

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dalila Šaćić Osmanović

**IDENTIFIKACIJA INFEKTIVNIH AGENASA U
NEATEROSKLEROTSKIM DELOVIMA KORONARNIH
ARTERIJA, UNUTRAŠNJE GRUDNE ARTERIJE I AORTE
KOD BOLESNIKA SA KORONARNOM BOLEŠĆU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Dalila Šaćić Osmanović

**IDENTIFICATION OF INFECTIOUS AGENTS
IN NON-ATHEROSCLEROTIC PARTS OF CORONARY
ARTERIES, INTERNAL THORACIC ARTERY AND
AORTA IN PATIENTS WITH CORONARY DISEASE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

1. Prof. dr Sofija Glumac, vanredni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Svetozar Putnik, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Jelena Milašin, redovni profesor,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević, vanredni profesor
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Nedeljković, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Milena Radunović,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Pre svega, želim da izrazim duboku zahvalnost *profesoru dr Svetozaru Putniku* sa Klinike za kardiohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije bez čijeg angažovanja ne bi bilo ove doktorske disertacije.

Profesorki dr Jeleni Milašin ne mogu dovoljno da zahvalim i ne mogu da nabrojim sve načine na koje je pomogla da ova teza postane stvarnost: od konceptualizacije eksperimentalne metode, preko realizacije. Ostavljajući po strani njen profesionalni doprinos, moram da izrazim srdačnu zahvalnost na besprekornom ličnom odnosu i podršci koju mi je pružila tokom prethodnih godina.

Profesorki dr Sofiji Glumac sa Instituta za patologiju “dr Đorđe Joannović” izražavam zahvalnost na stručnosti u histopatološkim tehnikama i pruženoj podršci, kao i za savete koji su doprineli u procesu istraživanja.

Članovima komisije: *prof. dr Ivani Nedeljković, doc. dr Mileni Radunović, prof. dr Biserki Vukomanović Đurđević* na pomoći u realizaciji disertacije.

Profesoru dr Zoranu Bukumiriću, na pomoći prilikom obrade i tumačenja statističkih podataka.

Docentu dr Martinu Popeviću moram posebno da se zahvalim na neprocenjivim savetima koji su odigrali ključnu ulogu u oblikovanju ove doktorske disertacije.

Svim zaposlenim na Klinici za kardiohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, na pomoći prilikom izrade disertacije.

Zahvaljujem se *roditeljima, posebno mom suprugu* na izuzetnoj podršci i razumevanju.

Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:

1. Kreiranju koncepta teze: *prof. dr Svetozar Putnik, prof. dr Jelena Milašin, prof. dr Sofija Glumac;*
2. Prikupljanju podataka: *prof. dr Sanja Radojević Škodrić, Ass dr Uroš Tomić i Ass dr Milena Jovanović;*
3. Formalnoj analizi: *prof. dr Jeleni Milašin*
4. Istraživanju: *prof. dr Svetozar Putnik, prof. dr Jelena Milašin, prof. dr Sofija Glumac, Ass Uroš Tomić, Ass Milena Jovanović;*
5. Metodologiji: *prof. dr Jeleni Milašin;*
6. Superviziji: *prof. dr Jelena Milašin, Sofija Glumac;*
7. Pisanju – originalni nacrt: *prof. dr Jelena Milašin, prof. dr Sofija Glumac;*
8. Pisanju- recenzija i uređivanje: *prof. Jelena Milašin, prof. dr Sofija Glumac .*

IDENTIFIKACIJA INFEKTIVNIH AGENASA U NEATEROSKLEROTSKIM DELOVIMA KORONARNIH ARTERIJA, UNUTRAŠNJE GRUDNE ARTERIJE I AORTE KOD BOLESNIKA SA KORONARNOM BOLEŠĆU

Sažetak

Ateroskleroza se trenutno smatra inflamatornim procesom koji se razvija kao posledica hroničnog oštećenja vaskularnog zida izazvanog različitim faktorima rizika, uključujući starenje, hiperlipidemiju, hipertenziju, pušenje, dijabetes melitus i izloženost određenim infektivnim agensima.

Ciljevi ove studije bili su da se ispita prisustvo DNK *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i Cytomegalovirusa u makroskopski nepromenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću, kao i da se proceni njihova povezanost sa inflamatornom komponentom i težinom ateroskleroze, postoperativnim komplikacijama i kliničkim ishodom.

Sprovedena je studija preseka, koja je obuhvatila pacijente sa dijagnozom koronarne arterijske bolesti, hospitalizovane na Klinici za kardiohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije radi hirurške revaskularizacije miokarda (eng. *Coronary Artery Bypass Graft - CABG*).

Analiza uzoraka tkiva, izolacija DNK i lančana reakcija polimerizacije (PCR) u realnom vremenu obavljene su u Organizacionoj jedinici Istraživačkog centra za implantologiju - Laboratoriji za genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a histopatološke (HP) i imunohistohemijske analize (IHH) u Institutu za patologiju „Prof. dr Đorđe Joannović“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Tokom hirurške revaskularizacije miokarda, uzeti su mali uzorci distalnih delova dijagonalnih grana (grane leve prednje silazne koronarne arterije, eng. *left anterior descending coronary artery - LAD*), delovi unutrašnje grudne arterije (lat. a. *mammaria interna*), koji se koriste za transplantaciju (graft), i delovi aorte bez makroskopski procenjene aterosklerotske degeneracije, na analizu.

Rezultati ove studije ukazali su na prisustvo mikroorganizama u naizgled zdravim arterijskim segmentima kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću (eng. *Coronary artery disease, CAD*), ne samo u koronarnim arterijama, već i u unutrašnjim grudnim arterijama, koje se inače smatraju otpornim na ateroskrozu. Njihovo prisustvo u makroskopski neizmenjenim krvnim sudovima koreliralo je sa inflamatornom komponentom ateroskleroze (povišeni nivoi sedimentacije i fibrinogena), ali nije pokazalo korelaciju sa postoperativnim komplikacijama.

Ključne reči: Koronarna bolest, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Cytomegalovirus, DNK, PCR, HP, IHH

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj: _____

IDENTIFICATION OF INFECTIOUS AGENTS IN NON-ATHEROSCLEROTIC PARTS OF CORONARY ARTERIES, INTERNAL THORACIC ARTERY AND AORTA IN PATIENTS WITH CORONARY DISEASE

Abstract

Atherosclerosis is currently regarded as an inflammatory process that develops as a consequence of chronic vascular wall injury caused by various risk factors, including aging, hyperlipidaemia, hypertension, smoking, diabetes mellitus, and exposure to certain infectious agents.

The aims of this study was to investigate the presence of *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and Cytomegalovirus DNA in macroscopically unchanged segments of coronary arteries, the internal thoracic artery, and aorta in patients with advanced coronary artery disease, as well as to evaluate their association with the inflammatory component and severity of atherosclerosis, postoperative complications, and clinical outcome.

A cross-sectional study was conducted, which included patients diagnosed with coronary artery disease (CAD), hospitalized at the Cardiac Surgery Clinic of the University Clinical Center of Serbia for surgical myocardial revascularization (Coronary Artery Bypass Graft - CABG).

Analysis of tissue samples, DNA isolation and real-time polymerase chain reaction (PCR) were performed in the Organizational Unit of the Implantology Research Center - Genetics Laboratory of the Faculty of Dentistry, University of Belgrade, and histopathological (HP) and immunohistochemical (IHH) analyzes at the Institute of Pathology "Prof. Dr. Đorđe Joannović", Faculty of Medicine, University of Belgrade.

During the surgical revascularization of the myocardium, small samples of the distal parts of the diagonal branches (branches of the left anterior descending coronary artery - LAD), parts of the internal thoracic artery (lat. a. mammae interna), which are used for transplantation (graft), and parts of the aorta without macroscopically assessed atherosclerotic degeneration, were taken for analysis.

The results of this study indicated the presence of microorganisms in apparently healthy arterial segments in patients with coronary artery disease (CAD), not only in coronary arteries, but also in internal thoracic arteries, which are otherwise considered resistant to atherosclerosis. Their presence in macroscopically unchanged blood vessels correlated with the inflammatory component of atherosclerosis (increased levels of sedimentation and fibrinogen), but did not show a correlation with postoperative complications.

Key words: Coronary artery disease, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Cytomegalovirus, DNA, PCR, PH, IHH

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDC number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Ateroskleroza i bolesti kardiovaskularnog sistema.....	3
1.2 Uloga inflamacije u patogenezi ateroskleroze	6
1.3 Infekcija i ateroskleroza	10
1.4 Infekcija i koronarna bolest.....	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1 Ispitivana populacija	19
3.2 Tip studije, mesto i period istraživanja	19
3.3 Instrumenti merenja	19
3.4 Histopatološka analiza	20
3.5 Imunohistohemijska analiza.....	21
3.6 DNK izolacija	21
3.7 Kvantitativna lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu	22
3.8. Statistička analiza.....	24
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	25
4.1 Demografske karakteristike ispitanika.....	25
4.2 PCR analiza.....	44
4.2.1 Kvantitativna PCR analiza	45
4.2.2 Uporedna analiza imunohistohemijskog nalaza i PCR nalaza.....	46
4.3 Patohistološki nalaz.....	47
4.4 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom DNK patogenih mikroorganizama.....	55
4.5 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom DNK patogenih mikroorganizama	56
4.6 Povezanost pojedinačnih patogena (<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Cytomegalovirus</i>) sa stepenom inflamacije i ateroskleroze	57
4.6.1 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom <i>Helicobacter pylori</i>	57
4.6.2 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom <i>Helicobacter pylori</i>	58
4.6.3 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom <i>Chlamydia pneumoniae</i>	59

4.6.4 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom <i>Chlamydia pneumoniae</i>	60
4.6.5 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom CMV	61
4.6.6 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom CMV	62
4.7 Korelacije detektovanih vrednosti patogena sa stepenom inflamacije i ateroskleroze	63
4.8 Povezanost prisustva patogena sa postoperativnim komplikacijama i smrtnim ishodom.....	64
4.8.1 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK <i>Helicobacter pylori</i>	64
4.8.2 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK <i>Chlamydia pneumoniae</i>	65
4.8.3 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK CMV	66
4.9 Regresioni modeli	68
5. DISKUSIJA	70
6. ZAKLJUČAK	77
7. LITERATURA	78

1. UVOD

BOLESTI KARDIOVASKULARNOG SISTEMA

Kardiovaskularna oboljenja (eng. *cardiovascular disorders, CVD*) predstavljaju jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svetu [1]. Bolesti srca i krvnih sudova, sa stopom mortaliteta od čak 32%, bile su odgovorne za približno 19,8 miliona smrtnih ishoda tokom 2022. godine.

Najveći procenat (85%) ovako visokog mortaliteta je uzrokovan aterosklerotskim kardiovaskularnim bolestima (eng. *atherosclerotic cardiovascular disorders, ASCVD*), poput infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog insulta. Ishemijska bolest srca (IBS) predstavlja vodeći uzrok smrti i odgovorna je za oko 49% svih smrtnih ishoda.. Teret kardiovaskularnih bolesti (KVB) je više izražen u zemljama sa nižom i srednjom stopom ekonomskog razvoja u odnosu na zemlje sa visokom stopom prihoda [2].

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization, WHO*), pored ishemijske bolesti srca, kao i ishemijskog i hemoragičnog cerebrovaskularnog insulta (CVI), arterijska hipertenzija predstavlja značajan uzrok mortaliteta i morbiditeta. Ona doprinosi velikom broju izgubljenih godina života korigovanih za invaliditet (eng. *Disability-adjusted life years, DALY*) [3].

U periodu od 1990. do 2019. godine došlo je do značajnog porasta incidence KVB u celom svetu (31,3 miliona obolelih 1990. godine naspram 55,5 miliona obolelih 2019). Posmatrajući stope obolevanja standardizovane prema uzrastu, postoji pad incidence u razvijenim zemljama Evrope, i Severne Amerike, pre svega IBS i bolesti perifernih arterija, u manjem stepenu CVI i srčane insuficijencije; jedino je incidenca nereumatskih valvularnih oboljenja u porastu. Sa druge strane, prevalenca KVB ne pokazuje znakove pada u nerazvijenim delovima sveta. Smatra se da je 2019. preko 523 miliona ljudi bolovalo od neke KVB, sa porastom učestalosti ishemijskog CVI, NSTEMI (eng. *non –ST elevation myocardial infarction, NSTEMI*) infarkta miokarda [4].

Troškovi vezani za KVB i njihove posledice u zemljama Evropske Unije (EU) dostižu 282 milijarde eura godišnje, pri čemu oko 55% otpada na dijagnostiku i samo lečenje, 17% na gubitak radne sposobnosti i 28% na potrebe neformalne nege [5].

Procenjuje se da će se u periodu od 2025-2050. godine nastaviti trend rasta obolevanja i umiranja od KV bolesti. Prema studiji Chong et al iz 2024. godine, očekivan je porast prevalencije KV bolesti od čak 90%, porast mortaliteta od 73% i DALY od 55%, sa dominacijom ishemijske bolesti srca kao uzročnika i arterijske hipertenzije kao glavnog faktora rizika. Posebno se naglašava rast uticaja KVB u regionima centralne i istočne Evrope, kao i centralne Azije [6,7].

Prema studiji globalnog opterećenja bolesti, povreda i faktora rizika (eng. *The Global Burden of Diseases, Injuries and Risk factors study*), glavni faktori rizika za smrtni ishod od KV bolesti su povišeni krvni pritisak, visoke vrednosti lipoproteina niske molekularne gustine holesterola (eng. *low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C*), glukoze u plazmi, gojaznost tj. visok indeks telesne mase (eng. *Body mass index, BMI*), poremećaj funkcije bubrega, visok sadržaj natrijuma u ishrani, fizička neaktivnost, ekspozicija aerozagađenju, određenim toksičnim agensima (poput olova, organskih rastvarača) i konzumiranje alkoholnih napitaka [8,9].

U zemljama Evrope, KV bolesti su glavni uzrok smrti, sa dominacijom ishemijske bolesti srca (45% mortaliteta žena, 39% ukupnog broja smrtnih ishoda muškaraca). Stope morbiditeta i mortaliteta standardizovane prema uzrastu značajno su više kod pripadnika muškog pola [10,11].

Prema poslednjim dostupnim podacima za Republiku Srbiju, tokom 2023. godine, kod praktično polovine preminulih stanovnika glavni uzrok bili su bolest srca i krvnih sudova, akutni koronarni sindrom (AKS) ili CVI. U poslednjih 10-ak godina postoji blagi pad smrtnosti od KVB (5% kod

žena, 2 % kod muškaraca), pre svega na račun pada mortaliteta od CV bolesti. Sa druge strane viđen je porast smrtnih ishoda od hipertenzivne bolesti od čak 103,5% u istom periodu [12].

Posmatrajući dostupne podatke o prepoznatim faktorima rizika, arterijska hipertenzija je u Evropi 2015. godine bila prisutna kod 22,3% žena i 26,5% muškaraca [10].

Prosečne vrednosti holesterola na nivou Evrope su iznosile oko 4,9 mmol/l (ženski pol) tj. 4,8 mmol/l, sa vrednostima preko 5 mmol/l u više zemalja uključujući Republiku Srbiju. Uvođenjem dostupne terapije, povišene vrednosti LDL-C, nekad patognomonične za aterosklerotske KVB, su izgubile na značaju, dok porast triglicerida (TG) i pad HDL-C (eng. *high density lipoprotein cholesterol*, *HDL-C*) u sklopu metaboličkog sindroma i epidemije gojaznosti dobija na značaju [13].

Procenjena prevalenca šećerne bolesti (diabetes mellitus, DM) se u Evropi kreće oko 6%, ali se smatra da je skoro 38% slučajeva i dalje nedijagnostikovano. Oko 23% smrtnih ishoda pre 60. godine života je povezano sa dijabetesom, od čega verovatno polovina je uzrokovana KV komplikacijama [14,15].

U Srbiji, oko 600.000 stanovnika boluje od DM (oko 8% populacije), dominantno tipa II, pri čemu trenutno dijabetes predstavlja treći po učestalosti uzročnik smrti u populaciji Srbije [12].

Jedan od rastućih faktora rizika kako za KVB tako i za DM je prekomerna telesna težina. Aktuelni podaci na nivou zemalja Evrope ukazuju da je prekomerna težina ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) prisutna kod neverovatnih 50,6% starijih od 18 godina, a da 20% odraslih spada u kategoriju gojaznih ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) [16].

Nizak nivo fizičke aktivnosti značajno doprinosi gojaznosti, DM i KVB. U meta analizi koja je obuhvatila studije sa 650.000 ispitanika, pokazano je da umereni do visoki nivo redovne fizičke aktivnosti može redukovati rizik od nastanka IBS i CVI za 20-30% [17].

Neadekvatan kvalitet i kvantitet sna se sve više nameće kao jedan od bitnih faktora rizika za razvoj i progresiju hroničnih nezaraznih bolesti. Sindrom opstruktivne apneje u snu sa procenjenom globalnom prevalencom od skoro milijardu ljudi je prisutan kod 30-50% pacijenata sa arterijskom hipertenzijom, tj. 70-90% pacijenata sa rezistentnom hipertenzijom. Samostalno, ili u kombinaciji sa insomnijom je značajan faktor rizika za IBS, AKS i poremećaje srčanog ritma [18-20].

Hronični poremećaji bubrežne funkcije su prisutni kod približno 10% odraslih, pri čemu skoro dve trećine pacijenata nije svesno tegoba ili nije dijagnostikovano [21,22].

Ekspozicija buci u radnoj i životnoj sredini uzrokuje ili potpomaže nastanak 50.000 slučajeva KV bolesti na godišnjem nivou [23,24].

Sličan problem predstavlja i aerozagađenje, gde je pokazano da je kratkotrajna i dugotrajna ekspozicija česticama manjim od 2,5 mikrona ($PM_{2.5}$), manjim od 10 mikrona (PM_{10}) i nitroznim gasovima povezana sa povećanim rizikom od arterijske hipertenzije, infarkta miokarda i CVI [23,25].

Konsumiranje duvana inhalatornim putem (e-cigarete i sl.) je u padu, ali i dalje prisutna kao redovna navika kod 15% žena i 28% muškaraca [10].

Pored bihevioralnih i faktora rizika sredine, ne bi trebalo zanemariti ni uticaj genetske predispozicije, poput monogenских oboljenja tipa familijarne hiperholesterolemije (FH) i hipertrofične kardiomiopatije koja doprinose ranoj pojavi i progresiji KVB [26].

Značajne faktore rizika predstavljaju pol (prevremena menopauza, preeklampsija, eklampsija, gestacioni dijabetes), uzrast i rasa pripadnost (Afroamerikanci i stanovnici južne Azije su pod povećanim rizikom) [27].

1.1 ATEROSKLEROZA I BOLESTI KARDIOVASKULARNOG SISTEMA

Ateroskleroza je primarna, patološka osnova najčešćih kardiovaskularnih bolesti. To je hronični, progresivni poremećaj koji karakteriše inflamacija velikih i srednjih arterijskih krvnih sudova praćena nakupljanjem lipida u njihovim zidovima. Najčešće su zahvaćeni koronarni, karotidni i cerebralni krvni sudovi, kao i abdominalna aorta [28].

Faktori rizika nastanka i progresije ateroskleroze obuhvataju proinflamatorne procese i poremećaje metabolizma (gojaznost, metabolički sindrom, dijabetes), kongenitalne faktore (genski polimorfizmi, familijarna hiperholesterolemija), pol, bihevioralne faktore rizika (fizička neaktivnost, konzumiranje alkohola i cigareta, deprivacija sna, stres, aerogađenje), poremećaje crevnog mikrobioma, infekciju i anatomske faktore (bifurkacije arterija) [29].

