



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милош Јован Станковић

ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЦИТОКИНИ У КАРОТИДНОЈ БОЛЕСТИ

докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miloš Jovan Stanković

**IMUNOMODULATORNI CITOKINI U
KAROTIDNOJ BOLESTI**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCE

Milos Stankovic

**IMMUNOMODULATORY CYTOKINES IN CAROTID
DISEASE**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

Аутор
Име и презиме: Милош Станковић
Датум и место рођења: 18.01.1978.
Садашње запослење: Клинички центар Крагујевац, специјалиста опште хирургије
Докторска дисертација
Наслов: Имуномодулаторни цитокини у каротидној болести
Број страница: 82
Број слика: 23 (14 графикана, 9 табела)
Број библиографских података: 188
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-594/29 од 10.09.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник 2. Проф. др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 3. Доц. др Весна Шкулетић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Цитологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Miloš Stanković
Datum i mesto rođenja: 18.01.1978.
Sadašnje zaposlenje: Klinički centar Kragujevac, specijalista opšte hirurgije
Doktorska disertacija
Naslov: Imunomodulatorni citokini u karotidnoj bolesti
Broj stranica: 82
Broj slika: 23 (14 grafikona, 9 tabela)
Broj bibliografskih podataka: 188
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: Prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika
Ocena i odbrana
Datum prijave teme:
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-594/29 od 10.09.2020.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija; Onkologija, predsednik
2. Prof. dr Dragče Radovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Hirurgija, član
3. Doc. dr Vesna Škuletić, docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Citologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Milos Stankovic
Date and place of birth: 18.01.1978.
Current employment: Clinical Center Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Immunomodulatory cytokines in carotid disease
No. of pages: 82
No. of images: 23 (14 charts, 9 tables)
No. of bibliographic data: 188
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences in Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Biljana Ljujić, MD, PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Genetics
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date:
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: : IV-03-594/29 from 10.09.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. Dr. Nebojsa Arsenijevic, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the already scientific fields of Microbiology and Immunology; Oncology, President 2. Dragče Radovanović, MD, PhD, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, member 3. Vesna Škuletić, MD, PhD, Assistant professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific field of Cytology, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

Захвалница

На првом месту, захвалност дугујем Професору Небојши Арсенијевићу и Професору Миодрагу Лукићу, за указано поверење, вишеструко понуђену шансу, али и веру у моје способности да завршим започети посао.

Посебна захвалност припада целом колективу Катедре за имунологију, и Имунолошке лабораторије, за несебичну помоћ и савете без којих израда овог Доктората не би била могућа.

Највећу захвалност дугујем, за неизмерно стрпљење, као и исказано разумевање и сталну подршку у раду, мојој Лидији.

Неизмерну и вечну захвалност, свом ментору Професорки Биљани Љујић, за сву упорност, пожртвовање, уложено време и труд, савете и прекоре...

САЖЕТАК

Каротидна болест је атеросклеротско сужење каротидних артерија, где инфламација игра кључну улогу у патолошкој и клиничкој прогресији развоја атеросклеротских плакова. Упркос тој чињеници, прецизни молекулски и ћелијски механизми стварања каротидног плака и даље нису у потпуности разјашњени.

У нашем истраживању испитивали смо серумски ниво IL-10, као и серумски ниво и ткивну експресију IL-33 и ST2 рецептора у атеросклеротским плаковима код пацијената подвргнутих оперативном лечењу атеросклеротског обољења каротидних артерија, каротидној ендартеректомији. У студији су учествовали пацијенти са атеросклеротском стенозом каротидне артерије и здраве особе. Серумске концентрације IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-23, IL-18, IL-10, IL-33 и ST2 су одређиване ELISA методом. Такође, преоперативно су мерени серумски нивои IL-33 и растворљивог ST2 (sST2). Извршена је хистолошка класификација атеросклеротских плакова добијених током операције, као и имунохистохемијска анализа експресије IL-33, IL-33R, CD68 и алфа-SMA. Прикупљени су демографски и клинички подаци о пацијентима подвргнутим оперативном лечењу- пол, старост, пушачки статус, крвни притисак, гликемија, ниво хемоглобина и креатинина, пратећи коморбидитети, након чега су поређења међу варијаблима статистички анализирана.

Пацијенти подвргнути ендартеректомији су имали значајно више серумске вредности IL-10 у поређењу са здравим контролама. Пацијенти са степеном стенозе каротидне артерије мањим од 70% или већим од 70% се нису разликовали у односу на пол, старост, кардиоваскуларне ризикофакторе изузев хипертензије, неуросимптома и АХА типа плака. Серумски ниво IL-10 се значајно разликује између болесника са различитим типовима атеросклеротског плака. Пацијенти са некомплицованим плаком су имали значајно више вредности серумског IL-10 у односу на пацијенте са компликованим плаком, па циркулишући IL-10 може да диференцира болеснике са компликованим плаковима од оних са некомплицованим плаком. Серумски нивои IL-33 и sST2 били су значајно већи у групи пацијента подвргнутих каротидној ендартеректомији у поређењу са здравим испитаницима. Показали смо обилну ткивну експресију IL-33 и ST2 у атеросклеротским лезијама каротидне артерије. Нивои експресије IL-33 и IL-33R били су значајно већи код нестабилних плакова и значајно корелирају са степеном инфилтрације инфламацијских ћелија у овим плаковима. Имунохистохемијском анализом је такође откривено да ћелије одговорне за експресију IL-33 нису само мононуклеарне ћелије ограничене на инфламацијске атеросклеротске лезије, већ и глаткомишићне ћелије које су стекле фенотипске карактеристике пенастих ћелија и испуниле се липидним капљицама. Добијени резултати потврђују значај IL-33/ST2 осовине у процесу атеросклерозе и указују на њену двосмислену функцију у имунском одговору, било као проинфламацијски цитокин у унапредовалим атеросклеротским лезијама, или као профибротичан, у раним фазама лезија. Серумски IL-10 може бити потенцијални биомаркер за разликовање болесника са каротидном болешћу од здравих особа. Нижи нивои IL-10 су повезани са присуством компликованих плакова.

Кључне речи: атеросклероза, каротидна болест, IL-10, IL-33, sST2, инфламација

SAŽETAK

Karotidna bolest je aterosklerotsko suženje karotidnih arterija, gde inflamacija igra ključnu ulogu u patološkoj i kliničkoj progresiji razvoja aterosklerotskih plakova. Uprkos toj činjenici, precizni molekularni i ćelijski mehanizmi stvaranja karotidnog plaka i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni.

U našem istraživanju ispitivali smo serumski nivo IL-10, kao i serumski nivo i tkivnu ekspresiju IL-33 i ST2 receptora u aterosklerotskim plakovima kod pacijenata podvrgnutih operativnom lečenju aterosklerotskog oboljenja karotidnih arterija, karotidnoj endarterektomiji. U studiji su učestvovali pacijenti sa aterosklerotskom stenozom karotidne arterije i zdrave osobe. Serumske koncentracije IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-23, IL-18, IL-10, IL-33 i ST2 su određivane ELISA metodom. Takođe, preoperativno su mereni serumski nivoi IL-33 i rastvorljivog ST2 (sST2). Izvršena je histološka klasifikacija aterosklerotskih plakova dobijenih tokom operacije, kao i imunohistohemijska analiza ekspresije IL-33, IL-33R, CD68 i alfa-SMA. Prikupljeni su demografski i klinički podaci o pacijentima podvrgnutim operativnom lečenju- pol, starost, pušački status, krvni pritisak, glikemija, nivo hemoglobina i kreatinina, prateći komorbiditeti, nakon čega su poređenja među varijablama statistički analizirana.

Pacijenti podvrgnuti endarterektomiji su imali značajno više serumske vrednosti IL-10 u poređenju sa zdravim kontrolama. Pacijenti sa stepenom stenozе karotidne arterije manjim od 70% ili većim od 70% se nisu razlikovali u odnosu na pol, starost, kardiovaskularne rizikofaktore izuzev hipertenzije, neurosimptoma i AHA tipa plaka. Serumski nivo IL-10 se značajno razlikuje između bolesnika sa različitim tipovima aterosklerotskog plaka. Pacijenti sa nekomplikovanim plakom su imali značajno više vrednosti serumskog IL-10 u odnosu na pacijente sa komplikovanim plakom, pa cirkulišući IL-10 može da diferencira bolesnike sa komplikovanim plakovima od onih sa nekomplikovanim plakom. Serumski nivoi IL-33 i sST2 bili su značajno veći u grupi pacijenta podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji u poređenju sa zdravim ispitanicima. Pokazali smo obilnu tkivnu ekspresiju IL-33 i ST2 u aterosklerotskim lezijama karotidne arterije. Nivoi ekspresije IL-33 i IL-33R bili su značajno veći kod nestabilnih plakova i značajno koreliraju sa stepenom infiltracije inflamacijskih ćelija u ovim plakovima. Imunohistohemijskom analizom je takođe otkriveno da ćelije odgovorne za ekspresiju IL-33 nisu samo mononuklearne ćelije ograničene na inflamacijske aterosklerotske lezije, već i glatkomišićne ćelije koje su stekle fenotipske karakteristike penastih ćelija i ispunile se lipidnim kapljicama. Dobijeni rezultati potvrđuju značaj IL-33/ST2 osovine u procesu ateroskleroze i ukazuju na njenu dvosmislenу funkciju u imunskom odgovoru, bilo kao proinflamacijski citokin u uznapredovalim aterosklerotskim lezijama, ili kao profibrotičan, u ranim fazama lezija. Serumski IL-10 može biti potencijalni biomarker za razlikovanje bolesnika sa karotidnom bolešću od zdravih osoba. Niži nivoi IL-10 su povezani sa prisustvom komplikovanih plakova.

Ključne reči: ateroskleroza, karotidna bolest, IL-10, IL-33, sST2, inflamacija

ABSTRACT

Carotid atherosclerosis is manifested by atherosclerotic narrowing of the carotid arteries where inflammation plays a key role in the progression of atherosclerotic plaques. Despite this fact, the precise molecular and cellular mechanisms of carotid plaque formation are still not fully elucidated. The role of IL-10 in carotid disease has not been fully investigated. In our study, we examined serum IL-10 levels, as well as serum levels and tissue expression of IL-33 and ST2 receptors in atherosclerotic plaques in patients undergoing carotid endarterectomy. Patients with atherosclerotic carotid stenosis and healthy controls were enrolled in this study. Serum IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-23, IL-18, IL-10, IL-33 and ST2 levels were determined by ELISA. Also, serum levels of IL-33 and soluble ST2 (sST2) were measured preoperatively. Atherosclerotic plaques obtained during surgery were initially histologically classified and immunohistochemical analyzes of IL-33, IL-33R, CD68, and alpha-SMA expression was performed. Demographic and clinical data such as gender, age, smoking status, blood pressure, glycaemia, hemoglobin and creatinine levels and comorbidities were collected and the comparisons between variables were statistically evaluated. Patients undergoing endarterectomy had significantly higher circulating IL-10 levels in comparison with healthy controls and IL-10 has good discriminatory efficacy between these two groups. Patients with < 70% and those with > 70% of carotid stenosis did not differ in terms of age, sex, cardiovascular risk factors except hypertension, neurosymptoms, and AHA plaque types. Circulating IL-10 levels differed significantly among patients with different carotid plaque types. Patients with uncomplicated plaques had significantly higher serum levels of IL-10 compared to those with complicated plaques. Serum levels of IL-33 and sST2 were significantly higher in the group of patients undergoing carotid endarterectomy compared to healthy subjects. We demonstrated abundant tissue expression of IL-33 and ST2 in atherosclerotic carotid artery lesions. The levels of IL-33 and IL-33R expression were significantly higher in vulnerable plaques and significantly correlated with the degree of inflammatory cells infiltration in these plaques. Immunohistochemical analysis also revealed that cells responsible for IL-33 expression are not only mononuclear cells confined to inflammatory atherosclerotic lesions but also smooth muscle cells which gained phenotypic characteristics of foam cells and were loaded with lipid droplets. The obtained results confirm the importance of IL-33/ST2 axis in the process of atherosclerosis, and indicate its ambiguous function in immune response, whether as proinflammatory cytokine in advanced atherosclerotic lesions or as profibrotic, in early lesions. IL-10 might be a potential biomarker in discriminating patients with carotid disease from healthy controls. Decreased serum levels of IL-10 are related to complicated carotid plaques.

Key words: atherosclerosis, carotid disease, IL-10, IL-33, sST2, inflammation

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Атеросклероза.....	1
1.2. Научна основа инфламације у атерогенези.....	2
1.3. Каротидна болест.....	3
1.4. Улога инфламацијских биомаркера у прогнози каротидне болести.....	4
1.4.1.1. IFN- γ	4
1.4.1.2. TNF- α	5
1.4.1.3. CRP	5
1.4.1.4. IL-6	6
1.4.1.5. IL-1.....	7
1.4.1.6. IL-17.....	7
1.4.1.7. IL-23.....	8
1.4.1.8. IL-18.....	8
1.4.1.9. IL-10.....	9
1.4.1.10. IL-33.....	10
2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ.....	12
2.1. ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	12
2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	13
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	14
3.1. Пацијенти.....	14
3.2. Хистопатолошка и имунохистохемијска анализа атеросклеротских каротидних плакова.....	14
3.3. Мерење нивоа цитокина у серуму.....	15
3.4. Статистичка обрада података.....	15
4. РЕЗУЛТАТИ.....	16
4.1. Демографске, клиничке и хистолошке карактеристике плака пацијената са каротидном атеросклерозом	16
4.2. Хистолошке карактеристике каротидних плакова.....	18
4.3. Серумски нивои цитокина IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23 и IL-33 се разликују између СЕА пацијената и здравих контрола.....	20
4.4. Серумски нивои IL-33 и sST2 су повећани код пацијената који су подвргнути каротидној ендартеректомији.....	22
4.5. Експресија ткивног IL-33 и ST2 у различитим врстама атеросклеротских плакова.....	23
4.6. Експресија ткивног интерлеукина 33 и ST2 корелира са инфламацијом у плаку.....	27
4.7. Постоји позитивна корелација између експресије IL-33 у плаку и скора инфламације.....	28
4.8. Серумски нивои IL-10 су повећани код пацијената који се подвргавају ендартеректомији у поређењу са здравим контролама.....	29
4.9. Нема разлике у серумском нивоу IL-10 код пацијената са различитим клиничким карактеристикама.....	30
4.10. Серумски нивои IL-10 су повезани са хистолошким особинама каротидних плакова.....	32
4.11. Серумске вредности IL-10 у односу на клиничке карактеристике пацијената и у односу на компликованост плака.....	34
4.11.1. Основне карактеристике пацијената у односу на серумске вредности IL-10.....	34

4.11.2. Ниво циркулишућег IL-10 се разликује код пацијената са компликованим плаковима од циркулишућег IL-10 код пацијената са некомпликованим плаковима.....	36
4.12. Основне карактеристике пацијената у односу на IFN- γ	37
4.13. Серумски нивои IL-10, IFN- γ и IL-33 се разликују између пацијената у односу на присуство или одсуство неуролошких симптома.....	40
4.14. Серумски нивои IFN- γ и IL-10 се разликује између здравих и болесних, у односу на степен каротидне стенозе, стабилност плака, али и у односу на хистолошке карактеристике плака.....	41
5. ДИСКУСИЈА.....	43
6. ЗАКЉУЧАК.....	48
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	50
8. РЕФЕРЕНЦЕ.....	52

1. УВОД

1.1. Атеросклероза

Кардиоваскуларне болести остају водећи узрок морбидитета и mortalитета годинама уназад, упркос значајним покушајима да се у потпуности разуме процес атеросклерозе, као и последице које се развијају током еволуције овог процеса (1).

Израз атеросклероза потиче од грчких речи *атера* што значи „мекано или налик каши“, и *склерос* што значи „тврдо“. Исти термин је користио лондонски лекар у 18.-ом веку за описивање физичког изгледа интима артерија. Везу између исхране и атеросклерозе предложио је почетком 20.-ог века руски лекар Александар Игнатовски који је успео да изазове лезије сличне атеросклерози код зечева исхраном од жуманаца и млека, сматрајући да је вишак липида у исхрани атероген (2).

Атеросклероза је хронична инфламаторна болест која захвата интиму великих и средњих системских артерија, укључујући аорту, каротидне, коронарне и периферне артерије (3) и манифестује се формирањем атеросклеротских плакова (4). Атеросклеротски плак омета проток крви услед сужења лумена крвног суда и последичног смањења протока крви дистално од места сужења, или може да руптурира, изазивајући тромбозу и неку од компликација, укључујући исхемијски мождани удар, инфаркт миокарда, исхемијско оштећења бубрега, црева и многе друге по живот опасне клиничке манифестације (5, 6).

Иако се раније сматрало да атеросклероза настаје као резултат складиштења липида, значајан напредак у базичној и експерименталној науци расветлио је улогу инфламације и темелјних ћелијских и молекулских механизма који доприносе атерогенези (4). Бројни подаци указују на везу између инфламације и атеросклерозе и пружају предиктивне и прогностичке информације од клиничког значаја (4). Претпоставља се да је атеросклероза резултат сложене ендотелне дисфункције узроковане повишеним и модификованим липопротеинима ниске густине, хипертензијом, токсинима изазваним пушењем, слободним радикалима, патогеним микроорганизмима, комбинацијом ових и других инфламацијских фактора (3, 7). Тренутно се сматра да је инфламација кључан фактор укључен у развој, прогресију и руптуру атеросклеротских плакова, а затим и тромбозу (8, 9). Штавише, ендотелну дисфункцију карактерише смањена синтеза азот-оксида и локална оксидација циркулишућих липопротеина и њихов улазак у зид крвних судова (9).

Атеросклероза је системска инфламацијска болест коју покрећу и регулишу ћелије имунског система. Плакови се формирају када се липопротеини таложе на одређеним местима зида артеријских судова кроз инфламацију интима, некрозу, фиброзу и калцификацију (7). Атеросклеротски процес годинама тихо напредује пре него што постане клинички очигледан (6). Атеросклеротске лезије могу бити присутне током читавог живота. Тачније, најранији тип лезија, тзв. масне пруге, које су уобичајене код одојчади и мале деце (9), представљају чисту инфламацијску лезију, која се састоји само од макрофага пореклом из моноцита и Т лимфоцита (10). Код особа са хиперхолестеролемијом, приливу ових ћелија претходи ванћелијско таложење аморфних и мембранских липида (9).

1.2. Научна основа инфламације у атерогенези

Различити животињски модели атеросклерозе су показали да се знаци инфламације јављају руку под руку са почетним накупљањем липида у зиду артерије. Липопротеин ниске густине (енгл. Low-density lipoprotein, LDL), је липопротеин који садржи молекул аполипопротеина В100, који је преносилац холестерола у крви. Честице LDL-а могу да мигрирају у интиму, везане за протеогликане и „заробљене“ унутар зида крвног суда, чинећи их склонима оксидативној модификацији (11). Пероксидација остатака масних киселина ствара оксидативно модификовани LDL, такозвани oxLDL, изазивајући снажну инфламацију околног ткива (12).

На пример, не само код експерименталних животиња, већ и код људи показано је да се леукоцити локализују у најранијим лезијама атеросклерозе. Основна наука о биологији инфламације примењена на атеросклерозу пружила је нови увид у механизме који су у основи регрутације леукоцита у атеросклеротским лезијама. Леукоцити у крви се слабо везују за нормални ендотел. Међутим, непосредно након почетка атерогене дијете, ендотелне ћелије артерија на својој површини почињу да експримирају селективне адхезивне молекуле који се везују за различите класе леукоцита, као што су селектини, васкуларни ћелијски адхезиони молекул-1 (енгл. vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) и међућелијски адхезиони молекул-1 (енгл. intercellular adhesion molecules-1, ICAM-1) (3, 13). Заједно са производњом хемокина, попут моноцитног хемоатрактаног протеина 1 (енгл. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ови механизми изазивају привлачење, адхезију и миграцију моноцита, Т лимфоцита и дендритских ћелија (енгл. dendritic cells, DC) у интиму (15). На пример, познато је да је MCP-1 одговоран за директну миграцију моноцита у интиму на местима настанка лезије (16). Породица хемоатрактаната из Т-ћелија такође може привући лимфоците у интиму (17). Једном настањене у артеријском зиду, инфламацијске ћелије крви учествују у локалном инфламацијском одговору и одржавају га. Једна студија је показала да се експресија VCAM-1 повећава на ендотелним ћелијама које се налазе непосредно изнад атерома који се развија (18). Занимљиво је да се жаришта повећане експресије адхезивних молекула преклапају са местима на зиду артерија која су посебно склона развоју атерома. Значајни докази показују да се поремећени ендогени атеропротективни механизми јављају на тачкама гранања артерија, где ендотелне ћелије доживљавају поремећен проток (20). На пример, одсуство нормалног ламинарног протока може смањити локалну производњу азот- монооксида кога ствара ендотел. Овај ендогени вазодилататорни молекул такође има антиинфламацијска својства и може ограничити експресију VCAM-1 (21). Повећани стрес на зид крвног суда може подстаћи артеријске глатке мишићне ћелије (енгл. arterial smooth muscle cells, SMCs) да стварају протеогликане који могу везати и задржати честице липопротеина, олакшавајући њихову оксидативну модификацију и тако стимулирати инфламаторни одговор на местима настанка лезије (22). Унутар интима, поред MCP-1, под утицајем фактора стимулације колонија макрофага (енгл. macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) моноцити постају макрофаги, експримирају рецепторе скупљаче (енгл. scavenger receptors, SRs) и почињу да преузимају oxLDL (21, 23). Акумулација липида унутар макрофага даје им „пенаст“ изглед под микроскопом, због чега добијају назив „пенасте ћелије“ (енгл. foamy cells) (24, 25). Наставком миграције масних ћелија и ћелија имунског система на место догађаја, стварају се први атеросклеротски плакови, такозване „масне пруге“. Због миграције SMCs у интиму и производње колагена, формира се влакнаста капица која штити

садржај протромботичних наслага из крви. Растући плак стоји на раскрсници између повећане инфламације, што води до даље дестабилизације са могућношћу руптуре плака, или повећане фиброзе и стабилизације (15).

Т ћелије су такође изложене сигнаlima због којих луче инфламацијске цитокине попут γ -интерферона и лимфотоксина (фактор туморске некрозе (енгл. *tumor necrosis factor beta*, TNF- β)) који заузврат могу стимулирати макрофаге, као и васкуларне ендотелне ћелије и глаткомишићне ћелије (4). Инфламацијски процеси не само да промовишу почетак и еволуцију атерома, већ у највећој мери и доприносе изазивању акутних тромботичних компликација атерома. Највећи број коронарних артеријских тромба настају због физичког поремећаја атеросклеротског плака који узрокују потенцијално смртоносни акутни инфаркт миокарда. Као саставни део атерома, активирани макрофаги могу произвести протеолитичке ензиме који могу да разграде колаген који је саставни део капице плака, чинећи капицу танком, слабом и подложном пуцању. IFN- γ који потиче од активираних Т ћелија у плаку може зауставити синтезу колагена помоћу SMC, ограничавајући њихову способност да обнови колаген који стабилизује плак (26). Медијатори инфламације регулишу експресију ткивних фактора помоћу макрофага у плаку, показујући важну везу између артеријске инфламације и тромбозе (27). Променљиви механизми, попут смањене синтезе и повећане разградње колагена посредованог Т-ћелијама и макрофагима узрокује стањивање капе. Након тога, капа може да руптурира изазивајући тромбозу и зачепљење крвних судова (28, 29). С друге стране, стабилни, али растући плакови могу изазвати повремене исхемијске болове узроковане ограниченим протоком крви (30). Многе од ових пенастих ћелија претоварене липидима на крају умиру, што резултира накупљањем апоптотских тела и некротичних остатака у лезији, формирајући „некротично“ језгро у еволуирајућој атероматској лезији. Компоненте овог детритуса могу промовисати прогресију плака и протромботичне су. Оштећен клиренс таквих апоптотичних остатака може стога допринети расту и тромботичним компликацијама атеросклеротских лезија (31).

