Lackovic V, Vukovic I. Cytohistological and immunohistochemical characteristics of vascular remodeling in diseases of the blood vessels. *Srp Arh Celok Lek* 2006; 134(1): 9-16.
75. Lačković V, Bajčetić M, Tanasković I, Todorović V. Glatko mišićno tkivo krvnih sudova. U: *Histologija i embriologija kardiovaskularnog i limfnog vaskularnog sistema – klinički značaj*, V. Kanjuh, V. Todorović (urednici). Crnogorska akademija nauka i umjetnosti i Klinički centar Crne Gore, Podgorica, 2020. Pp 197-203.
76. Lačković V, Tanasković I, Todorović V, Nešić D. Vaskularizacija srca. U: *Histologija i embriologija kardiovaskularnog i limfnog vaskularnog sistema – klinički značaj*, V. Kanjuh, V. Todorović (urednici). Crnogorska akademija nauka i umjetnosti i Klinički centar Crne Gore, Podgorica, 2020. Pp 79-82
77. Li ZL, Lilienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene* 1989; 78 (2): 243–254.
78. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology* 1997; 139 (1): 129–144.
79. Li W, Jin K, Luo J, Xu W, Wu Y, Zhou J, Wang Y, Xu R, Jiao L, Wang T, Yang G. NF- κ B and its crosstalk with endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Sep 20;9:988266.
80. Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis 2014; 47(1):1-7.
81. Lin CJ, Hunkins BM, Roth RA, Lin CY, Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Smooth Muscle Cell Subpopulations and Neointimal Formation in Mouse Models of Elastin Insufficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Dec;41(12):2890-2905.
82. Liu Y, Zhang R, Xin J, Sun Y, Li J, Wei D, Zhao AZ. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*. 2011 Mar;152(3):903-11. doi: 10.1210/en.2010-1059.
83. Louis SF, Zahradka P. Vascular smooth muscle cell motility: from migration to invasion. *Exp Clin Cardiol*. 2010;15(4):e75-e85.
84. Lu J, Esposito G, Scuderi C, Steardo L, Delli-Bovi LC, Hecht JL, Dickinson BC, Chang CJ, Mori T, Sheen V. S100B and APP promote a gliocentric shift and impaired neurogenesis in Down syndrome neural progenitors. *PLoS One*. 2011;6(7):e22126.
85. Lu QB, Wan MY, Wang PY, Zhang CX, Xu DY, Liao X, Sun HJ. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NF κ B/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:656-668.
86. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1248–1258.
87. Man JJ, Beckman JJ, Jaffe ZI. Sex as a biological variable in atherosclerosis. *Circ Res* 2020; 126(9):1297-1319.

88. Martinsen A, Dessy C, Morel N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into role of myosin light chain kinase. *Channels (Austin)* 2014; 8(5):402-413.
89. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 2010 Jun;24(6):1838-51.
90. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, Corvino V, Geloso MC. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem.* 2019 Jan;148(2):168-187.
91. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* 2001;52(3):372–386.
92. Moses MA, Klagsbrun M, Shing Y. The role of growth factors in vascular cell development and differentiation. *Internat Rev Cytol* 1995; 161:1-48.
93. Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K.. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res* 2008;79:14–23.
94. Nanda V, Miano JM.. Leiomodulin 1, a new serum response factor-dependent target gene expressed preferentially in differentiated smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2012;287:2459–2467.
95. Navas-Madroñal M, Castelblanco E, Camacho M, Consegal M, Ramirez-Morros A, Sarrias MR, Perez P, Alonso N, Galán M, Mauricio D. Role of the Scavenger Receptor CD36 in Accelerated Diabetic Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 5;21(19):7360.
96. Nayeri H, Naderi GA, Asgari S, Sadeghi M, Boshtam M, Mohamadzadeh S, Babaknejad N. LDL fatty acids composition as a risk biomarker of cardiovascular disease. *Artery Research* 2017; 20: 1-7.
97. Németh J, Stein I, Haag D, Riehl A, Longerich T, Horwitz E, Breuhahn K, Gebhardt C, Schirmacher P, Hahn M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology.* 2009 Oct;50(4):1251-62
98. Oesterle A, Bowman MA. S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Dec;35(12):2496-507.
99. Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR.. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res* 2010;47:168–180.
100. Owens AP et al. Angiotensin II induces a region-specific hyperplasia of the ascending aorta through regulation of inhibitor of differentiation *Circ Res* 2010; 106: 611–619.
101. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, et al. A Consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J Immunol.* 2017;198(10):3775-3789.