Sa kliničkog aspekta, ateroskleroza se manifestuje kroz nekoliko bolesti sa visokim morbiditetom i mortalitetom, kao što su ishemijska bolest srca (angina pectoris, srčani udar, iznenadna srčana smrt); cerebrovaskularna bolest (moždani udar); periferna vaskularna bolest (intermitentna klaudikacija, gangrena) [30].

Ateroskleroza se danas posmatra kao imunološko, metaboličko oboljenje u čijem nastanku i progresiji učestvuju hronična inflamacija, oksidativni stres, epigenetika i metabolička disfunkcija [31,32].

Hipoteze o nastanku i razvoju ateroskleroze obuhvataju tri potencijalna principa: odgovor na povredu (eng. *response to injury*), odgovor na zadržavanje i oksidativnu modifikaciju. Prema teoriji odgovora na povredu [33], početni korak u aterosklerozi je oštećenje endotela koje dovodi do gubitka endotelnih ćelija i povećane propustljivosti za lipoproteine i leukocite. Po drugom principu zadržavanje lipoproteina na bifurkaciji arterije smatra se početnim korakom [34,35].

Konačno, po teoriji oksidativne modifikacije [36] oksidacija lipoproteina niske gustine (LDL) početna je tačka u aterogenezi, aktivirajući diferencijaciju monocita u makrofage i stvarajući „penaste ćelije“.

Danas se ateroskleroza smatra inflamatornom bolešću, s obzirom na značajnu ulogu upale tokom faze formiranja i razvoja aterosklerotske lezije. Početak je povezan sa antigenima iz oksidovanih lipoproteina niske gustine, dok je progresija povezana sa oslobađanjem antigena iz ćelija u plakovima koje prolaze kroz apoptozu [37].

Tokom rasta aterosklerotskog plaka dolazi do kontinuirane akumulacije makrofaga i limfocita, proliferacije glatkih mišićnih ćelija i akumulacije lipida u intimi. U procesu akumulacije lokalne ćelijske masti, značajan deo pripada stvaranju oksidovanih LDL (oxLDL) čestica. Promene u intimi i formiranje ateromatoznog plaka uglavnom rezultiraju progresivnom degeneracijom i slabljenjem medije i limfocitnom infiltracijom adventicije. Ponovljeno oštećenje endotela je značajno za rast ateromatoznog plaka, što dalje dovodi do agregacije trombocita i oslobađanja faktora rasta trombocita, kao i do proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija. Progresivno zadebljanje intime dovodi do ishemije dubljih slojeva plaka, takođe i do spoja intima-medija. Stoga, ateroskleroza predstavlja inflamatorni proces, čije je formiranje posledica hroničnog oštećenja zidova krvnih sudova višestrukim faktorima rizika, kao što su: starenje, hiperlipidemija, hipertenzija, pušenje, dijabetes melitus i izloženost nekim infektivnim agensima (herpes virusi, hlamidija) [13,38].

Skoro 40% slučajeva ateroskleroze može se pripisati genetskim varijacijama. Koristeći podatke iz velikih evropskih i japanskih kohorti, meta-analize su identifikovale više od 200 genskih lokusa direktno povezanih sa bolešću [26,31].

Reč ateroskleroza je kombinacija dve grčke reči, athero (što znači kaša,) i sclerosis (otvrdnjavanje), što ukazuje na glavne makroskopske karakteristike zahvaćenih arterija (zadebljanje intimalnog sloja arterija, nakupljanje lipida).

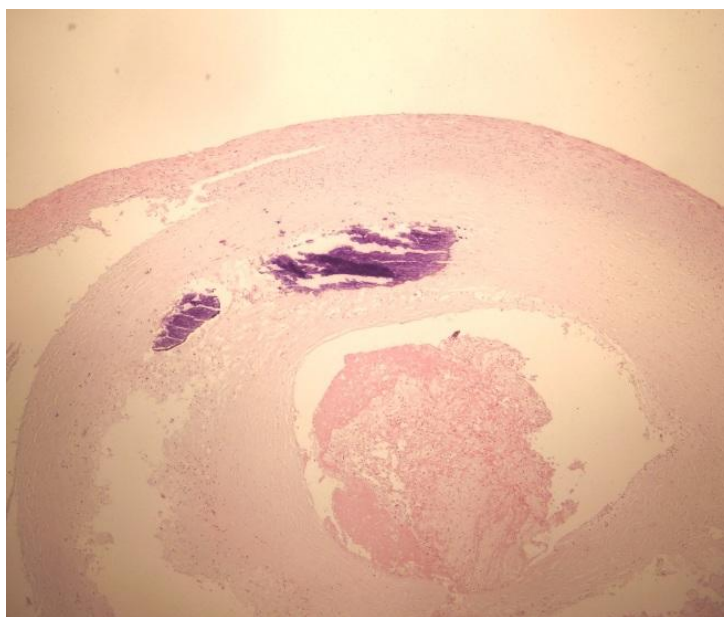
Arterijski zid se sastoji od tri sloja koji okružuju arterijski lumen. Sloj najbliži lumenu je intima, sastavljena od jednog sloja endotelnih ćelija i sloja glikozaminoglikana i kolagena. Srednji sloj je uglavnom napravljen od glatkih mišićnih ćelija i poznat je kao medija, dok se najudaljeniji sloj naziva adventicija.

Razvoj aterosklerotske lezije prolazi kroz nekoliko faza (masne pruge, aterom, plak), koje karakteriše akumulacija i transformacija ekstracelularnih i intracelularnih lipida, ćelija glatkih mišića, inflamatornih ćelija i nekrotičnih ostataka u subendotelnom prostoru u intimi zahvaćenih arterija i narušavanje ravnoteže pro- i antiinflamatornih mehanizama.

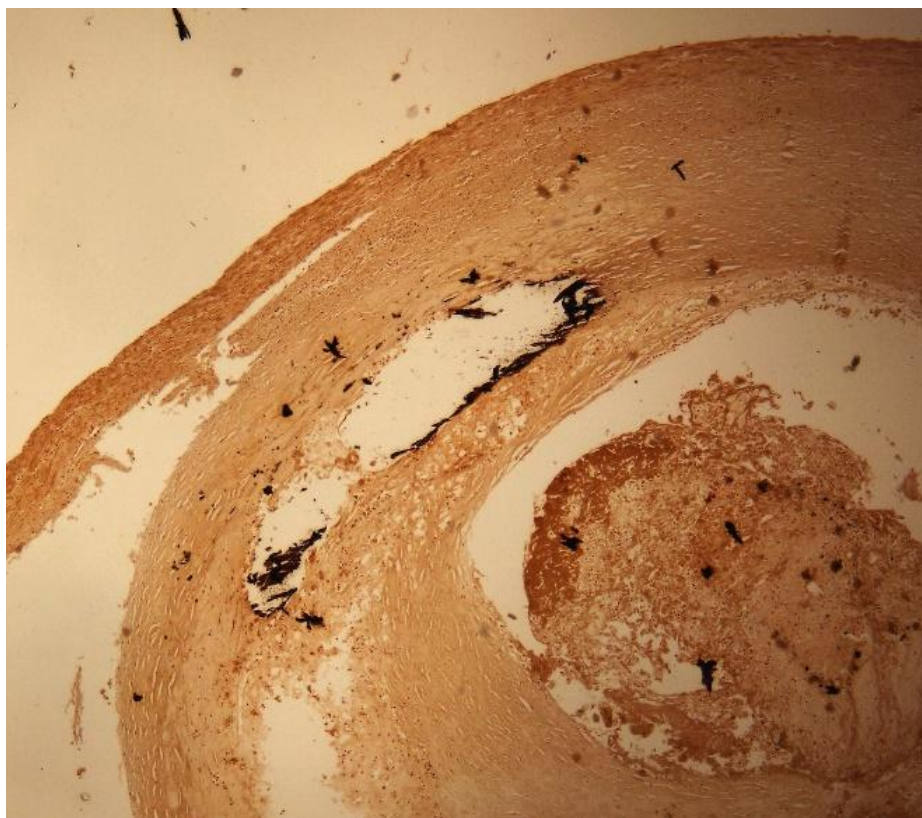
Potpuno razvijena lezija (plak) ima lipidno jezgro, prekriveno fibroznom kapom. Formiranje aterosklerotskih plakova dovodi do smanjenja arterijskog lumena i promena u protoku krvi, što dovodi do tromboze, dok u nekim slučajevima plakovi mogu postati nestabilni ili pući, što posledično stvara tromboembolijske komplikacije u bliskim ili udaljenim krvnim sudovima [28,39].

Inicijalna klasifikacija ateroklerotskih lezija je predložena 1990-ih godina od strane Američkog udruženja za srce (eng. *American Heart Association, AHA*) i obuhvatala je 6 tipova [40], u zavisnosti od stepena progresije, odnosno od stadijuma u kome se proces nalazi:

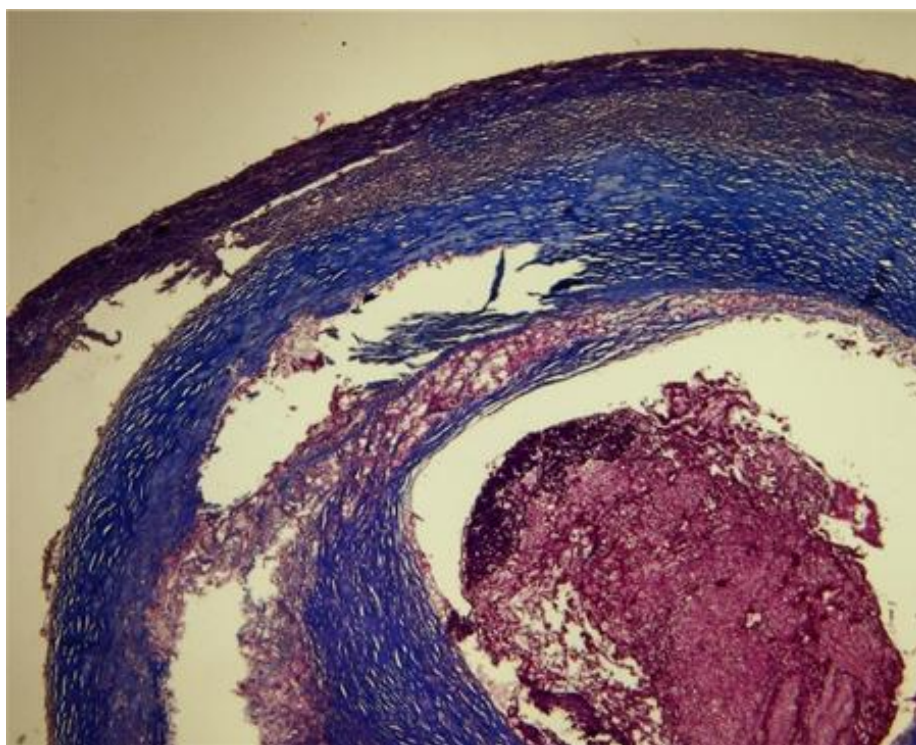
- Tip I (adaptivno zadebljanje intime) - hemijski i mikroskopski utvrđeno prisustvo lipoproteina u intimi, praćeno ćelijskom reakcijom (penaste ćelije, makrofagi, T limfociti, mastociti). Viđa se kod dece ili odraslih osoba bez izražene predispozicije za ateroklerozu.
- Tip II (masna pruga; eng. *fatty streak*)
- Tip III (tranziciona ili intermedijarna lezija)
- Tip IV (aterom).
- Tip V (fibroaterom, aterom sa debelom fibroznom kapom) i
- Tip VI (komplikovani plak) – fisura, hematom, tromboza



Slika 1. Fibroaterom koronarne arterije, sa trombom u lumenu i distrofičnim kalcifikacijama u mediji (H&E bojenje, uvećano 4x)



Slika 2. Von Kossa bojenje (kalcijumovi depoziti obojeni crno, uvećani 4x)



Slika 3. Masonovo trihromno bojenje (plava boja označava naslage vezivnog tkiva, uvećano 4x)

U kasnijem periodu, izvršena je modifikacija AHA morfološke klasifikacije [41], sa definisanjem sledećih deskriptivnih kategorija:

- Neaterosklerotske lezije intime
 - zadebljanje intime (fiziološko nakupljanje glatkih mišićnih ćelija u intimalnom sloju, bez akumulacije lipida i penastih ćelija)
 - intimalni ksantom (površinsko nakupljanje penastih ćelija, bez nekrotičnog jezgra ili fibrozne kape)
- Progresivne aterosklerotske lezije
 - Patološko zadebljanje intime (eng. *Pathologic intimal thickening, PIT*) – plak bogat glatkim mišićnim ćelijama, proteoglikanski matriks, fokalna akumulacija ekstracelularnih lipida
 - Aterom sa fibroznom kapom – sa znacima rane (fokalna infiltracija makrofaga,) ili kasne nekroze (gubitak matriksa, izražen ćelijski debris)
 - Fibroaterom sa tankom kapom uz infiltraciju makrofaga i limfocita, odsustvo glatkih mišićnih ćelija, veliko nekrotično jezgro, moguće krvarenje unutar plaka)
- Lezije sa akutnim tromбом
 - Ruptura plaka
 - Eroziја plaka
 - Kalcifikovani nodulus
- Lezije sa tromбом u organizaciji (nakon rupture, erozije ili kalcifikovanog nodulusa) – lezije nakon zarastanja sadrže glatke mišićne ćelije, proteoglikane, kolagenska vlakna tip III, sa ili bez tanke fibrozne kape, nekrotizovanog jezgra ili kalcifikacija.

1.2 ULOGA INFLAMACIJE U PATOGENEZI ATEROSKLEROZE

Klasičan pogled na patogenezu ateroskleroze bio je povezan sa akumulacijom holesterola usled apsorpcije lipoproteina (posebno lipoproteina niske gustine, LDL) u intimi arterija, što je usmereno imunološkim odgovorom. Ros [42] je 1999. godine ukazao da ateroskleroza treba smatrati hroničnom inflamatornom bolešću, budući da je upala prisutna od najranijih faza (infiltracija monocita iz cirkulacije u masne pruge). Otkriće molekula adhezije vaskularnih ćelija-1 (eng. *Vascular cell adhesion molecule, VCAM-1*), kao faktora čija prekomerna ekspresija na površini endotelnih ćelija dovodi do regrutovanja leukocita, potvrdilo je ulogu upale u procesu. U kasnijim istraživanjima, identifikovana je uloga proinflamatornih citokina kao što su interleukin-1 i faktor nekroze tumora (eng. *Tumor necrosis factor, TNF*), kao i različitih vrsta belih krvnih zrnaca.

Trenutna istraživanja o ulozi upale u aterosklerozi identifikovala su nekoliko grupa faktora koji mogu pokrenuti i dovesti do progresije lezija. Ovi faktori uključuju (ali nisu ograničeni na) endogene faktore (oštećenje makromolekula prilikom akumulacije holesterola, promene u osmotskom pritisku, hipoksija, poremećaj koncentracije kalcijuma i ATP-a), egzogene faktore, kao što su faktori životne sredine (buka, zagađenje vazduha, ishrana bogata mastima), stres, nesanica, dijabetes, pušenje, ali i neki hematološki poremećaji (policitemija, anemija, hronična hipoksija), kao i hronična infekcija i upala (endotoksinemija, parodontopatija). Svi ovi faktori deluju kroz dva osnovna obrasca, molekularne obrasce povezane sa patogenom, (eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP*), kao što je npr. hronična endotoksinemija, i molekularne obrasce povezane sa oštećenjem (eng. *Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP*), kao npr. oksidovani LDL, glikovani proteini i dr. U aterosklerozi, receptori prepoznavanja obrasca (eng.

pattern recognition receptors, PRRs), pre svega, TLR (eng. *toll-like receptor*) reaguju na PAMP/DAMP i doprinose endoteliozi i inflamatornoj transformaciji makrofaga [43].

Ćelijski proinflamatorni stres predstavlja kompleks unutarćelijskih procesa koji se pokreću kao odgovor na dejstvo faktora koji mogu uzrokovati oštećenje ćelije. Procesi koji se pokreću imaju prvenstveno ulogu u održavanju homeostaze ćelije, tkiva organa i organizma u celini i deo su normalnog starenja ćelije, međutim, u patološkim okolnostima mogu dovesti do inflamatorne reakcije, gde jedan od ishoda može biti i ateroskleroza.

Elementi ćelijskog stresa obuhvataju oksidativni stres, odgovor DNK na oštećenje, mitohondrijalni i stres endoplazmatskog retikuluma, autofagiju i apoptozu. Od posebnog su značaja inflamazomi, nekodirajuće RNK, tzv. receptori (eng. *scavenger*) čistači i klonalna hematopoeza neodređenog potencijala [44].

Oksidativni stres, stvaranje i akumulacija reaktivnih kiseoničkih molekula (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) i slobodnih radikala primarno u mitohondrijama bi trebalo da bude u balansu sa dejstvom antioksidanasa. U slučaju neadekvatnog antioksidativnog odgovora, može doći do oštećenja makromolekula i endotela krvnih sudova, aktivacije endotelinih ćelija, makrofaga i drugih ćelija ateroskleroze [45].

Odgovor DNK na oštećenje (eng. *DNA damage response*), pre svega odgovor na genotoksične agense, može dovesti do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, ćelijskog starenja, apoptoze ili maligne transformacije ćelije [46]. Mitohondrijalni stres podrazumeva reakciju povezanu sa sintezom proteina toplotnog šoka (eng. *Heat shock protein*, HSP) u cilju smanjenja oštećenja organela, ali, koji mogu uticati i na ćelije ateroskleroze [47]. Stres endoplazmatskog retikuluma (eng. *endoplasmatic reticulum stress*, ER stress) sprečava stvaranje i ekskreciju sekretornih proteina iz ćelije i povećanje transkripcije proteina pratilaca (eng. *chaperones*) neophodnih za savijanje proteina, što sve u određenim okolnostima može doprineti akumulaciji holesterola u penastim ćelijama [48].

Aktivacija proteina toplotnog šoka je jedan od načina održavanja homeostaze proteina na nivou ćelija i tkiva, ali sa druge strane, produkcija HSP doprinosi razvoju ateroskleroze [49]. Intenzitet autofagije raste prilikom gladovanja i izraženog katabolizma. Veći proteinski molekuli i organele (mitohondrije) se mogu reciklirati samo kroz proces autofagije i angažovanje lizozoma, čime se sprečava nekroza ili apoptoza. Sa druge strane porast autofagije se viđa pri starenju ćelija, kao i kod ćelija uključenih u proces ateroskleroze, što u slučaju disproporcionalnog odgovora doprinosi daljoj progresiji bolesti [50].

Inflamazomi predstavljaju proteinske komplekse citosola koji sadrže senzorne molekule sa mogućnošću prepoznavanja endogenog ili egzogenog (mikroorganizmi i drugi patogeni) molekularnog obrasca povezanog sa oštećenjem. Prilikom formiranja kompleksa, receptori se vezuju za prokaspazu-1, koja prelazi u aktivnu formu kaspazu-1, što indukuje obradu IL-1 beta i IL-18 i razvoj piropoptoze. Nastanak inflamazoma ukazuje na izražen ćelijski stres. U nastanku ateroskleroze dominira NLRP3 inflamazom, aktiviran od strane produkata ćelijskog raspada, ROS, holesterola, egzogenim stimulusima i oslobađanjem mitohondrijalne DNK u citoplazmu [51,52].