1.3. Каротидна болест

Каротидна болест представља један од најчешћих и најважнијих облика атеросклерозе због велике распрострањености и услед велике осетљивости мозданог ткива на смањење крвног протока, и може за последицу имати озбиљна трајна оштећења чак и у кратким периодима смањеног крвног протока. Каротидна болест се обично манифестује као атеросклеротска стеноза и може бити повезана са неуролошким компликацијама, укључујући пролазни губитак вида (*amaurosis fugax*), пролазне исхемијске нападе (енгл. *transient ischemic attack*, TIA) и церебрални инфаркт. Плакови склони пуцању имају танке фиброзне капице и класификују се као нестабилни плакови, док се они са дебелим фиброзним капицама, мањим степеном инфламације и малим липидним и некротичним језгром називају стабилни плакови. Компликоване плакове карактерише калцификација унутар плака, крварење, тромбоза или ерозија плака (32). Упркос све већем броју доказа да инфламација игра кључну улогу у развоју каротидне болести, прецизни молекулски и ћелијски механизми у основи формирања каротидних плакова нису у потпуности дефинисани (32, 33). Експресија цитокина унутар плака или њихов

повишен ниво у циркулацији повезани су са нежељеним васкуларним догађајима и вишим стадијумом атеросклеротске болести (32).

Хируршка процедура, каротидна ендартеректомија, остаје златни стандард у лечењу, и тренутно је један од ретких профилактичких хируршких захвата. Ова чињеница је доказана у бројним мултицентричним испитивањима, и упркос свим ризицима задржава предност у односу на ендоваскуларне процедуре (34).

1.4. Улога инфламацијских биомаркера у прогнози каротидне болести

Циркулишући нивои инфламацијских биомаркера, укључујући TNF- α , Ц-реактивни протеин високе осетљивости (енгл. high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP), IL -1, IL-6 или IL-18 (енгл. Interleukin, IL), предвиђају васкуларне догађаје (35-39), рањивост каротидних плакова и већу дебљину комплекса интима-медија (40, 41). Супротно томе, повишени серумски нивои антиинфламацијског цитокина IL-10 и Th2 цитокина IL-5 повезани су са повољном прогнозом атеросклеротске болести пожељним исходом лечења код пацијената са акутним коронарним синдромом (42, 43).

IFN- γ

Већина ћелија које су присутне у атеросклеротском плаку укључујући макрофаге, Т ћелије и васкуларне глатко-мишићне ћелије (енгл. *Vascular smooth muscle cells*, VSMC) код људи али и мишева, експримира IFN- γ . Највећи број Т ћелија присутних у атеросклеротском плаку су Th1 позитивне ћелије, које производе обилне количине IFN- γ . Макрофаги, ендотелне ћелије (енгл. *Endothelial stem cells*, ECs) и VSMC производе IFN- γ као одговор на инфламацијске стимулусе; будући да је IFN- γ снажан индуктор Th1 фенотипа, то индукује ширење локализоване инфламације. IFN- γ посредује кроз активацију JAK/STAT сигналног пута и такође активира сигнални комплекс SMAD који индукује производњу инфламацијских цитокина, а поред поларизације Т ћелија у Th1 фенотип, IFN- γ такође индукује макрофаге, ECs и VSMC да експримирају проинфламацијске гене (44, 45). IFN- γ -индукована експресија IACM и VCAM-1 у ендотелним ћелијама резултира повећаном екстравазацијом циркулишућих Т ћелија, чиме се повећава инфламацијско оптерећење у атеросклеротичним лезијама.

Неколико директних доказа из животињских модела показује да је IFN- γ снажан проатерогени цитокин. Системска интраперитонеална примена IFN- γ промовисала је атеросклерозу код аполипопротеин Е негативних (ApoE^{-/-}) мишева (46). Сходно томе, двоструки нокаут мишеви IFN- γ R^{-/-}/ApoE^{-/-} показују смањено атеросклеротско оптерећење у поређењу са контролом (47). Слично томе, трансфер гена за секретовани антагонист рецептора за IFN- γ код ApoE^{-/-} мишева спречио је прогресију атеросклеротског плака (47, 48). Постоје и други начини деловања који указују на IFN- γ као на моћно про-атеросклеротско средство. Осим Th1 поларизације, IFN- γ може смањити пролиферацију VSMC и таложење колагена, док такође индукује експресију MMP-а у VSMC, што има за последицу нестабилност плака и већу подложност руптури (47). IFN- γ такође може повећати преузимање оксидованих липида и формирање пенастих ћелија у макрофагима и VSMC. Такође,

IFN- γ посредује у про-атеросклеротским ефектима проинфламацијског цитокина IL-18. Инјекција IL-18 повећала је величину лезије код ApoE^{-/-} мишева (50); ово је инхибирано код мишева који су двоструки нокауту за IFN γ /ApoE (48). Може се закључити да је IFN- γ моћан проатеросклеротски цитокин, и да се повећани нивои IFN- γ уочавају у нестабилним плаковима (48).

TNF- α

Фактор некрозе тумора- α је члан TNF- α суперфамилије који на основу секвенци, функционалних и структурних сличности садржи деветнаест различитих цитокина. Канонска TNF- α сигнализација посредује у p38 митогеном активираној протеин кинази MAPK (енгл. mitogen-activated protein kinase, MAPK) и нуклеарном фактору капа б (NF- κ B) сигналном путу. Због чињенице да индукује друге проинфламацијске цитокине, TNF- α добија епитет „главног инфламацијског цитокина“. TNF- α је плејотропни цитокин са снажним проинфламацијским ефектима и може изазвати каскаду експресије проинфламацијских гена укључујући IL-1 β , IL-8, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, и матриксних металопротеиназа (енгл. matrix metalloproteinases, MMPs) у различитим типовима ћелија, укључујући лимфоците, макрофаге, ендотелне ћелије и VSMC. Такође, ниво TNF- α у серуму корелира са степеном атеросклеротсклерозе што је процењено интраваскуларним ултразвуком каротидне артерије, због чега се повећава могућност да се TNF- α користи као неинвазивни биомаркер за развој атеросклерозе (51). Имунореактивност TNF- α се налази у свим типовима ћелија у људским и експерименталним атеросклеротским плаковима, иако се првенствено уочава код моноцита и макрофага. У складу са својим ефектима на експресију молекула ћелијске адхезије, TNF- α промовише интеракцију леукоцита и ендотелних ћелија *in vivo* (52).

CRP

CRP су први пут описали Tillett и Francis 1930.-е године, док су концепт CRP који функционише као „реактант у акутној фази“ развили Macleod, Avery и McCarthy 1940.-их (53, 54). До 1980.-их, радови Kushner-а, Repis-а и других утврдили су да највећи део циркулишућег CRP производе хепатоцити под регулаторном контролом циркулишућих цитокина, у највећој мери IL-6 (55). CRP је негликозилирани циркулишући пентраксин састављен од пет идентичних подјединица распоређених са пентамерном симетријом. Са полувременом циркулације од приближно 19 сати, концентрација CRP у плазми је у великој мери одређена брзином синтезе.

Иако је неколико извештаја о случајевима из 1950.-их сугерисало на повишене нивое CRP након акутног инфаркта миокарда, заинтересованост за улогу CRP-а у кардиоваскуларним болестима поново се појавила деведесетих година прошлог века са извештајима неколико група који описују повишени ниво CRP међу болесницима са трајном исхемијом, нестабилном ангином и хроничном атеросклеротском болешћу (56, 57). Међутим, пошто се нивои CRP-а повећавају након различитих инфламацијских надражаја (укључујући исхемију миокарда), ове важне студије нису могле да одгонетну да ли је повећање CRP-а претходило настанку васкуларне болести. Одговор на то контроверзно питање су дали истраживачи из проспективне

Студије здравља лекара (енгл. Prospective Physician Health Study, PHS) која је 1997. године објавила доказе који показују да су нивои CRP-а мерени „тестом високе осетљивости“ повишени деценијама пре првих акутних исхемијских догађаја (58). Ова студија је такође показала да су они са будућим ризиком од васкуларних догађаја имали стабилно повишење hsCRP током дужег временског периода; да је антиинфламацијско средство, аспирин било знатно ефикасније у спречавању првих срчаних удара када су га узимали они са повишеним нивоом hsCRP; и ти ефекти су били придодати ефектима укупног и HDL холестерола, али ограничени на артеријске атеросклеротске догађаје (укључујући периферну артеријску болест, мождани удар и изненадну срчану смрт), али не и на дубоку венску тромбозу (59, 60). Ретроспективно је важно препознати да тада није сматрано да је сам CRP узрочник атеросклерозе јер су и други инфламацијски биомаркери мерени у тој студији, укључујући растворљиви међућелијски молекул адхезије-1 (енгл. Soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1), IL-6 и фибриноген, који су такође предвиђали будући васкуларни ризик (61).

CRP се углавном производи у јетри као примарни реактант акутне фазе и игра улогу у активацији комплемента и у урођеној имуности. CRP такође могу произвести инфламацијске ћелије у локализованој инфламацији, иако у концентрацијама за које је мање вероватно да ће имати системске ефекте. На пример, изван производње у јетри, показало се да инфламацијски цитокини стимулишу производњу CRP-а у ћелијама глатких мишића коронарних артерија и у људским адипоцитима (62, 63). У другим радовима је утврђено да CRP има директне проинфламацијске и про-тромботичке ефекте на ћелије ендотела човека (64), делимично повећањем експресије инхибитора активатора плазминогена и смањеним ослобађањем простациклина (65). Повећана тромбоза након повреде артерија пријављена је и код трансгених мишева за хумани CRP (66), који, када су укрштени са мишевима дефицијентним апо-Е, су резултирали сојевима код којих се јавља убрзана атеросклероза аорте (67). Друге студије на мишевима, међутим, нису пронашле доказе о улози CRP-а у развоју атеросклерозе (68, 69). Текуће контроверзе о узрочно - последичној улози CRP-а не умањују клиничку корисност hsCRP као дијагностичког теста у примарној и секундарној превенцији (70).

IL-6

IL-6 има снажне проинфламацијске ефекте на различите типове ћелија. Ендотелне ћелије, VSMC и макрофаги синтетишу IL-6. Овај цитокин се експримира у хуманом атеросклеротском плаку, а његов серумски ниво се повећава код пацијената са коронарном артеријском болешћу и нестабилном ангином и сматра се независним фактором ризика за коронарну артеријску болест (44). IL-6 појачава експресију молекула ћелијске адхезије (енгл. Cell adhesion molecules, CAMs) у ендотелним ћелијама и VSMC, доприносећи екстравазацији леукоцита и развијању атеросклеротске лезије. IL-6 активира JAK/STAT сигнални пут (енгл. The Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)) и митоген је за VSMC. Директна улога IL-6 у атерогенези је установљена након што је системском апликацијом АпоЕ -/- са рекомбинантним IL-6 индуковано значајно повећање плака (71). Неочекивано, величина лезије је повећана код IL-6/АпоЕ двоструких нокаут мишева (72). Потенцијални механизми којима може да се објасни овакав исход били су неочекивано повећана експресија IL-10 и повећани нивои рецептора

за IL-1R α и TNF α , за које се сматрало да неутралишу биорасположивост ових моћних проинфламацијских медијатора. Укратко, иако је снажан проинфламацијски цитокин, IL-6 може имати сложене и помало збуњујуће антиатеросклеротске ефекте (72, 73). IL-6 може имати директне про- и анти-атерогене ефекте на процесе повезане са развојем и прогресијом атеросклерозе. Проатерогени ефекти укључују стимулацију пролиферације глатких мишића крвних судова (74), активацију ендотелних ћелија (75) и активацију тромбоцита (76), док атеропротективни ефекти укључују смањење LDL-а у плазми повећањем експресије гена за LDL рецепторе (77).

IL-1

Фамилија IL-1 се састоји од четири протеина који деле хомологе секвенце: IL-1 α , IL-1 β , антагонист рецептора за IL1 и IL-18 (78). Имунореактивност IL-1 β је нађена у моноцитима, макрофагима, ендотелним ћелијама и VSMC у хуманом и експерименталном атеросклеротском плаку, а IL-1 β продукују макрофаги, моноцити, ендотелне ћелије и VSMC. IL-1 β је индукован другим проинфламацијским стимулусима, укључујући TNF- α , и снажно је проинфламаторан јер иницира експресију других инфламацијских цитокина у више типова ћелија (44). Сигнали IL-1 β активирају p38 MAPK и затим конвергирају ка NF- κ B, изазивајући тако експресију цитокина и адхезивних молекула, а митогени су за VSMC и ендотелне ћелије (79). IL-1 β је од великог значаја у раном формирању лезија јер повећава интеракцију леукоцита и ендотелних ћелија, и тако олакшава екстравазацију (80). Зато што може да изазове екстравазацију леукоцита у лезију која се тек формира и да индукује експресију цитокина у скоро свакој ћелији присутној у лезији, аутокринна и паракрина производња IL-1 β не само да покреће, већ и одржава локално инфламацијско окружење. У неколико животињских модела је показано да IL-1 β испољава директне, проатеросклеротске ефекте. Инфузијом антагонисте рецептора за IL-1 смањено је формирање масних пруга у аполипопротеин Е- дефицијентним мишевима (81). Слично томе, повећана површина лезије са значајним повећањем инфилтратата макрофага уочена је код двоструких нокаут мишева за IL-1 рецептор/ApoE-/- (82). Двоструки нокаут мишеви за IL-1 β /Apo E показали су смањење атеросклерозе за 30% (83).

IL-17

Интерлеукин-17 (IL-17) је један од оснивача нове породице инфламацијских цитокина. IL-17 продукују готово искључиво активирани Т ћелије и налази се претежно у меморијском одељку Т-ћелија (84). Насупрот томе, његов рецептор је присутан свуда, чинећи готово сваку ћелију потенцијалном метом овог цитокина (85). Активација рецептора помоћу IL-17 генерално доводи до индукције других проинфламацијских цитокина, активацијом NF- κ B (86). Недавна истраживања показала су да експресија IL-17 карактерише јединствену линију Т-помогачких ћелија која регулише инфламацију ткива, фаворизујући идеју о различитој ефекторској линији која се назива „Th-17“ (87). Претходне студије су, међутим, показале да IL-17 ослобађају активирани линије CD4+ Т-ћелија које припадају подскупинама Th0, Th1 и Th2 (88) или обрнуто неким CD4+Т ћелијама које су искључиво из Th1/ Th0 типа, а не Th2 типа (89). Студије ћелијске културе указују на

то да IL-17 испољава плејотропна дејства, укључујући индукцију других цитокина (IL-6, TNF- α , IL-1 β), хемокина (нпр. MCP -1, инфламаторни протеин макрофага-2/IL-8 (енгл. Macrophage inflammatory protein, MIP-2) и онкоген повезан са растом протеина алфа (енгл. Growth-related oncogene- α , GRO- α), адхезионе молекуле (ICAM-1) и проинфламацијске медијаторе (простагландин E2, азот-оксид и циклооксигеназа-2) у различитим ћелијама, укључујући ендотелне ћелије, ћелије глатких мишића и макрофаге (90, 91). Дакле, јасно је да је главна улога IL-17 у интеракцији са мрежом цитокина, изазивањем ослобађања инфламацијских медијатора како би обезбедио везу између активације Т-ћелија и инфламације.

Трансплантација костне сржи без рецептора за IL-17 у мишићем моделу двоструких нокаута за LDLr (LDLr -/-) умањује атеросклерозу, док недостатак цитокина у мишићем моделу ApoE -/- нема ефекта на оптерећење плака, али умањује васкуларну и системску инфламацију (92, 93). Насупрот томе, инхибиција помоћу неутралишућег антитела у ApoE -/- моделу спречава напредовање атеросклеротске лезије смањењем инфламацијског оптерећења и ћелијске инфилтрације, и тако побољшава стабилност лезије (94, 95). Слично томе, недостатак цитокина или његовог рецептора у ApoE -/- мишевима смањује атеросклерозу и васкуларну инфламацију док инјекција IL-17 промовише болест (96). Потенцијалну улогу IL-17 у коронарној атеросклерози потврђује једна студија која је показала да је у плазми пацијената са нестабилном ангином као и код пацијената са акутним инфарктом миокарда ниво IL-17 значајно повишен (97).

IL-23

Интерлеукин 23 (IL-23) је члан цитокина из породице IL-6-IL-12 и хетеродимер који је састављен од p19 (јединствене) субјединице и p40 (коју дели са IL-12) субјединице. IL-23 је познати регулатор производње цитокина IL-17A и IL-22 (99). Улога IL-17A у атеросклерози је опсежно истражена (100). Механизми деловања IL-22 у атеросклерози остају углавном непознати, иако је забележено да IL-22 супримира метаболичке поремећаје и регулише метаболизам липида у јетри и масном ткиву (101, 102). Повишен ниво IL-23 забележен је у ткиву аорте мишева и људи са кардиоваскуларним болестима (103), док је смањен у моноцитима периферне крви пацијената са кардиоваскуларним болестима (КВБ) (104). IL-23 је такође укључен у регулацију срчане инфламације, јер двоструки нокаут мишеви за IL23 (IL23-/-) показују повећано оштећење и неповољно ремоделовање након инфаркта миокарда (105). Док подаци у другим моделима инфламације указују на то да IL-23 потенцијално може да промовише атеросклерозу, тачна улога овог цитокина остаје непозната.

IL-18

IL-18 је снажни проинфламацијски цитокин, што се може очекивати од цитокина који је сродан IL-1 и сигнализира преко рецептора са високим степеном хомологе секвенце са рецептором IL-1 β . IL-18 и његов рецептор се детектују у атеросклеротском плаку код људи, и што је важно, нивои IL-18 у серуму су повишени код пацијената са коронарном артеријском болешћу (енгл. *coronary artery disease*, CAD) (106). IL-18 продукују првенствено макрофаги, али је рецептор IL-18

присутан на макрофагима, ендотелним ћелијама и у мањем степену на VSMC, што указује на улогу овог цитокина у двосмерној комуникацији између инфламацијских и васкуларних ћелија. Трансдукција сигнала IL-18 активира NF-κB и регулише IL-6, IL-8 и адхезионе молекуле на моноцитима и ендотелним ћелијама, подржавајући његова проинфламацијска и атерогена својства (107). IL-18 испољава проатеросклеротске ефекте у неколико животињских модела. Иако није строго у категорији Th1 цитокина, IL-18 нагиње ка томе да буде Th1 интерлеукин јер индукује производњу IFN-γ (50). Системска примена IL-18 значајно је повећала атеросклеротски плак код ApoE^{-/-} мишева, а мишеви који су двоструки нокаут за IL-18/ApoE имали су мање и стабилније лезије у поређењу са контролама (108). Однос између IL-18 и IFN-γ је синергијски, што показује студија код двоструких нокаут мишева за IFN-γ/ApoE, где је након егзогене примене IL-18 дошло до смањења атеросклерозе (108).

IL-10

IL-10, цитокин типа II, описали су *Mosmann, Fiorentino* и *Bond* 1989. године као цитокин који инхибира синтезу и излучивање проинфламацијских цитокина помоћу Th1 ћелија (109). IL-10 је плејотропни цитокин који секретује већина ћелија имунског система, укључујући макрофаге, моноците, Т и В ћелије. Стога, IL-10 се може детектовати у свим овим ћелијама и у атеросклеротским плаковима човека. Експресија IL-10 повезана је са смањеном апоптозом у липидном језгру лезије (110) Бројне студије сматрају да је IL-10 атеропротективан с обзиром на механизме посредством којих делује, као што су поларизација Th2 ћелија, инхибиција презентације антигена, инхибиција пролиферације Т ћелија и слабљење инфламацијске експресије гена у више типова ћелија (44,106). Молекулски механизми активности IL-10 су сложени. IL-10 посредством IL-10 хетеродимерног рецептора активира JAK/STAT сигнални пут, углавном STAT3. IL-10 блокира TNF-α индуковану сигнализацију MAPK и активацију NF-κB у моноцитима, макрофагима, ендотелним ћелијама и VSMC (112,113). У култивисаним моноцитима недавно је показано да IL-10 може смањити стабилност инфламацијских транскрипта информационе РНК (енгл. *Messenger RNA*, mRNA) сугеришући да IL-10 може смањити инфламацијски одговор ћелијама имунског система на транскрипцијом, као и на посттранскрипцијом нивоу. Ендотелне ћелије и VSMC не експримирају IL-10, овај цитокин има вишеструке ефекте на васкуларне ћелије, што указује на једносмерну, паракрину/јукстакринску сигнализацију између резидентних васкуларних и инфламаторних ћелија. У култивисаним ендотелним ћелијама, IL-10 не смањује експресију инфламацијских цитокина, али може смањити експресију ICAM-1 и VCAM-1. У VSMC, IL-10 није смањивао IL-1β индуковану експресију инфламацијских цитокина, али је смањивао пролиферацију VSMC посредством NF-κB (114). Главно биолошко деловање IL-10 се испољава у инхибицији макрофага и DCs да презентују антигене што поларизује имунски одговор у правцу Th1 ћелија, путем инхибиције експресије МНС (енгл. *Major histocompatibility complex*) молекула II, као и експресије костимулаторних молекула (115, 116). На овај начин ћелије без антигена лишене су стимуланса за синтезу и излучивање цитокина (IL-2, IFN-γ) својствених Th1 ћелијама. IL-10 такође инхибира синтезу проинфламацијских цитокина које продукују макрофаги и DCs укључујући IL-1, IL-6, IL-12 и TNF-α. Надаље, инхибира инфламацију повећавајући ослобађање антагониста IL-1 рецептора које продукују макрофаги (117, 118).

Међутим, нису сви ефекти IL-10 имуносупресивни, јер IL-10 стимулише активацију В лимфоцита, утиче на промену типа имуноглобулина и продужава опстанак В лимфоцита (119). Већина експерименталних података потврђује атеропротективну улогу IL-10 у животињским моделима атеросклерозе (120, 121).