102. Passman JN, Rong Dong X, Wu SP, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL, Majesky MW. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(27): 9349–9354.
103. Pickering JG, Chow LH, Li S, Rogers KA, Rocnik EF, Zhong R, Chan BM. α 5 β 1 integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol* 2000;156:453–465.
104. Pruett, N. D. et al. Changing topographic Hox expression in blood vessels results in regionally distinct vessel wall remodeling. *Biol Open* 2012; 1: 430–435.
105. Prunotto M, Bruschi M, Gunning P, Gabbiani G, Weibel F, Ghiggeri GM, Petretto A, Scaloni A, Bonello T, Schevzov G, Alieva I, Bochaton-Piallat ML, Candiano G, Dugina V, Chaponnier C. Stable incorporation of α -smooth muscle actin into stress fibers is dependent on specific tropomyosin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2015 Jun;72(6):257-67
106. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res*. 1999 Jun 11;84(11):1237-44.
107. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15:100–108
108. Rescher U, Gerke V. S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch*. 2008 Jan;455(4):575-82.
109. Rohde D, Schön C, Boerries M, Didrihson I, Ritterhoff J, Kubatzky KF, Völkers M, Herzog N, Mähler M, Tsoporis JN, Parker TG, Linke B, Giannitsis E, Gao E, Peppel K, Katus HA, Most P. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO Mol Med*. 2014 Jun;6(6):778-94.
110. Ross R. Arteriosclerosis, an Overview. In: *Molecular Cardiovascular Medicine*, Haber E, ed. New York:Scientific American Inc.1995:11–31.
111. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791–804.
112. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115–26.
113. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas, with Cell and Molecular Biology*. 7th edition. Editor Cristal Taylo. Wolters Kluwer, Philadelphia, 2016.
114. Rumpret M, von Richthofen HJ, van der Linden M, Westerlaken GHA, Talavera Ormeño C, Low TY, Ovaa H, Meyaard L. Recognition of S100 proteins by Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 negatively regulates human neutrophils. *Eur J Immunol*. 2021 Sep;51(9):2210-2217.
115. Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama K, Horiuchi S, et al. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 1998; 78:423-434.

- 116.Sakaguchi M, Sonegawa H, Murata H, Kitazoe M, Futami J, Kataoka K, Yamada H, Huh NH. S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Mol Biol Cell*. 2008 Jan;19(1):78-85.
- 117.Sapkota D, Bruland O, Costea DE, Haugen H, Vasstrand EN, Ibrahim SO. S100A14 regulates the invasive potential of oral squamous cell carcinoma derived cell-lines *in vitro* by modulating expression of matrix metalloproteinases, MMP1 and MMP9. *Eur J Cancer*. 2011;47:600–10.
- 118.Sawada H, Rateri D L, Moorleghen JJ, Majesky M W, Daugherty A. Smooth muscle cells derived from second heart field and cardiac neural crest reside in spatially distinct domains in the media of the ascending aorta - brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 1722–1726.
- 119.Schümborg K, Polyakova M, Steiner J, Schroeter ML. Serum S100B Is Related to Illness Duration and Clinical Symptoms in Schizophrenia-A Meta-Regression Analysis. *Front Cell Neurosci*. 2016 Feb 25;10:46.
- 120.Shah PK. Inflammation, neointimal hyperplasia, and restenosis: as the leukocytes roll, the arteries thicken. *Circulation*. 2003;107(17):2175-7.
- 121.Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowskaa P, Newman AAC, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med* 2015; 21: 628–637.
- 122.Sharif AF, Elsheikh E, Al-Asmari AZ, Gameel DE. Potential Role of Serum S-100 β Protein as a Predictor of Cardiotoxicity and Clinical Poor Outcome in Acute Amphetamine Intoxication. *Cardiovasc Toxicol*. 2021 May;21(5):375-386.
- 123.Siengethaler G, Roulin D and Chatellard-Gruaz D. A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S-100A8) and MRP14 (S-100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* 1997; 272:9371-9377.
- 124.Siewers DR, Etedgui J and Pahl E. Coarctation and hypoplasia of the aortic arch: Will the arch grow? *Ann Thorac Surg* 1991; 52:608-614.
- 125.Singh H, Rai V, Agrawal DK. Discerning the promising binding sites of S100/calgranulins and their therapeutic potential in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Pat*. 2021 Nov;31(11):1045-1057.
- 126.Singh P, Ali SA. Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells*. 2022 Jul 23;11(15):2274.
- 127.Siow RCM, Churchman AT. Adventitial growth factor signalling and vascular remodelling: potential of perivascular gene transfer from the outside-in. *Cardiovasc Res* 2007; 75(4): 659-668.
- 128.Slomnicki LP, Nawrot B, Lesniak W. S100A6 binds p53 and affects its activity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):784-90.
- 129.Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, et al. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathol* 2011;7:e1001315.