Postoji pet klasa receptora za prepoznavanje obrazaca na površini (eng. *Toll-like receptor*, TLR) ili u citoplazmi (eng. *NOD-like receptor*, NLR) makrofaga, neutrofila i drugih inflamatornih ćelija. Inflamazomi pokreću proizvodnju proinflamatornih citokina, proliferaciju makrofaga, Th1 i Th17 limfocita. Aktivirani NLRP3 inflamazomi su u korelaciji sa nivoom koronarne ateroskleroze, kao i sa prisustvom velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja (eng. *Major Adverse Cardiovascular Events* - MACE). Takođe, pokazano je da statini i kolhicin kao antiinflamatorni lekovi smanjuju ekspresiju NLRP3 kod osoba sa koronarnom aterosklerozom, što dovodi do boljih ishoda [53].

Nekodirajuće RNK, poput mikroRNK i dugačke nekodirajuće RNK (eng. *long noncoding RNA*, lncRNA) regulišu proteostazu i autofagiju, a mogu uticati na modulaciju genske ekspresije i pojavu ateroskleroze [54,55]. Kompleksi proteina i RNK mogu formirati tzv. stres granule u citoplazmi

ćelija izloženih ćelijskom stresu, koje u slučaju neadekvatne autofagije i hroničnog stresa, mogu uticati i na pojavu ateroskleroze. Porast markera stres granula je utvrđen u makrofagima i glatkim mišićnim ćelijama aterosklerotskih plakova na animalnom modelu [56].

„Scavenger“ receptori-SR (receptori „čistači“) su locirani na površini makrofaga i endotelnih ćelija i predstavljaju primarne senzore modifikovanih LDL, a sa druge strane, formiraju komplekse sa TLR i učestvuju kako u fiziološkom, tako i u patološkom procesu. SR-E1 (LOX-1) učestvuje u aktivaciji endotelnih ćelija, makrofaga i glatkomišićnih ćelija, dok SR-A1 učestvuje u preuzimanju modifikovanih LDL od strane makrofaga i mišićnih ćelija [57].

Klonalna hematopoeza neodređenog potencijala (eng. *Clonal hematopoiesis of indeterminant potential, CHIP*) označava somatske mutacije hematopoeznih ćelija kostne srži koje daju proliferativnu prednost i usmeravaju klonalnu proliferaciju ćelija mijeloidne loze u perifernoj krvi. CHIP su prisutne kod 10% osoba starijih od 70 godina i pokazano je da ubrzavaju ateroskrozu i trombozu [58].

Ćelijski stres pokreće veliki broj signalnih puteva sa aktivacijom različitih protein kinaza i drugih transkripcionih faktora (mTOR, NF- κ B, p53, AP-1, HIF, HSF, NRF2, ATF4), koji imaju specifične uloge poput reakcije na hipoksiju (eng. *hypoxia-inducible factor-1, HIF-1*), produkcije HSP (eng. *heat shock factor 1, HSF1*) i doprinose integraciji elemenata ćelijskog stresa, ali i nastanku ateroskleroze. Na mestima usporenog ili turbulentnog toka krvi, dolazi do aktivacije faktora transkripcije NRF2, HIF-1 α , NF- κ B, AP-1 u endotelnim ćelijama. Povećanje aktivnosti protein kinaza je nađeno u makrofagima u aterosklerotskim plakovima. NF-KB ima značajnu proinflamatornu aktivnost, dok transkripcioni faktori aktivirani lipidima (eng. *peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs*), su bitni za regulaciju homeostaze glukoze i lipida, kao i inflamacije; ovi molekuli takođe imaju značajnu antiaterosklerotsku ulogu [59-61].

Upotreba monoklonskih antitela pokazala je da i urođeni i adaptivni imuni odgovor imaju svoju ulogu u procesu ateroskleroze. Proinflamatorni monociti su prvi koji ulaze u proces, transformišući se u makrofage koji imaju mogućnost proliferacije i transformacije u penaste ćelije, nakon apsorpcije lipida. S druge strane, prepoznat je i značaj adaptivnih imunskih ćelija, kao što su T helper-1 i B1 limfociti. Antitela i T ćelijski receptori prepoznaju antigene, sa posledičnom aktivacijom T ćelija i interakcijom sa antigen prezentujućim ćelijama [31].

Početni korak u aterosklerozi može biti poremećaj protoka krvi (na primer, turbulencija na bifurkaciji arterija), što dovodi do disfunkcije na nivou endotelnih ćelija koje formiraju unutrašnji sloj intime. Ova disfunkcija može omogućiti veći unos lipoproteina niske gustine i triglicerida iz plazme u intimu. LDL se akumulira u subendotelnim regionima krvnih sudova, gde dolazi do njihove modifikacije (oksidacije). U drugom koraku, endotelne ćelije se aktiviraju kao odgovor na oksidativnu modifikaciju LDL-a, sa ekspresijom VCAM-1, intercelularnog adhezionog molekula 1 (ICAM-1), sekrecijom proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α), vezivanjem sa TLR i PRR, i drugih faktora koji podstiču adheziju monocita i drugih belih krvnih zrnaca. Lipidni hidroperoksidi, lizofosfolipidi, karbonilna jedinjenja pronađeni su u lipidnoj frakciji ateroma [62].

Glatke mišićne ćelije, nakon ekspozicije modifikovanom oxLDL oslobađaju hemoatraktante, (hemokin 2, hemokin 5) koji stimulišu reakciju monocita.

Preuzimanje oxLDL od strane ćelija aktivira NLRP3 inflamazom i dovodi do pojačane sekrecije IL-1 β i istovremeno funkcioniše kao antigen koji vezivanjem za specifična antitela formira imune komplekse i pokreće inflamatornu reakciju u makrofagima i dendritičnim ćelijama. Adheziju i ulazak monocita u intimalni sloj prati njihova diferencijacija u makrofage. Postoje dve glavne kategorije makrofaga, M1 sa proinflamatornim i M2 sa ateroprotektivnim efektima. Progresija aterosklerotskih lezija povezana je sa akumulacijom i proliferacijom M1 makrofaga. U fazi formiranja masnih pruga, T limfociti oslobađaju citokine i medijatore fibroze i proliferacije, čime se stimuliše migracija i proliferacija glatkih mišićnih ćelija. Holesterol aktivira NLRP3 inflamazom oštećenjem lizozoma. Aktivirane endotelne ćelije pojačano eksprimiraju VCAM-1,

ICAM-1 čime privlače leukocite u aterosklerotske lezije. Sve navedene ćelije eksprimiraju LOX-1 receptore čime se pojačava dejstvo oxLDL, produkcija ROS i nekroza glatkih mišićnih ćelija, sa daljim prodiranjem oxLDL u endotel. U aterosklerotskom procesu značajnu ulogu igra ekspresija mikro RNK i dugačke nekodirajuće RNK [63].

Iako postoje neki dokazi o direktnoj oksidaciji lipida u makrofagima i crevima, što doprinosi inflamatornom procesu kod ateroskleroze, sugerirše se da većina makrofaga u plaku apsorbiraju već oksidovani LDL putem fagocitoze. Takozvane penaste ćelije koje se vide u lezijama su uglavnom makrofagi prepunjeni holesterolom, koji prolaze kroz proces apoptoze ili nekroze, stvarajući jezgro plaka. Ćelije vaskularnih glatkih mišića migriraju iz medije u intimu, podležući promenama u svom fenotipu, tako da, pored kontraktilnih karakteristika, dobijaju proinflamatorne karakteristike slične makrofagima, fibromiocitne, osteogene ili adipocitne. Ove promene u ponašanju ćelija glatkih mišića stimulišu sintezu kolagenskih vlakana, ali, s druge strane, indukuju dalju proliferaciju makrofaga, proizvodnju penastih ćelija i ubrzavaju upalu. Osetljiv marker transformacije ćelija glatkih mišića je protein povezan sa citoskeletom, označen kao glatki mišić 22 alfa (SM22 α) [64,65].

Početak i progresija aterosklerotskih lezija je u korelaciji sa aktivnošću T i B limfocita. Na rast i nestabilnost plaka snažno utiču T pomoćni limfociti 1 koji luče interferon gama, dok T helper ćelije 2 proizvode interleukine 5 i 13, koji imaju antiinflamatorne efekte. Slično tome, neke subpopulacije B limfocita mogu stimulisati ateroskleroze, kao što su one koje proizvode antitela na LDL, oksidovani LDL, apolipoprotein B, citomegalovirus ili imunoglobuline Ig E [31].

Manifestacija upale ateroskleroze ogleda se u korelaciji nivoa inflamatornih markera u krvi, posebno C-reaktivnog proteina (eng. *C reactive protein*, CRP) sa pojavom i progresijom ateroskleroze [66]. Povišena brzina sedimentacije eritrocita (eng. *erythrocyte sedimentation rate*, ESR) može biti važan indikator bolesti koronarne arterije, verovatno povezan sa njenim inflamatornim stanjem [67]. Epidemiološke studije su pokazale da su nivoi fibrinogena snažan primarni i sekundarni faktor rizika za koronarnu arterijsku bolest, cerebralnu i perifernu arterijsku bolest i povezani su sa prevalencijom arterijske bolesti u ovim entitetima [68].

Biomarkeri inflamatorne komponente ateroskleroze, pored visokosenzitivnog CRP-a, uključuju mijeloperoksidazu (MPO), matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9), molekule intercelularne i vaskularne ćelijske adhezije, IL-6 i TNF- α čiji je nivo u korelaciji sa kardiovaskularnim rizikom i stvaranjem aterosklerotskog plaka.

Drugi biomarkeri prisustva i progresije ateroskleroze uključuju midkin (MK), faktor rasta koji vezuje heparin, mikroRNK (miRNA), pentaksin 3 (PTX3), ekstracelularne vezikule izvedene iz endotelnih ćelija, kao i prethodno pomenuti inflamazomi NLRP3 [69].

Crevna mikrobiota u ljudskom organizmu doprinosi regulaciji bioloških funkcija, od skladištenja energije, apsorpcije i obrade hranljivih sastojaka i sazrevanja imunog sistema. U slučaju poremećaja crevnog balansa, može doći do porasta intestinalne propustljivosti, translokacije lipopolisaharida sa indukcijom inflamatornog odgovora niskog stepena preko TLR receptora. Produkti metabolizma crevne mikrobiote, kao što je trimetilamin N oksid (TMAO) mogu povećati inflamatorni odgovor zida krvnog suda sa stimulacijom akumulacije holesterola u intimi. Poslednjih godina, metaboliti crevnog mikrobioma, kao što su metabolit karnitina TMAO, fenilacetil glutamin i lipidni metabolit žučne kiseline, predloženi su kao potencijalni biomarkeri ateroskleroze [70].

Indirektne infekcije regiona udaljenih od aterosklerotskih plakova takođe doprinose razvoju i destabilizaciji plakova. Veliki broj studija je pokazao povezanost između prisustva različitih virusa i bakterija sa pojavom i progresijom ateroskleroze [59].

1.3 INFEKCIJA I ATEROSKLEROZA

Redefinisanje ateroskleroze kao hroničnog inflamatornog oboljenja, kao i perzistiranje visoke prevalence ateroskleroze i pored kontrole tradicionalnih faktora rizika je povećalo interesovanje za potencijalne interakcije između infektivnih agenasa i kardiovaskularnog sistema.

Od inicijalnih studija 1980-ih godina, kada je na animalnom modelu pokazano da infekcija Citomegalovirusom dovodi do pogoršanja aterosklerotskih kardiovaskularnih oboljenja [71] pa sve do danas, identifikovan je veći broj mikroorganizama koji su značajan faktor rizika za nastanak i progresiju ateroskleroze.

U velikom broju studija na animalnim modelima i u ljudskoj populaciji je pokazana povezanost ASCVD sa bakterijama - uzročnicima periodontalne bolesti, *Helicobacter pylori* (HP), *Chlamidia pneumoniae* (Cpn), kao i sa virusima tipa Citomegalovirus (CMV), virusom humane imunodeficijencije (HIV), Herpes simplex virusom (HSV) i COVID-19 (SARS-CoV-2) [72-78]. Međutim, mehanizmi ovih asocijacija ostaju nejasni, a rezultati istraživanja su kontroverzni.

Predložena su dva osnovna mehanizma, direktni efekat tj. invazija ćelija koje učestvuju u aterosklerozi sa posledičnim ubrzanjem rasta ili destabilizacijom ateroma, ili indirektni efekat, pri čemu sistemska infekcija dovodi do porasta inflamatornog odgovora i sekrecije citokina koji dalje utiču na razvoj i progresiju ateroskleroze. Moguće je da se radi o efektu hronične infekcije niskopatogenim mikroorganizmima, ili opterećenost organizma sa više vrsta mikroorganizama odjednom (eng. *pathogen burden*) koji pojačavaju ćelijski proinflamatorni odgovor i ubrzavaju proces propadanja ćelija i tkiva koji učestvuju u aterosklerozi [79].

U svakom slučaju, infektivni agensi predstavljaju jedan od fokusa istraživanja ateroskleroze, pre svega zbog visokog morbiditeta i mortaliteta koji prate infekcije i ASCVD u zemljama sa niskom do umerenom stopom ekonomskog rasta, kao i zbog mogućnosti da relativno dostupnim lečenjem infekcija preveniramo teže posledice po kardiovaskularni sistem.

Periodontalna bolest predstavlja hroničnu infekciju struktura koji podržavaju zube najčešće uzrokovana gram negativnim anaerobnim bakterijama *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* [80].

Osnovni znaci oboljenja su gubitak zuba, upala desni sa krvarenjem, nagomilavanje kamenca, infekcija, gubitak fiksacije zuba i povlačenje desni sa gubitkom kosti. Step en apsorpcije alveolarne kosti je primarni pokazatelj težine bolesti. Periodontalni patogeni mogu dospeti direktno u cirkulaciju, uzrokujući bakterijemiju. Dokazano je prisustvo ovih bakterija direktno u aterosklerotskim plakovima, a sa druge strane, opisan je uticaj na metabolizam lipoproteina, porast LDL, oxLDL i triglicerida kod obolelih osoba. Kod periodontalne bolesti, uočava se porast parametara sistemske inflamacije (CRP, IL-1, IL-6, TNF- α , fibrinogen). U meta-analizi Humphrey et al iz 2008. [81] ustanovljeno je da postoji jasna povezanost između periodontalne bolesti i ASCVD, pri čemu je, nakon kontrole za pridružene faktore, rizik od lošijeg ishoda ASCVD bio povećan za 24-35% kod ispitanika sa ovim oboljenjem.

U meta analizi iz 2021. [82], koja je obuhvatila 30 kohortnih studija, oboleli od periodontalne bolesti imaju 20% veći rizik od obolevanja od aterosklerotskih bolesti, pri čemu veću šansu da obole imaju muškarci, sa težom kliničkom slikom bolesti. Sa druge strane, primena terapije periodontalne bolesti je dovela do poboljšanja endotelne funkcije kod pacijenata bez ASCVD i pacijenata nakon preležanog infarkta miokarda [83,84].

***Helicobacter pylori* (H. Pylori, HP)** je Gram–negativna acidofilna bakterija koja primarno naseljava želudac i duodenum. Jedan je od glavnih uzročnika akutnog gastritisa, a povezan je i sa pojavom hroničnog gastritisa, ulkusne bolesti, ali i adenokarcinoma želuca i MALT limfoma (eng. *gastric mucosa associated lymphoid tissue, MALT*). Smatra se da je u zemljama u razvoju skoro 70-

90% populacije inficirano sa HP. Infekcija se prenosi oralno-oralnim i feko-oralnim putem, direktno ili indirektnim kontaktom sa kontaminiranim predmetima. Faktori koji doprinose infekciji su navike u ishrani, pušenje, unos kontaminirane vode za piće, kao i stanje crevne mikrobiote domaćina [85,86].

Dijagnostika HP infekcije se postavlja neinvazivnim i invazivnim metodama. Neinvazivne metode podrazumevaju detekciju HP antigena u stolici, antitela u serumu i urinu, urea izdisajni test, dok invazivne metode uključuju uzimanje biopsije, praćene brzim ureaza testom, patohistološke analize i fluorescentnu in situ hibridizaciju (eng. *fluorescent in situ hybridization, FISH*) [87].

HP infekcija je povezana i sa ekstragastričnim oboljenjima, poput deficita vitamina B12, sideropenijske anemije, ali i neurodegenerativnim (Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest) i kardiovaskularnim bolestima [88].

Smatra se da je stepen virulencije HP kao i stanje organizma domaćina od jednakog značaja za nastanak patoloških promena uzrokovanih HP infekcijom. Prisustvo genetskih polimorfizama gena koji kodiraju citokine (IL-1, IL-8, IL-10) može uzrokovati teži stepen inflamacije i povećan rizik od maligne transformacije ćelija. Virulencija HP je u velikoj meri određena građom bakterije, fleksibilnošću citoskeleta i pokretima flagela. Infekcija HP podrazumeva više faza. Nakon ulaska u organizam, inicijalno dolazi do adhezije i kolonizacije mukoze želuca usled afiniteta površinskih HP lipopolisaharida za Lewis antigene na površini mukoze želuca, a zatim i dejstva adhezina (eng. *blood antigen A binding protein, BabA*; *sialic acid binding protein, SabA*). U sledećoj fazi aktivira se proteinski kompleks T4SS koji omogućava translokaciju citotoksina, pre svega CagA (eng. *cytotoxin-associated gene A*) putem egzozoma, i VacA (eng. *vacuolating cytotoxin A*) na epitelne ćelije želuca, što omogućava izbegavanje imunog odgovora domaćina i dalje oštećenje mukoze i prodor u dublje slojeve i cirkulaciju. Ekspresija CagA je prisutna samo kod nekih sojeva HP i povezana je sa značajnijim imunološkim odgovorom domaćina.

HP inflamatorni odgovor može biti praćen lokalnim i sistemskim oslobađanjem proinflamatornih citokina (IL-1, IL-18) ali u određenim slučajevima, modifikacijom parametara oksidativnog stresa (super oksid dizmutaza, SOD) može doći do hronične inflamacije niskog stepena. Pokazano je da HP može uticati na ćelije želudačnog epitela i menjati karakteristike mukozne barijere, ali i da može uticati na sastav i karakteristike crevne mikrobiote na mestima udaljenim od mesta infekcije.

Jedan od faktora udaljenih efekata HP je i translokacija regulatornih T ćelija i drugih imunološki aktivnih molekula koji mogu da utiču na imunološku toleranciju [74,89,90].

Veza između HP infekcije i kardiovaskularnih bolesti je uočena u velikom broju istraživanja [91]. U nedavno objavljenim meta analitičkim studijama, potvrđena HP infekcija je povezana sa dva puta većim rizikom od akutnog koronarnog sindroma, sa značajno većim rizikom u zemljama u razvoju [92]. U drugoj meta analizi je pokazano da HP infekcija povećava šansu za pojavu ASCVD za 50%, a u slučaju CVI i do 80% [93]. U obe studije se ističe značaj HP sojeva sa CagA antigenom, koji indukuju jači imunološki odgovor, što se manifestuje i većim koncentracijama biomarkera inflamacije u krvi domaćina (CRP, odnos trombociti-limfociti, neutrofili-limfociti).

Liu i saradnici u metaanalizi koja je obuhvatila preko 20 000 ispitanika su pokazali da HP infekcija (potvrđena serološki) povećava rizik od infarkta miokarda za čak 70-100% [94].

Većina studija o efektu HP se bazirala na serološkim testovima ili urea izdisajnom testu, a u manjem broju slučajeva se studija zasnivala na direktnom dokazivanju HP u aterosklerotski izmenjenim ili neizmenjenim segmentima arterija [95,96].