Бројне студије на мишијим моделима су показале да је IL-10 снажно антиатероген. У студијама прекомерне експресије, IL-10 трансгени мишеви су имали знатно мање атеросклеротске плакове, а трансплантација костне сржи IL-10 трансгених мишева у LDLR^{-/-} мишеве смањила је атеросклерозу (122). Системска експресија гена IL-10 посредована аденовирусом смањила је атеросклерозу инактивацијом имунских ћелија и смањењем инфилтрата инфламацијских ћелија у плаку (123). Занимљиво је да је код ових мишева снижен холестерол у серуму, што такође може допринети смањењу васкуларне инфламације. IL-10 трансгени мишеви са C57/B6 генетском позадином који су били изложени атерогеној исхрани, укључујући холат, смањили су стварање плака, а мишеви IL-10^{-/-} са истом позадином и храњени истом исхраном развили су већи плак у поређењу са контролом. У сваком случају, нивои IL-10 су у корелацији са инфилтрацијом леукоцита и продукцијом инфламацијских цитокина (122, 123). Сходно томе, атеросклероза је повећана код двоструких нокаут мишева за IL-10/ApoE, а трансфер гена из IL-10^{-/-} мишева у двоструке нокаут мишеве за LDLR^{-/-} показује да IL-10 кога секретују леукоцити посредује у заштитним ефектима посредством поларизације Т ћелија у правцу анти-инфламацијског фенотипа (124). Сумарни подаци ових студија показују да је IL-10 моћан имунолошки модулатор који може смањити атеросклерозу смањењем експресије инфламацијских гена, смањењем интеракција леукоцита и ендотелних ћелија и поларизацијом адаптивног имунског одговора у правцу Th2 фенотипа. Упркос свему горе наведеном, резултати добијени на експерименталним животињским моделима, где је атеросклероза резултат унапред одређених експерименталних услова, могу бити у супротности са студијама пацијената са атеросклерозом на које могу утицати различити генетски фактори и фактори околине.

IL-33

Интерлеукин (IL)-33 је члан IL-1 породице цитокина који конститутивно експримирају ендотелне, епителне, глаткомишићне ћелије и ћелије имунског система (125). Када се ослободи из ћелија, током некрозе или оштећења ћелије, испољава своје паракрино проинфламацијско дејство везивањем за свој рецептор (ST2, IL-33R) (126). Апоптоза ћелија, с друге стране, не изазива такав одговор услед инактивације IL-33 дејством каспаза, активираних током овог контролисаног процеса. Биолошки активан, IL-33 у целости, делује двојако (127, 128), про- и антиинфламацијски, повећањем активности мастоцита, Th2 ћелија, регулаторних Т ћелија (Treg) и урођених лимфоидних ћелија. Због свог конститутивног начина експресије, за разлику од већине цитокина, IL-33 може деловати као алармин, сигнал опасности, и по томе припада већој породици молекула повезаних са оштећењем (енгл. *Damage-associated molecular patterns*, DAMPs) (129). Бројна истраживања на људима показала су улогу IL-33 у аутоимунским, инфламацијским, алергијским, фибротичним и малигним обољењима (130-136). С обзиром на чињеницу да је IL-33 лиганд за ST2 рецептор (137), ген ST2 кодира две изоформе протеина ST2: ST2L, трансмембрански облик и растворљиви ST2 (енгл. *soluble ST2*,

sST2), излучени облик који може послужити као рецептор мамац за IL-33. ST2L се првенствено експримира на Th2 ћелијама, али не и на Th1 ћелијама (138), и може значајно да супримира урођени и стечени имунски одговор. ST2L је такође експримиран у кардиомиоцитима, а серумски пораст sST2 прогнозира морталитет и срчану инсуфицијенцију код пацијената са акутним инфарктом миокарда (139, 140).

С обзиром да га експримирају Th2 ћелије и сматра се Th2 интерлеукином, IL-33 повећава синтезу IL-4, IL-5 и IL-13, док смањује експресију IFN- γ . IL-33 је присутан у здравим артеријама, али се повећава у макрофагима у атеросклеротском плаку код људи (141). IL-33 се експримира у неколико типова ћелија, а уколико га макрофаги експримирају, онда се постиже директан супресивни ефекат на функцију макрофага. Мишеви којима је убризгана солубилна форма ST2 (енгл. *soluble ST2*, sST2) који има улогу рецептора мамца који неутралише IL-33 имали су већи атеросклеротски плак и смањену експресију IL-5 и anti-oxLDL антитела (141). Код ApoE $^{-/-}$ мишева на режиму исхране са високим садржајем масти, IL-33 је смањивао акумулацију макрофага у атеросклеротском плаку, али површина плака код ових мишева имунохистохемијским бојењем *en face* није директно процењена (141). IL-33 такође може смањити стварање пенастих ћелија макрофага смањењем уноса липида и повећањем одлива холестерола из тих ћелија (142). Предложени механизми ових ефеката су смањена експресија рецептора за сакупљање, као што је CD36 и повећана експресија гена, који промовишу истицање холестерола као што су ApoE, АТФ везујући транспортер A1 (енгл. *ATP binding cassette transporter A1*) ABCA-1 (142). Код ApoE дефицијентних мишева, на режиму исхране са високим садржајем масти, третман rIL-33 смањује развој атеросклеротског плака аорте и повећава ниво серумских атеропротективних цитокина типа 2 (126). Недавни рад, међутим, указује да недостатак ендогено произведеног IL-33 и његовог рецептора ST2 не утичу на развој атеросклерозе код ApoE дефицијентних мишева (143). С друге стране, улога IL-33 у хуманој атеросклерози била је предмет испитивања у ограниченом броју радова са контроверзним резултатима. Интерлеукин IL-33 и IL-33 R (ST2) су експримирани у атеросклеротским плаковима код људи (144).

Клинички подаци открили су да су серумски нивои IL-33 повезани са морталитетом код пацијената који су доживели инфаркт миокарда са СТ елевацијом (STEMI) (145). Повишене вредности циркулишућег IL-33 након имплантације коронарног стента су биле повезане са коронарном рестенозом (146). Клиничке студије су показале повезаност између вредности IL-33 у серуму и тромботичких компликација након руптуре плака (147) и прогресије каротидне атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом (148). IL-33 у хуманим каротидним плаковима повећава протромботичку активност ендотелних ћелија (149). Ове разлике у резултатима добијених на животињским и хуманим моделима атеросклерозе могу се објаснити недавним истраживањем које је расветлило специфичне разлике између врста у обрасцима експресије и имуномодулације IL-33 (33).

2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог испитивања је одредити степен ткивне експресије, ниво циркулишућих IL-10, IL-33 и sST2 код пацијената са каротидном атеросклерозом и њихову повезаност са серумским нивоима других цитокина и стадијумом каротидне атеросклеротске болести.

У том циљу поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Одредити ниво цитокина (IL-33, sST2, IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-23 и IL-10) у системској циркулацији пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији, и здравих особа подударних по полу и старости.
2. Дефинисати и квантификовати стадијум атеросклеротског плака код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији, одређивањем хистопатолошког скорa за процену тежине болести.
3. Имунохистохемијским бојењима испитати ткивну експресију IL-33 и ST2 у узорцима атеросклеротског плака.
4. Дефинисати и квантификовати инфламаторне промене у узорцима атеросклеротског плака, одређивањем броја и заступљености CD68⁺ ћелија.
5. Одредити ниво биохемијских параметара у системској циркулацији пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији (CRP, холестерол, триглицериди, гликемија).
6. Утврдити корелацију између свих клиничких, хистолошких и биохемијских варијабли.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Ниво мерених цитокина у системској циркулацији код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији је виши у односу на ниво истих цитокина мерених у серуму здравих особа.
2. Постоји позитивна корелација између ткивне експресије IL-33 и ST2 и прогресије атеросклеротског плака односно стадијума болести.
3. Број и заступљености CD68⁺ ћелија, је у позитивној корелацији са стадијумом атеросклеротског процеса.
4. Постоји позитивна корелација између бар неких клиничких, хистолошких и биохемијских варијабли.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ова истраживачка студија је спроведена на узорцима крви и серума добијених од пацијената са атеросклеротском стенозом каротидних артерија, који су подвргнути оперативном лечењу, на Институту за кардиоваскуларне болести „Дедиње“, у складу са одобрењем Етичког Одбора ИКВБ Дедиње. Њихово лечење је спроведено према одредбама Декларације о људским правима из Хелсинкија (150), уз одобрење Етичког комитета. Преоперативно је од сваког пацијента понаособ добијен писани информисани пристанак на предложено лечење. У истраживање су били укључени сви узастопни болесници код којих је спроведено хируршко лечење, током периода узимања узорака. Контролну групу су чиниле здраве особе, као и болесници са неатеросклеротским обољењем каротидне артерије.

3.1. Пацијенти

У наше истраживање смо укључили две стотине узастопних пацијената оболелих од критичне стенозе каротидних артерија узрокованих атеросклеротским плаком. Сви пацијенти су примљени ради планираног хируршког лечења каротидне болести.

Ултразвучни Доплер преглед је урађен преоперативно сваком пацијенту ради процене степена стенозе каротидних артерија. Степен стенозе смо проценили у складу са NASCET критеријумима (151) (енгл. *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial criteria*). Такође смо сваком пацијенту урадили СТ ангиографију, ради додатне процене степена стенозе и карактеристика атеросклеротског плака.

Пацијенти који су изабрани за хируршки начин лечења каротидне стенозе су били клинички симптоматски, или асимптоматски пацијенти. Код симптоматских пацијената у анамнези и претходној историји болести налазимо неки облик неуролошког испада, дефицита, церебро-васкуларни инсулт (CVI), пролазно слепило (*amaurosis fugax*), транзиторни исхемијски атак или реверзибилни исхермијски неуролошки дефицит (TIA, RIND). Свим пацијентима је, такође, узета детаљна анамнеза, забележене су претходне операције, хроничне незаразне болести чија патофизиолошка основа може утицати на резултате истраживања, као и присуство удружених васкуларних и кардиолошких обољења. Све пацијенте укључене у ово истраживање смо одабрали кроз планиране и систематски спроведене скрининг програме, које су извели неуролози великог броја здравствених установа Републике Србије.

Пацијентима је преоперативно узет узорак крви, ради даљих серолошких тестова, док је операцијом добијен материјал у виду атеросклеротског плака из каротидне артерије. У наше истраживање смо укључили и тридесет здравих добровољаца, који су чинили контролну групу испитаника, усклађених према полу и старости са групом пацијената, којима је узет узорак крви.

3.2. Хистопатолошка и имунохистохемијска анализа атеросклеротских плакова каротидних плакова

Све атеросклеротске плакове које смо хируршким путем уклонили из каротидних артерија оперисаних пацијената смо иницијално хистопатолошки прегледали. Ови препарати су на стандардан начин замрзнути, потом и укалупљени у парафин. Микротомом смо добили препарате дебљине 5 μ m, које смо обојили стандардним бојењем хематоксилин-еозином (152), и потом прегледали.

Степен атеросклерозе у плаку смо утврдили у складу са АНА класификацијом (153) из 1995. године, а стабилност плака смо проценили према критеријумима које

су претходно описали у својим истраживањима Moreno (154), Shindo (3), као и Mehta и Shah (155).

Према овим критеријумима, стабилни плак карактерише низак садржај липида, дебела и фиброзна капа плака, низак степен запаљења у плаку, као и одсуство знакова руптуре, ремоделовања или крвављења унутар плака.

Све остале плакове, који имају велика, липидима богата језгра, са знацима некрозе у плаку, са танком капом плака, која показује запаљенске промене (<65 μm дебљине), као и оне плакове са знацима ремоделовања плака, знацима крвављења у самом плаку, неоваскуларизације, запаљенским инфилтратима у адвентицији, тачкастим калцификатима, смо означили као нестабилне плакове.

Имунохистохемијска анализа пресека плакова има за циљ одређивање експресије IL-33, ST2, CD-68 и α -SMA. Имунохистохемијском методом смо анализирали 28 плакова, чији су узастопни пресеци инкубирани са примарним анти-IL-33 антителом, примарним анти ST2 антителом, примарним анти CD68 антителом, и примарним анти глаткомишићним α -актин антителом (Dako A/S, Denmark). Идентификација циљних антигена се врши помоћу секундарног, биотинисаног антитела.

Имунохистохемијско бојење смо вршили симултано са позитивном и негативном контролом специфичности бојења према UK NEQAS пропозицијама. Процену степена инфламације у плаку, стабилности плака и нивоа експресије поменутих протеина у испитиваним плаковима су извршила два, међусобно независна истраживача.

3.3. Мерење нивоа цитокина у серуму

Крв смо пацијентима узимали рутински, преоперативно, као и контролним субјектима венепункцијом, у јутарњим сатима, пре доручка. Серум смо потом издвајали центрифугирањем, и чували на -20°C до одмрзавања и припреме за ELISA тест. Нивое испитиваних цитокина смо одређивали употребом hsELISA сетова (R&D Systems Minneapolis, MN), специфичним за хумане цитокине, према упутствима произвођача. Наше истраживање обухвата испитивање серумских нивоа следећих цитокина - IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IL-33.

Абсорбанцу смо мерили ZENYTH 3100 апаратом, на 450nm или 590nm, према упутствима датим у специфичном тесту за тражени цитокин, а вредности добијене овим мерењем смо обрадили употребом софтвера Anthos Multimode Detector-a. Резултате смо изразили у вредностима pg/ml (130).

3.4. Статистичка обрада података

Резултате смо изразили као медијану или средњу вредност \pm SE. Клиничке и хистолошке податке смо поредили између група (симптоматски и асимптоматски пацијенти) помоћу χ^2 теста. Kruskal-Wallis и Mann-Whitney непараметријски тестови или независни Studentov t-test су употребљени да испитамо значајност испитиваних разлика између група, у зависности од нормалности расподеле добијених података. Вредност параметра $p < 0,05$ смо сматрали статистички значајном. Све статистичке операције смо урадили у програму IBM SPSS v.20.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Демографске и клиничке карактеристике плака пацијената са каротидном атеросклерозом.

Пацијенти су разврстани у две групе на основу степена каротидне стенозе: они са стенозом мањом или једнаком 70% или већом од 70% стенозе како је приказано у Табели 1. Није било значајних разлика између две групе пацијената у односу на старост, пол, кардиоваскуларне факторе ризика: дислипидемију, пушачки статус и дијабетес, присуство болести периферних артерија (енгл. *peripheral artery disease*, PAD), коронарне артеријске болести (енгл. *coronary artery disease*, CAD) или неуросимптома. Међутим, детектовали смо статистички значајно више пацијената са хипертензијом и коронарном стенозом већом од 70% у поређењу са пацијентима који су имали хипертензију и стенозу мању од 70%.

Кардиоваскуларни фактори ризика и хистологија плака	Каротидна стеноза ≤ 70% n=18 (9.3%)	Каротидна стеноза ≥70% n=176 (90.7%)	P
Пол			
Старост	66.3 ± 6.8	66.4 ± 8.0	.994
Мушки	12 (11.2)	95 (88.8)	.303
Женски	6 (6.9)	81 (93.1)	
Diabetes mellitus			
Да	5 (7.8)	59 (92.2)	.566
Не	13 (10.4)	112 (89.6)	
Пушење			
Да	15 (10.6)	127 (89.4)	.419
Не	3 (6.2)	45 (93.8)	
Хипертензија			
Да	14 (7.7)	168 (92.3)	.003 ^b
Не	4 (50.0)	4 (50.0)	
Неуросимптоми			
Да	109 (98.2)	2 (1.8)	.097
Не	85 (96.6)	3 (3.4)	
Триглицериди mmol/L, (SD)	1.42 ± 0.46	1.54 ± 0.55	.400
Креатинин mmol/L, (SD)	113.63 ± 87.95	83.85 ± 18.57	.273
PAD			
Присутна	4 (16.0)	21 (84.0)	.259
Одсутна	14 (8.3)	155 (91.7)	
CAD			
Присутна	5 (6.2)	76 (93.8)	.207
Одсутна	13 (11.5)	100 (88.5)	
Инфламаторна инфилтрација у плаку			
Присутна	1 (14.3)	6 (85.7)	1.000
Одсутна	17 (9.1)	170 (90.9)	
Калцификација у плаку			
Присутна	7 (9.7)	65 (90.3)	.870
Одсутна	11 (9.0)	111 (91.0)	
Крварење у плаку			
Присутно	2 (12.5)	14 (87.5)	.648
Одсутно	16 (9.0)	162 (91.0)	
Руптура плака			
Присута	4 (7.1)	52 (92.9)	.514
Одсутна	14 (10.1)	124 (89.9)	
АНА класификација каротидних плакова			
IV	0 (0.0)	13 (100.0)	.737
Va	3 (15)	17 (85)	
Vb	3 (10.3)	26 (89.7)	
Vc	7 (10.9)	57 (89.1)	
VIa	3 (5.9)	48 (94.1)	
VIb	2 (13.3)	13 (86.7)	
VIc	0 (0.0)	2 (100.)	

PAD, енгл., peripheral artery disease; CAD, енгл., coronary artery disease

^a Вредности су изражене као средња вредност ± SE или апсолутни бројеви са израчунатим процентом

^b Статистички значајно (енгл. Chi-Square, Independent-Samples T, Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis H tests; P < .05)

^c Подаци о степену стенозе за шест пацијената нису били доступни

Табела 1. Демографске и клиничке карактеристике пацијената на ендартеректомији Табела 1 приказује морфолошке карактеристике плака, и одсуство значајне разлике између две групе у односу на инфламаторне инфилтрације плака, калцификације унутар плака, крварења, руптуре и типова каротидних плакова.

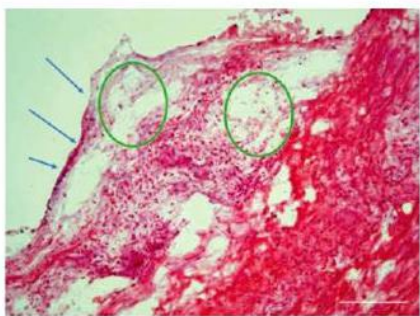
4.2. Хистолошке карактеристике каротидних плакова

На основу хистолошких карактеристика каротидних плакова, пацијенти су класификовани у групе IV, V и VI према АНА критеријумима.

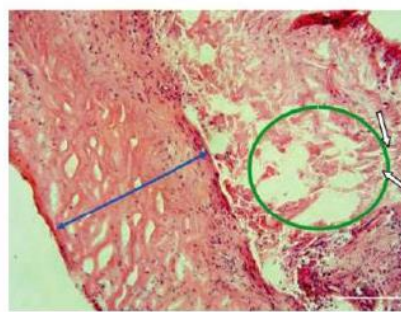
Све атеросклеротске лезије у овој студији биле су напредне атеросклеротске лезије. Од 191 анализираних каротидних плакова (Фигура 1Б), 13 су били атеросклеротски плакови у стадијуму атерома (6,7%, IV тип лезије), 43 је било у стадијуму фиброатерома (22,4%, V тип лезије), 66 су били фиброзни плакови (34,4%, лезија типа Vc), 69 је било у фази руптуре атерома са калцификацијама, атерома компликованог претходном руптуром, тромбозом или крварењем, тако означеном као VI тип лезије (36,5%).

На основу хистолошких карактеристика које дефинишу стабилност атеросклеротских плакова, пацијенти су подељени у две групе, прву групу чине пацијенти са стабилним атеросклеротским лезијама (66 пацијената, 34,56%), а у другој групи су били пацијенти са нестабилним плаковима (125 пацијената, 65,44%).

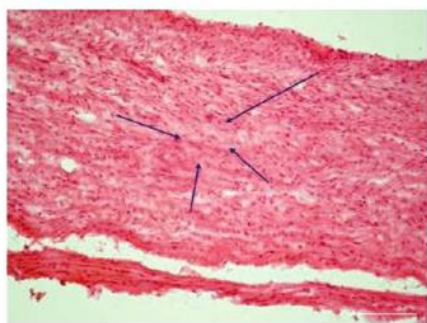
Репрезентативне слике типова каротидних плакова приказане су на Фигури 1А, 1Б, 1В и 1Г.