- 130.Sorokin V, Vickenson K, Kofidis T, Woo CC, Lin XY, Foo R, Shanahan CM. Role of vascular smooth muscle cell plasticity and interactions in vessel wall inflammation. *Front Immunol* 2020; 11:599415.
- 131.Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W JR, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Atheroscler Thromb* 1994; 14: 840-856.
- 132.Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374.
- 133.Streejit G, Flynn MC, Patil M, Krishnamurthy P, Murphy AJ, Nagareddy PR. Chapter Six – S100 family proteins in inflammation and beyond. *Adv Clin Chem* 2020; 98: 173-231.
- 134.Sturchler E, Cox JA, Durussel I, Weibel M, Heizmann CW. S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily. *J Biol Chem.* 2006;281:38905–17.
- 135.Sudhir K, Wilson E, Chatterjee K and Ives HE. Mechanical strain and collagen potentiate mitogenic activity of angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1993; 92:3003-3007.
- 136.Suvarna K.S, Layton C, Bancroft J.D. (Eds.). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th ed.; Churchill Livingstone / Elsevier Science: London, UK, 2018.
- 137.Svenningsson P, Greengard P. p11 (S100A10)--an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Feb;7(1):27-32.
- 138.Sweeney M, Jones CJ, Greenwood SL, Baker PN, Taggart MJ. Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta.* 2006; 27(6-7): 635-47.
- 139.Tabas I, García-Cardena G, Owens GK.. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 2015;209:13–22.
- 140.Tanaskovic I, Lackovic V, Radak Dj, Knezevic Usaj S, Lackovic M, Stankovic V, Vulovic M, Pock L, Kanjuh V. Ultrastructural characteristics of the vascular wall components of ruptured atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arch Biol Sci* 2013; 65(4):1271-1278.
- 141.Toma I, McCaffrey TA. Transforming factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 155-175.
- 142.Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Dev. Biol.* 1996; 178: 430–445.

143. Trigueros-Motos L et al. Embryological-origin independent differences in homeobox expression in adult aorta: role in regional phenotypic variability and regulation of NF-kappaB activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1248–1256.
144. Tuna BG, Bakker ENTP, VanBavel E. Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 110(1):35–41.
145. Turnier JL, Fall N, Thornton S, Witte D, Bennett MR, Appenzeller S, Klein-Gitelman MS, Grom AA, Brunner HI. Urine S100 proteins as potential biomarkers of lupus nephritis activity. *Arthritis Res Ther.* 2017 Oct 24;19(1):242.
146. Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh MT, Waseem A. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel).* 2021 Oct 5;13(19):4985.
147. Vallius M and Kazlauskas A. Phospholipase C- γ 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 1993; 73:321-334.
148. Villarreal A, Seoane R, González Torres A, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, Barker PA, Ramos AJ. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem.* 2014 Oct;131(2):190-205.
149. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN, et al.; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2020 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2020; 141(9):e139–e596.
150. von Richthofen HJ, Gollnast D, van Capel TMM, Giovannone B, Westerlaken GHA, Lutter L, Oldenburg B, Hijnen D, van der Vlist M, de Jong EC, Meyaard L. Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 is highly expressed on lung monocytes, but absent on mononuclear phagocytes in skin and colon. *Cell Immunol.* 2020 Nov;357:104199
151. Vukovic I, Arsenijevic N, Lackovic V, Todorovic V. The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11(2): 123-128.
152. Wang F, Li C, Ding FH, Shen Y, Gao J, Liu ZH, Chen JW, Zhang RY, Shen WF, Wang XQ, Lu L. Increased serum TREM-1 level is associated with in-stent restenosis, and activation of TREM-1 promotes inflammation, proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2017;267:10–18.
153. Wang Y, Dubland JA, Allahverdian S, Asonye E, Sahin B, Jaw JE, et al. Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39: 876–887.
154. Wight TN. The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 326-334.

155. Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH and Ives HE. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* 1993; 123:741-747.
156. Wilson DP, Sutherland C, Walsh MP. Ca²⁺ activation of smooth muscle contraction. Evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the Triton insoluble fraction even in the absence of Ca²⁺. *J Biol Chem*. 2002; 277(3), 2186–2192.
157. Wilson DP. Vascular smooth muscle structure and function. In: *Mechanisms of vascular disease: a reference book for vascular specialists*, Fitzridge R, Thompson M (eds). University of Adelaide Press, 2011.
158. Wolf R, Ruzicka T, Yuspa SH. Novel S100A7 (psoriasin)/S100A15 (koebnerisin) subfamily: highly homologous but distinct in regulation and function. *Amino Acids*. 2010;41:789–96
159. Xie W et al. Smad2 and myocardin-related transcription factor B cooperatively regulate vascular smooth muscle differentiation from neural crest cells. *Circ Res* 2013; 113: 76–86.
160. Xiao X, Yang C, Qu SL, Shao YD, Zhou CY, Chao R, Huang L, Zhang C. S100 protein in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2020; 502: 293-304.
161. Xu C, Lee S, Singh T, Sho E, Li X, Sho M, et al. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg* 2001; 33: 571-580.
162. Xu C, Zarins CK and Glagov S. Gene expression of tropoelastin is enhanced in the aorta proximal to the coarctation in rabbits. *Exp Mol Pathol* 2002; 72:115-123.
163. Xu C, Lee S, Shu C, Masuda H and Zarins K. Expression of TGF- β 1 and TGF- β 3 but not apoptosis factors relates to flow-induced aortic enlargement. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2:11-21.
164. Xu YD, Wang Y, Yin LM, Peng LL, Park GH, Yang YQ. S100A8 inhibits PDGF-induced proliferation of airway smooth muscle cells dependent on the receptor for advanced glycation end-products. *Biol Res*. 2017 Jun 21;50(1):23.
165. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, Deng C, Fan C, Di S, Sun Y, Yi W. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis*. 2016 May 26;7(5):e2234.
166. Yang D, Sun C, Zhang J, Lin S, Zhao L, Wang L, Lin R, Lv J, Xin S. Proliferation of vascular smooth muscle cells under inflammation is regulated by NF- κ B p65/microRNA-17/RB pathway activation. *Int J Mol Med*. 2018 Jan;41(1):43-50.
167. Yoshida T, Flegler A, Kozlov A, Stern PH. Direct inhibitory and indirect stimulatory effects of RAGE ligand S100 on sRANKL-induced osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*. 2009 Aug 1;107(5):917-25.
168. Yu J, Lu Y, Li Y, Xiao L, Xing Y, Li Y, Wu L. Role of S100A1 in hypoxia-induced inflammatory response in cardiomyocytes via TLR4/ROS/NF- κ B pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Sep;67(9):1240-50.

- 169.Zhang B, He M. Identification of Potential Biomarkers for Coronary Artery Disease Based on Cuproptosis. *Cardiovasc Ther.* 2023 Jan 25;2023:5996144.
- 170.Zhou H, Pan Y, Yang W, Zhao C, Sun X, Hong B, Jin X, Zhang T, Zhang Y, Liu N, Zhang S, Zhu H. S100P promotes trophoblast syncytialization during early placenta development by regulating YAP1. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Sep 14;13:860261.
- 171.Zhu Q.-S., Rosenblatt K., Huang K.-L., Lahat G., Brobey R., Bolshakov S., Nguyen T., Ding Z., Belousov R., Bill K., et al. Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene.* 2010;30:457–470.

А. Биографски подаци

Др Весна (Нешић) Росић рођена 02.05.1983. године у Крагујевцу где је завршила основну школу и Прву крагујевачку гимназију са одличним успехом. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2002/2003. године, где је и дипломирала 31.10.2008. године са просечном оценом 9,62. Након завршених студија, обавила је обавезан лекарски стаж и положила сртучни испит 30.06.2009. године.

Докторске академске студије на Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, изборно поручје Клиничка и екпериментална интерна медицина, подручје Кардиологија, уписала је школске 2008/2009. године. Усмени докторански испит положила је 2011. године. Од 06.03.2009.године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као истраживач приправник за ужу научну област Хистологија и Ембриологија.

Б. Библиографија објављених радова

M20. Рад у међународном часопису (M20)

1. Silconi BZ, **Rosic V**, Benazic S, Radosavljevic G, Mijajlovic M, Pantic J, Ratkovic RZ, Radic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Arsenijevic N and Milovanovic J. The Pt(S-pr-thiosal)2 and BCL1 Leukemia Lymphoma: Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. Int J Mol Sci 2022 Jul 24;23(15):8161. **M21**

2. **Rosic V**, Tanaskovic I, Milosavljevic Z, Sazdanovic M, Rosic M, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T, Zornic N, Nesic J, Aleksic A, Stankovic V. Function of S100 protein in coronary atherosclerosis. Int J Morph 2022; 40(3): 760-767. **M23**

3. Petkovic AM, Jakovljevic VL, Bradic JV, Jeremic JN, Jeremic NS, Nikolic Turnic TR, Jovicic NU, **Rosic VZ**, Srejovic IM, Zivkovic VI. The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role of Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:5979721. **M21**

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са
узнапредовалим формама атеросклерозе”**

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 17.03.2023. године,


потпис аутора

Образац 2

***ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ***

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са
узнапредовалим формама атеросклерозе”**

истоветне.

У Крагујевцу, 17.03.2023. године,

Весна Росић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Весна Росић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**„Фенотипске карактеристике глатких мишићних ћелија у артеријама особа са
узнапредовалим формама атеросклерозе”**

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

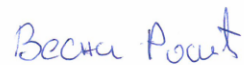
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²**

У Крагујевцу, 17.03.2023. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>