Prisustvo HP u aterosklerotskim plakovima je dokazano pomoću PCR kod 29,5%, a serološki znaci infekcije su potvrđeni kod više od 50% pacijenata koji su podvrgnuti hirurškoj revaskularizaciji miokarda (eng. *Coronary artery bypass graft, CABG*) [97].

HP infekcija je povezana sa početnom aterosklerozom karotidnih arterija, ali i sa subkliničkom aterosklerozom koronarnih arterija. U osnovi se nalazi stimulacija proinflamatornog odgovora (IL-

1, IL-6, CRP, TNF- α), ali i direktno oštećenje endotela (CagA), redukcija antioksidativnih kapaciteta NO (vacA) i promocija agregacije trombocita.. Sa druge strane, lipopolisaharidi iz HP mogu formirati komplekse sa LDL i oxLDL i dospeti direktno u aterosklerotske plakove. Moguće je da dolazi i do molekularne mimikrije na nivou ćelija, gde HSP protein iz *H. pylori* unakrsno reaguje sa HSP domaćina, uzrokujući endotelno oštećenje. HP infekcija pogoršava lipidni status, arterijsku hipertenziju, dijabetes i sekundarno utiče na progresiju ASCVD [98].

Chlamydia pneumoniae (Cpn) je intracelularna Gram-negativna bakterija iz familije Chlamydiaceae. Primarni je uzročnik u čak 10-20% slučajeva vanbolnički stečenih pneumonija. Pored toga, infekcije ovim mikroorganizmom su često asimptomatske ili minimalno simptomatske, posebno u mlađim uzrastima, ali Cpn može perzistirati dugo nakon primarne infekcije, uzrokujući prevalencu anti-Cpn antitela od 50% u mlađim, i čak 80% u starijim uzrastima.

Životni ciklus Cpn karakteriše postojanje više formi Cpn. Ekstracelularna forma koja ima mogućnost invazije ćelija se označava kao elementarno telo (eng. *elementary body*, EB), dok se intracelularna forma, koja se umnožava u citoplazmi inficirane ćelije, označava kao retikularno telo (eng. *reticular body*, RB). Definisana je i treća, posebna intracelularna forma, koja nema mogućnost replikacije ili invazije, tzv. perzistirajuće telo (eng. *persistent body*, PB). Ova forma se smatra bitnom za hronicitet Cpn infekcija, gde uzročnik ne samo da izbegava imuni sistem organizma, nego je i otporan na dejstvo antibiotika, interferona, i drugih infektivnih agenasa [99-102].

Osnovni način dijagnostike Cpn infekcije je serološkim putem, utvrđivanjem nivoa anti-Cpn antitela. Dok izraženo prisustvo IgM klase antitela ukazuje na akutnu infekciju, sekundarni porast IgG antitela može ukazivati na preležanu infekciju, ali i na perzistiranje Cpn u organizmu. Čest pratilac porasta IgG je i porast IgA klase antitela koji se smatra i karakterističnim za potvrdu perzistiranja Cpn u relativno inaktivnoj (latentnoj) formi ili hroniciteta infekcije [103].

Ovo se posebno javlja kod starijih muškaraca pušača [104], tako da ne iznenađuje činjenica da je visok nivo anti Cpn antitela povezan sa pojavom i progresijom koronarne bolesti već krajem 1980-ih godina [105]. Studije u kojima je testirana primena antibiotika u cilju eradikacije Cpn kod ovih pacijenata su inicijalno pokazale pad neželjenih KV događaja [106,107], ali sekundarne studije, poput ACADEMIC (*The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia*), WIZARD (*Weekly Intervention With Azithromax Against Atherosclerotic-Related Disorders*), CLARICOR (*CLARithromycin for patients with stable CORonary heart disease*) nisu potvrdile ove rezultate, tako da je preventivna dugotrajna primena antibiotika u cilju redukcije pojave i progresije aterosklerotskih bolesti napuštena i usled sve većeg broja rezistentnih formi mikroorganizama, čak i kontraindikovana [108-111].

Pored prisustva antitela, jedini siguran način potvrde Cpn infekcije je detekcija Cpn u zidu arterijskih krvnih sudova - antigena imunohistohemijskim metodama ili Cpn DNK primenom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (eng. *polymerase chain reaction*, PCR).

U studiji Kuo i saradnika [112], gde su analizirana srca pacijenata na obdukciji, potvrđeno je direktno prisustvo Cpn u EB (*elementary body*) formi ovim metodama. Muhlestein i saradnici su na uzorcima aterosklerotskih plakova dobijenih endarterektomijom dokazali prisustvo Cpn imunohistohemijskim metodama u 73% ispitanika [113].

Prisustvo Cpn infekcije je danas povezano ne samo sa ASCVD, već i sa drugim formama ateroskleroze, poput stenoze karotidnih arterija, periferne arterijske bolesti i aneurizme aorte [114].

Dokazan je prenos Cpn iz respiratornog sistema u zidove krvnih sudova, dokazana je i infekcija glatkih mišićnih ćelija zida krvnog suda, sa pojačanom ekspresijom TLR2 receptora, ali i migracija ovih inficiranih ćelija i razvoj aterosklerotskih lezija. Najverovatniji mehanizam ovog procesa je mitohondrijalna disfunkcija sa proizvodnjom mitohondrijalnih ROS i aktivacijom JunB-Fra-1/MMP2 signalnog puta [115].

In vivo i in vitro studije su pokazale da Cpn infekcija može da stimuliše aterogenezu kroz infekciju arterijskog zida, upalu, intracelularnu proizvodnju ROS, LDL oksidaciju. Na nivou endotela, stimuliše se ekspresija ICAM i VCAM, ali i faktora rasta fibroblasta. Može dovesti i do pojačane ekspresije SR-A1 receptora i porasta IL-1 β preko NLRP3 inflamazoma, ali i do porasta ekspresije LOX-1 mRNA u makrofagima i endotelijalnim ćelijama, sa pojačanim preuzimanjem oxLDL. Hlamidijalni HSP je takođe dokazan u aterosklerotskim segmentima arterija prilikom hirurške revaskularizacije miokarda. Cpn olakšava transendotelijalnu migraciju monocita. Cpn indukuje nastanak penastih ćelija od makrofaga nastalih od monocita, u prisustvu LDL holesterola.

Posebno se ističe interakcija između Cpn i trombocita, sa povećanjem agregacije trombocita preko sinteze hemokina sa jedne strane, i produkcijom ROS preko protein kinaze C [114].

Pored bakterija, sve više se ističe uloga različitih virusa, poput Cytomegalovirusa (CMV), Epstein Barr Virusa (EBV), Herpes simplex virusa (HSV), Hepatitis B i C virusa, virusa humane imunodeficijencije (HIV), kao i SARS-CoV-2 virusa u aterosklerozi [75-78].

Smatra se da je hronična virusna infekcija odgovorna za pokretanje procesa „inflammaging-a“, (kovanica engleskih reči *inflammation*, zapaljenje i *aging*, starenje), hronične inflamatorne reakcije niskog stepena koja dovodi do progresivne stimulacije imunog sistema i porastom morbiditeta i mortaliteta kod starijih osoba [116]. Pojam „inflammaging“ se oslanja na pojam imunosenescencije, tj. postepenog slabljenja imunog sistema u kasnijim fazama života, sa padom celularnog odgovora, promenom odnosa CD4 i CD8 limfocita, neadekvatnim odgovorom na prisustvo antigena i poremećajem kalcijumske signalne mreže [117,118].

Virusna infekcija može pokrenuti i ubrzati proces imunosenescencije direktnim oštećenjem genetskog materijala, ili indirektnim uticajem preko promene sekrecije citokina, sa izmenjenim imunim odgovorom i daljom proizvodnjom proinflamatornih medijatora [117,119].

Cytomegalovirus (CMV), DNK virus sa omotačem, koji pripada porodici herpes virusa (*Beta herpes viridae*), široko je rasprostranjen u populaciji [120,121]. Smatra se da je prisutan u 40% do 90% populacije, sa većom učestalošću u zemljama nižeg ekonomskog razvoja i starijoj populaciji.

Infekcija može nastati u svakom uzrastu i virus se lako prenosi putem kontakta sa biološkim tečnostima, seksualnim putem, transfuzijom i transplantacijom tkiva i organa. Nakon infekcije, perzistira u organizmu, sa povremenim reaktivacijama u slučaju pada imuniteta.

Kod imunokompetentnih osoba, infekcija ima blagi tok ili prolazi kompletno bez simptoma. Kod imunokompromitovanih, primarna infekcija i reaktivacija može dovesti do ozbiljnih poremećaja zdravlja u vidu pneumonija, hepatitisa, kolitisa i encefalopatija. CMV prolazi fetoplacentalnu barijeru (verovatnoća 30-40%) uzrokujući teška oštećenja ploda posebno ukoliko je infekcija nastupila u prvom trimestru (teratogeni agens).

Virusni omotač sadrži glikoproteine (gc I do gc III) koji su odgovorni za adheziju i ulazak virusa u ćelije domaćina i ciljni su antigeni za imuni odgovor domaćina. Virusni matriks, lociran između omotača i kapsida, sadrži protein pp 65, koji se smatra odgovornim za sposobnost virusa da izbegava tj. atenuira imuni odgovor domaćina, i jedan je od osnovnih markera CMV infekcije. Virusna DNK je dvolančana, i formira dva regiona, jedinstveni dugački (eng. *unique long*, *UL*) i kratki (eng. *unique short*, *US*). Replikativni ciklus CMV traje 48 do 72 h u zavisnosti od inficirane ćelije, sa ekspresijom ranih i kasnih gena, međutim, infekcija CMV može ući u latentnu fazu (bez replikacije), kojom CMV izbegava imuni odgovor domaćina. Iako se latencija može dešavati u velikom broju ćelija, dominira latentna infekcija u CD34+ mijeloidnim prekursorima, koji nose virusni genom u sebi, ali bez ekspimiranja antigenih determinanti na površini [122].

Primarna infekcija CMV pokreće nespecifični (NK ćelije, TLR) i specifični imuni odgovor (CD4+ i CD8+), dok u latentnoj fazi CMV izbegava imuni odgovor pre svega kroz poremećaj funkcije antigen prezentujuće ćelije i aktivacije inhibitornih molekula na nivou receptora NK ćelija i T limfocita. Kontinuirana CMV ekspozicija dovodi do erozije telomera i replikativnog starenja CD8+

limfocita, uz porast proinflammatoryh citokina (IFN- γ , TNF- α). Reaktivacija virusa podrazumeva inhibiciju supresivnog dejstva na MIE gene (eng. *major immediate early genes*) i proteine. Sekretija ili porast proinflammatoryh medijatora u ćeliji je jedan od glavnih pokretača reaktivacije [122,123].

CMV infekcija se dokazuje iz uzoraka bioloških tečnosti (krv, saliva, likvor, amnionska tečnost) sa karakterističnim „oko sove“ inkluzionim telašcima u jedru ćelija u ćelijskoj kulturi. U sledećem koraku često se radi bojenje imunoperoksidadom upotrebom antitela na Immediate Early (IE) antigene ili detekcija CMV genoma putem kvantitativne PCR reakcije [124].

U kohortnim studijama je uočen porast mortaliteta i faktora inflamacije kod CMV pozitivnih starijih osoba primarno u vezi sa kardiovaskularnim oboljenjima. CMV infekcija je povezana i sa povećanim rizikom od pojave udruženih bolesti, poput dijabetesa, ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti [125,126].

Veza između CMV infekcije i ateroskleroze je uočena još 1980-ih godina, kada su detektovana IgG antitela u krvi, ali i virusni antigeni direktno u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova pacijenata pri vaskularnim hirurškim intervencijama [127].

CMV infekcija narušava funkciju endotela kroz direktnu infekciju endotelnih i glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, praćenu disregulacijom proizvodnje azot-oksida i lokalnim inflamatornim odgovorom [128]. Pored toga, CMV stimuliše sekretiju hemokina i citokina, povećava agregabilnost trombocita i angiogenezu. Mogući mehanizmi obuhvataju i efekat HSP, molekularnu mimikriju i dejstvo mikro RNK-a. Posebno se ističe efekat CMV na pojavu ateroskleroze kod imunokompromitovanih pacijenata (HIV infekcija, transplantacija), ali i u trudnoći (preeklampsija) [129].

Meta-analiza koja je uključivala 34.564 učesnika (uključujući 4789 pacijenata sa ASCVD) pokazala je povećanje relativnog rizika od ASCVD od 22% usled CMV infekcije [130]. U grupi od 12.903 slučaja i 16.097 kontrola, pacijenti sa pozitivnim CMV IgG imali su 1,7 puta veći rizik od ASCVD, dok su oni sa pozitivnim CMV IgM imali skoro 3 puta veći rizik od CAD [131]. CMV infekcija je povezana sa sistemskom inflamatornom reakcijom, što dovodi do povišenih inflamatornih biomarkera (CRP, IL-1, IL-6, TNF, IFN) koji mogu doprineti progresiji CAD [132]. Visok titar CMV IgG antitela kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 je korelirao sa markerima ateroskleroze [133].

Istraživači su otkrili CMV DNK u aterosklerotskim plakovima i pronašli korelaciju između prisustva CMV i restenoze kod pacijenata koji su prošli koronarnu aterektomiju ili angioplastiku [130,134,135]. Nađeno je i povećano opterećenje CMV virusom kod pacijenata sa infarktom miokarda sa ST elevacijom u odnosu na zdrave ispitanike [136]. U drugoj studiji, veći broj DNK kopija je nađen kod pacijenata sa AKS, što ukazuje na mogućnost reaktivacije CMV kao faktora progresije ateroskleroze [132]. Porast učestalosti CMV DNK u aterosklerotskim plakovima je korelirao i sa većom aktivnošću T ćelija kod pacijenata sa oštećenjem perifernih arterija [137]. CMV DNK je nađena u aterosklerotskim plakovima u aorti kandidata za hiruršku revaskularizaciju miokarda [138]. U sličnoj populaciji imunohistohemijske analize su pokazale prisustvo CMV pp65 antigena u plakovima [139].

Epstein Barr virus (EBV) pripada porodici Herpes virusa i uzročnik je akutnog infektivnog oboljenja - infektivne mononukleoze, ali, slično CMV, može ući u latentnu fazu, koja u kasnijim stadijumima može dovesti do maligne transformacije ćelija, sa posledičnim razvojem maligniteta (Burkitt limfom, Hodgkin limfom, itd.). EBV infekcija je povezana sa hiperproliferacijom B ćelija koja može uzrokovati oštećenje DNK, prekid ćelijskog ciklusa i prevremeno ćelijsko starenje. Nađen je veći titar antitela kod pacijenata sa aterosklerozom, a reaktivacija latentne infekcije je povezana sa porastom sekretije proinflammatoryh citokina i progresijom ateroskleroze [140].

Hepatitis C virus spada u grupu RNK virusa i uzročnik je zapaljenja i drugih oštećenja jetre. Hronična HCV infekcija je povezana sa porastom sinteze ROS, sekrecijom proinflammatoryh citokina, oštećenjem DNK i prekidanjem ćelijskog ciklusa što stimuliše aterosklerozu direktno i indirektno (preko stimulacije faktora rizika poput metaboličkog sindroma). Velike meta analitičke studije su pokazale povećan rizik od ASCVD i koronarne arterijske bolesti kod HCV inficiranih ispitanika [141,142].

HCV je detektovan u karotidnim plakovima i primena ciljane, direktno delujuće antiviralne terapije je pokazala poboljšanja tipa redukcije zadebljanja intime karotidnih arterija, kao i rizika od KV bolesti kod HCV pozitivnih pacijenata [143-145].

Virus humane imunodeficijencije (HIV) pripada grupi RNK virusa, familija Retroviridae i primarno napada CD4+ T limfocite dovodeći do imunodeficijencije, povećane sklonosti oportunističkim infekcijama, sindroma stečene imunodeficijencije (eng. *acquired immune deficiency syndrome, AIDS*) i malignih oboljenja (Kapoši sarkom, B ćelijski limfom). Kod HIV inficiranih osoba dolazi do pada u broju i funkciji T limfocita, sa padom ekspresije CD28 i povećanom ekspresijom p16, kao i redukcijom dužine telomera u odnosu na zdrave kontrole. Povećan je permeabilitet crevne mukoze, sa olakšanim prelazom lipopolisaharida crevne mikrobiote u cirkulaciju i porastom medijatora zapaljenja i ateroskleroze.

Stopa ASCVD je dvostruko veća kod HIV pozitivnih osoba u odnosu na opštu populaciju.

Sa druge strane, kod HIV pozitivnih osoba je češća i koinfekcija sa CMV, HCV i drugim infektivnim uzročnicima ateroskleroze [76].

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 virus spada u kategoriju RNK virusa, familija Coronaviridae i uzročnik je dominantno infekcija respiratornog trakta, različitog stepena zahvaćenosti, simptoma i težine kliničke slike (eng. *coronavirus disease 2019, COVID-19*). U sklopu oboljenja, veoma su česta oštećenja kardiovaskularnog sistema, čak i kod asimptomatskih pacijenata (miokarditis, poremećaji ritma, infarkt miokarda, srčana insuficijencija). Kod SARS-CoV-2 infekcije, jedan od dominantnih receptora je ACE2 receptor, koji se eksprimira i na kardiomiocitima. Povećani su nivoi troponina i NT pro BNP, produkcija proinflammatoryh citokina (citokinska oluja) i fibrinogena, i poremećen je metabolizam lipida, što sve pogoduje nastanku i progresiji ateroskleroze [146-148].

1.4 INFEKCIJA I KORONARNA BOLEST

Hronični koronarni sindromi (eng. *chronic coronary syndromes, CCS*) predstavljaju spektar kliničkih sindroma koji nastaju usled strukturnih i/ili funkcionalnih poremećaja usled hroničnih oboljenja koronarnih krvnih sudova i/ili mikrocirkulacije. Ovi poremećaji mogu dovesti do reverzibilnog disbalansa između potreba miokarda za kiseonikom i dostupnosti kiseonika putem krvi, sa posledničnom hipoperfuzijom miokarda. Hronični koronarni sindromi mogu dugo vremena biti asimptomatski, simptomatski sa relativno stabilnim simptomima i sporom progresijom, ali u bilo kom trenutku mogu progredirati u akutni koronarni sindrom (AKS) [149].

Patofiziologija CCS obuhvata strukturne i funkcionalne poremećaje u makro i mikrovaskularnoj miokardnoj koronarnoj mreži. Na makrovaskularnom nivou, ishemija se može razviti, pored fiksne lokalne stenozе, i u slučaju dugačke aterosklerotske lezije koja ne sužava lumen koronarnog krvnog suda drastično, ili može doći do epikardnog spazma na aterosklerotski neizmenenom ili minimalno izmenjenom segmentu koronarnog krvnog suda. U manjem broju slučajeva, prepoznate su kongenitalne abnormalnosti, poput miokardnog mosta (eng. *bridging*). Na mikrovaskularnom nivou, moguće je da koronarna mikrovaskularna disfunkcija (eng. *coronary microvascular dysfunction, CMD*) dovede do angine ili ishemije u odsustvu značajne opstrukcije srednjih i velikih koronarnih krvnih sudova (eng. *angina with non-obstructive coronary arteries, ANOCA*); *ischaemia with non-obstructive coronary arteries, INOCA*) [150,151].

Svetska zdravstvena organizacija prema kliničkoj prezentaciji kategoriše koronarnu bolest srca (KBS) u 5 tipova [152]: tiha miokardna ishemija (okultna KBS), angina pectoris, infarkt miokarda, ishemijska srčana insuficijencija (ishemijska bolest srca) i iznenadna smrt. Klinički se deli na stabilnu KBS i akutni koronarni sindrom (AKS), uz moguća preklapanja simptoma i znakova.