A

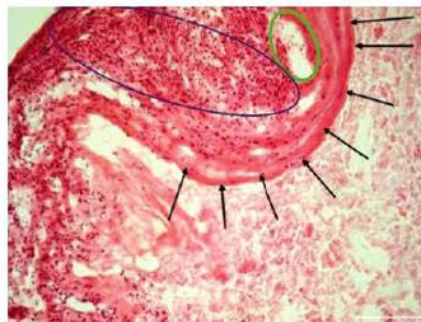
← танка фибозна капа
○ липидна језгра

Атером**Б**

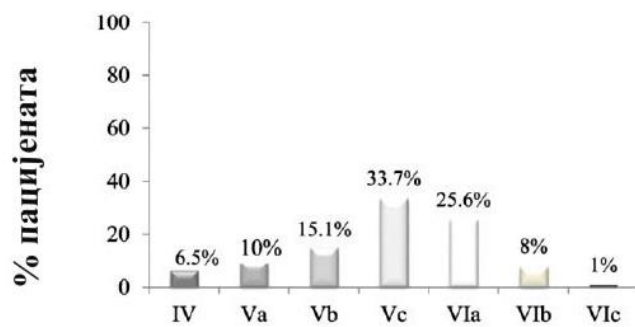
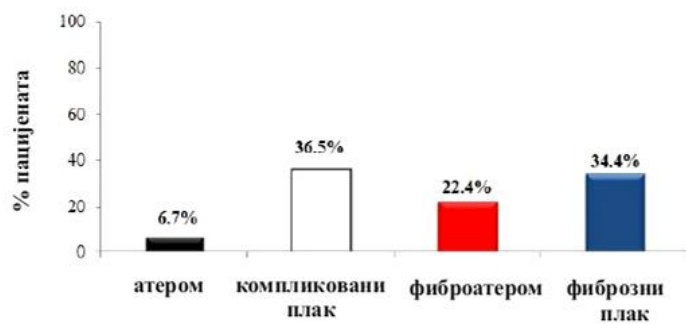
↔ дебела фибозна капа
○ липидна језгра
← кристали холестерола

Фиброатером**В**

← хипоцелуларно везивно ткиво

Фибром**Г**

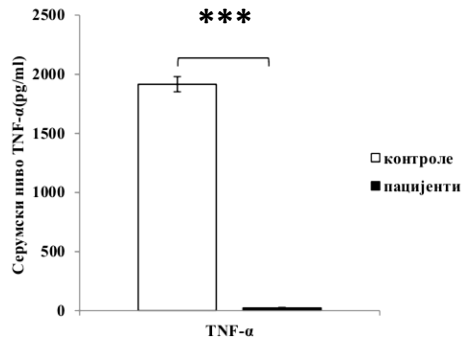
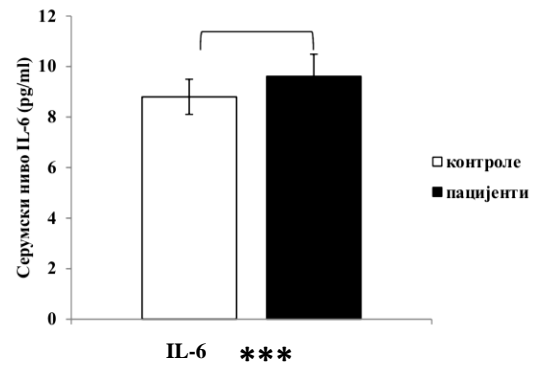
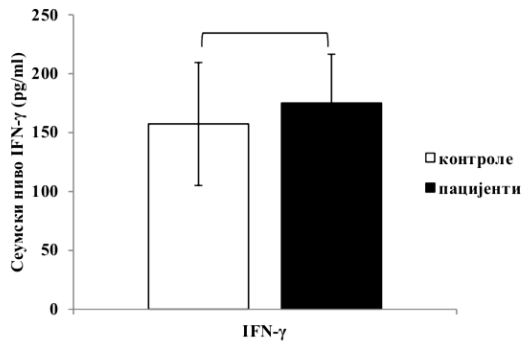
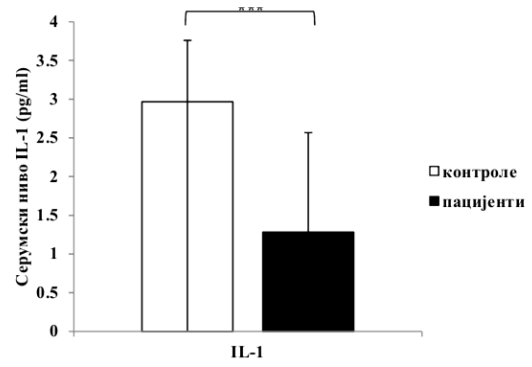
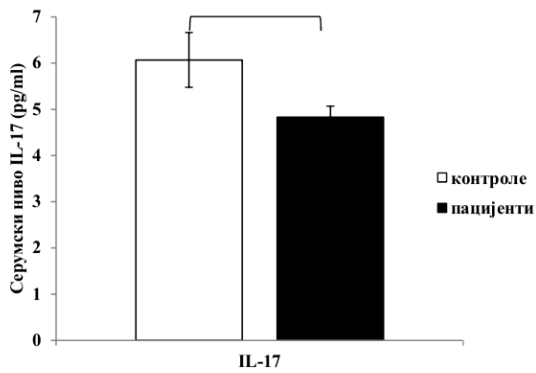
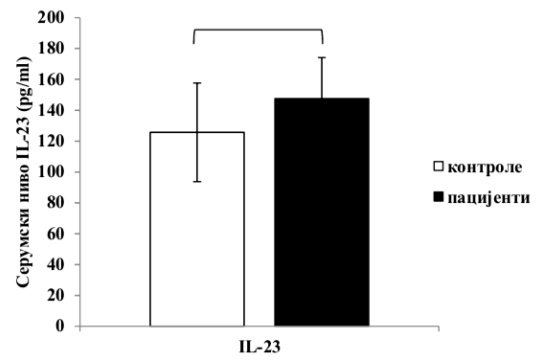
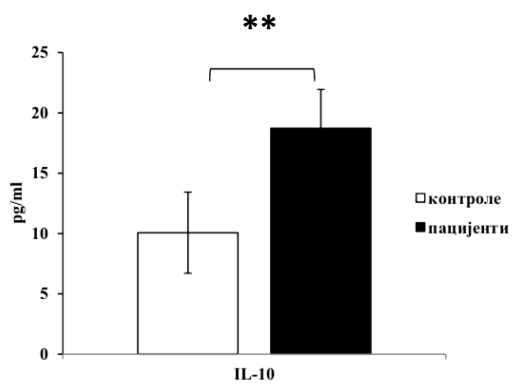
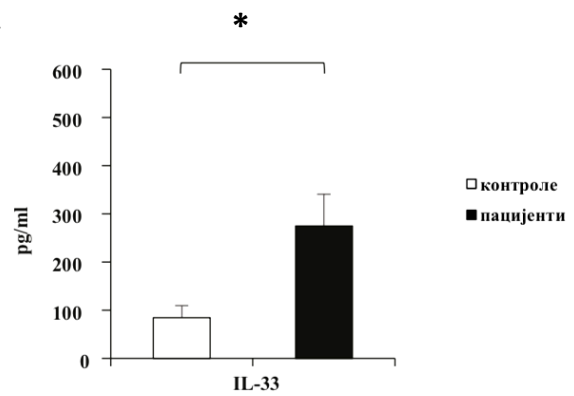
← крварење
○ липидна језгра
○ инфламаторни инфилтрат

Компликовани плак**Д****АНА класификација каротидних плакова****Б**

Фигура 1. АНА класификација каротидних плакова у испитиваној популацији А-Г. Репрезентативне слике типова каротидних плакова четири групе, на основу њиховог састава, класификована су као атером, фиброатером, фибром и компликовани плак. Репрезентативне фотографије које показују бојења Н/Е четири различите врсте атеросклеротских плакова уклоњених из унутрашње каротидне артерије. Приказан је атером са танким влакнастим чепом, великим језгром липида, повећаном инфламацијом плака и позитивним васкуларним ремоделирањем (Фигура 1А), фиброатером показује присуство великог липидног језгра и кристала холестерола, прекривених широким фиброзним чепом (Фигура 1Б), фиброзни плак са доминацијом хипоцелуларног везивног ткива (Фигура 1В), компликованог плака са крварењем у плаку, инфламаторног инфилтрата и језгра липида (Фигура 1Г). Увећање 200х, промер 100µм. Д. Пропорције пацијената са каротидном болешћу са различитим врстама плакова према АНА критеријумима (Фигура 1Д). Дистрибуција пацијената са СЕА на основу хистопатолошких анализа каротидних плакова (n = 191) (Фигура 1Ђ).

4.3. Серумски нивои цитокина IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23 и IL-33 се разликују између СЕА пацијената и здравих контрола

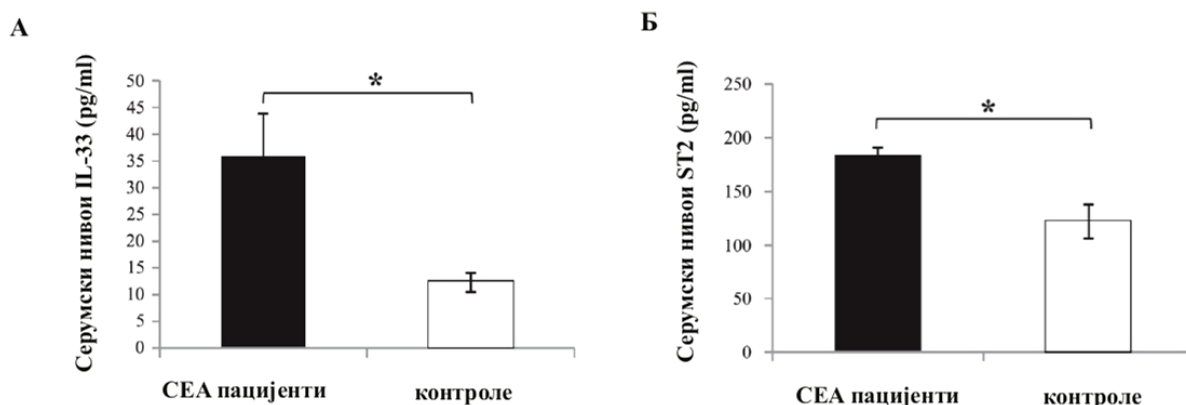
Анализирали смо серумске нивое цитокина IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23 и IL-33 у серуму здравих пацијената и пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији. Серумски нивои TNF-α и IL-1β, су били значајно мањи у серуму СЕА пацијената у поређењу са здравим контролама (***p <0,001; Фигура 2А, Г). Серумски ниво IL-17 био је мањи код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији у поређењу са здравим пацијентима, али без статистички значајне разлике (p>0.05; Фигура 2Д). Међутим, серумски нивои IL-6, IFN-γ, IL-23, су били виши код СЕА пацијената, али без статистичке значајности (p>0.05; Фигура 2Б, В, Ђ), док су IL-33 и IL-10 били значајно виши код СЕА пацијената, у односу на контролу (**p <0,01; p<0.05; Фигура 2Е, Ж).

А**Б****В****Г****Д****Б****Е****Ж**

Фигура 2. Серумски ниво цитокина IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23 и IL-33 у серуму здравих пацијената и пацијената подвргнутих СЕА. Значајно мање вредности серумског TNF- α и IL-1 β код СЕА пацијената у поређењу са здравима пацијентима (*) $p < 0,001$; Фигура 2А, Г). Серумски нивои IFN- γ , IL-6 и IL-23 су били виши код СЕА пацијената, у поређењу са здравим контролама, али без статистичке значајности ($p > 0,05$; Фигура 2Б, В, Ђ). IL-17 је био мањи код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији у поређењу са здравим пацијентима, али без статистички значајне разлике ($p > 0,05$; Фигура 2Д). Серумски нивои IL-10 и IL-33 су били значајно виши код СЕА пацијената (** $p < 0,01$; Фигура 2 Е; * $p < 0,05$, Фигура 2Ж). Подаци су представљени као средња вредност+SEM.**

4.4. Серумски нивои IL-33 и sST2 су повећани код пацијената који су подвргнути каротидној ендартеректомији

Показана је значајна разлика у серумским нивоима IL-33 код пацијената са каротидном атеросклерозом у поређењу са здравим особама (Фигура 3А). Виши нивои IL-33 су били код пацијената са СЕА у поређењу са здравим контролама ($35,86 \pm 7,93$ pg/ml у поређењу $12,29 \pm 1,8$ pg/ml, $p < 0,05$) (Фигура 3А). Исти резултати су добијени када је у серуму одређиван ниво sST2. Пацијенти укључени у ову студију имали су већи ниво sST2 у поређењу са здравим контролама ($183 \pm 8,03$ у поређењу $122,31 \pm 15,89$ pg/ml, $p < 0,05$) (Фигура 3Б).



Фигура 3. Серумски нивои IL-33 и sST2 код пацијената који су подвргнути каротидној ендартеректомији. (А) Серумски нивои IL-33 код пацијената са каротидном болешћу и здраве контроле ($35,86 \pm 7,93$ pg/ml у поређењу са $12,29 \pm 1,8$ pg/ml) (Б) нивои серумског sST2 код пацијената са каротидном болешћу и контроле ($183 \pm 8,03$ у поређењу са $122,31 \pm 15,89$ pg/ml), * $p < 0,05$; резултати су изражени као средња вредност ± SE.

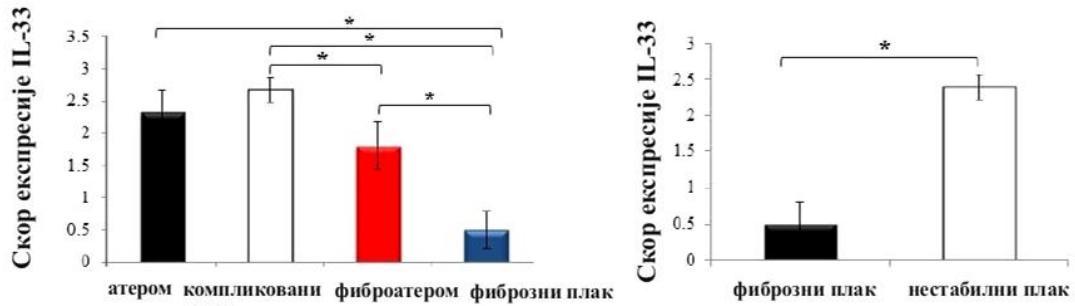
4.5. Експресија ткивног IL-33 и ST2 у различитим врстама атеросклеротских плакова

Хистоморфолошка и имунохистохемијска анализа је представљена у Табели 2. Експресија IL-33 и ST2 у различитим типовима атеросклеротских лезија блиско корелира и показује сличне обрасце. Експресија IL-33 и ST2 је изражена и слична код атероматозних, фиброатероматозних и компликованих атеросклеротских лезија, док је значајно слабија код фиброзних плакова, као што је приказано Фигури 4А и 4Б. Дакле, највиши ниво експресије IL-33 и ST2 у плаку ограничен је на нестабилне плакове, док је најнижи ниво експресије је примећен у стабилним, фиброзним плаковима (Фигура 4А и 4Б).

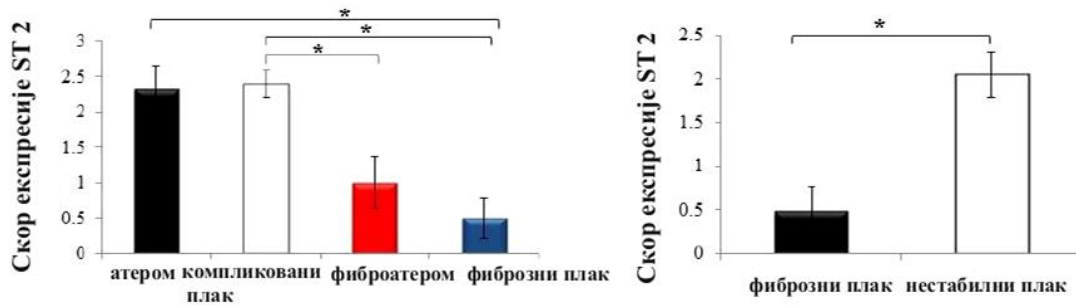
Тип атеросклеротске лезије	Број анализа раних плакова	Степен инфламације	Експресија IL-33	Предоминантни типови ћелија које експримирају IL-33
IV – атером	7	++/+++	+++	Пенасте ћелије доминантно, лимфоцити, ендотелне ћелије
Va – фиброатером	7	+/++	+/++	Макрофаги, лимфоцити, ендотелне ћелије глатке мишићне ћелије
Vc – фиброзни плак	7	0/+	+	ендотелне ћелије глатке мишићне ћелије, Макрофаги, лимфоцити,
VI – компликована лезија	7	++/+++	+++	Пенасте ћелије доминантно, лимфоцити, ендотелне ћелије

Табела 2. Хистоморфолошка и имунохистохемијска анализа

A



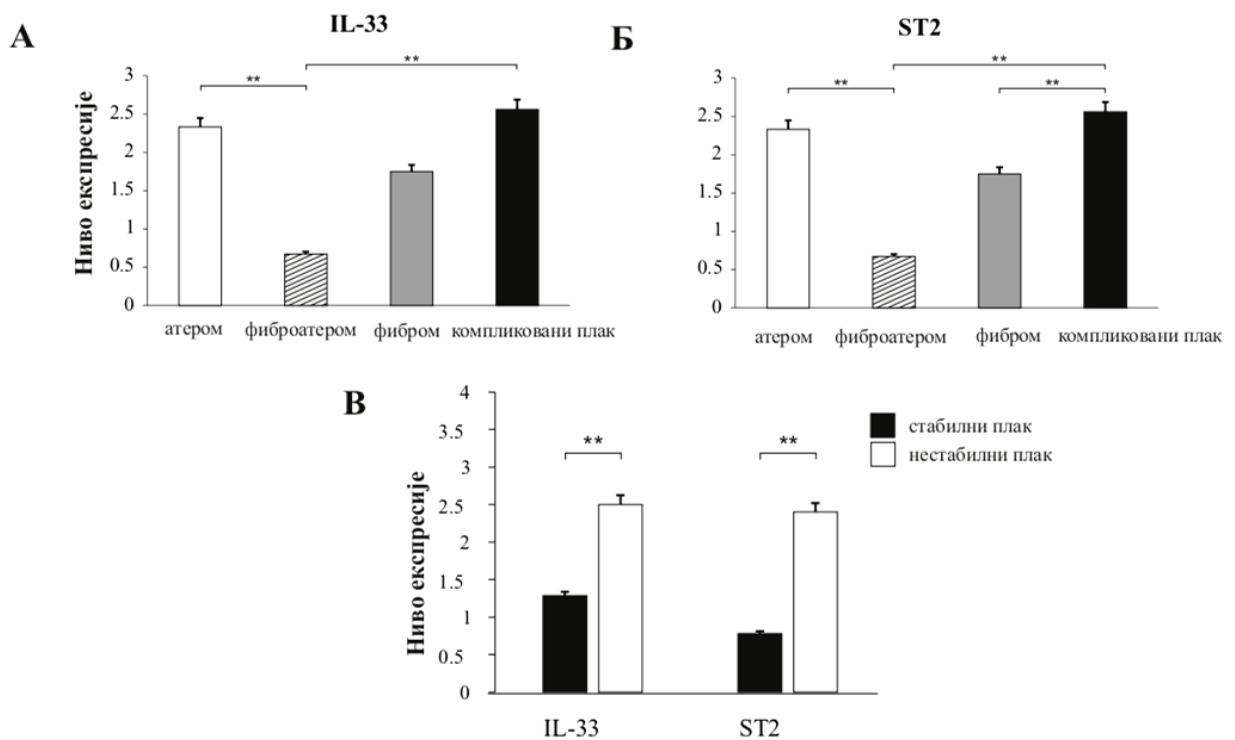
Б



Фигура 4. Експресија IL-33 и IL-33R у каротидним атеросклеротским плаковима.

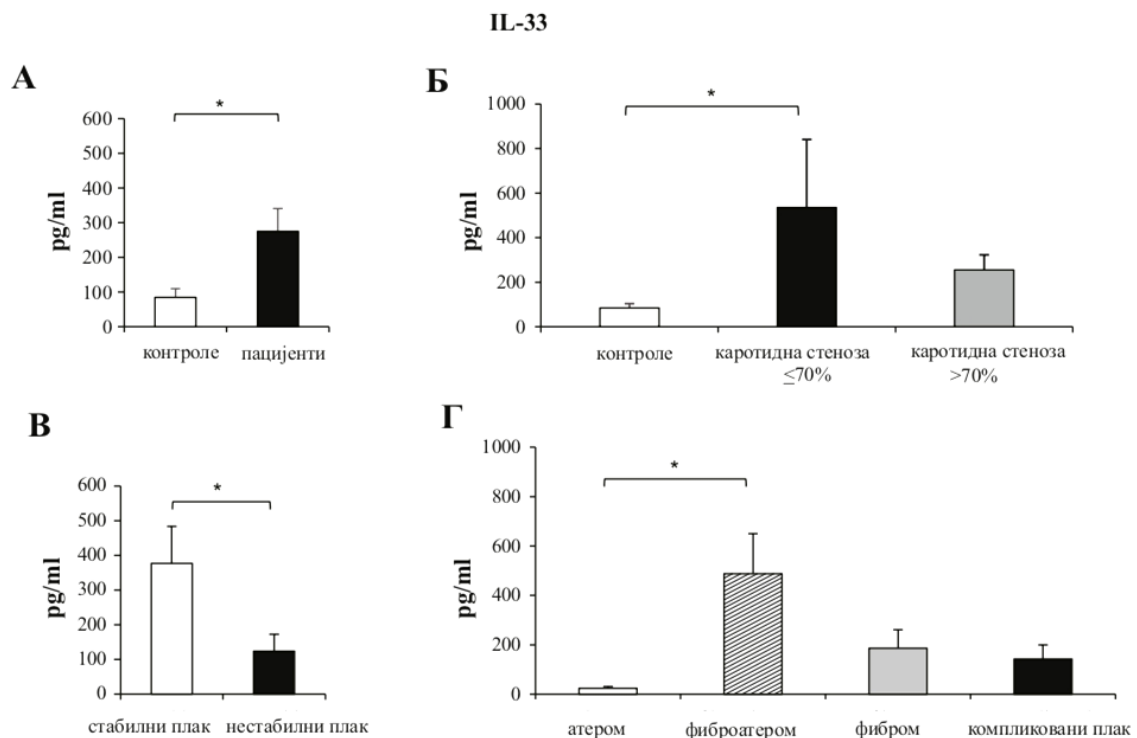
Експресија IL-33 и IL-33R у каротидним атеросклеротским плаковима. (А) Репрезентативне фотомикрографије имунобојења IL-33 и IL-33R четири типа каротидних плакова (n= 28). Бројне ћелије позитивне на IL-33 и IL-33R углавном су биле локализоване у некротичном језгру богатом липидима, инфламацијском инфилтрату и пенастим ћелијама што се види код атерома и компликованих плакова (стрелице), док је мање обиље IL-33 и IL-33R позитивних ћелија примећено код фиброатерома и фиброма (стрелице). (Б) Нивои експресије IL-33 и IL-33R (скор) у стабилним (n= 14) и нестабилним плаковима (n= 14). Резултати су изражени као средња вредност+SD ** p< 0,01. Увећање 200x, промер 500µm.

Као што је већ објашњено, образац експресије IL-33 и ST2 блиско је повезан са нивоом инфламације у прегледаним атеросклеротским плаковима, тј. са нивоом нестабилности плака. Стога, је степен инфилтрације инфламацијских ћелија био је повезан са нивоима експресије IL-33 и ST2 унутар плакова. Статистички значајно виши нивои експресије IL-33 и ST2 су били код пацијената са компликованим плаком, у поређењу са пацијентима који су имали фиброатероме (** $p < 0,01$; Фигура 5А, Б). Исто тако, статистички значајно виши ниво експресије ST2 је био код пацијената са компликованим плаком у поређењу са онима који су имали фибром (** $p < 0,01$; Фигура 5Б). Значајно виши ниво експресије IL-33 и ST2 такође је уочен код пацијената са атеромом, у поређењу са онима који су имали фиброатером (** $p < 0,01$; Фигура 5А, Б). Ниво експресије IL-33 и ST2 је статистички значајно виши код пацијената са нестабилним плаком, у поређењу са пацијентима који имају стабилне плакове (** $p < 0,01$; Фигура 5В).



Фигура 5. Експресија IL-33 и IL-33 рецептора у каротидном артеријском плаку. Квантификација IL-33 и ST2 позитивних ћелија у четири хистолошка типа и два типа стабилности лезије. Резултати су изражени као средња вредност +SD за наведене јединице, ** $p < 0.01$. Увећање 200 \times , промер 100 μm .