Kod približno polovine pacijenata sa INOCA je funkcionalnim testiranjem utvrđeno prisustvo koronarnog arterijskog spazma, što je povezano sa težom kliničkom slikom, lošijom prognozom, ali i izraženijom aterosklerozom epikardnih koronarnih krvnih sudova. Koronarni spazam se javlja i na mestima okultne, angiografski beznačajne ili minimalno vidljive ateroskleroze (intimalno zadebljanje), posebno ukoliko se spazam javlja u malim segmentima krvnih sudova (fokalni spazam). Istraživanja sprovedena kod pacijenata sa koronarnim spazmom pomoću intravaskularnog ultrazvuka (IVUS) su utvrdila da je opterećenje plakom najveće u predelu fokalnog spazma, i da su češći plakovi bogati lipidima, ili sa crvenim trombom (tzv. vulnerabilni plakovi). Sve je više dokaza da se epikardni spazam može javiti na angiografski praktično normalnim segmentima koronarnih krvnih sudova što može biti od značaja pri izboru krvnih sudova za hirurške revaskularizacione procedure [153].

Iako je poznato da klasični faktori rizika, nepromenljivi (kao što su starost, pol, etnička pripadnost i porodična istorija) ili modifikovani, poput visokih lipida u krvi, visokog krvnog pritiska, pušenja, gojaznosti, dijabetesa, loše ishrane i sedentarnog načina života, doprinose KBS, njena potpuna etiologija ostaje nejasna. Poslednjih godina, tradicionalni modifikovani faktori rizika su efikasno smanjeni, ali incidenca AS ostaje visoka [154]. Pored toga, više od 30% pacijenata sa aterosklerozom nema ove klasične faktore rizika, što ukazuje na učešće nepoznatih tj. neprepoznatih faktora u njenoj patogenezi.

S obzirom da se u osnovi većine sindroma koji pripadaju CCS nalazi ateroskleroza, sa jasnom vezom između inflamacije i ateroskleroze sa jedne, i infekcije sa druge strane, ne iznenađuje činjenica da je dosta istraživanja usmereno ka potencijalnoj infektivnoj etiologiji hroničnih koronarnih sindroma.

Pored prethodno opisane veze između infektivnih agenasa i nastanka, a potom i progresije ateroskleroze, u većem broju istraživanja je dokazano i direktno prisustvo mikroorganizama u koronarnim krvnim sudovima. U velikoj meta analizi publikovanoj 2022. [155], analizirano je 44 istraživanja koja su dokazala prisustvo genetskog materijala/antigena jedne ili čak više vrsta

bakterija i virusa u aterosklerotskim plakovima koronarnih arterija pomoću PCR, iHH ili FISH metoda.

Prisustvo *C. pneumoniae* je nađeno prosečno u skoro 43% slučajeva, CMV u 29%, a *H. pylori* u 19% uzoraka aterosklerotskih plakova koronarnih arterija, što jasno doprinosi hipotezi da mikroorganizmi direktno i indirektno doprinose nastanku i progresiji ateroskleroze koronarnih arterija.

Međutim, u izvesnom broju istraživanja uočeno je prisustvo infektivnih agenasa, tj. njihovog genoma ili antigena i u segmentima arterija koje makroskopski nisu pokazivale znakove ateroskleroze. U istraživanju Wonga i saradnika iz 1999. godine [156] analizirano je PCR prisustvo DNK *C. pneumoniae* u krvnim sudovima pacijenata kod kojih je došlo do reakcije odbacivanja grafta koronarne arterije. Poređeni su tzv. „normalni“ segmenti unutrašnje grudne arterije (lat. *arteria mammaria interna*, IMA), vene safene magne (lat. *vena saphena magna*, VSM) koji su predviđeni za novi graft, odbačeni venski graftovi iz prvog pokušaja i aterosklerotski izmenjeni krvni sudovi novih pacijenata. Utvrđena je visoka učestalost (38%) DNK Cpn u odbačenim venskim graftovima, što je bilo približno učestalosti u aterosklerotski izmenjenim koronarnim arterijama (38%). Nasuprot tome, u normalnim venskim graftovima je učestalost bila oko 11%, ali u segmentima unutrašnje grudne arterije, koja se tretira kao krvni sud prvog izbora za graft [157], učestalost Cpn u naizgled normalnim segmentima je bila oko 30%. Ibrahim i saradnici (140) su analizirali prisustvo genoma HSV, CMV i EBV u aterosklerotskim delovima koronarnih arterija i neaterosklerotskim venama i arterijama korišćenim za graft i našli su HSV DNK u 35% plakova, ali i u 9% venskih i čak 22% uzoraka unutrašnje grudne arterije. CMV i EBV su nađeni samo u plakovima. U studiji Izadija i saradnika (135) je potvrđeno prisustvo CMV DNK samo u aterosklerotskim uzorcima (27%), dok su Pucar i saradnici našli DNK CMV i *C. pneumoniae* u značajnom procentu u uzorcima unutrašnje grudne arterije [158].

Prisustvo mikroorganizama, genoma ili antigena u naizgled makroskopski normalnim, aterosklerotski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija i drugih krvnih sudova koji se često koriste u hirurškoj revaskularizaciji miokarda može biti od velikog značaja, i ukazivati na rizike od progresije inflamacije i ateroskleroze u već izmenjenim i/ili revaskularizovanim segmentima, sa posledičnim kraćim trajanjem graftova, pogoršanjem koronarne bolesti i pratećih poremećaja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi prisustvo molekula DNK infektivnih mikroorganizama *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i Cytomegalovirus-a u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.
2. Ispitati povezanost prisustva i kvantitativnog sadržaja DNK *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, i Cytomegalovirus-a u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte sa inflamatornom komponentom ateroskleroze i težinom ateroskleroze kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.
3. Ispitati povezanost prisustva patogenih mikroorganizama (*Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* i Cytomegalovirus-a) u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte sa postoperativnim tokom (pojava komplikacija-atrijalna fibrilacija, pleuralni izlivi, pneumonija, pneumotoraks, itd.) i ishodom (preživljavanje ili smrtni ishod) kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitivana populacija

Učesnici iz grupe pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću odabrani su na osnovu kriterijuma uključivanja u studiju, među pacijentima hospitalizovanim na Klinici za kardiovaskularnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije

Kriterijumi za uključivanje pacijenata su: postavljena dijagnoza višesudovne koronarne arterijske bolesti (potvrđena koronarografijom), pacijenti kojima je indikovana implantacija LIMA grafta zbog značajnog suženja leve prednje silazne arterije (eng. *left anterior descending artery, LAD*), indikovana hirurška revaskularizacija miokarda odlukom kardiohirurškog konzilijuma, starost ≥ 40 godina u vreme potpisivanja informisanog pristanka, odsustvo akutne infekcije ili upale. Svaki učesnik je dobio obrazac informisanog pristanka pre nego što se uključi u studiju, koji će predstaviti lekar-istraživač. U istraživanje su uključeni svi učesnici koji su potpisali obrazac informisanog pristanka, nakon što su potvrdili razumevanje njegovog sadržaja.

Glavni kriterijum isključivanja bila je koronarna angiografija koja je pokazala stenozu manju od 50%, odsustvo indikacija ili prisustvo kontraindikacija za hirušku revaskularizaciju miokarda.

Apsolutne kontraindikacije za hiruršku revaskularizaciju miokarda su bile: terminalna bolest sa očekivanim kratkim životnim vekom (npr. metastatski karcinom); teška, disfunkcija leve komore (ejekciona frakcija ispod 20% uz nekontraktilan miokard); komorbiditeti (npr. terminalni stadijum plućne bolesti, teška insuficijencija jetre); teška difuzna bolest koronarnih arterija koja tehnički onemogućava izvođenje graftova. Relativne kontraindikacije su bile: starije životno doba sa više komorbiditeta (npr. loša bubrežna funkcija - terminalni stadijum, cerebrovaskularna bolest); teška plućna hipertenzija; akutna infekcija; nekontrolisana hipertenzija ili loše regulisana šećerna bolest; nekomplijantnost pacijenta (otežava postoperativni tok).

3.2 Tip studije, mesto i period istraživanja

Prema epidemiološkom tipu, istraživanje predstavlja studiju preseka.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, na osnovu odobrenja od strane Klinike za kardiohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (datum odobrenja 28.12.2021.), Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj protokola 1322/XII-8, datum odobrenja 30. decembar 2021. godine), Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (broj protokola: 307/12, datum odobrenja: 29.11.2024.), Instituta za patologiju "Prof. dr Đorđe Joannović", Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj protokola: 02-542/25, datum odobrenja 21.05.2025.), kao i Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj protokola: 1032/2, datum odobrenja 22.05.2025.).

Veličina uzorka bazirana je na potrebi procene povezanosti sadržaja genetskog materijala *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i Cytomegalovirus sa inflamatornom komponentom ateroskleroze i težinom ateroskleroze. Za *cut-off* vrednost koeficijenta korelacije uzeto je 0,4 (osrednja povezanost). Dovoljan broj ispitanika za procenu povezanosti varijabli od interesa za statističku snagu od 0,8% i nivo statističke značajnosti od 0,05 iznosi 46. Izračunati minimalni broj ispitanika (46) je povećan za 15% zbog očekivanog gubitka podataka tokom trajanja studije (nedostajući ili neprimenljivi podaci) pa je konačan minimalan broj planiranih ispitanika 53.

3.3 Instrumenti merenja

Demografske podatke i biohemijske podatke lekar-istraživač je pribavio iz medicinske dokumentacije (istorije bolesti) pacijenata Klinike za kardiohirurgiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, pridržavajući se standardnih mera zaštite podataka učesnika.

Svi analizirani uzorci krvi su uzeti tokom inicijalne konsultacije kardiologa i/ili kardiohirurga prilikom definisanja hirurške procedure koja odgovara lečenju pacijenta. Praćeni su sledeći laboratorijski parametri: C-reaktivni protein (CRP), sedimentacija eritrocita, fibrinogen, lipidni status (holesterol, LDL, trigliceridi), urea, kreatinin, jačina glomerulske filtracije (eGFR), mokraćna kiselina, krvna slika (leukociti, eritrociti, trombociti, hemoglobin, hematokrit).

Indeks telesne mase („Body mass index“, BMI) je izračunat kao odnos telesne mase i kvadrata telesne visine po sledećoj formuli: $BMI = TT / TV^2$, i izražava u kg/m^2 .

Po preporukama Svetske zdravstvene organizacije [159], BMI se koristi za klasifikaciju stepena uhranjenosti po sledećim kriterijumima:

- BMI < 18,5 – pothranjeni
- BMI = 20-24,9 – normalno uhranjeni
- BMI = 25-29,9 – gojazni
- BMI > 30 – ekstremno gojazni
- BMI > 40 – morbidno gojazni

Za analizu su tokom hirurške revaskularizacije miokarda uzeti mali uzorci distalnih delova dijagonalnih grana (grane leve prednje silazne koronarne arterije, eng. *left anterior descendens*, LAD), delova unutrašnje grudne arterije (lat. *a. mammaria interna*) koji se koriste za presađivanje (graft) i delova aorte bez makroskopski procenjene aterosklerotske degeneracije.

Uzet je uzorak cele debljine zida arterijskog krvnog suda. Prilikom formiranja proksimalne anastomoze venskog grafta, uzet je deo ushodne aorte sa samog mesta proksimalne anastomoze, bez ugrožavanja arhitektonike anastomoze i protoka kroz graft. Ciljno mesto za uzimanje uzorka (cele debljine zida) koronarne arterije je bila neka od terminalnih grana dijagonalne grane koje su izuzetno malog dijametra, te njihovim uzorkovanjem ne može doći do perfuzionog defekta.

Odmah nakon biopsije uzorci su stavljeni u bočice sa formalinom i transportovani u roku od 6–48h na Institut za patologiju “Prof. dr Đorđe Joannović”, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zatim su u sterilnim epruvetama prebačeni u OJ Implantološko istraživački centar-Laboratorija za genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4 Histopatološka analiza

Rutinska histopatološka praksa se u velikoj meri oslanja na morfološke procene tkiva obojenog hematoksilinom i eozinom (H&E) [160]. Ovaj pristup nastavlja da ispunjava kliničke zahteve i ostaje 'zlatni standard' za dijagnozu na osnovu tkiva u većini slučajeva.

U cilju histopatološke analize, detekcije ateroskleroze i prisustva inflamatornog infiltrata, dobijeni uzorci su kalupljeni u parafin i sečeni na preseke debljine 4 μm koji su bojeni hematoksilin-eozin (HE) metodom. Histološka evaluacija aterosklerotskih promena je uključivala procenu stepena razvoja aterosklerotskih lezija. Korišćena je klasifikacija histoloških promena u aterosklerozi prema Herbert C. Sary i saradnicima, koju je usvojila American Heart Association [40].. Ova klasifikacija deli aterosklerotske lezije na šest osnovnih tipova prema morfološkim karakteristikama i stepenu progresije bolesti.

Tip I lezije predstavljaju najraniji stadijum ateroskleroze i karakterišu se pojavom izolovanih penastih ćelija u intimi arterije. U ovom stadijumu ne postoje značajnije ekstracelularne lipidne nakupine niti izražene strukturne promene zida krvnog suda.

Tip II lezije, se označavaju najčešće kao masne trake, karakteriše veća akumulacija penastih ćelija i intracelularnih lipidnih depozita.

Tip III lezije predstavljaju intermedijarni stadijum između masnih pruga i razvijenog ateroma. Histološki se uočavaju manje ekstracelularne lipidne nakupine između glatkih mišićnih ćelija intime.

Tip IV lezije označavaju formiranje ateroma, odnosno razvijenog aterosklerotskog plaka sa jasno definisanim ekstracelularnim lipidnim jezgrom. Lipidno jezgro sastoji se od holesterola, estara holesterola, ćelijskog detritusa i nekrotičnog materijala.

Tip V lezije, odnosno fibroateromi, karakterišu se formiranjem fibrozne kape koja prekriva lipidno jezgro. Fibrozna kapa sastavljena je pretežno od kolagena i proliferisanih glatkih mišićnih ćelija. U ovom stadijumu često su prisutne kalcifikacije i izražena fibroza.

Tip VI lezije predstavljaju komplikovane aterosklerotske promene i karakterišu se rupturom ili erozijom fibrozne kape, hemoragijom i trombozom.

Takođe, u uzorcima je analiziran i stepen inflamacije koji smo ocenjivali od negativne, slabo izražene 1+, srednje izražene 2+ i izražene inflamacije 3+.

3.5 Imunohistohemijska analiza

U cilju utvrđivanja prisustva ekspresije infektivnih agenasa (Cytomegalovirus-a i *Helicobacter pylori*) urađena su imunohistohemijska (IHH) bojenja na isečcima sa parafinskih kalupa tkiva krvnih sudova pacijenata. Sa svakog odabranog parafinskog kalupa sečeni su preseći debljine 4 µm, a zatim su nakon deparafinizacije i antigenskog demaskiranja, a u cilju identifikacije infektivnog agensa korišćena sledeća antitela: anti-Cytomegalovirus (klon CCH2 pDDG9, *Agilent Technologies, Santa Clara, California*, razblaženje 1:100) i anti-*Helicobacter pylori* (klon SP48, *Ventana, Tucson, AZ, USA, ready to use*). Imunohistohemijska bojenja na anti-*Helicobacter pylori* su učinjena manuelno sa detekcionim sistemom *En Vision FLEX*, Dako K800. Nuklearna i citoplazmatska pozitivnost je uzeta u obzir. Imunohistohemijski obojeni preseći su analizirani korišćenjem svetlosnog mikroskopa Olympus BX41. Citoplazmatska i nuklearna pozitivnost su određena semikvantitativno, nakon čega su uzorci bili razvrstani u dve grupe: pozitivni i negativni. IHH bojenje na anti-*Helicobacter pylori* je ocenjivano kao pozitivno ukoliko je bilo prisutno granularno, braon bojenje ćelijske membrane.

Imunohistohemijska bojenja na anti-Cytomegalovirus su urađena u autostejneru 480S Epredia. IHH bojenje na anti-Cytomegalovirus je ocenjivano kao pozitivno ukoliko je postojala intracitoplazmatska ili intrajedarna inkluzija braon boje u inficiranim endotelnim ćelijama i ćelijama glatkih mišića unutar krvnih sudova.

3.6 DNK izolacija

Parafinski uzorci krvnih sudova su isečeni na mikrotomu, a zatim deparafinizovani ksilenom. Izolacija DNK iz uzoraka je obavljena fenol-hloroform metodom. Na uzorak je dodat digestivni pufer (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH=8.0, 25mM EDTA pH=8.0), 10% SDS (Na-dodecilsulfat) do finalne koncentracije 0,5 % i proteinaza K (1 mg/ml) do konačne koncentracije od 0,1mg/ml. Cilj ovog postupka je oslobađanje DNK iz nukleoproteinskog kompleksa, denaturacija proteina, kao i inaktivacija DNA-aza.

Ovako pripremljen uzorak je inkubiran 1h na 50°C. Nakon digestije, DNK je ekstrahovana dodavanjem iste zapremine ranije pripremljene mešavine fenola/hloroforma/izoamilalkohola (25:24:1) i uzorak zatim centrifugiran 10 minuta na 10000 rpm. Ekstrahovanje DNK sa mešavinom fenol/hloroform/izomilalkohol ponavljano je nekoliko puta do iščezavanja belog proteinskog precipitata u interfazi. Eliminacija RNK ostvaruje se dodavanjem enzima ribonukleaze (1µg/µl) do finalne koncentracije od 0,1 µg/µl i inkubiranjem na 37°C u trajanju od 30 minuta. Uklanjanje suvišnog fenola postignuto je dodavanjem iste zapremine mešavine hloroforma i izoamilalkohola (24:1) i centrifugiranjem na 14000 rpm u trajanju od 2 minuta. Iz dobijenog vodenog rastvora DNK je precipitirana dodavanjem 1/10V 7.5M amonijum acetata i 2.5-3.0 zapremine hladnog 96% etanola. Nakon ponovnog centrifugiranja, pažljivo je odliven supernatant vodeći računa o DNK talogu; dodato je 1 ml hladnog 70% etanola i tubica dobro promućkana pa je uzorak opet centrifugiran 2 minuta na 14000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta, DNK talog ostavljen je u termostatu 10 minuta kako bi ispario etanol, a potom je DNK resuspendovana u 50 µl destilovane vode. Do analize, uzorci ovako izolovane DNK, čuvani su na -20°C. DNK koncentracija i čistoća merena je na spektrofotometru BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). 1µl izolovane DNK je korišćen za analizu koja se zasniva na absorbanci uzorka nakon izlaganja monohromatskoj svetlosti tri talasne dužine (230, 260 i 280nm). Odgovarajućom softverskom analizom dobijene su koncentracija i čistoća uzoraka.

3.7 Kvantitativna lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time PCR*, qPCR)

Određivanje prisustva tri mikroorganizma (*Helicobacter pylori*, Cytomegalovirus i *Chlamydia pneumoniae*) i njihova kvantifikacija izvedeni su u 15 µL qPCR rastvora koji sadrži 20 ng DNK, 0,5 µM prajmera, 0,25 µM TaqMan probe, 1× FastGene® Probe CR (NIPPON Genetics EUROPE, Nemačka) i sterilisanu vodu bez nukleaze. Temperaturni profili qPCR reakcije su bili sledeći: 10 min na 95 °C, praćeno 45 ciklusa od 15 s na 95 °C i 30 s na 58 °C.

Za svaki mikroorganizam su korišćeni specifični parovi prajmera, a kao kontrolni gen u kvantifikaciji poslužio je gen gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH).

FastGene ICGreen 2× PCR univerzalni miks (NIPPON Genetics EUROPE, Nemačka) je korišćen za amplifikaciju segmenata HP, Cpn i CMV uz upotrebu odgovarajućih prajmera. qPCR protokol je podrazumevao fazu denaturacije DNK na 95 °C tokom 3 minuta, nakon čega je usledilo 45 ciklusa sledećeg profila: denaturacija na 95 °C tokom 30 s, hibridizacija) vezivanje prajmera) na 60 °C tokom 30 s i elongacija na 72 °C tokom 30 s, uz finalnu elongaciju u trajanju od 10 min. Svako qPCR testiranje je sprovedeno korišćenjem CFKS96 sistema u realnom vremenu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) i praćeno analizom krive topljenja da bi se potvrdila specifičnost amplifikacije. qPCR mešavina od 10 µL sadržala je 20 ng DNK šablona, 0,25 µM *forward* i *reverse* prajmera, FastGene ICGreen 2× PCR univerzalnu mešavinu (NIPPON Genetics EUROPE, Nemačka) i sterilisanu vodu bez nukleaze. Sve analize su rađene u duplikatu. Sekvence pomenutih prajmera su navedene u tabeli 1.

Tabela 1. Sekvence prajmera korišćenih u PCR.

Mikroorganizam/Gen	Prajmeri (5'-3')/sonda
<i>Chlamidia pneumoniae</i>	<i>Forward</i> — GTTGTTCATGAAGGCCTACT <i>Reverse</i> —TGCATAACCTACGGTGTGTT
<i>Helicobacter pilori</i>	<i>Forward</i> —CGCTGAAATCTCTCTTTATG) <i>Reverse</i> —CATGCTTTGATTGCCGATAGC
Citomegalovirus	<i>Forward</i> —GAAGGTGCAGGTGCCCTG <i>Reverse</i> —GTCTCGACGAACGACGTACG
Glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza	<i>Forward</i> — GGGCTCTCCAGAACATCATCC — GTCCACCACTGACACGTTGG <i>Sonda</i> — FAM-CCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCT-TAMRA

Ishodi su određeni u smislu vrednosti graničnog ciklusa (Ct), a relativna kvantifikacija je procenjena korišćenjem $\Delta\Delta Ct$ tehnike [161]. Utvrđena je prosečna vrednost duplikata uzoraka, a relativna kvantifikacija je utvrđena poređenjem vrednosti svakog mikroorganizma sa ekspresijom glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaze.

Vrednosti dobijene metodom kvantitativnog PCR-a poređene su sa angiografski procenjenim nivoom stenoze i brojem zahvaćenih koronarnih krvnih sudova kao i drugim kliničkim (povezanost sa navikom pušenja cigareta, komorbiditetima, prisutnom urođenom srčanom manom) i laboratorijskim (CRP, fibrinogen, sedimentacija eritrocita, holesterol, LDL, HDL, trigliceridi, urea, kreatinin, jačina glomerulske filtracije-eGFR, mokraćna kiselina, krvna slika) parametrima.

3.8 Statistička analiza

U zavisnosti od tipa varijabli i normalnosti raspodele, rezultati su predstavljeni kao učestalost (procenat), medijana (opseg) i srednja vrednost $\pm$ SD. Metode korišćene za testiranje statističkih hipoteza uključivale su t -test, *Mann-Whitney* test, hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće. Povezanost između varijabli je procenjena korišćenjem Pirsonovog koeficijenta linearne korelacije ili Spirmanovog koeficijenta korelacije rangova. Regresiona analiza je korišćena za analizu ishoda i potencijalnih prediktora. Statističke hipoteze su testirane na nivou značajnosti od 0,05. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Svi podaci su obrađeni u IBM SPSS Statistics 24 (*IBM Corporation, Armonk, NY, USA*) softverskom paketu ili R programskom okruženju (*R Core Team, 2024*).

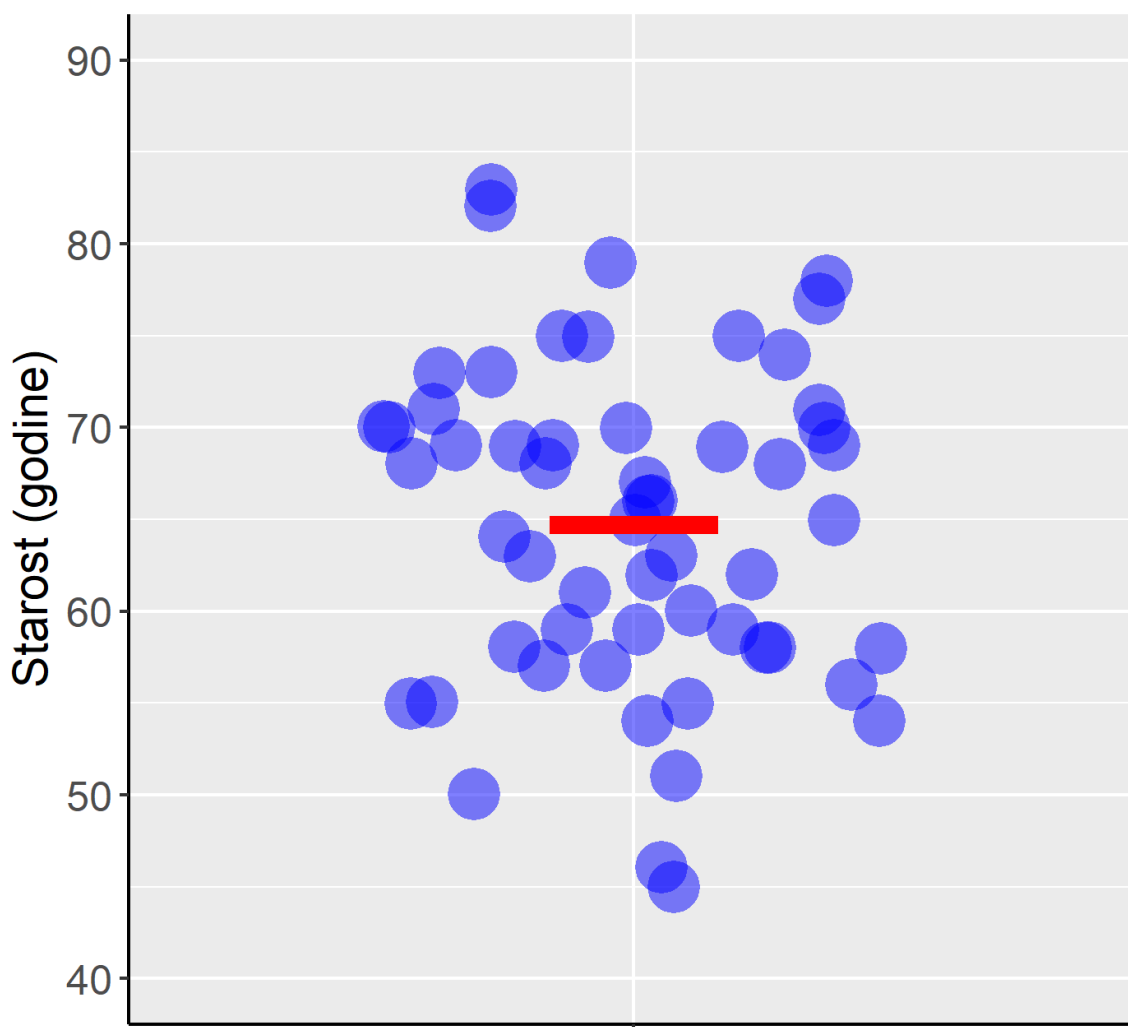
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1 DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Većina ispitanika su bili muškarci (85,7%), stariji od 60 godina, prekomerne telesne težine ili gojazni (66%), nepušači ili bivši pušači (60,7%), a primljeni su u bolnicu zbog nestabilne angine pectoris (Tabela 2).

Prosečna starost svih ispitanika u istraživanju iznosila je 64,7 godina (95% CI 62,4-67,0) (Grafikon 1).

Najmlađi ispitanik imao je 45 a najstariji 83 godine.



Grafikon 1. Individualne vrednosti starosti ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava aritmetičku sredinu.

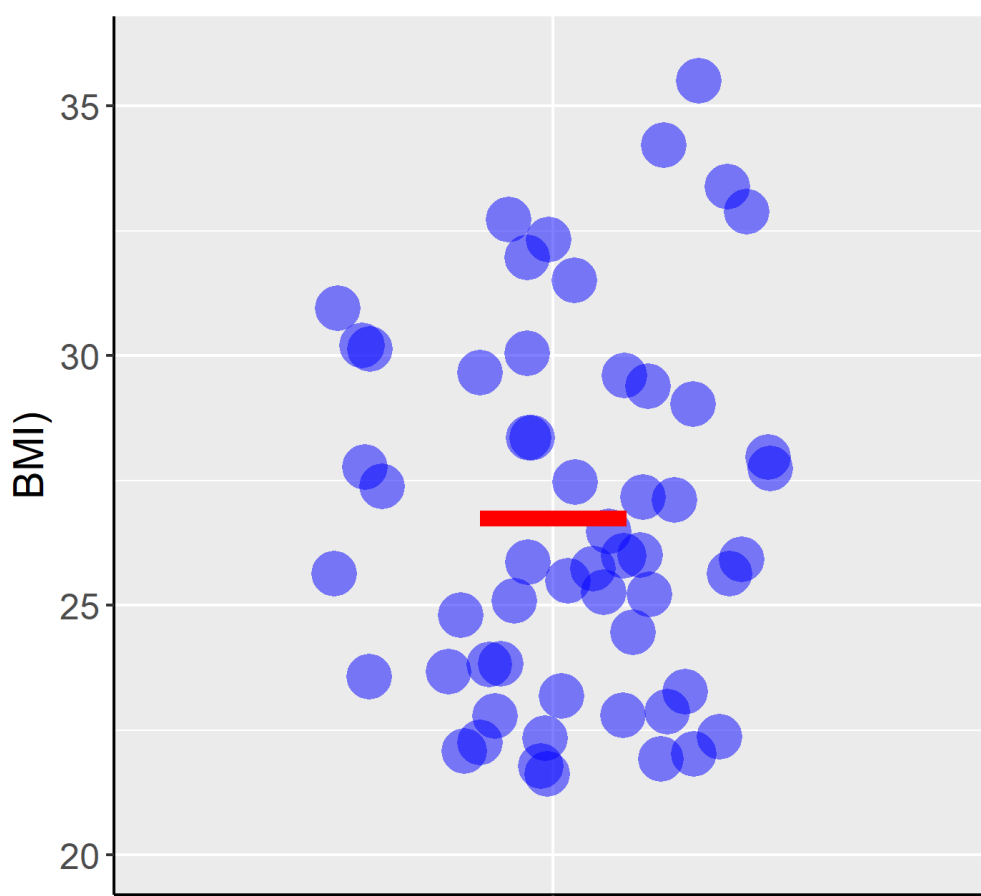
Osnovne demografske karakteristike ispitanika su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2. Osnovne demografske karakteristike ispitanika

Ukupno	<i>n</i> = 56 (%)
Pol, <i>n</i> (%)	
muški	48 (85,7%)
ženski	8 (14,3%)
Starost, godine, srednja vrednost $\pm$ SD	64,7 $\pm$ 8,8
Dijagnoza na prijemu, <i>n</i> (%)	
Stabilna AP	14 (25,0%)
NSAP	25 (44,6%)
IM	17 (30,4%)
Pušenje, <i>n</i> (%)	
pušač	22 (39,3%)
nepušač	34 (60,7%)

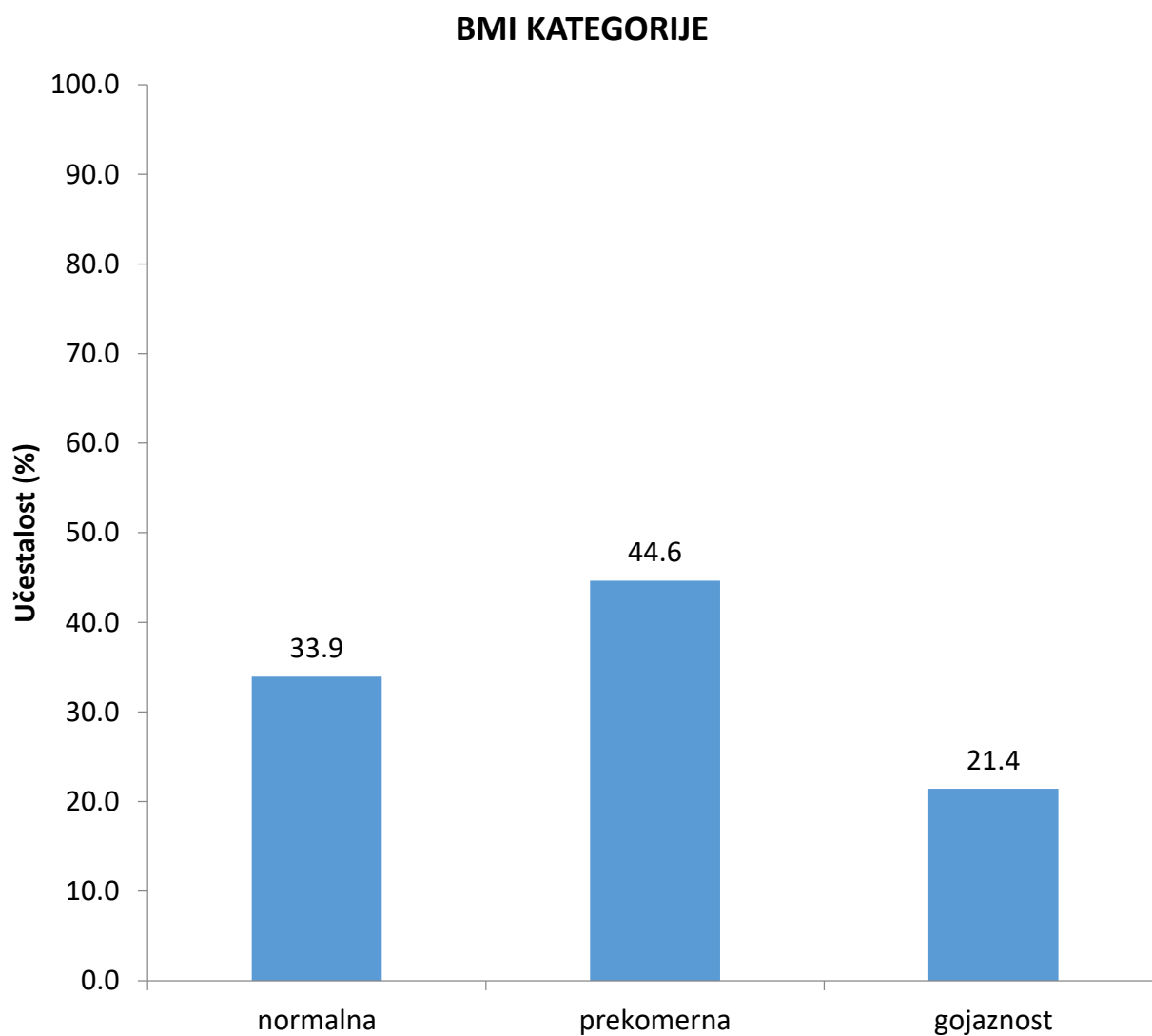
AP: angina pectoris; NSAP: Nestabilna angina pectoris; IM: Infarkt miokarda

Aritmetička sredina vrednosti BMI svih ispitanika u istraživanju iznosila je $26,7 \pm 3,6$ kg/m². Najniža vrednost iznosila je 21,6 a najviša 35,5 kg/m² (Grafikon 2).



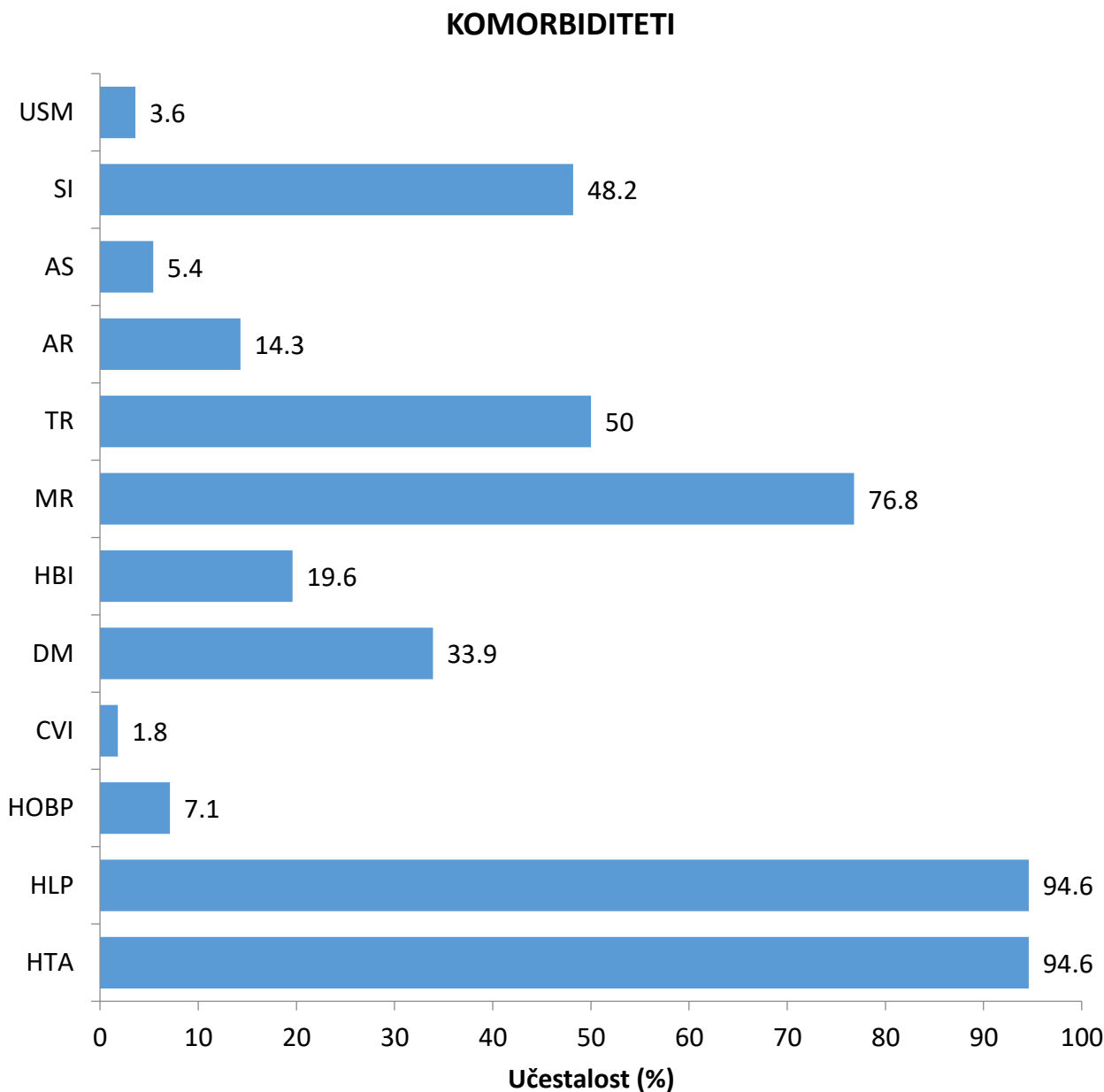
Grafikon 2. Individualne vrednosti starosti ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava aritmetičku sredinu.