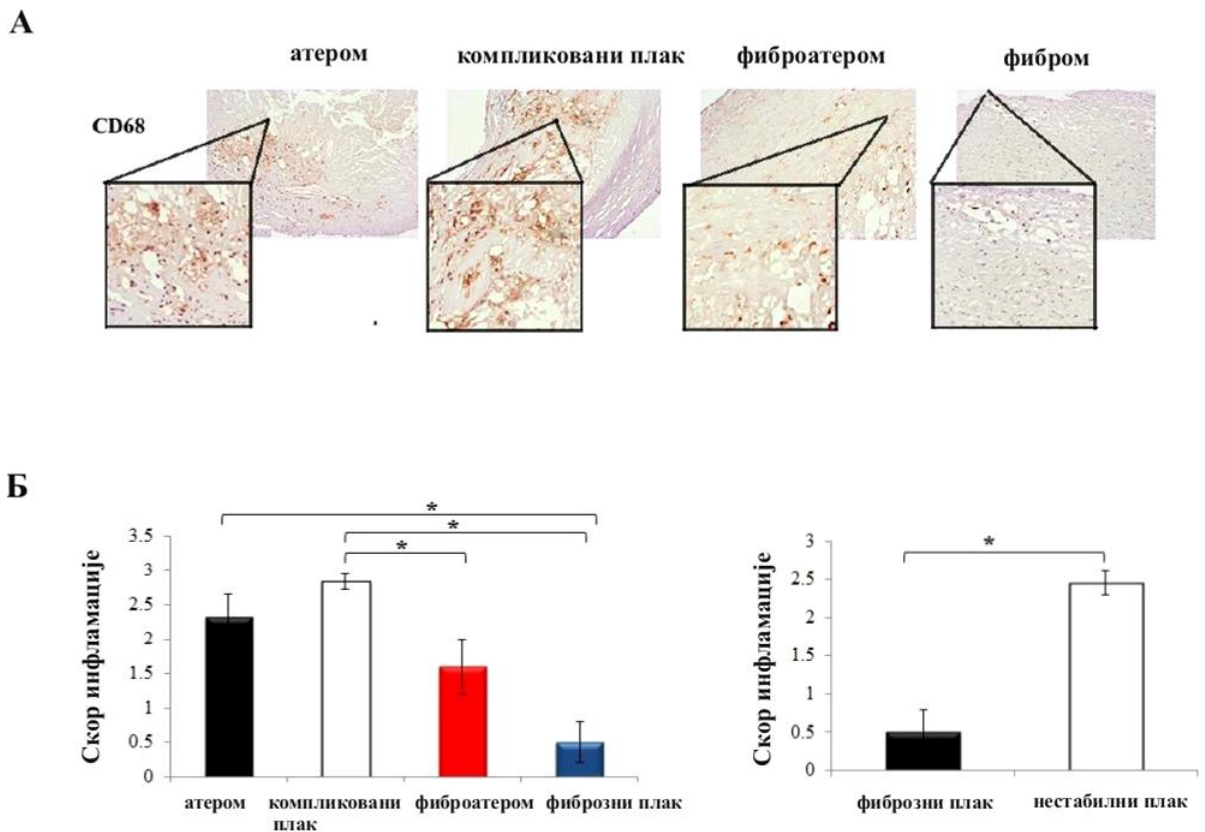
Анализирали смо разлику у серумском нивоу IL-33 код пацијената са СЕА и здравих контрола. Показано је серумски ниво IL-33 значајно већи код пацијената са СЕА у односу на контроле (* $p < 0,05$; Фигура 6А). Група пацијената са стенозом мањом од 70% имала је значајно већи ниво IL-33 у поређењу са здравим контролама (* $p < 0,05$; Фигура 6Б). Ако се пореди серумски ниво IL-33 између пацијената са каротидном стенозом мањом од 70% и оних пацијената са каротидном стенозом већом од 70%, ниво IL-33 је већи у групи пацијената са каротидном стенозом мањом од 70%, али без статистички значајне разлике између ове две групе ($p > 0,05$; Фигура 6Б). Затим смо анализирали разлику у серумском нивоу IL-33 код пацијената са стабилним и нестабилним каротидним плаковима. Серумски ниво IL-33 био је значајно већи код пацијената са стабилним плаковима, у поређењу са пацијентима који су имали нестабилне плакове (* $p < 0,05$; Фигура 6В). Серумски ниво IL-33 био је значајно већи код пацијената са фиброатеромом, у поређењу са групом пацијената који су имали атером (* $p < 0,05$; Фигура 6Г).



Фигура 6. Серумски ниво IL-33 код СЕА пацијената. Поређење серумских нивоа IL-33 између хируршких пацијената и контролне групе (А), као и међу хируршким пацијентима, када је цела група подељена у складу са степеном стенозе (Б), стабилношћу плака (В) и хистолошком структуром плака (Г). * $p < 0,05$ СЕА пацијената у односу на контролу; * $p < 0,05$ у односу на пацијенте са каротидном стенозом $\leq 70\%$ и * $p < 0,05$ пацијената са стабилним у поређењу са нестабилним плаком. Подаци су представљени као средња вредност+SEM.

4.6. Експресија ткивног интерлеукина 33 и ST2 корелира са инфламацијом у плаку

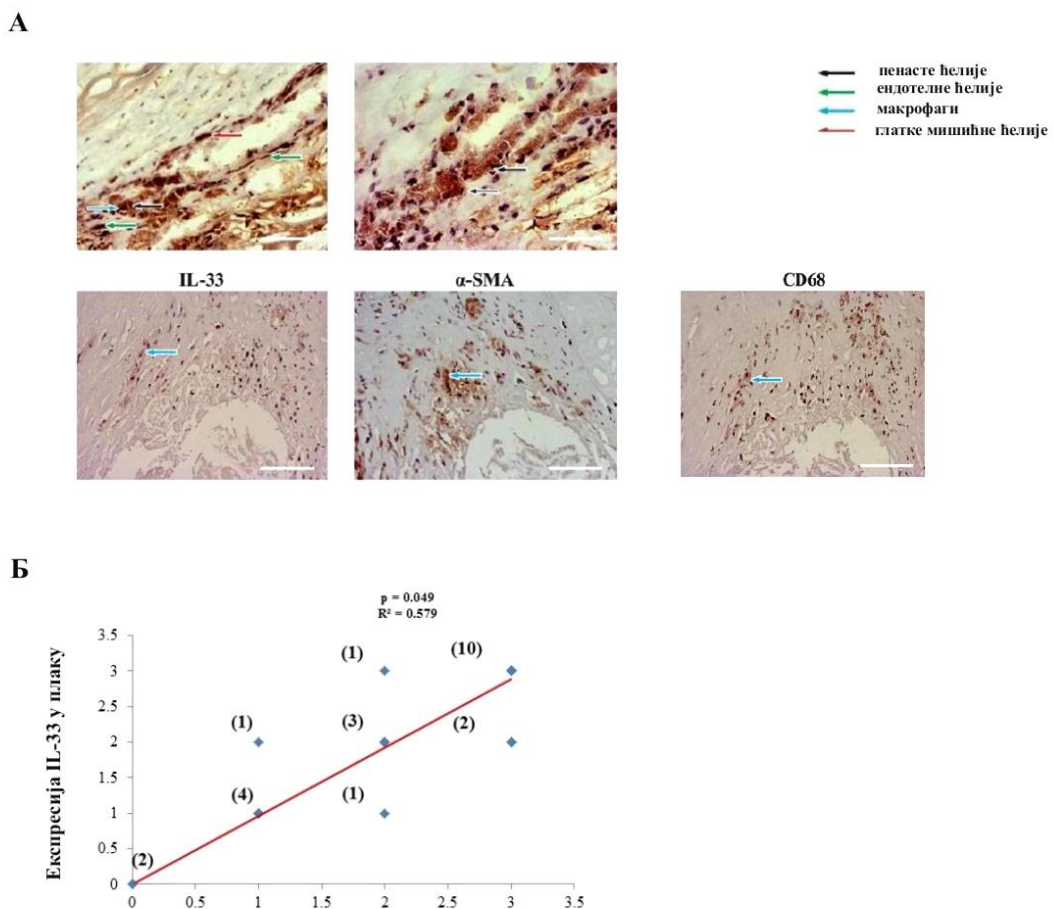
Штавише, овај образац експресије IL-33 и ST2 блиско је повезан са нивоом инфламације у прегледаним атеросклеротским плаковима (Фигура 7А). Нестабилне атеросклеротске лезије су показале обилно присуство инфламацијских ћелија и већу инфламацију, док фиброзне, стабилне плакове одликује доминантно присуство екстраћелијског матрикса са разбацаним и спорадичним ћелијским елементима. Степен инфилтрације инфламацијских ћелија био је повезан са нивоима експресије IL-33 и ST2 унутар плакова. Плакови са мање обилним запаљенским инфилтратом су имали нижи ниво експресије IL-33 и ST2, као нпр. фиброзни плакови. Дакле, највиши ниво CD68 позитивних макрофага у плаку је ограничен на нестабилне плакове, док је најнижи ниво експресије забележен у стабилним, фиброзним плаковима (Фигура 7Б).



Фигура 7. Инфламација у каротидним атеросклеротским плаковима. (А) Репрезентативне фотомикрографије које показују ткивну експресију CD68 у плаковима каротидне артерије (n= 28). Експресија CD68 је највећа у компликованим и атероматозним плаковима. Код компликованих плакова инфламација је знак хистолошке слике. У атерому, експресија CD68 је ограничена на ткивне макрофаге. Низак ниво експресије CD68 откривен је у фиброатерому, пропорционално малом броју ткивних макрофага. Најнижи ниво експресије CD68 је откривен у фибромима. (Б) Поређење скора инфламације код четири врсте каротидних плакова и код у нестабилних (вулнерабилних) и стабилних (фиброзних) плакова (стабилни плакови n= 14; нестабилни плакови n= 14). Резултати су изражени као средња вредност+SD **p < 0,01. Увећање 200x, размера 500µм.

4.7. Постоји позитивна корелација између експресије IL-33 у плаку и сора инфламације

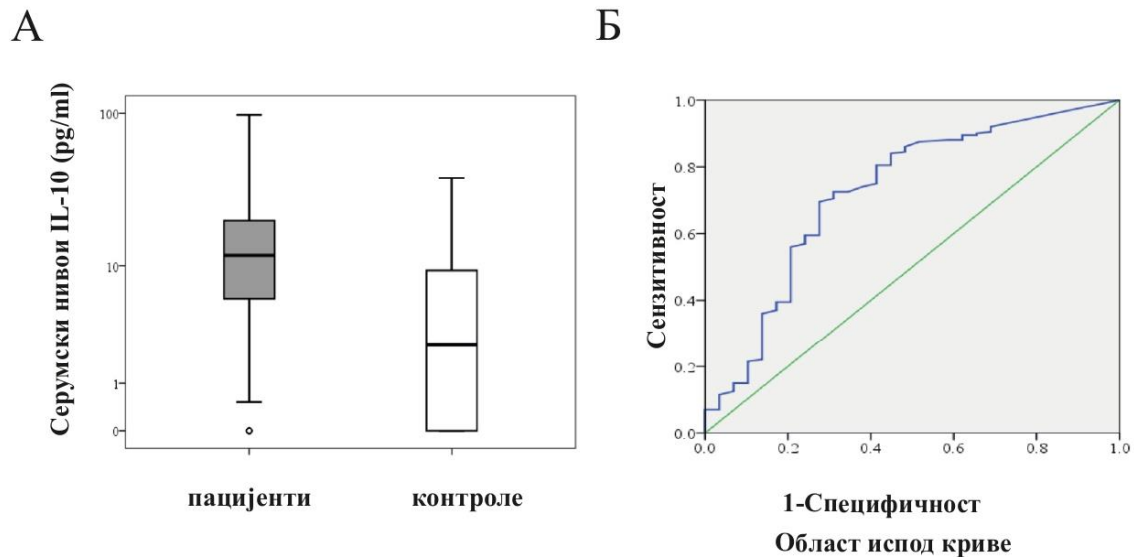
Експресија IL-33 је углавном ограничена на различите типове ћелија у атеросклеротским лезијама највише у пенастим ћелијама, али се такође примећује да је изражена у ендотелним ћелијама, мононуклеарним ћелијама и ћелијама глатких мишића у слоју медија крвних судова (Фигура 8А). Да би се потврдило да макрофаги унутар плакова експримирају IL-33, обојени су узастопни серијски пресеци на CD68 и α -SMA. Образац ћелијске експресије CD68 корелира са експресијом IL-33 у различитим врстама атеросклеротских плакова. Утврђено је да удео IL-33 позитивних пенастих ћелије експримира α -SMA, маркер ћелија глатких мишића (Фигура 8А). Према томе уочена је значајна корелација између нивоа експресије IL-33 и инфламаторног сора у анализираним плаковима ($p = 0.579$, $p = 0.049$) (Фигура 8Б).



Фигура 8. Корелација између експресије IL-33 у плаку и сора инфламације плака. (А) Ћелијско порекло IL-33 унутар каротидних плоча. Репрезентативне фотомикрографије IL-33 обојених пенастих ћелија, ендотелних ћелија, макрофага и васкуларних ћелија глатких мишића у каротидним плаковима (горње плоче, стрелице). Серијски пресеци каротидних атеросклеротских лезија ($n = 28$) који показују ко-бојење IL-33 са α -SMA и CD68 позитивним ћелијама (доње плоче, стрелице). (Б) Позитивна корелација између нивоа експресије плака IL-33 и сора инфламације плака (Spearman-ов коефицијент корелације $R^2 = 0.579$, $*p < 0.05$).

4.8. Серумски нивои IL-10 су повећани код пацијената који се подвргавају ендартеректомији у поређењу са здравим контролама

У овом истраживању је учествовало 200 пацијената који су подвргнути каротидној ендартеректомији од којих је било 110 мушкараца (55%) и 90 жена (45%), у распону од 43 до 83 године (просек $66,5 \pm 7,9$). Показано је да је просечан ниво IL-10 у серуму код здравих испитаника био $7,2 \pm 1,8$ pg/ml. Значајно виши ниво IL-10 био је у серуму пацијената са каротидном атеросклерозом у поређењу са здравим субјектима ($p=0,001$; Фигура 9А). Пацијенти који су подвргнути каротидној ендартеректомији имали су значајно већи просечни ниво IL-10 ($18,7 \pm 3,2$ pg/ml; $p=0,001$) у поређењу са здравим субјектима. ROC крива је показала да су серумски нивои IL-10 показали добру дискриминаторну ефикасност између здравих појединаца и пацијената са каротидном болешћу ($AUC = 0,723$, $p = 0,0001$) ($p = 0,0001$; Фигура 9Б).



Област	Стандардна грешка	Асимптоматски Sig. b	Асимптоматски 95% Интервал конфидентности	
			Доња граница	Горња граница
.723	.055	.000	.615	.831

Фигура 9. Серумски нивои IL-10 код пацијената са каротидном болешћу А. Серумски нивои IL-10 су повећани код пацијената са ендартеректомијом Б. ROC крива за IL-10 код здравих појединаца у поређењу са пацијенатима са каротидном атеросклерозом

4.9. Нема разлике у серумском нивоу IL-10 код пацијената са различитим клиничким карактеристикама

Није било значајних разлика у серумским нивоима IL-10 код пацијената у односу на старост, пол, кардиоваскуларне факторе ризика: хипертензију, дислипидемију, пушачки статус, дијабетес и степен каротидне стенозе или неуросимптоме. Пацијенти са САД имали су значајно веће серумске концентрације IL-10 у поређењу са пацијентима без САД ($25,8 \pm 7,1$ pg/ml у поређењу са $12,1 \pm 1,2$, $P = 0,031$), док су пацијенти са РАД имали сличне серумске нивое IL-10 у поређењу са онима без РАД -а. Ови резултати су сумирани у Табели 3.

Варијабле	Серумски ниво IL-10 (pg/ml) n (%)	P
Узраст		
≤ 65	12.4 (7.2 - 23.2) 92 (47.4)	.627
>65	10.8 (4.6 - 16.6) 102 (52.6)	
Пол		
Мушки	12.3 (7.3-22.2) 109 (54.8)	.520
Женски	11.0 (3.9 - 17.1) 90 (45.2)	
Пушење		
Да	11.3 (5.6 - 20.19) 146 (74.9)	.701
Не	13.2 (6.3 - 20.4) 49 (25.1)	
Diabetes mellitus		
Да	11.0 (4.0 - 22.8) 66 (34.0)	.551
Не	12.0 (6.4 - 19.8) 128 (66.0)	
Хипертензија		
Да	11.6 (5.7 - 20.2) 187 (95.9)	.658
Не	12.5 (8.5 - 29.7) 8 (4.1)	
Степен каротидне стенозе		
≤70%	9.9 (6.2 - 18.6) 18 (9.2)	.839
>70%	12.3 (5.7 - 21.4) 176 (90.8)	
CAD		
Присутна	15.7 (7.9 - 25.6) 85 (42.7)	.031 ^b
Одсутна	9.4 (4.8 - 15.5) 114 (57.3)	
PAD		
Присутна	9.8 (4.2 - 16.7) 26 (13.1)	.524
Одсутна	12.2 (6.0 - 16.7) 173 (86.9)	
Неуросимптоми		
Да	11.0 (5.4 - 17.5) 111 (55.8)	.918
Не	13.4 (6.1 - 23.7) 88 (44.2)	

PAD енгл. peripheral artery disease; CAD енгл. coronary artery disease;

^a Вредности су приказане као медијана и крећу се од 25. до 75.перцентила или као апсолутни бројеви са израчунатим процентом

^b Статистичка значајност (Mann-Whitney U test; P < .05).

Табела 3. Серумски нивои интерлеукина-10: Поређење између пацијената са различитим клиничким карактеристикама

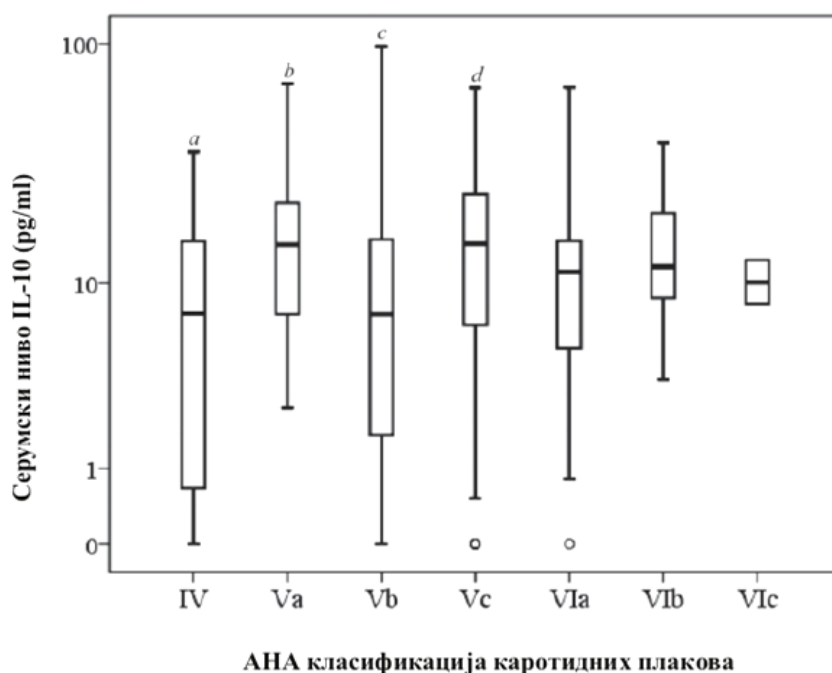
4.10. Серумски нивои IL-10 су повезани са хистолошким особинама каротидних плакова

Није било значајне разлике у серумским нивоима IL-10 код пацијената у односу на присуство инфламације унутар плака, крварење, руптуру или калцификацију (Табела 4). Постојала је значајна разлика у серумским нивоима IL-10 код пацијената са различитим врстама каротидних плакова према АНА критеријумима као што је приказано на Фигури 10. Када је серумски ниво IL-10 анализиран у односу на хистолошке карактеристике каротидних плакова, највећи ниво IL-10 нађен је у групи пацијената са фиброзним плаковима ($26,8 \pm 9,0$ pg/ml), затим у групи пацијената са фиброатероматозним плаковима ($18,0 \pm 3,5$ pg/ml). Пацијенти са фиброатеромом који се компликовао крварењем имали су серумски ниво IL-10 од $15,1 \pm 2,4$ pg/ml; пацијенти са руптуром атерома са калцификацијама $13,1 \pm 1,6$ pg/ml, пацијенти са фиброатеромом са калцификацијама $11,5 \pm 3,3$ pg/ml и најнижи серумски ниво IL-10 уочен је у групи пацијената са атеромом који је компликован претходном тромбозом ($10,3 \pm 2,3$ pg/ml) и атеромом ($10,9 \pm 3,2$ pg/ml). Резултати циркулишућих нивоа IL-10 између пацијената са различитим врстама каротидних плакова сумирани су у Табели 4.

Хистологија каротидног плака	Серумски ниво IL-10 (pg/ml) n (%)	P	
Инфламаторна инфилтрација у плаку	Присутна	21.4 (13.8 – 26.8) 7 (3.9)	.640
	Одсутна	(8.0 – 70.2) 192 (96.1)	
Калцификација у плаку	Присутна	11.1 (3.8 – 15.7) 73 (36.7)	.189
	Одсутна	13.0 (6.6 – 23.4) 126 (63.3)	
Крварење у плаку	Присутна	13.0 (8.6 – 21.8) 17 (8.5)	.808
	Одсутна	11.6 (5.4 – 20.0) 182 (91.5)	
Руптура плака	Присутна	11.1 (6.5 – 15.5) 56 (28.1)	.351
	Одсутна	12.5 (5.7 – 23.0) 143 (71.9)	
АНА класификација каротидног плака	IV	7.3 (0.3 – 18.0) 13 (6.5)	.041 ^b
	Va	14.7 (7.3 – 23.00) 20 (10.0)	
	Vb	7.3 (1.3 – 15.6) 30 (15)	
	Vc	14.9 (6.4 – 24.6) 67 (33.7)	
	VIa	11.3 (4.8 – 15.7) 51 (25.5)	
	VIb	11.9 (8.5 – 21.9) 16 (8.0)	
	VIc	10.4 (8.1 – 12.6) 3 (1.5)	

^a Вредности су приказане као медијана и крећу се од 25. до 75. перцентила или апсолутни бројеви са израчунатим процентом
^b Статистички значајност Mann-Whitney U и Kruskal Wallis H тестови P < .05).

Табела 4. Серумски нивои IL-10: поређење између пацијената са различитим хистолошким особинама каротидних плакова



Фигура 10. Циркулишући нивои IL-10 у зависности од врсте каротидног плака А. Серумски IL-10 значајно варира међу пацијентима са различитим врстама каротидних плакова (АНА класификација); а тип IV у поређењу са Vc, $p = 0.081$; b тип Va у поређењу са Vb, $p = 0.014$; c тип Vb у поређењу са Vc, $p = 0.004$; d тип Vb у поређењу са VIb, $p = .035$; d тип Vc у поређењу са Va, $p = 0.068$

4.11. Серумске вредности IL-10 у односу на клиничке карактеристике пацијената и у односу на компликованост плака

У наредном поглављу биће описане основне демографске и биохемијске карактеристике пацијената и хистолошко стање плакова (компликован или некомпликован) у односу на серумске вредности IL-10.