Ispitanici su najčešće imali prekomernu telesnu težinu (44,6%) ili su spadali u kategoriju gojaznih (21,4%) prema BMI kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (Grafikon 3).



Grafikon 3. Struktura ispitanika prema BMI kategoriji

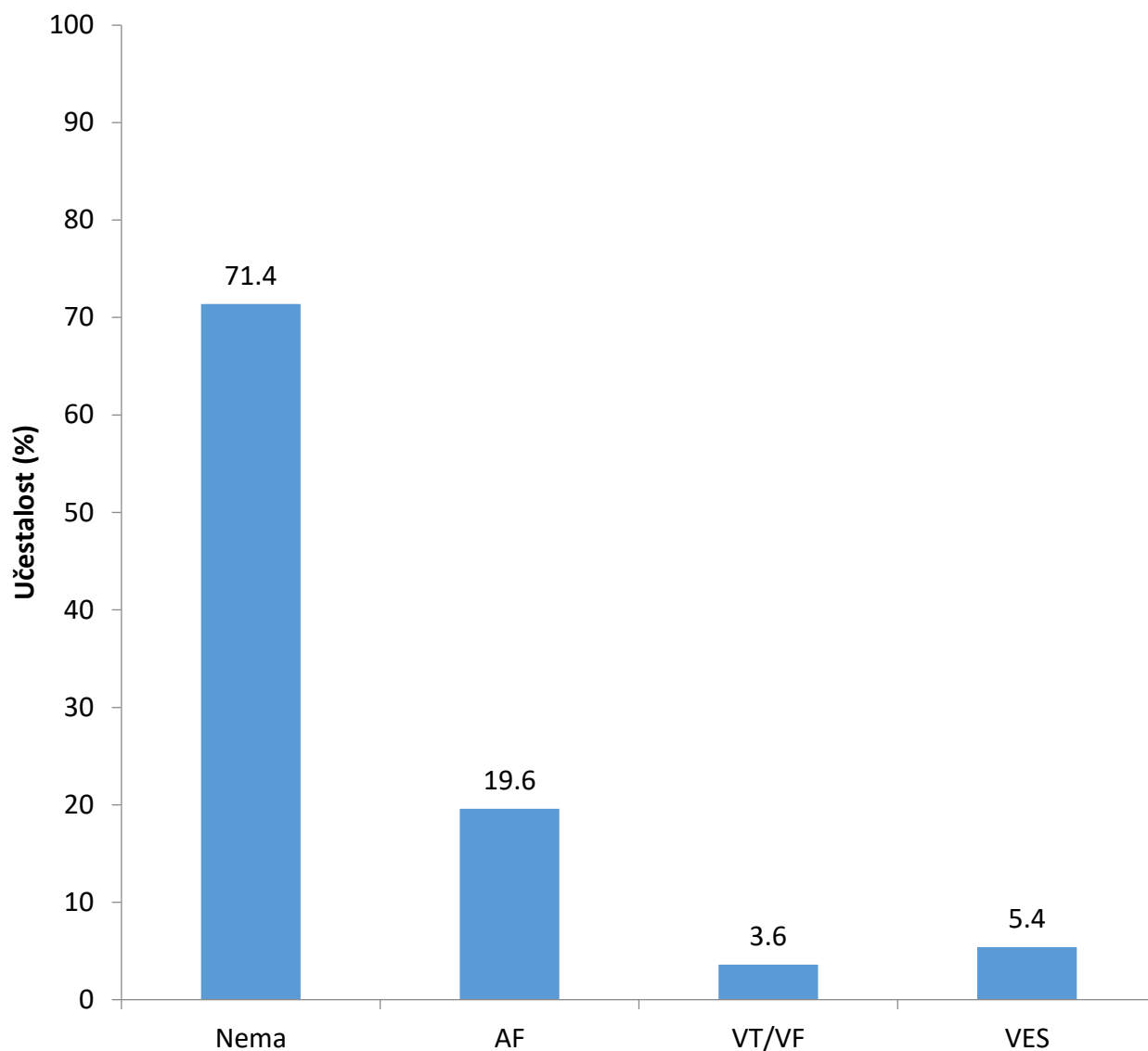
Glavni komorbiditeti su bili arterijska hipertenzija i hiperlipoproteinemija (94,6%), zatim mitralna regurgitacija (78%), trikuspidalna regurgitacija (50%) i kongestivna srčana bolest (48%). Dijabetes melitus je ranije dijagnostikovao kod 33,9%, a hronična bolest bubrega stadijuma 2 ili 3 kod 19,6% ispitanika (Grafikon 4).



Grafikon 4. Struktura ispitanika prema prisutnim komorbiditetima

USM: urođene srčane mane; SI: srčana insuficijencija; AS: aortna stenoza; AR: aortna regurgitacija; TR: trikuspidalna regurgitacija; MR: mitralna regurgitacija; HBI: hronična bubrežna insuficijencija; DM: dijabetes melitus; CVI: cerebrovaskularni insult; HOBP: Hronična opstruktivna bolest pluća; HLP: Hiperlipoproteinemija; HTA: Arterijska hipertenzija

Najveći broj ispitanika sa koronarnom bolešću srca nije imao prateće poremećaje srčanog ritma (71,4%). Ukoliko je ustanovljen poremećaj, najčešće se radilo o fibrilaciji pretkomora (19,6%) (Grafikon 5).



Grafikon 5. Struktura ispitanika prema prisustvu pratećeg poremećaja srčanog ritma

AF: Atrijalna fibrilacija; VT/VF: Ventrikularna tahikardija/Ventrikularna fibrilacija; VES: Ventrikularna ekstrasistola

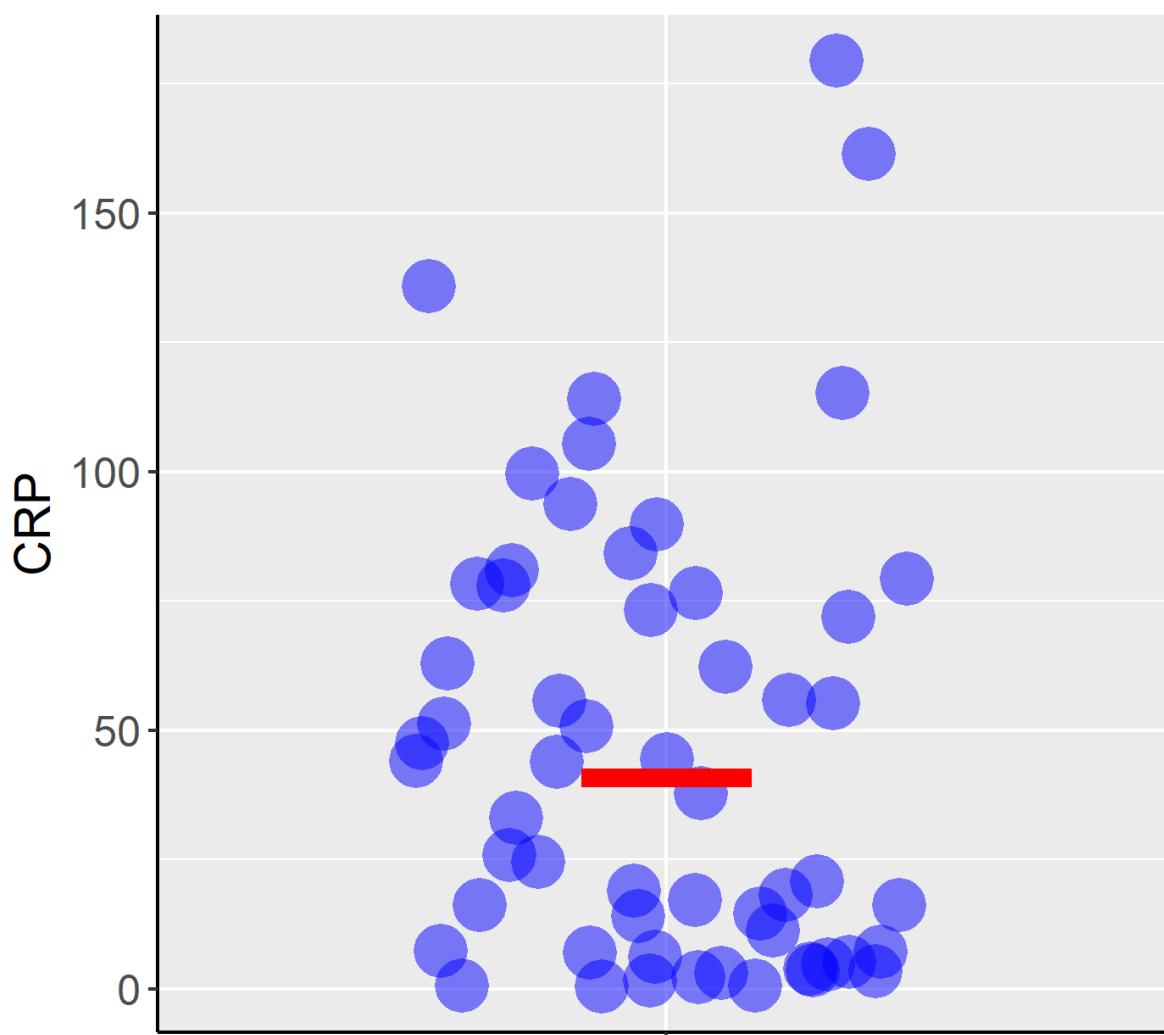
Laboratorijski parametri su pokazali povećane markere inflamacije, kao što su C-reaktivni protein, fibrinogen i brzina sedimentacije eritrocita (Tabela 3).

Tabela 3. Vrednosti laboratorijskih parametara ispitanika u istraživanju

Laboratorijski parametri	Aritmetička sredina	SD	Med	Min	Max	Referentne vrednosti i jedinice
CRP	46,70	43,50	40,80	0,50	179,40	0 -5 mg/dl
Fibrinogen	4,29	1,06	4,10	2,80	8,00	2-4 g/L
SE	30,09	22,78	23,00	2,00	95,00	2-12 mm/h
Holesterol	4,53	1,34	4,46	2,43	10,07	< 5,2mmol/L
HDL -C	1,10	0,34	1,04	0,44	2,02	> 1,3 mmol/L
LDL-C	2,68	1,44	2,31	0,86	8,50	< 3,3 mmol/L
Trigliceridi	1,89	0,99	1,62	0,42	4,90	<1,7 mmol/L
Urea	7,51	2,48	7,00	4,00	16,00	2,8-8,3 mmol/L
Kreatinin	101,13	32,97	99,00	53,00	199,00	62-103 umol/L
eGRF	55,61	9,29	61,00	31,00	61,00	> 60 mL/min
Mokraćna kiselina	385,61	130,45	373,50	105,00	705,00	142-416 umol/L
Leukociti	9,50	2,67	9,65	4,30	16,70	3,9 - 10x10 ⁹ /L
Eritrociti	4,18	0,80	4,18	2,61	5,42	3,86-5,08 x 10 ¹² /L
Hemoglobin	126,41	22,71	129,50	81,00	164,00	110-180 g/L
Hematokrit	0,37	0,07	0,38	0,25	0,49	0,41 - 0,53 1/L
Trombociti	202,77	54,47	204,00	84,00	366,00	140-450 x 10 ⁹ /L

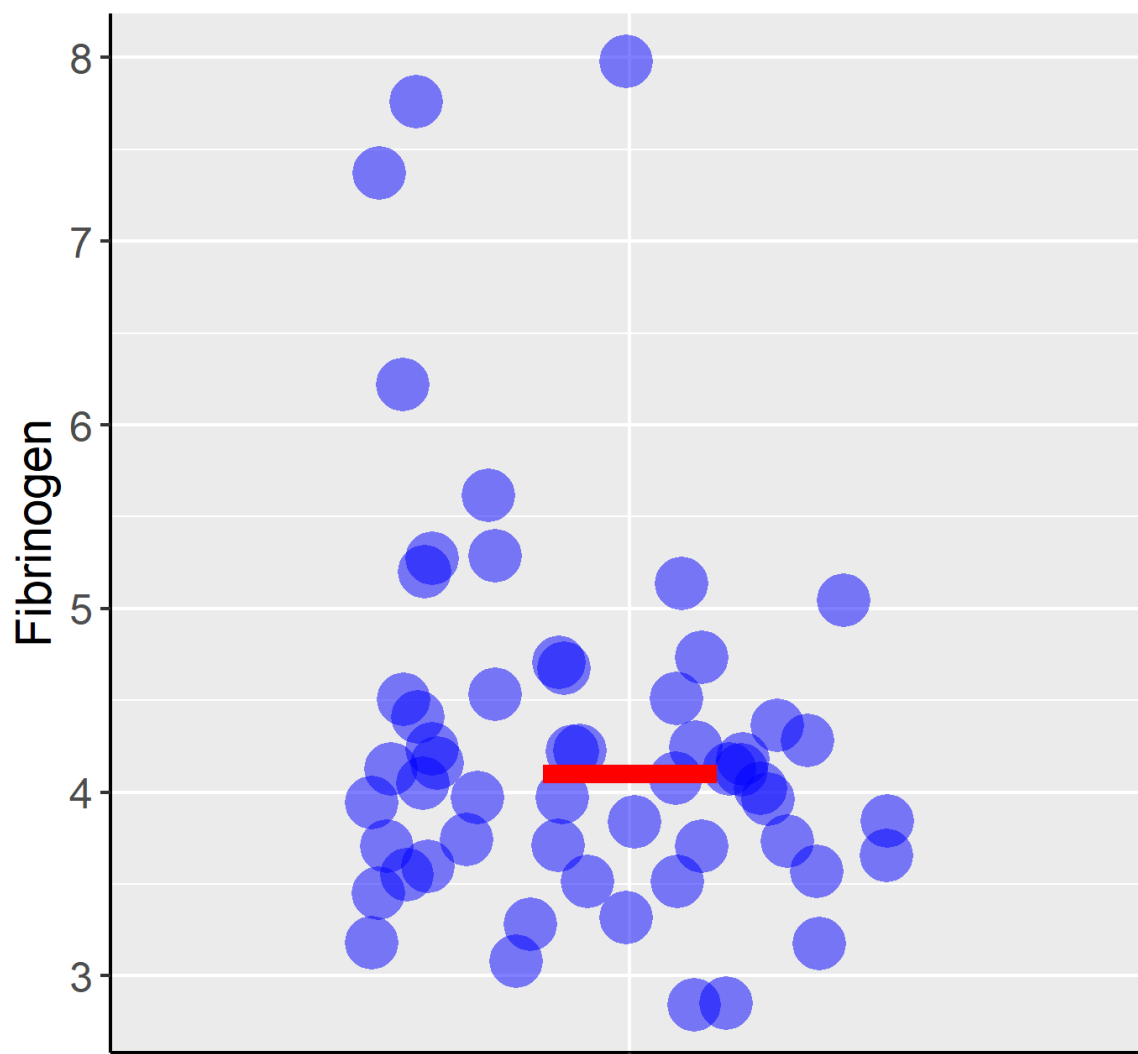
CRP: C-reaktivni protein; SE: brzina sedimentacije eritrocita; HDL-C: kolesterol lipoproteina visoke gustine; LDL-C: kolesterol lipoproteina niske gustine; eGFR: očekivana brzina glomerularne filtracije.

Medijana vrednosti CRP svih ispitanika u istraživanju iznosila je 40,8 mg/dl (opseg 0,5 mg/dl - 179,4 mg/dl) što je prikazano na grafikonu 6.



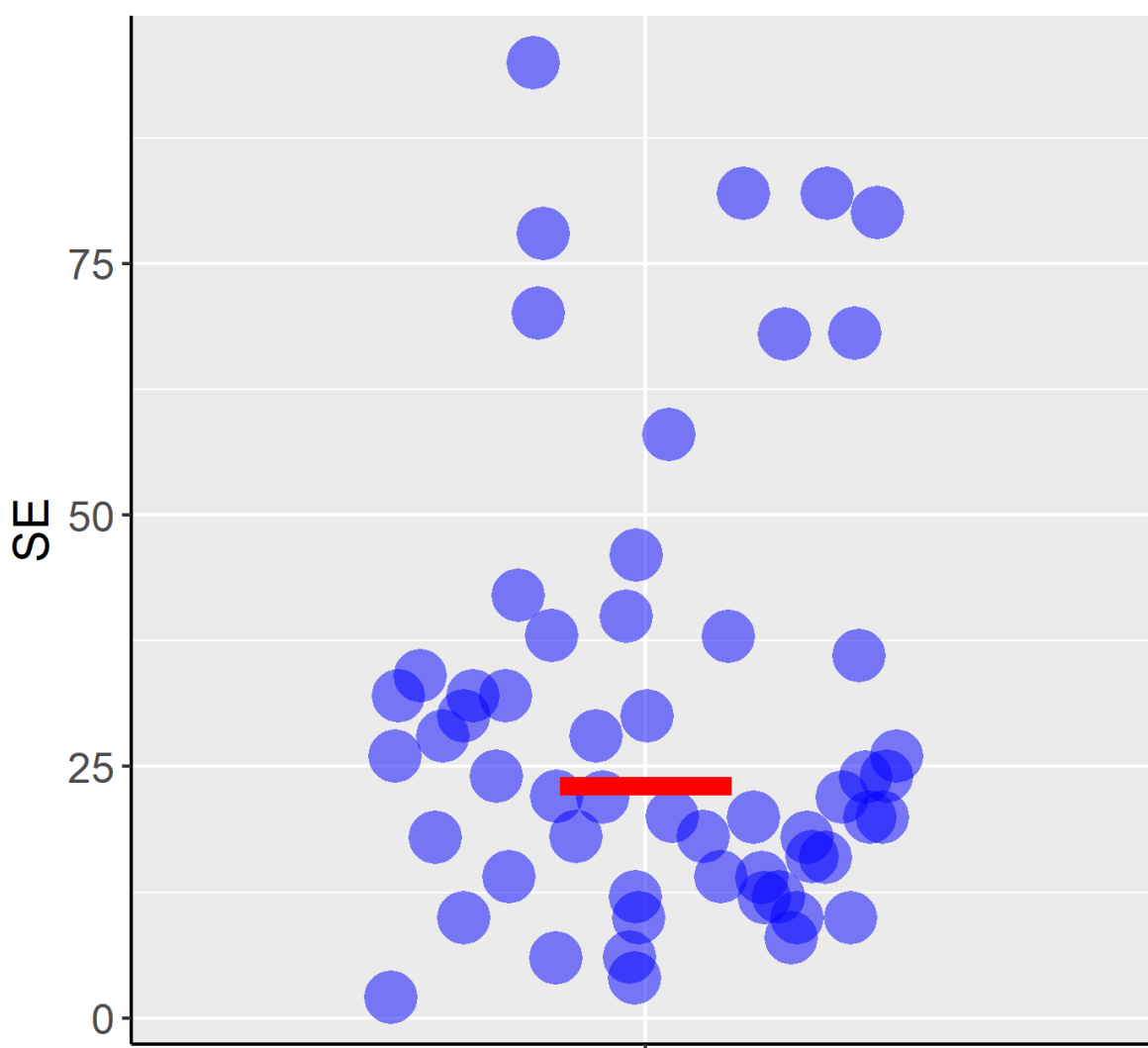
Grafikon 6. Individualne vrednosti CRP-a ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava medijanu.

Medijana vrednosti fibrinogena svih ispitanika u istraživanju iznosila je 4,1 g/L (opseg 2,8 g/L - 8,0 g/L) što je prikazano na grafikonu 7.