4.11.1. Основне карактеристике пацијената у односу на серумске вредности IL-10

У табели 5 могу се видети неке од основних карактеристика пацијената попут старости, пола, хистолошке групе плака, стабилности плака, % стенозе, пушачког статуса, хипертензије, хиперхолестеролемије и хипертриглицеридемије као и серумске вредности IL-10 за сваку од ових група.

	n= (број пацијената)	серумске вредности IL-10	p вредност
Старост (године)			
<65	93	18,07 ± 2,17	0.814 или Mann-Whitney тест 0.069
>65	102	19,63 ± 5,99	
Пол			
Женски	90	17,49 ± 1,95	0.674 или Mann-Whitney тест 0.079
Мушки	110	20,22 ± 6,75	
Хистолошке групе			
атером	13	10,94 ± 3,2	0.572
фиброатером	74	24,46 ± 8,1	
фибром	43	16,08 ± 2,7	
нестабилни плак	70	15,7 ± 2,5	
Карактеристике плака			
стабилни	70	15,70 ± 2,5	0.493
нестабилни	130	20,34 ± 4,7	
% стенозе			
≤ 70%	18	16,20 ± 5,07	0.787
> 70%	177	19,29 ± 3,59	
Садашњи пушач			
Да	147	19,80 ± 4,31	0.711
Не	49	15,46 ± 2, 11	
Нема података	4		
Diabetes mellitus			
Да	66	15,46 ± 1,90	0.457
Не	129	20,66 ± 4,80	
Хипертензија			
Да	188	18,58 ± 3,39	0.318
Не	8	24,99 ± 10,79	
Хиперхолестеролемија			
≤ 5,2 mmol / L	112	19,51 ± 5,59	0.985
> 5,2 mmol / L	70	19,37 ± 1,56	
Хипертриглицеридемија			
≤ 1,7 mmol /L	129	17,18± 1,78	0.294
> 1,7 mmol /L	52	25,39 ± 11,52	

Табела 5. Основне карактеристике пацијената у односу на серумске вредности IL-10- наставка табеле на следећој страни

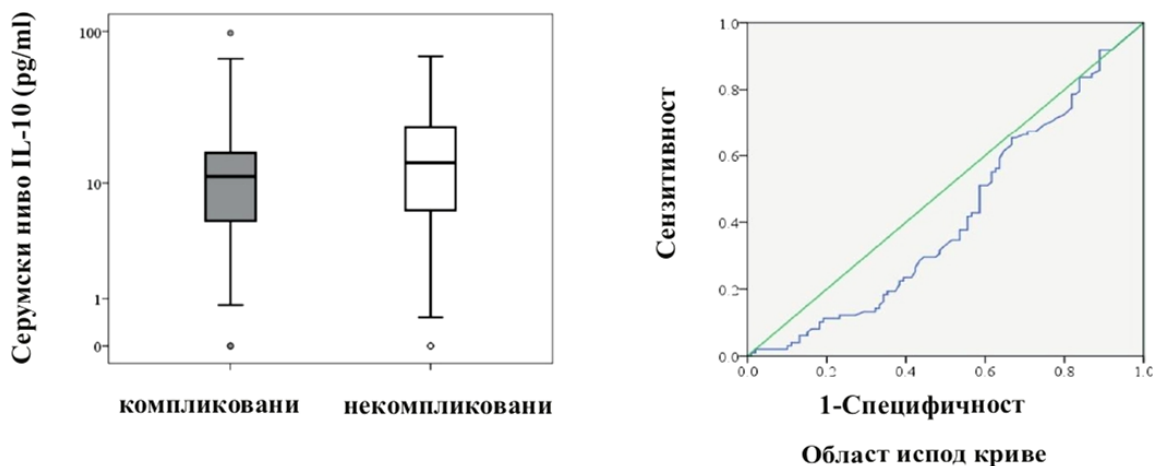
Хемоглобин				
≤ 140 g/L	53		28,39 ± 11,64	0.497
>140 g/L	125		15,91 ± 1,3	
Креатинин				
≤ 85 mmol /L	113		15,41 ± 1,47	0.110
> 85 mmol /L	66		27,26 ± 9,32	
ТИА				
Да	31		19,83 ± 5,27	0.882
Не	169		18,51 ± 3,68	
Други неуросимптоми				
			Средња вредност	0.763 или 0,066 Mann-Whitney тест
Да	112	19,58 ± 5,57	93,84	
Не	88	17,62 ± 1,77	108,98	

Табела 5. Основне карактеристике пацијената у односу на серумске вредности IL-10

4.11.2. Ниво циркулишућег IL-10 се разликује код пацијената са компликованим плаковима од циркулишућег IL-10 код пацијената са некомпликованим плаковима

Пацијенти су подељени у две групе на основу хистолошке карактеристике плакова. Једну групу су чинили пацијенти са било којим обликом компликација у самом плаку, попут руптуре плака, крварења у плаку, реканализације плака или тромбозе плака, као и присуства великог липидног језгра са танком влакнастом капом или калцификацијом док су другу групу чинили пацијенти чији плакови нису имали горе наведене особине.

Концентрације IL-10 у серуму биле су значајно ниже код пацијената са компликованим плаковима у поређењу са пацијентима који су имали некомпликоване плакове ($13,03 \pm 1,36$ pg/ml наспрам $23,04 \pm 6,15$ pg/ml; $p = 0,035$) (Фигура 11А). ROC крива за серумске нивое IL-10 показала је значајну дискриминаторну ефикасност између пацијената са компликованим плаковима у односу на пацијенте са некомпликованим плаковима ($AUC = 0,413$, $P = 0,035$) (Фигура 11Б).



Област	Стандардна грешка	Асимптоматски Sig.b	Асимптоматски 95% Интервал конфидентности	
			Доња граница	Горња граница
.413	.041	.035	.333	.493

Фигура 11. Серумски нивои IL-10 код пацијената са компликованим и некомпликованим плаковима А. Серумски нивои IL-10 код пацијената са некомпликованим плаковима Б. ROC крива за серумски IL-10 код пацијената са компликованим и некомпликованим плаковима.

4.12. Основне карактеристике пацијената у односу на серумске вредности IFN-γ

У табели 6 могу се видети неке од основних карактеристика пацијената као што су старост, пол, хистолошка група плака, карактеристике плака, % стенозе, пушачки статус, дијабетес, хипертензија, хиперхолестеролемија, хипертриглицеридемија, хемоглобин, креатинин, ТИА-а, и неуросимптоми као и серумске вредности IFN-γ за сваку од ових група.

	<i>n</i> = (број пацијената)	средња вр. ± ст. дев. или ст. грешка	р вредност
Старост(године)			0.394
≤65	93	147,19 ± 46,03	
>65	102	219,86 ± 69,62	
Пол			p=0.194
Женски	110	132,09 ± 32,73	
Мушки	90	240,65 ± 82,89	
Хистолошке групе			P=0.017 између атерома и фиброатерома (MW test) 0.580 <i>Не постоји значајност ни између појединачним групама</i>
атером	13	31,11 ± 11,03	
фиброатером	74	274,72 ± 81,50	
фибром	43	207,72 ± 108,42	
нестабилни плак	70	135,47 ± 46,96	
Карактеристике плака			
стабилни	70	135,47 ± 46,96	0.423
нестабилни	130	205,43 ± 58,60	
% стенозе			0.024
≤ 70%	18	483,09 ± 275,98	
> 70%	177	153,51 ± 37,28	
Садашњи пушач			p=0.538
Да	147	199,46 ± 53,71	
Не	49	139,10 ± 51,74	

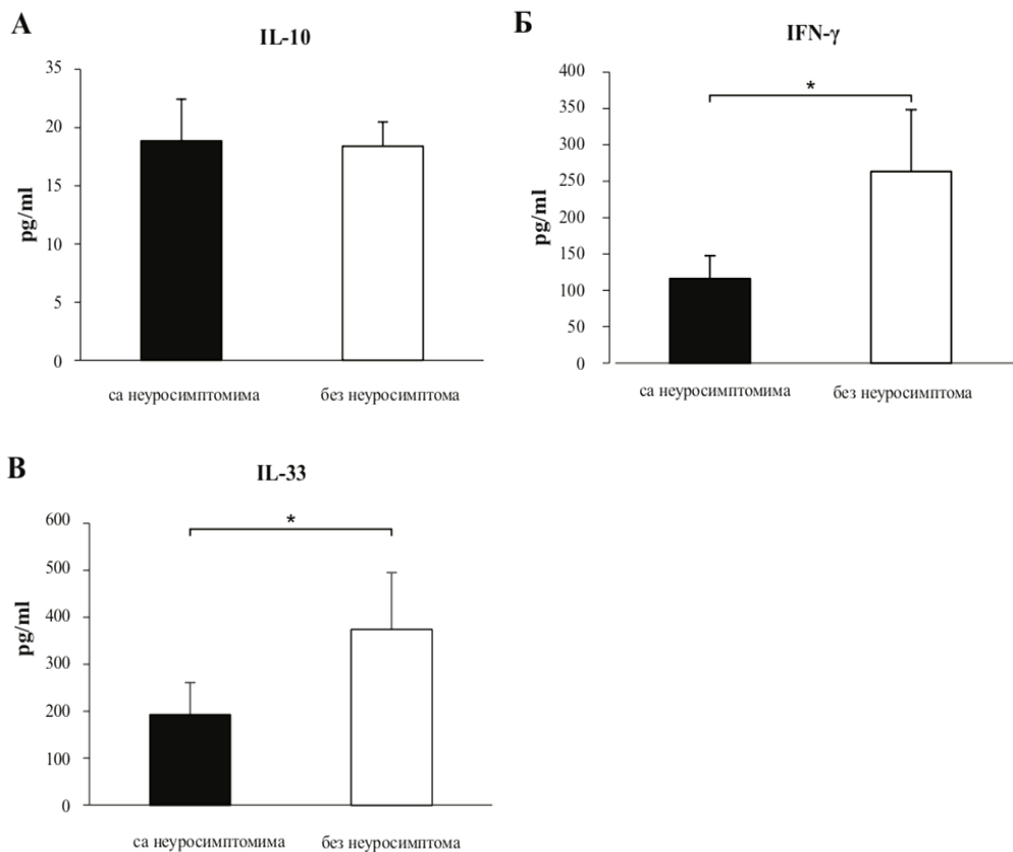
Табела 6. Основне карактеристике пацијената у односу на IFN-γ-наставка табеле на следећој страни

Diabetes mellitus			
Да	66	245,78 ± 105,65	<i>p=0.308</i>
Не	129	154,02 ± 34,87	
Хипертензија			
Да	188	186,19 ± 43,91	<i>p=0.836</i>
Не	8	141,73 ± 98,92	
Хиперхолестеролемија			
≤ 5,2 mmol/L	112	217,10 ± 66,23	<i>p=0.237</i>
> 5,2 mmol/L	70	112,41 ± 34,95	
Хипертриглицеридемија			
≤ 1,7 mmol/L	129	209,25 ± 57,79	<i>p=0.250</i>
> 1,7 mmol/L	52	99,11 ± 44,67	
Хемоглобин			
≤ 140 g/L	53	213,55 ± 79,54	<i>p=0.801</i>
>140 g/L	125	187,87 ± 56,89	
Креатинин			
≤ 85 mmol/L	113	222,63 ± 68,23	<i>p=0.429</i>
> 85 mmol/L	66	146,85 ± 44,48	
ТИА			
Да	31	165,47 ± 80,12	<i>p=0.874</i>
Не	169	183,78 ± 46,91	
Неуросимптоми			
Да	112	116,10 ± 31,45	<i>p=0.078</i>
Не	88	263,47 ± 84,83	

Табела 6. Основне карактеристике пацијената у односу на IFN- γ

4.13. Серумски нивои IL-10, IFN- γ и IL-33 се разликују између пацијената у односу на присуство или одсуство неуролошких симптома

Пацијенти подвргнути каротидној ендартеректомији су груписани у односу на присуство или одсуство неуролошке симптоматологије пре операције. Од 200 пацијената, 139 пацијената је имало претходне неуропатолошке догађаје, а 61 пацијент је био без симптома пре каротидне ендартеректомије. Није примећена статистички значајна разлика ($p > 0,05$; Фигура 12 А) у серумском нивоу IL-10 између пацијената који су имали неуросимптоме и оних који их нису испољавали, за разлику од серумског нивоа IFN- γ (Б) и IL-33 (В), $*p < 0,05$, где је постојала статистички значајно нижа концентрација ових цитокина код пацијената са неуросимптомима.

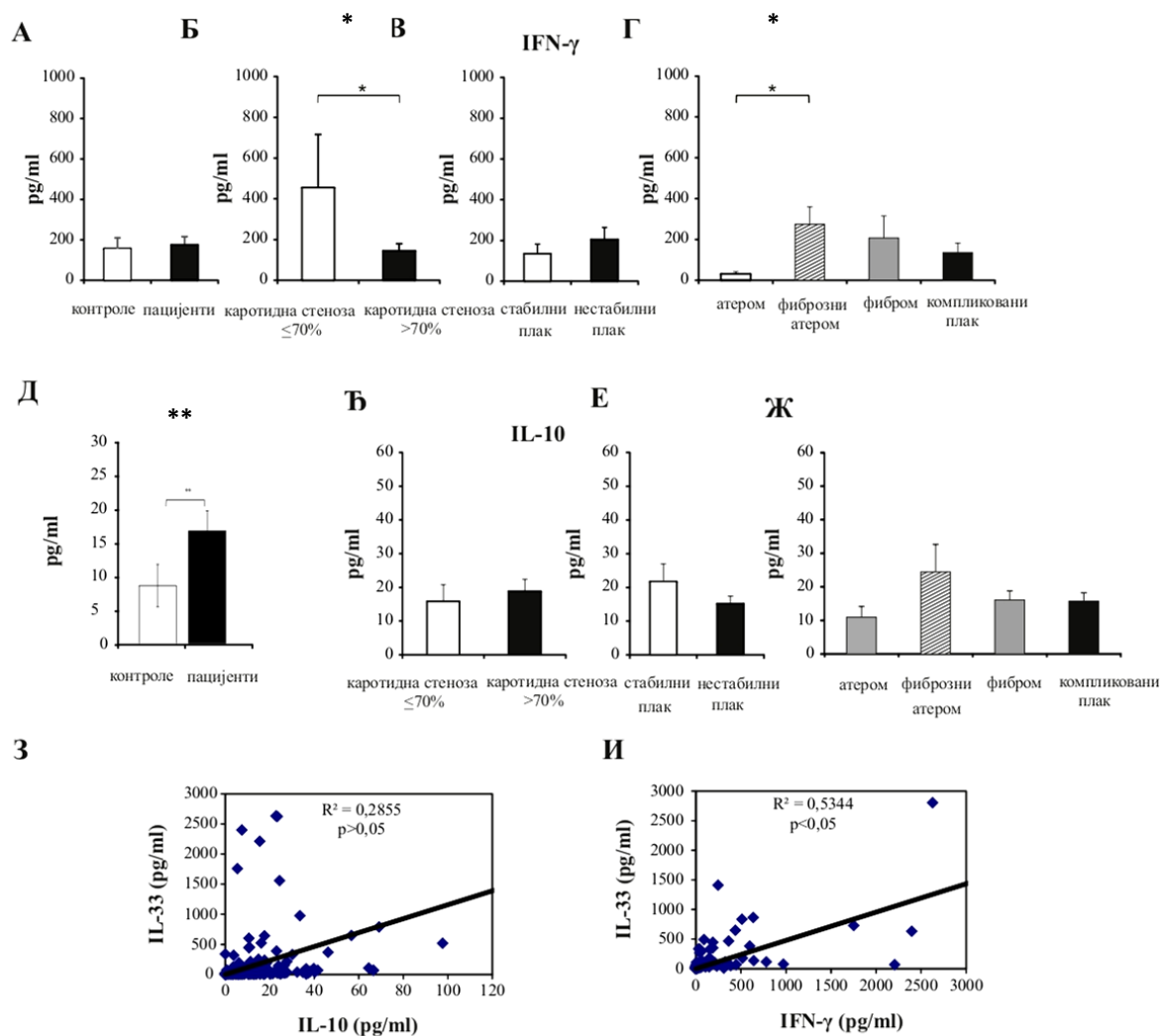


Фигура 12. Серумски ниво IL-10, IFN γ и IL-33 код пацијената са СЕА и њихова корелација са неуролошким симптомима. Присуство неуросимптома не зависи од нивоа IL-10 (А), $p > 0.05$., али очигледно да присуство неуросимптома корелира са нижим средњим нивоима IFN γ (Б) и IL-33 (В), $*p < 0,05$, Подаци су представљени као средња вредност+SEM.

4.14. Серумски нивои IFN- γ и IL-10 се разликују између здравих и болесних, у односу на степен каротидне стенозе, стабилност плака, али и у односу на хистолошке карактеристике плака

Анализирали смо разлику у серумским нивоима IL-10 и IFN- γ код пацијената и здравих контрола. Показано је да нема значајне разлике у серумском нивоу IFN- γ између здравих контрола и пацијената ($p > 0,05$; Фигура 13А), док је серумски ниво IL-10 код пацијената значајно виши у поређењу са здравим контролама ($p < 0,05$; Фигура 13Д). Један од клиничких критеријума за извођење изборне операције каротидне артерије је стеноза унутрашње каротидне артерије (енгл. *internal carotid artery*, ICA) већа од 70%. Група пацијената са стенозом мањом од 70% имала је значајно већи ниво IFN- γ у поређењу са пацијентима где је каротидна стеноза већа од 70% ($p < 0,05$; Фигура 13Б), док је IL-10 био већи у групи пацијената где је каротидна стеноза већа од 70% али без статистички значајне разлике ($p > 0,05$; Фигура 13Ђ). Затим смо анализирали разлику у серумским нивоима IL-10 и IFN- γ код пацијената са стабилним и нестабилним каротидним плаковима. Серумски ниво IFN- γ био је већи код пацијената са нестабилним плаковима у поређењу са пацијентима који су имали стабилне плакове, без статистички значајне разлике између група ($p > 0,05$; Фигура 13В). Међутим, серумски ниво IL-10 је био већи у групи пацијената са стабилним плаком, у односу на пацијенте са нестабилним плаком, без статистички значајне разлике ($p > 0,05$; Фигура 13Е).

Након тога смо одређивали серумску концентрацију IL-10 и IFN- γ код пацијената који су имали различите форме стабилних каротидних плакова (фиброзни плакови и фиброатером) (87 пацијената; 43,5%) и оне са нестабилним каротидним плаковима (атером, атером и фиброатером са компликацијама укључујући калцификацију, крварење, руптуру или тромбозу) (113 пацијената; 56,5%). Значајно виши ниво IFN- γ је уочен у групи пацијената са фиброзним атеромом, у поређењу са пацијентима са атеромом ($*p < 0,05$; Фигура 13Г). Ниво IL-10 је виши у групи пацијената са фиброзним атеромом у поређењу са пацијентима са фибромом или компликованим плаком, али без статистички значајне разлике ($p > 0,05$; Фигура 13Ж). Такође смо утврдили корелацију између IL-33 и IL-10, која је врло слаба ($R^2 = 0,285$, $p > 0,05$; Фигура 13З), док је корелација између IL-33 и IFN- γ позитивна и јака ($R^2 = 0,5344$, $*p < 0,05$; Фигура 13И).



Фигура 13. Серумски ниво IFN-γ, и IL-10, и њихова корелација са IL-33. Серумски ниво IFN-γ између пацијената са СЕА и контроле (А), и између пацијената са стабилним или нестабилним плаковима (В), није показао статистички значајну разлику ($p > 0.05$). Статистички значајно виши нивои IFN-γ у серуму нађени су код пацијената са каротидном стенозом испод 70% у поређењу са пацијентима са каротидном стенозом већом од 70% (Б), и пацијентима са СЕА са фиброзним атеромом у поређењу са пацијентима са атеромом (* $p < 0,05$; Г). Слика (Д) приказује статистички значајну разлику између серумског нивоа IL-10 код пацијената са СЕА и контролних група. Серумски ниво IL-10 између пацијената са каротидном стенозом испод 70% у поређењу са пацијентима са каротидном стенозом већом од 70% (Б), као и пацијената са стабилним или нестабилним плаковима (Е), није показао статистички значајну разлику ($p > 0.05$). Иако је серумски ниво IL-10 највећи код СЕА пацијената са фиброзним атеромом, у односу на пацијенте са фибромом, није било статистички значајне разлике (Ж). Пацијенти са атеросклеротском болешћу каротидне артерије имали су значајно виши просечни ниво IL-10 (** $p < 0,01$). Овај просечно низак ниво IL-10 не зависи од нивоа стенозе каротидне артерије, стабилности и хистолошких типова атеросклеротских лезија ($p > 0.05$). (З, И) Корелација између IL-33 и IL-10 била је врло слаба ($R^2 = 0.285$, $p > 0.05$), док је корелација између IL-33 и IFN-γ позитивна и јака ($R^2 = 0.5344$, * $p < 0.05$). Подаци су представљени као средња вредност+SEM.

5. ДИСКУСИЈА

У овој клиничкој студији испитиван је ниво серумских концентрација IL-10, IL-33 и sST2 као и одређивање нивоа ткивне експресије IL-33 и sST2 у атеросклеротском плаку код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији. С обзиром на комплексност атеросклеротског процеса, испитиван је и серумски ниво других имуномодулаторних цитокина као што су IFN- γ , IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17A и IL-23.

У овој студији је показано да пацијенти који су подвргнути каротидној ендартеректомији имају значајно већи просечни ниво IL-10, IL-33, sST2 и IL-6, док су значајно мање вредности серумског TNF- α и IL-1 β у поређењу са здравима пацијентима.

Пацијенти са степеном стенозе каротидне артерије мањим од 70% или већим од 70% се нису разликовали у односу на пол, старост, кардиоваскуларне ризикофакторе изузев хипертензије, неуросимптома и АНА типа плака. Пацијенти са САД имали су значајно веће серумске концентрације IL-10 у поређењу са пацијентима без САД.

Највећи ниво IL-10 нађен је у групи пацијената са фиброзним плаковима, а најнижи серумски ниво IL-10 припада групи пацијената са атеромом који је компликован претходном тромбозом и атеромом. Пацијенти са фиброзним атеромом, имају значајно виши ниво IFN- γ , у поређењу са пацијентима са атеромом. Пацијенти са компликованим плаковима у поређењу са пацијентима који су имали некомплицоване плакове имали су значајно ниже концентрације IL-10 у серуму. Иако је серумски ниво IFN- γ био је већи код пацијената са нестабилним плаковима у поређењу са пацијентима који су имали стабилне плакове, није било статистички значајне разлике између група. Значајно нижа концентрација IFN- γ и IL-33 је регистрована код пацијената са неуролошким симптомима у поређењу са групом без неуролошких симптома.

IL-10 је већи у групи пацијената где је каротидна стеноза већа од 70% али без статистички значајне разлике. Значајно већи ниво IFN- γ уочен је у групи пацијената са стенозом мањом од 70% у поређењу са пацијентима где је каротидна стеноза већа од 70%. У овом истраживању је показана обилна ткивна експресија IL-33 и ST2 у атеросклеротским лезијама каротидне артерије. Највиши ниво експресије IL-33 и ST2 у плаку ограничен је на нестабилне плакове, док је најнижи ниво експресије је примећен у стабилним, фиброзним плаковима.

Откривено је да ћелије одговорне за експресију IL-33 нису само мононуклеарне ћелије ограничене на инфламацијске атеросклеротске лезије, већ и глаткомишићне ћелије које су стекле фенотипске карактеристике пенастих ћелија и испуниле се липидним капљицама.

5.1. Серумски нивои цитокина IL-6, IL-10, и IL-33 се разликују између СЕА пацијената и здравих контрола

Резултати добијени у овој студији указују на то да IL-10 може имати значајан утицај на еволуцију атеросклеротског процеса у каротидним артеријама. Наиме, показано је да су пацијенти који су подвргнути каротидној ендартеректомији имали значајно већи просечни ниво IL-10, као и IL-33 у поређењу са здравим субјектима. Показан је значајно већи ниво циркулишућег IL-10 у групи пацијената са каротидном болешћу у поређењу са здравим пацијентима. Такође, серумски нивои IFN- γ , IL-6 и IL-23 су били виши код СЕА пацијената, у поређењу са здравим контролама, али без статистичке значајности. Значајно ниже вредности серумског TNF- α и IL-1 β уочене су код СЕА пацијената у поређењу са здравима пацијентима, док је IL-17 је био мањи код пацијената у поређењу са здравим контролама, али без статистички значајне разлике.

Међутим, недавни радови показују противречне резултате у односу на ово истраживање. *Zhu* и колеге показују повезаност између смањеног нивоа IL-10 у серуму и ризика од церебралног инфаркта (156). Студија *Ambrosius W.* и сарадника (157) показује ниже нивое IL-10 код пацијената који су имали дебљи слој интима-медија каротидних артерија (енгл. *intima-media thickness*, ИМТ), која представља ултразвучни маркер нивоа атеросклерозе, за разлику од овог истраживања где су пацијенти који су подвргнути хируршком лечењу каротидне артерије имали значајно веће серумске концентрације IL-10 у поређењу са контролним субјектима. Налази ове студије су у складу са недавним доказима о вишим нивоима IL-6 и IL-10 код пацијената са прогресивном каротидном склерозом (158). Штавише, у овој студији је утврђено да су IL-6 и IL-10 независне варијабле неповољне динамике промена у морфологији атеросклеротских каротидних плакова. На атеросклеротске плакове могу утицати промене у системским нивоима циркулишућих цитокина, укључујући IL-10. Може се закључити да, према подацима из ових истраживања, виши нивои циркулишућег IL-10 у крви не испољавају атеропротективно дејство код каротидне болести. Резултати овог истраживања показују да стадијум каротидне болести и структура плака заиста зависе од нивоа циркулишућег IL-10. Ово истраживање показује да су пацијенти са стабилним плаковима обогаћеним везивним ткивом, попут фиброма и фиброатерома (лезије типа Va и Vc) имали значајно већи ниво циркулишућег IL-10 од пацијената са нестабилним плаковима. Ово може бити одраз склоности IL-10 да индукује Th2 имунски одговор у локалном миљеу, и да покрене ткивне макрофаге ка инфламацијском одговору типа 2, и да стимулише регенерацију ткива и активацију фибробласта. То би потенцијално могло да доведе до повољног исхода атеросклеротског процеса јер су ове врсте плакова мање подложне руптури од нестабилних плакова. Они, међутим, изазивају сужавање дијаметра крвних судова и на тај начин компромитују доток крви у мозак.

Pinderski је у експерименталном моделу атеросклерозе показао смањење акумулације липида без обзира на циркулишући ниво IL-10. Претпоставља се да је један од могућих механизма неравнотежа између проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина (122). Међутим, *Halvorsen* и сарадници (159) су показали да IL-10 стимулише накупљање липида у оксLDL макрофагима и инхибира њихову апоптозу. Када је апоптоза инхибирана, има мање кристала слободног холестерола и масних киселина које би потенцијално могле изазвати инфламацијски одговор у локалној средини. Када је апоптоза изражена, атеросклеротски плак постаје подложнији руптури, као што је показано у новијим радовима (160-162). На овај начин, како аутори објашњавају, IL-10 смањује величину некротичног језгра атеросклеротског плака. Ово може стабилизovati сам плак, чинећи га мање склоном руптури. Показано је

да IL-10 модификује метаболизам липида у макрофагима, стимулишући и унос и излазак холестерола из ћелија (163). Постоје извештаји који показују да је ефикасна елиминација холестерола углавном ограничена на M2 макрофаге, индукована у Th2 имунском одговору (164,165). Ова студија се такође слаже са овим сазнањима, јер је показан већи ниво IL-10 код пацијената са некомпликованим плаковима. Сада се може закључити да су виши нивои IL-10 повезани са структуром плака мање склоном руптури, па на тај начин овај цитокин може испољити атеропротективну активност.

Као што је горе поменуто, бројни експериментални подаци потврђују атеропротективну улогу IL-10 у високо контролисаној средини и код нокаут (енгл. IL-10 *knockout*) животиња којима недостаје IL-10, где он има несумњиво повољан утицај на атеросклеротски процес, како инхибицијом инфламације, тако и стимулацијом повратног дејства фибробласта (120, 121, 166,167).

Међутим, постоје недавне студије које су показале да IL-10 не успорава атеросклеротски процес (168) у различитим животињским моделима, налази који одражавају вишефакторску основу атерогенезе. Такође, експериментални резултати се не могу једноставно применити на патологију људи. То је показано у овом истраживању, да су нивои IL-10 значајно већи код пацијената са коронарном артеријском болешћу, али не и код пацијената са периферном артеријском болешћу. Добро је познато да инфаркт миокарда и ангину пекторис прате различите промене нивоа про- и антиинфламацијских цитокина (169, 170). То се може објаснити чињеницом да болест миокарда може изазвати системски инфламаторни одговор, као што се види код тешких бактеријских инфекција, само без микробиолошких стимулуса (171, 172). Ова врста системске инфламације може се понекад јавити код тешког можданог инфаркта, али се никада не јавља током развоја атеросклеротске лезије.

Штавише, утврђено је да се прогноза исхода атеросклерозе више односи на структуру атеросклеротске лезије, њен ћелијски садржај и ниво инфламације унутар плака (124). Ове карактеристике одређују да ли може доћи до нежељеног догађаја са могућим фаталним последицама, инвалидитетом, продуженом хоспитализацијом и потребом за различитим медицинским интервенцијама. Степен стенозе артерија представља једну од индикација за медицинске интервенције, јер се сужавање крвних судова дешава независно од структуре плака, а различите врсте плакова могу изазвати исто оштећење крвотока ако постоји сличан степен стенозе. Све ове чињенице показују да на процес атеросклерозе могу утицати промене у имунолошким реакцијама које би могле довести до жељеног исхода, стабилизације атеросклеротске лезије и смањења њене величине. Постоји и пионирски пројекат који је усмерен ка том циљу, а резултате је потребно оценити тек након дуготрајног праћења (173).

5.2. Серумски нивои TNF- α и IL-1 β се разликују између СЕА пацијената и здравих контрола

Студије *Terkeltaub-a*, *Han-a* и *Boisvert-a* показују да су макрофаги присутни у атеросклеротским плаковима главни извор производње IL-10 који инхибира експресију MMPs, проинфламацијских цитокина у активираним макрофагима, али и моноците да ослобађају проинфламацијске цитокине укључујући IL-1 β , TNF- α и IL-8 уз промоцију поларизације макрофага према фенотипу M2 (174,175). На основу ових студија, могу се објаснити и вредности серумских цитокина овог истраживања IL-1 β и TNF- α , које су значајно ниже код пацијената подвргнутих каротидној ендартеректомији, у односу на здраве пацијенте, а ниво серумског IL-10 је у СЕА групи виши. Снижен ниво ових проинфламацијских цитокина се приписује присуству IL-10 који испољава антиинфламацијске ефекте. Како блокада рецептора IL-10 у макрофагима доводи до значајно веће активације NF- κ B (175), способност IL-10 да сузбије експресију инфламацијских медијатора као што су TNF- α , MCP-1 и ICAM-1 се приписује инхибицији активности NF- κ B (174-176).

У студији *Erbel-a* и сарадника, показано је да је каротидна ендартеректомија код асимптоматских пацијената показала само ниске нивое ћелија које експримирају IL-17A mRNA и IL-17A, док су плакови симптоматских пацијената, које карактерише високо активан инфламацијски миље, показали значајно већи ниво експресије IL-17A, као и значајно већи број ћелија које експримирају IL-17A. У истој студији показано је да је експресија важних индуктора ослобађања IL-17A- а то су цитокини IL-21 и IL-23 у складу са нивоима mRNA IL-17A. Осим тога, ова студија показује да нивои експресије mRNA IL-17A и IL-21 корелирају у атеросклеротским лезијама (177). Штавише, експресија IL-17A повезана је са карактеристикама компликованих плакова које су у складу са налазом обрнуто корелираних нивоа експресије mRNA IL-17A са снажним антиинфламаторним/атеропротективним цитокином IL-10, што се поклапа са овим истраживањем, у ком је серумски ниво IL-17 нижи а ниво IL-10 значајно виши код СЕА пацијената у поређењу са контролама. Најважнији покретач Th17 имунског одговора је IL-23. Међутим, за пролиферацију и одржавање Th17 имунског одговора, поред IL-23, неопходно је истовремено присуство и IL-22 (178), што на неки начин може да објасни дискрепантне вредности између IL-23 који је виши, и IL-17 који је нижи у групи СЕА пацијената у поређењу са контролама у овом истраживању.

5.3. Серумски нивои IL-33 и sST2 се разликују између СЕА пацијената и здравих контрола

У овој студији је показано значајно повишење нивоа IL-33 и sST2 у серуму пацијентата са СЕА у поређењу са здравим особама. Штавише, СЕА пацијенти са нестабилним плаковима су показали већу експресију ткивног IL-33 и IL-33R (ST2) у односу на пацијенте са стабилним, фиброзним плаковима. Додатно, ово испитивање је показало да су извор IL-33 првенствено CD68 позитивне ћелије. Забележена је значајна позитивна корелација између нивоа експресије IL-33 и степена инфламације у каротидним атеросклеротским лезијама. Многе студије спроведене на пацијентима који болују од кардиоваскуларних болести указују на утицај серумских нивоа различитих цитокина на исход и предвиђање прогресије болести (144-148). Висок ниво sST2 у

серуму означен је као предиктор лошег исхода код пацијената са NSTEMI и STEMI инфарктами. Недавно су *Dhillon* и сарадници (147) показали да високи нивои sST2 корелирају са лошим исходом код пацијената са NSTEMI и STEMI, али високи нивои IL-33 повезани су са повећаним морталитетом пацијената са STEMI инфарктом (34). Међутим, студија *Willems*-а и сарадника (179) није показала предиктивну вредност серумског нивоа sST2 за кардиоваскуларне догађаје код пацијената са тешком стенозом каротидне артерије. С друге стране, забележена је корелација између нивоа IL-33, стадијума и прогресије атеросклеротске болести каротидне артерије код пацијената са реуматoidним артритисом (148). Овај налаз се делимично слаже са резултатима овог испитивања- да пацијенти са атеросклеротском болешћу имају веће нивое циркулишућег IL-33 и sST2, у поређењу са здравим појединцима.

Када су детектовани значајно већи серумски нивои IL-33 и sST2 код пацијената са СЕА, анализирана је локална експресија ових молекула у атеросклеротским плаковима. Показано је да су IL-33 и IL-33R (ST2) експримирани у све четири врсте атеросклеротских плакова и да је њихова експресија највећа у атерому и компликованим плаковима. Како обе ове патологије припадају нестабилним плаковима, закључено је да стабилност плака негативно корелира са експресијом IL-33 и IL-33R (ST2) у лезији. Највиши ниво експресије IL-33 откривен је у компликованим плаковима које карактеришу велика подручја некрозе, крварења и/или тромбозе. Овај налаз је очекиван с обзиром да се IL-33 ослобађа и активира током некротичне ћелијске смрти, која је повезана са оштећењем ткива током инфекције или трауме, али остаје унутар ћелије током апоптозе (180- 183).

Инфламација фундаментално доприноси формирању и прогресији атеросклеротских лезија и клиничком развоју атеротромботичних компликација које се манифестују као акутни инфаркт миокарда, нестабилна ангина пекторис или мождани удар (15,184,185). Стога, даље је испитиван степен инфламације и врста инфламацијских ћелија у атеросклеротским плаковима и њихова повезаност са експресијом IL-33. Овде је примећено да компликовани плакови имају обилни инфламацијски инфилтрат, углавном укључују CD68 позитивне макрофаге, док је најнижи инфламаторни скор и низак број CD68- позитивних макрофага пронађен у фиброзним плаковима. Овај налаз није изненађујући, због чињенице да компликовани плакови, који припадају групи унапредовалих атеросклеротских плакова, показују прогресију у зависности од степена инфламације (186).

Показано је да се IL-33 експримира у инфламаторним стањима, али и да је његова експресија повезана са степеном инфламације (149). Тако је испитана могућа веза између нивоа експресије IL-33 и инфламаторних скорова у каротидним плаковима. Нађена је значајна позитивну корелација између експресије IL-33 у плаковима и инфламаторног скорa. Ово се слаже са недавном студијом да IL-33 делује углавном проинфламацијски у атеросклеротској болести каротидне артерије (187). IL-33 се не експримира само у некротичним ћелијама, већ и у различитим ћелијама других ткива и ендотелним ћелијама крвних судова (182,183). Резултати добијени у овој студији указују на то да су пенасте ћелије, ендотелне ћелије, макрофаги и ћелије глатких мишића извор IL-33. Познато је да све ове врсте ћелија активно учествују у покретању и прогресији атеросклеротских плакова, а присуство и број ових ћелија расте са напредовањем патологије плака (188), што указује да експресија IL-33 корелира са стадијумом прогресије атеросклеротских плакова.

6. ЗАКЉУЧАК

Резултати овог истраживања показују повећано присуство, као и могућу улогу IL-33 у каротидној атеросклерози, јер овај цитокин карактерише прогресивне и нестабилне атеросклеротске плакове. Виши нивои циркулишућег IL-33 код пацијената пре каротидне ендартеректомије у поређењу са здравим појединцима, а такође и у његова значајна експресија у узрапредовалим атеросклеротским лезијама, посебно оних за које је познато да су склоне нежељеним и потенцијално штетним инцидентима, попут руптуре, тромбозе или и једног и другог, недвосмислено указују на позитиван ефекат испитиваног цитокина у смислу промоције атеросклерозе у испитиваним лезијама.

Ова студија јасно показује утицај разлике у нивоима IL-10 у серуму на типове атеросклеротских лезија. Према овим налазима, IL-10 испољава атеропротективне ефекте, пошто су највећи серумски нивои IL-10 детектовани код пацијената са некомплицованим плаковима, док су нижи нивои IL-10 повезани са присуством компликованих плакова. Такође, ова студија је показала одсуство утицаја испитиваних клиничких параметара на степен стенозе или тип атеросклеротске лезије.

Добијени резултати потврђују значај IL-33/ST2 осовине у процесу атеросклерозе, али и указују на њену двосмислену функцију у имунском одговору, било као проинфламацијског цитокина у узрапредовалим атеросклеротским лезијама, или као профибротичног, у раним фазама лезија.

Закључке смо извели на основу следећих резултата

1. Пацијенти који су подвргнути каротидној ендартеректомији имали су значајно већи серумски ниво IL-10, IL-33 и sST2 у односу на здраве пацијенте.
2. Највиши ниво експресије IL-33 и ST2 у плаку ограничен је на нестабилне плакове, док је најнижи ниво експресије је примећен у стабилним, фиброзним плаковима, који имају мање обилни запаљенски инфилтрат.
3. Концентрације IL-10 у серуму биле су значајно ниже код пацијената са компликованим плаковима у поређењу са пацијентима који су имали некомпликоване плакове, док је серумски ниво IL-33 значајно био већи у групи пацијената са стабилним плаковима у односу на пацијенте са нестабилним плаковима
4. Највиши ниво CD68 позитивних макрофага у плаку је ограничен на нестабилне плакове, док је најнижи ниво експресије забележен у стабилним, фиброзним плаковима
5. Серумски ниво IL-33 био је значајно већи код пацијената са фиброатеромом, у поређењу са групом пацијената који су имали атером
6. Постоји значајна корелација између нивоа експресије IL-33 и инфламаторног скорa у анализираним плаковима.
7. Пацијенти са CAD имали су значајно веће серумске концентрације IL-10 у поређењу са пацијентима без CAD, док су пацијенти са PAD имали сличне серумске нивое IL-10 у поређењу са онима без PAD -а.
8. Није примећена статистички значајна разлика у серумском нивоу IL-10 између пацијената који су имали неуросимптоме и оних који их нису испољавали, за разлику од серумског нивоа IFN- γ и IL-33 где је постојала статистички значајно нижа концентрација ових цитокина код пацијената са неуросимптомима.
9. Највећи ниво IL-10 нађен је у групи пацијената са фиброзним плаковима, док је најнижи серумски ниво IL-10 уочен је у групи пацијената са атеромом који је компликован претходном тромбозом и атеромом, док је значајно виши ниво IFN- γ је уочен у групи пацијената са фиброзним атеромом, у поређењу са пацијентима са атеромом
10. Група пацијената са стенозом мањом од 70% имала је значајно већи ниво IFN- γ у поређењу са пацијентима где је каротидна стеноза већа од 70%, док је IL-10 био већи у групи пацијената где је каротидна стеноза већа од 70% али без статистички значајне разлике, а IL-33 је био већи код пацијената са стенозом мањом од 70% у поређењу са пацијентима где је каротидна стеноза већа од 70% али без статистички значајне разлике.
11. Корелација између IL-33 и IFN- γ је позитивна и јака

7. СКРАЋЕНИЦЕ

ABCA-1	АТП везујући транспортер А1 (енгл. ATP binding cassette transporter A1)
AFX	пролазно слепило (amaurosis fugax)
alpha -SMA	глатко мишићни алфа актин (енгл. Smooth muscle alpha-actin)
AHA	American Heart Association
CAD	коронарна артеријска болест (енгл. coronary artery disease)
CAMs	молекули ћелијске адхезије (енгл. Cell adhesion molecules)
CD	кластер диференцијације (енгл. cluster of differentiation)
CEA	каротидна ендартеректомија (енгл. carotid endarterectomy)
CVI	церебро-васкуларни инсулт
DAMP	молекулски обрасци удружени са оштећењем (енгл. damage-associated molecular pattern molecules)
DC	дендритске ћелије (енгл. dendritic cells)
GRO-α	онкоген повезан са растом протеина алфа (енгл. Growth-related oncogene- α)
hs-CRP	Ц-реактивни протеин високе осетљивости (енгл. high-sensitivity C-reactive protein)
ICA	стеноза унутрашње каротидне артерије (енгл. internal carotid artery)
IFN-γ	интерферон- γ (енгл. interferon- γ)
IL	интерлеукин
IMT	дебљина интима-медија слоја (енгл. intima-media thickness)
JAK/STAT	енгл. The Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription
LDL	Липопротеин ниске густине (енгл. Low-density lipoprotein)
LDLr	енгл. Low-density lipoprotein receptor
MCP-1	моноцитни хемоатрактантни протеин 1 (енгл. monocyte chemoattractant protein-1)
M-CSF	фактор стимулације колоније макрофага (енгл. macrophage colony-stimulating factor)
MDCT	мултидетекторска компјутеризована томографија (енгл. multi-detector computerized tomography)
MHC	главни генски комплекс ткивне подударности (енгл. Major histocompatibility complex)

MIP-2	инфламаторни протеин макрофага-2 (енгл. Macrophage inflammatory protein)
mRNA	mRNA информациона РНК (енгл. Messenger RNA)
NASCET критеријуми	Енгл. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial criteria
NF-κB	нуклеарни фактор капа бета
oxLDL	оксидативно модификовани LDL
p38 MAPK	митогеном активирана протеин киназа (енгл. mitogen-activated protein kinase)
PAD	болест периферних артерија (енгл. peripheral artery disease)
RIND	реверзибилни исхермијски неуролошки дефицит
ROC	Receiver's operating characteristic curve
SMCs	глатке мишићне ћелије (енгл. smooth muscle cells)
SRs	рецептори скупљачи (енгл. scavenger receptors)
STEMI	инфаркт миокарда са СТ елевацијом (енгл. ST-elevation myocardial infarction)
TIA	пролазни исхемички напад (енгл. transient ischemic attack)
TNF-α	фактор некрозе тумора- α (енгл. tumor necrosis factor- α)
Tregs	регулаторне Т ћелија (енгл. Regulatory T cells)
VCAM-1	васкуларни ћелијски адхезиони молекул-1 (енгл. vascular cell adhesion molecule 1)
ICAM-1	међућелијски адхезиони молекул-1 (енгл. intercellular adhesion molecules-1)
VSMCs	васкуларне глатко-мишићне ћелије (енгл. vascular smooth muscle cells)
ELISA	Енгл. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ИКВБ	институт за кардиоваскуларне болести
КВБ	кардиоваскуларне болести

8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 2015 Jan 16;116(2):307-11.
2. Autieri, Michael. (2012). Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Networks in Atherosclerosis. *ISRN Vascular Medicine*. 2012. 10.5402/2012/987629.
3. Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, Asakura F, Toma N, Sakaida H, Fujisawa T, Taki W, Tomimoto H. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS One*. 2014 Jun 17;9(6):e100045.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5;105(9):1135-43.
5. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986 Mar-Apr;6(2):131-8.
6. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013 May 23;368(21):2004-13.
7. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
8. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am*. 2002 May;286(5):46-55. doi: 10.1038/scientificamerican0502-46.
9. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
10. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2680-90.
11. Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):750-4.
12. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):199-206.
13. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Nov;27(11):2292-301.
14. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):788-91
15. Krychtiuk KA, Kastl SP, Speidl WS, Wojta J. Inflammation and coagulation in atherosclerosis. *Hamostaseologie*. 2013;33(4):269-82.
16. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):894-7.
17. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):1041-50.
18. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993 Feb;13(2):197-204.

19. 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.
20. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10417-22.
21. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):60-8.
22. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Wight TN. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17):13847-51.
23. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997 May;150(5):1687-99.
24. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):204-12. doi: 10.1038/ni.2001. PMID: 21321594.
25. Lundberg AM, Hansson GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol.* 2010 Jan;134(1):5-24.
26. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001 Jul 17;104(3):365-72.
27. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation.* 2001 Apr 3;103(13):1718-20. doi: 10.1161/01.cir.103.13.1718. PMID: 11282900.
28. Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Apr;27(4):705-13.
29. Arbab-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute coronary events. *Circulation.* 2012 Mar 6;125(9):1147-56.
30. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1282-92.
31. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011 Apr 29;145(3):341-55.
32. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity.* 2013 Jun 27;38(6):1092-104.
33. Sundnes O, Pietka W, Loos T, Sponheim J, Rankin AL, Pflanz S, Bertelsen V, Sitek JC, Hol J, Haraldsen G, Khnykin D. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol.* 2015 Jul;135(7):1771-1780.
34. H.H, Eckstein, European Society for Vascular Surgery Guidelines on the Management of Atherosclerotic Carotid and Vertebral Artery Disease, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 55 (2018) 1-2.
35. Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb Haemost.* 2006 Mar;95(3):511-8.

36. Unni M, Breland, Annika E, Michelsen, Mona Skjelland, Lasse Folkersen, Kirsten Krohg-Sørensen, David Russell, Thor Ueland, Arne Yndestad, Gabrielle Paulsson-Berne, Jan K. Damås, Erik Øie, Gøran K. Hansson, Bente Halvorsen, Pål Aukrust, Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation, *Cardiovascular Research*, Volume 86, Issue 2, 1 May 2010, Pages 265–273,
37. Szodoray P, Timar O, Veres K, Der H, Szomjak E, Lakos G, Aleksza M, Nakken B, Szegedi G, Soltesz P. TH1/TH2 imbalance, measured by circulating and intracytoplasmic inflammatory cytokines--immunological alterations in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Scand J Immunol*. 2006 Sep;64(3):336-44.
38. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Dec;26(6):673-85. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003. Epub 2015 May 12. PMID: 26005197;.
39. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res*. 2016 Jan 8;118(1):145-56.
40. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Wakaume K, Kameda R, Nemoto S, Takahira N, Masuda T, Izumi T. Circulating interleukin-18: A specific biomarker for atherosclerosis-prone patients with metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2011 Jan 20;8:3.
41. Elkind MS, Rundek T, Sciacca RR, Ramas R, Chen HJ, Boden-Albala B, Rabbani L, Sacco RL. Interleukin-2 levels are associated with carotid artery intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2005 May;180(1):181-7.
42. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM; CAPTURE Study Investigators. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003 Apr 29;107(16):2109-14.
43. Silveira A, McLeod O, Strawbridge RJ, Gertow K, Sennblad B, Baldassarre D, Veglia F, Deleskog A, Persson J, Leander K, Gigante B, Kauhanen J, Rauramaa R, Smit AJ, Mannarino E, Giral P, Gustafsson S, Söderberg S, Öhrvik J, Humphries SE, Tremoli E, de Faire U, Hamsten A. Plasma IL-5 concentration and subclinical carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015 Mar;239(1):125-30.
44. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):515-81.
45. Pauku, K. and O. Silvennoinen. "STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5." *Cytokine & growth factor reviews* 15 6 (2004): 435-55 .
46. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2002 Jun;22(6):661-70.
47. Gupta S, Pablo AM, Jiang Xc, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997 Jun 1;99(11):2752-61.
48. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol*. 2000 Dec;157(6):1819-24.
49. Leon ML, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res*. 2005 Oct;54(10):395-411.

50. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res.* 2002 Feb 8;90(2):E34-8.
51. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J.* 2002 Mar;23(5):376-83
52. Woollard KJ, Suhartoyo A, Harris EE, Eisenhardt SU, Jackson SP, Peter K, Dart AM, Hickey MJ, Chin-Dusting JP. Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ Res.* 2008 Nov 7;103(10):1128-38.
53. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930 Sep 30;52(4):561-71.
54. Macleod CM, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : ii. isolation and properties of the reactive protein. *J Exp Med.* 1941 Jan 31;73(2):183-90.
55. Ridker PM. C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem.* 2009 Feb;55(2):209-15.
56. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 1994 Aug 18;331(7):417-24.
57. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet.* 1997 Feb 15;349(9050):462-6.
58. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997 Apr 3;336(14):973-9.
59. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation.* 1998 May 26;97(20):2007-11.
60. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation.* 1998 Feb 10;97(5):425-8.
61. Casscells W, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, Bearman G, Willerson JT. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet.* 1996 May 25;347(9013):1447-51.
62. Calabró P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation.* 2003 Oct 21;108(16):1930-2.
63. Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep 20;46(6):1112-3. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.017. PMID: 16168299.
64. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2165-8.
65. Singh U, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases tissue plasminogen activator activity in human aortic endothelial cells: evidence that C-reactive protein is a procoagulant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2216-21.

66. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*. 2003 Aug 5;108(5):512-5.
67. Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004 Feb 10;109(5):647-55.
68. Trion A, de Maat MP, Jukema JW, van der Laarse A, Maas MC, Offerman EH, Havekes LM, Szalai AJ, Princen HM, Emeis JJ. No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug;25(8):1635-40.
69. Hirschfield GM, Gallimore JR, Kahan MC, Hutchinson WL, Sabin CA, Benson GM, Dhillon AP, Tennent GA, Pepys MB. Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8309-14.
70. Ridker PM. A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Feb 16;67(6):712-723.
71. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct;19(10):2364-7.
72. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Nov 30;110(22):3493-500.
73. Allison B, Reiss, Nicolle M, Siegart & Joshua De Leon. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? 2017. *Clinical Lipidology*, 12:1, 14-23,
74. Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, Nakagawa T, Ohashi R, Johnson RJ. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol*. 2004 Jul-Aug;24(4):387-92.
75. Wung BS, Hsu MC, Wu CC, Hsieh CW. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci*. 2005 Dec 12;78(4):389-97.
76. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007 Dec 13;357(24):2482-94.
77. Gierens H, Nauck M, Roth M, Schinker R, Schürmann C, Scharnagl H, Neuhaus G, Wieland H, März W. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jul;20(7):1777-83. doi: 10.1161/01.atv.20.7.1777. PMID: 10894816.
78. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Dec;8(4):253-65.
79. Suzuki H, Shibano K, Okane M, et al. Interferon-gamma modulates messenger RNA levels of c-sis (PDGF-B chain), PDGF-A chain, and IL-1 beta genes in human vascular endothelial cells. *The American Journal of Pathology*. 1989 Jan;134(1):35-43.
80. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest*. 1985 Nov;76(5):2003-11.
81. Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):242-4.

82. Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, James RW, Mach F, Gabay C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2005 Jun 1;66(3):583-93.
83. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Apr 1;23(4):656-60.
84. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1910-4.
85. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995 Dec;3(6):811-21.
86. Moseley TA, Haudenschield DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Apr;14(2):155-74.
87. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
88. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000 Jul;115(1):81-7.
89. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):29-37.
90. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002 Jan;71(1):1-8.
91. Miljkovic D, Trajkovic V. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb;15(1):21-32.
92. Erbel C, Akhavanpoor M, Okuyucu D, Wangler S, Dietz A, Zhao L, Stellos K, Little KM, Lasitschka F, Doesch A, Hakimi M, Dengler TJ, Giese T, Blessing E, Katus HA, Gleissner CA. IL-17A influences essential functions of the monocyte/macrophage lineage and is involved in advanced murine and human atherosclerosis. *J Immunol.* 2014 Nov 1;193(9):4344-55.
93. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Iwakura Y, Yagita H, Tsutsui H, Uede T. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Feb;32(2):273-80.
94. van Es T, van Puijvelde GH, Ramos OH, Segers FM, Joosten LA, van den Berg WB, Michon IM, de Vos P, van Berkel TJ, Kuiper J. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 16;388(2):261-5.
95. Madhur MS, Funt SA, Li L, Vinh A, Chen W, Lob HE, Iwakura Y, Blinder Y, Rahman A, Quyyumi AA, Harrison DG. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1565-72.
96. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, Galkina E. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2010 Apr 20;121(15):1746-55.

97. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2006 Dec;17(8):699-706.
98. Fatkhullina AR, Peshkova IO, Dzutsev A, Aghayev T, McCulloch JA, Thovarai V, Badger JH, Vats R, Sundd P, Tang HY, Kossenkov AV, Hazen SL, Trinchieri G, Grivennikov SI, Koltsova EK. An Interleukin-23-Interleukin-22 Axis Regulates Intestinal Microbial Homeostasis to Protect from Diet-Induced Atherosclerosis. *Immunity.* 2018 Nov 20;49(5):943-957.e9.
99. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014 Sep;14(9):585-600.
100. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol.* 2010 Oct;21(5):404-8.
101. Behnsen J, Jellbauer S, Wong CP, Edwards RA, George MD, Ouyang W, Raffatellu M. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity.* 2014 Feb 20;40(2):262-73.
102. Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidenschenk C, Zhang J, Lesch J, Lee WP, Ross J, Diehl L, van Bruggen N, Kolumam G, Ouyang W. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature.* 2014 Oct 9;514(7521):237-41.
103. Abbas A, Gregersen I, Holm S, Daissormont I, Bjerkeli V, Krohg-Sørensen K, Skagen KR, Dahl TB, Russell D, Almås T, Bundgaard D, Alteheld LH, Rashidi A, Dahl CP, Michelsen AE, Biessen EA, Aukrust P, Halvorsen B, Skjelland M. Interleukin 23 levels are increased in carotid atherosclerosis: possible role for the interleukin 23/interleukin 17 axis. *Stroke.* 2015 Mar;46(3):793-9.
104. Khojasteh-Fard M, Abolhalaj M, Amiri P, Zaki M, Taheri Z, Qorbani M, Bazzaz JT, Amoli MM. IL-23 gene expression in PBMCs of patients with coronary artery disease. *Dis Markers.* 2012;33(6):289-93.
105. Savvatis K, Pappritz K, Becher PM, Lindner D, Zietsch C, Volk HD, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C. Interleukin-23 deficiency leads to impaired wound healing and adverse prognosis after myocardial infarction. *Circ Heart Fail.* 2014 Jan;7(1):161-71.
106. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ; AtheroGene Investigators. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation.* 2002 Jul 2;106(1):24-30.
107. C. A. Dinarello, "IL-18: A T(H1)-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 103, no. 1, pp. 11–24, 1999.
108. Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1;59(1):234-40.
109. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989 Dec 1;170(6):2081-95.
110. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Mar;19(3):611-6.
111. Wakkach A, Cottrez F, Groux H. Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine? *Eur Cytokine Netw.* 2000 Jun;11(2):153-60.

112. von der Thüsen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2003 Mar;55(1):133-66. doi: 10.1124/pr.55.1.5. PMID: 12615956.
113. Rajasingh J, Bord E, Luedemann C, Asai J, Hamada H, Thorne T, Qin G, Goukassian D, Zhu Y, Losordo DW, Kishore R. IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. *FASEB J.* 2006 Oct;20(12):2112-4.
114. Lisinski TJ, Furie MB. Interleukin-10 inhibits proinflammatory activation of endothelium in response to *Borrelia burgdorferi* or lipopolysaccharide but not interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. *J Leukoc Biol.* 2002 Sep;72(3):503-11.
115. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:205-18.
116. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929-79.
117. Ma X, Aste-Amezaga M, Gri G, Gerosa F, Trinchieri G. Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem Immunol.* 1997;68:1-22.
118. Varma TK, Toliver-Kinsky TE, Lin CY, Koutrouvelis AP, Nichols JE, Sherwood ER. Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5249-63.
119. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 2003 Jan;24(1):36-43.
120. Sikka G, Miller KL, Stepan J, Pandey D, Jung SM, Fraser CD 3rd, Ellis C, Ross D, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson K, Walston JD, Berkowitz DE, Barouch LA. Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. *Exp Gerontol.* 2013 Feb;48(2):128-35.
121. Han X, Kitamoto S, Wang H, Boisvert WA. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J.* 2010 Aug;24(8):2869-80.
122. Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroutre H, Curtiss LK, Berliner JA, Boisvert WA. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res.* 2002 May 31;90(10):1064-71.
123. Von Der Thüsen JH, Kuiper J, Fekkes ML, De Vos P, Van Berkel TJ, Biessen EA. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr^{-/-} mice. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2730-2.
124. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999 Oct 15;85(8):e17-24.
125. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010 Feb;10(2):103-10.
126. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008 Feb 18;205(2):339-46.
127. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005 Nov;23(5):479-90..

128. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, Gombert JM, Schneider E, Dy M, Gourdy P, Girard JP, Herbelin A. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol*. 2009 Apr;39(4):1046-55.
129. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol*. 2016 Feb;17(2):122-31.
130. Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic L, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D, Arsenijevic N. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. *Arch Med Res*. 2010 Apr;41(3):182-9.
131. Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One*. 2012;7(9):e45225.
132. Zdravkovic N, Pavlovic S, Zdravkovic V, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. ST2 gene-deletion reveals a role of Foxp3+ regulatory T cells in diabetes modulation in BALB/c mice. *Transl Res*. 2013 Feb;161(2):118-29.
133. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol*. 2012 Jan;56(1):26-33.
134. Jetic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mol Med*. 2015 May 22;21(1):453-65.
135. Vannella KM, Ramalingam TR, Borthwick LA, Barron L, Hart KM, Thompson RW, Kindrachuk KN, Cheever AW, White S, Budelsky AL, Comeau MR, Smith DE, Wynn TA. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Sci Transl Med*. 2016 May 4;8(337):337ra65.
136. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014 Apr 1;134(7):1669-82.
137. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):479-90.
138. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang Fp, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med*. 1998 Mar 2;187(5):787-94.
139. Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003 Feb 11;107(5):721-6.
140. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, Lee RT. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 May 11;109(18):2186-90.
141. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):339-46.

142. McLaren JE, Michael DR, Salter RC, Ashlin TG, Calder CJ, Miller AM, Liew FY, Ramji DP. IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1222-9.
143. Martin P, Palmer G, Rodriguez E, Woldt E, Mean I, James RW, Smith DE, Kwak BR, Gabay C. Atherosclerosis severity is not affected by a deficiency in IL-33/ST2 signaling. *Immun Inflamm Dis*. 2015 Sep;3(3):239-46.
144. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, Kaun C, Rauscher S, Niessner A, Pentz R, Pfaffenberger S, Rychli K, Lemberger CE, de Martin R, Heinemann A, Huk I, Gröger M, Maurer G, Huber K, Wojta J. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Sep;31(9):2080-9.
145. Demyanets S, Speidl WS, Tentzeris I, Jarai R, Katsaros KM, Farhan S, Krychtiuk KA, Wonnerth A, Weiss TW, Huber K, Wojta J. Soluble ST2 and interleukin-33 levels in coronary artery disease: relation to disease activity and adverse outcome. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e95055.
146. Demyanets S, Tentzeris I, Jarai R, Katsaros KM, Farhan S, Wonnerth A, Weiss TW, Wojta J, Speidl WS, Huber K. An increase of interleukin-33 serum levels after coronary stent implantation is associated with coronary in-stent restenosis. *Cytokine*. 2014 Jun;67(2):65-70.
147. Dhillon OS, Narayan HK, Khan SQ, Kelly D, Quinn PA, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Pre-discharge risk stratification in unselected STEMI: is there a role for ST2 or its natural ligand IL-33 when compared with contemporary risk markers? *Int J Cardiol*. 2013 Sep 1;167(5):2182-8.
148. Shen J, Shang Q, Wong CK, Li EK, Wang S, Li RJ, Lee KL, Leung YY, Ying KY, Yim CW, Kun EW, Leung MH, Li M, Li TK, Zhu TY, Yu SL, Kuan WP, Yu CM, Tam LS. IL-33 and soluble ST2 levels as novel predictors for remission and progression of carotid plaque in early rheumatoid arthritis: A prospective study. *Semin Arthritis Rheum*. 2015 Aug;45(1):18-27.
149. Stojkovic S, Kaun C, Basilio J, Rauscher S, Hell L, Krychtiuk KA, Bonstingl C, de Martin R, Gröger M, Ay C, Holnthoner W, Eppel W, Neumayer C, Huk I, Huber K, Demyanets S, Wojta J. Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation. *Sci Rep*. 2016 May 4;6:25171.
150. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191-4.
151. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators, Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, Ferguson GG, Fox AJ, Rankin RN, Hachinski VC, Wiebers DO, Eliasziw M. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991 Aug 15;325(7):445-53.
152. Bancroft JD, Bancroft M. *Theory and practice of histological techniques*. 5th ed. Livingstone; 2002.
153. 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 Sep 1;92(5):1355-74.
154. Moreno PR. Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment. *Cardiol Clin*. 2010 Feb;28(1):1-30.

155. Mehta AB, Shah S. Unstable or High Risk Plaque: How Do We Approach It? *Med J Armed Forces India*. 2006 Jan;62(1):2-7.
156. Zhu Y, Yang H, Diao Z, Li Y, Yan C. Reduced Serum Level of Interleukin-10 is Associated with Cerebral Infarction: A Case-Control and Meta-Analysis Study. *Mol Neurobiol*. 2016 May;53(4):2698-704.
157. Ambrosius W, Kazmierski R, Michalak S, Kozubski W. Anti-inflammatory cytokines in subclinical carotid atherosclerosis. *Neurology*. 2006 Jun 27;66(12):1946-8.
158. Puz P, Lasek-Bal A. Repeated measurements of serum concentrations of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in the evaluation of internal carotid artery stenosis progression. *Atherosclerosis*. 2017 Aug;263:97-103.
159. Halvorsen B, Waehre T, Scholz H, Clausen OP, von der Thüsen JH, Müller F, Heimli H, Tonstad S, Hall C, Frøland SS, Biessen EA, Damås JK, Aukrust P. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J Lipid Res*. 2005 Feb;46(2):211-9.
160. Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*. 1996 Aug;149(2):367-80.
161. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):2013-20.
162. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995 Jun 1;91(11):2844-50.
163. Han X, Boisvert WA. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thromb Haemost*. 2015 Mar;113(3):505-12.
164. Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar;19(3):734-42.
165. van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):345-9.
166. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, Nicoletti A. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med*. 2003 Jan-Feb;9(1-2):10-7.
167. Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Nomoto T, Takeuchi K, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takahashi M, Matsushita T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Ookawara S, Kawano M, Ishibashi S, Shimada K, Ozawa K. Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther*. 2004 Dec;11(24):1772-9.
168. Du L, Dronadula N, Tanaka S, Dichek DA. Helper-dependent adenoviral vector achieves prolonged, stable expression of interleukin-10 in rabbit carotid arteries but does not limit early atherogenesis. *Hum Gene Ther*. 2011 Aug;22(8):959-68.
169. Kosmala W, Derzhko R, Przewlocka-Kosmala M, Orda A, Mazurek W. Plasma levels of TNF-alpha, IL-6, and IL-10 and their relationship with left ventricular diastolic function in patients with stable angina pectoris and preserved left ventricular systolic performance. *Coron Artery Dis*. 2008 Sep;19(6):375-82.

170. Zhang DF, Song XT, Chen YD, Yuan F, Xu F, Zhang M, Zhang MD, Wang W, Dai J, Lyu SZ. Prognostic performance of interleukin-10 in patients with chest pain and mild to moderate coronary artery lesions-an 8-year follow-up study. *J Geriatr Cardiol*. 2016 Mar;13(3):244-51.
171. Fang L, Moore XL, Dart AM, Wang LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*. 2015 May;12(3):305-12.
172. Kozinski, M., Krzewina-Kowalska, A., Kubica, J. et al. Percutaneous coronary intervention triggers a systemic inflammatory response in patients treated for in-stent restenosis – comparison with stable and unstable angina. *Inflamm. res.* 54, 187–193 (2005).
173. Kimura T, Tse K, McArdle S, Gerhardt T, Miller J, Mikulski Z, Sidney J, Sette A, Wolf D, Ley K. Atheroprotective vaccination with MHC-II-restricted ApoB peptides induces peritoneal IL-10-producing CD4 T cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017 Apr 1;312(4):H781-H790.
174. Han X, Boisvert WA. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thromb Haemost.* 2015 Mar;113(3):505-12.
175. Terkeltaub RA. IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Dec;19(12):2823-5.
176. Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA. Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2457-61.
177. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, Lasitschka F, Bea F, Wambsgans N, Hakimi M, Böckler D, Katus HA, Gleissner CA. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol*. 2011 Jan;106(1):125-34.
178. Allam G, Abdel-Moneim A, Gaber AM. The pleiotropic role of interleukin-17 in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1412-1418.
179. Willems S, Quax PH, de Borst GJ, de Vries JP, Moll FL, de Kleijn DP, Hofer IE, Pasterkamp G. Soluble ST2 levels are not associated with secondary cardiovascular events and vulnerable plaque phenotype in patients with carotid artery stenosis. *Atherosclerosis*. 2013 Nov;231(1):48-53.
180. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016 Nov;16(11):676-689.
181. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1538-49.
182. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, Krychtiuk KA, Rauscher S, Pfaffenberger S, Zuckermann A, Aliabadi A, Gröger M, Maurer G, Huber K, Wojta J. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Jul;60:16-26.
183. Mousson C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008 Oct 6;3(10):e3331.
184. Kastl SP, Speidl WS, Kaun C, Katsaros KM, Rega G, Afonyushkin T, Bochkov VN, Valent P, Assadian A, Hagmueller GW, Hoeth M, de Martin R, Ma Y, Maurer G, Huber K, Wojta J. In human macrophages the complement component C5a induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):498-503.

185. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Gröger M, Klinger M, Wojta J, Neumayer C, Huk I, Demyanets S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016 May;51(5):623-31.
186. Graebe M, Pedersen SF, Borgwardt L, Højgaard L, Sillesen H, Kjaer A. Molecular pathology in vulnerable carotid plaques: correlation with [18]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009 Jun;37(6):714-21.
187. Stojkovic S, Kaun C, Heinz M, Krychtiuk KA, Rauscher S, Lemberger CE, de Martin R, Gröger M, Petzelbauer P, Huk I, Huber K, Wojta J, Demyanets S. Interleukin-33 induces urokinase in human endothelial cells--possible impact on angiogenesis. *J Thromb Haemost.* 2014 Jun;12(6):948-57.
188. Moreno PR. Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment. *Cardiol Clin.* 2010 Feb;28(1):1-30.

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Доктор Милош Станковић рођен је у Крагујевцу 18.01.1978. године. Гимназију у Крагујевцу је завршио 1996. године. Исте године је уписао Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, а основне студије медицине је од 2000. године наставио на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Дипломирао је школске 2003. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду са просечном оценом 9,34. Од новембра 2006. године је стално запослен у Клиничком центру у Крагујевцу као клинички лекар, а од 2008. године као лекар на специјализацији из опште хирургије на Медицинском факултету у Београду. Од 2011. до 2012. године је похађао специјализацију из кардиохирургије на Медицинском факултету у Београду, а од 2013. године је уписан на специјалистичке студије из опште хирургије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Током школске 1998/99. и 1999/2000. учествовао је у настави на предмету Анатомија Медицинског факултета у Крагујевцу као студент- демонстратор. Школске 2013/14. године изабран је у звање сарадник у настави за ужу научну област Хирургија Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Тренутно је запослен на Факултету медицинских наука као асистент на предмету Хирургија. Говори енглески језик.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. Stankovic, Milos, Ljubic, Biljana, Radak, Djordje, Mitrovic, Slobodanka, Babic, Srdjan, Arsenijevic, Nebojsa, Lukic, Miodrag and Pejnovic, Nada. "Circulating IL-10 Levels in Carotid Artery Disease" Serbian Journal of Experimental and Clinical Research, vol.20, no.1, 2019, pp.53-63
2. Stankovic M, Ljubic B, Babic S, Maravic-Stojkovic V, Mitrovic S, Arsenijevic N, Radak D, Pejnovic N, Lukic ML. IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. Cytokine. 2019 Aug; 120:242-250.
3. Protrka Z, Mitrovic S, Arsenijevic N, Baskic D, Radosavljevic G, Stankovic M, Arsenijevic S. HER-2 expression in uterine cervix carcinogenesis. J BUON 2007;12(1):91-7. M23
4. Protrka Z, Mitrović S, Arsenijević N, Baskić D, Radosavljević G, **Stanković M**, Lukic G, Arsenijevic S. Expression of c-myc proto-oncogene in premalignant and malignant uterine cervix lesions. Medicus 2007; 8(1):15-19. **M52**

Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Наставно научном већу

Прегледавши завршену докторску дисертацију кандидата
Милоша Станковића под називом
“Имунорегулаторни цитокини у карцидном болесту” сматрам да иста
може да уђе у даљу процедуру.

У Крагујевцу,

Ментор

15.03.2022.

проф. др Биљана Љубић

Велико

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Станковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Имуноиндулаторни цитокини у
кэротичкој болести

која је одбрањена на Филолетиу медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу 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,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2022. године,

Милош Станковић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Станковић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Имуномодулаторни цитокини у
каротиној болести

која је одбрањена на Филозофском факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 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

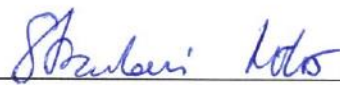
не дозвољавам¹

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 Крегујевцу, 2022. 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/](http://creativecommons.org.rs/)