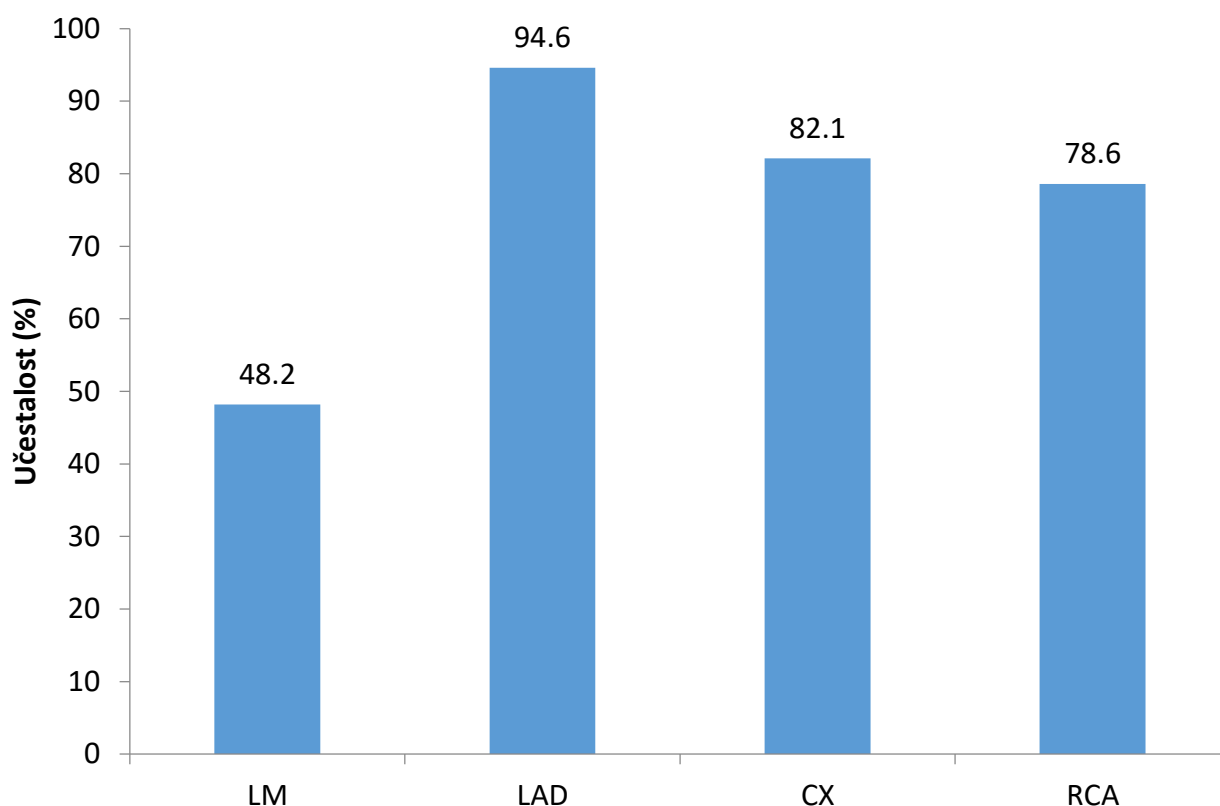
Grafikon 7. Individualne vrednosti Fibrinogena ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava medijanu.

Medijana vrednosti brzine sedimentacije eritrocita svih ispitanika u istraživanju iznosila je 23,0 mm/h (opseg 2,0 mm/h -95,0 mm/h) što je predstavljeno na grafikonu 8.



Grafikon 8. Individualne vrednosti SE ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava medijanu.

Stenoza koronarnih arterija najčešće je verifikovana na LAD (94,6% slučajeva), pri čemu je 44 ispitanika imalo zahvaćene tri ili četiri koronarne arterije. Najznačajnije promene su primećene kod RCA (37,5% ispitanika je imalo stenozu preko 90%) i LAD (16,1% ispitanika je imalo stenozu preko 90%) što je prikazano na grafikonu 9.



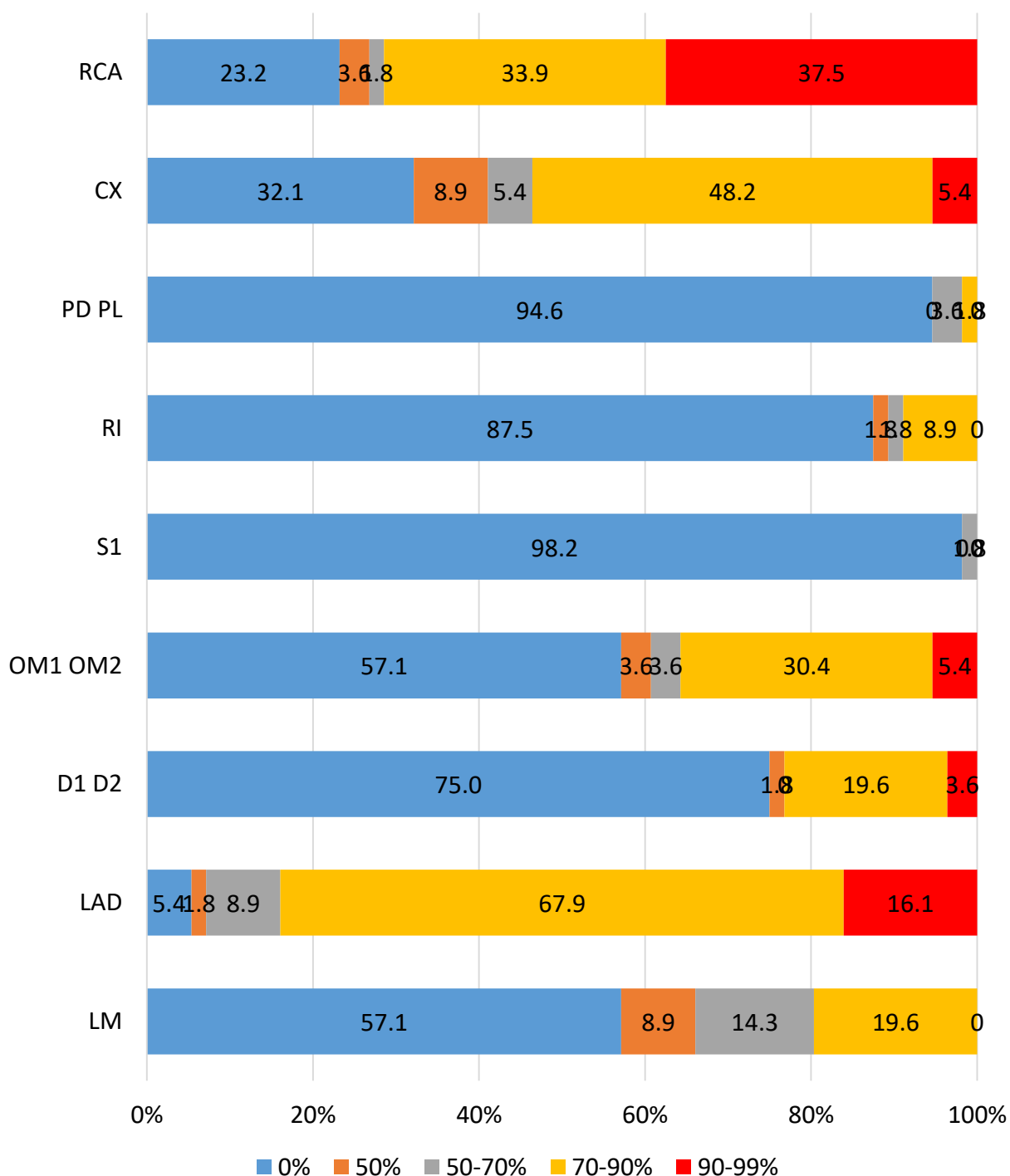
Grafikon 9. Struktura ispitanika prema dominantnoj lokaciji aterosklerotskog suženja

LM: Leva glavna arterija; LAD: Leva prednja silazna arterija; CX: cirkumfleksna arterija; RCA: Desna koronarna arterija

U tabeli 4. je predstavljena struktura ispitanika prema broju zahvaćenih krvnih sudova, a na grafikonu 10 lokacija i nivo stenozе koronarnih arterija u ispitivanom uzorku

Tabela 4. Struktura ispitanika prema broju aterosklerozom zahvaćenih krvnih sudova

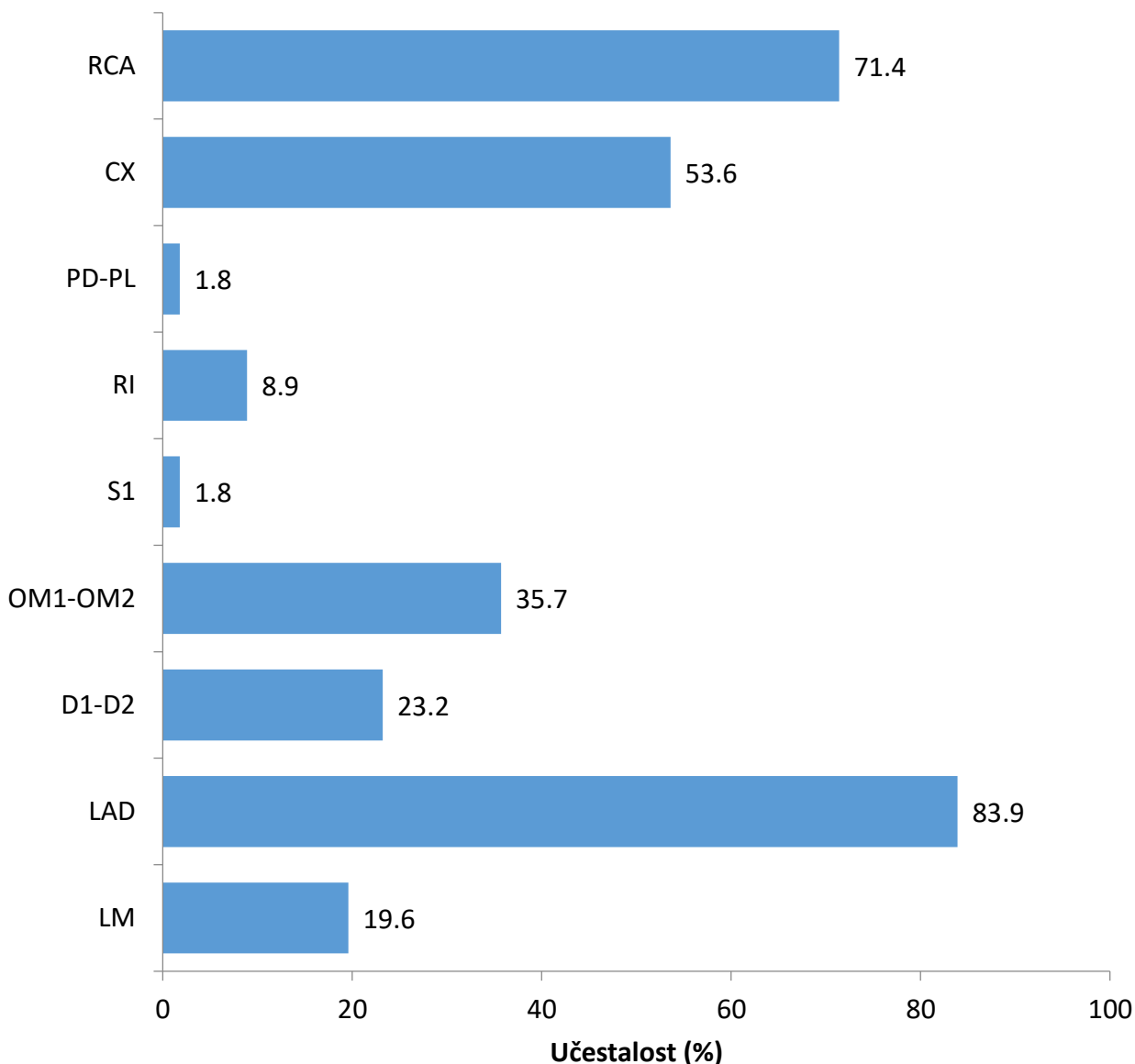
Broj zahvaćenih sudova	n	%
1	3	5,4
2	9	16,1
3	28	50,0
4	16	28,6
Ukupno	56	100,0



Grafikon 10. Lokacija i nivo stenozе koronarnih arterija u ispitivanom uzorku.

RCA: Desna koronarna arterija; CKS: cirkumfleksna arterija; PD PL: Posteriorna silazna/posterolateralna arterija; RI: Ramus intermedius; S1: segment 1; OM: Tupa marginalna arterija; D: Dijagonalna grana; LAD: Leva prednja silazna arterija; LM: Leva glavna arterija.

Kada se posmatraju signifikantne stenozе koronarnih krvnih sudova veće od 70% dijametra lumena, najčešće su bile zahvaćene LAD (83,9%) i RCA (71,4%) što je prikazano na grafikonu 11.



Grafikon 11. Struktura ispitanika prema stepenu stenozе koronarnih arterija većem od 70% dijametra lumena

RCA: Desna koronarna arterija; CX: cirkumfleksna arterija; PD PL: Posteriorna silazna/posterolateralna arterija; RI: Ramus intermedius; S1: segment 1; OM: Tupa marginalna arterija; D: Dijagonalna grana; LAD: Leva prednja silazna arterija; LM: Leva glavna arterija.

Kada je posmatrana povezanost između stepena suženja koronarnih krvnih sudova sa BMI, tj. prisustvom prekomerne telesne težine ili gojaznosti, nije utvrđena statistički značajna povezanost BMI i BMI kategorija u odnosu na stepen suženja ($p>0,05$), što je predstavljeno u tabeli 5.

Tabela 5. Odnos stenoze koronarnih arterija sa BMI

Variable		BMI	BMI kategorije
LM	rs	-0,108	-0,039
	p	0,428	0,777
LAD	rs	0,126	0,043
	p	0,356	0,755
D1-D2	rs	-0,154	-0,195
	p	0,256	0,150
OM1-OM2	rs	0,122	0,087
	p	0,370	0,525
S1	rs	-0,213	-0,166
	p	0,115	0,221
RI	rs	-0,065	-0,090
	p	0,632	0,511
PD-PL	rs	0,231	0,151
	p	0,087	0,265
CX	rs	-0,205	-0,172
	p	0,129	0,206
RCA	rs	0,003	0,144
	p	0,983	0,291

RCA: Desna koronarna arterija; CX: cirkumfleksna arterija; PD PL: Posteriorna silazna/posterolateralna arterija; RI: Ramus intermedius; S1: segment 1; OM: Tupa marginalna arterija; D: Dijagonalna grana; LAD: Leva prednja silazna arterija; LM: Leva glavna arterija.

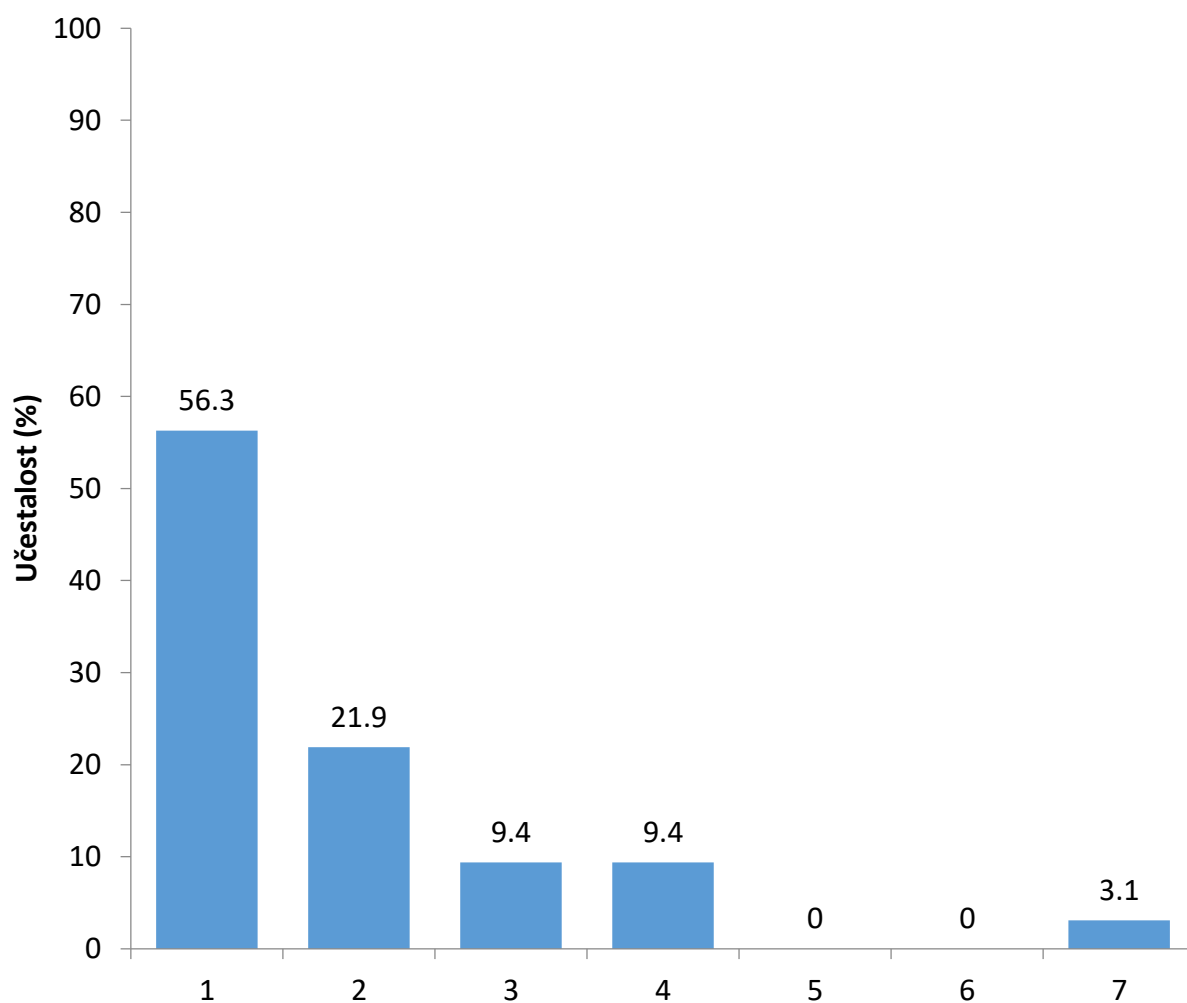
Posle hirurške revaskularizacije miokarda, 57,1% ispitanika imalo je neke postoperativne komplikacije koje su se obično javljale u ranoj fazi oporavka (48,2%).

Pleuralni izliv je dijagnostikovao kod 16 ispitanika (28,6%), a atrijska fibrilacija kod 11 ispitanika (19,6%). U tri slučaja postojala je potreba za ponovnom intervencijom, a smrtni ishod se desio kod jednog ispitanika. U tabeli 6. je prikazana učestalost komplikacija nakon hirurške revaskularizacije miokarda.

Tabela 6. Struktura ispitanika prema pojavi komplikacija hirurške revaskularizacije

Komplikacije	n	%
Hipotenzija	4	7,1
Febrilnost	2	3,6
Respiratorna insuficijencija	4	7,1
Atrijska fibrilacija	11	19,6
Ventrikularna fibrilacija	1	1,8
Cerebrovaskularni insult	1	1,8
Pleuralni izliv	16	28,6
Pneumotoraks	4	7,1
Pneumonija	3	5,4
Dijarealni sindrom	3	5,4
Urinarna infekcija	1	1,8
Smrtni ishod	1	1,8
Reintervencija	3	5,4
Perikardni izliv	0	0,0
Secerniranje rane	6	10,7

Ispitanici u istraživanju najčešće su imali po jednu komplikaciju (56,3%) ili dve komplikacije (21,9%) u postoperativnom periodu (Grafikon 12).

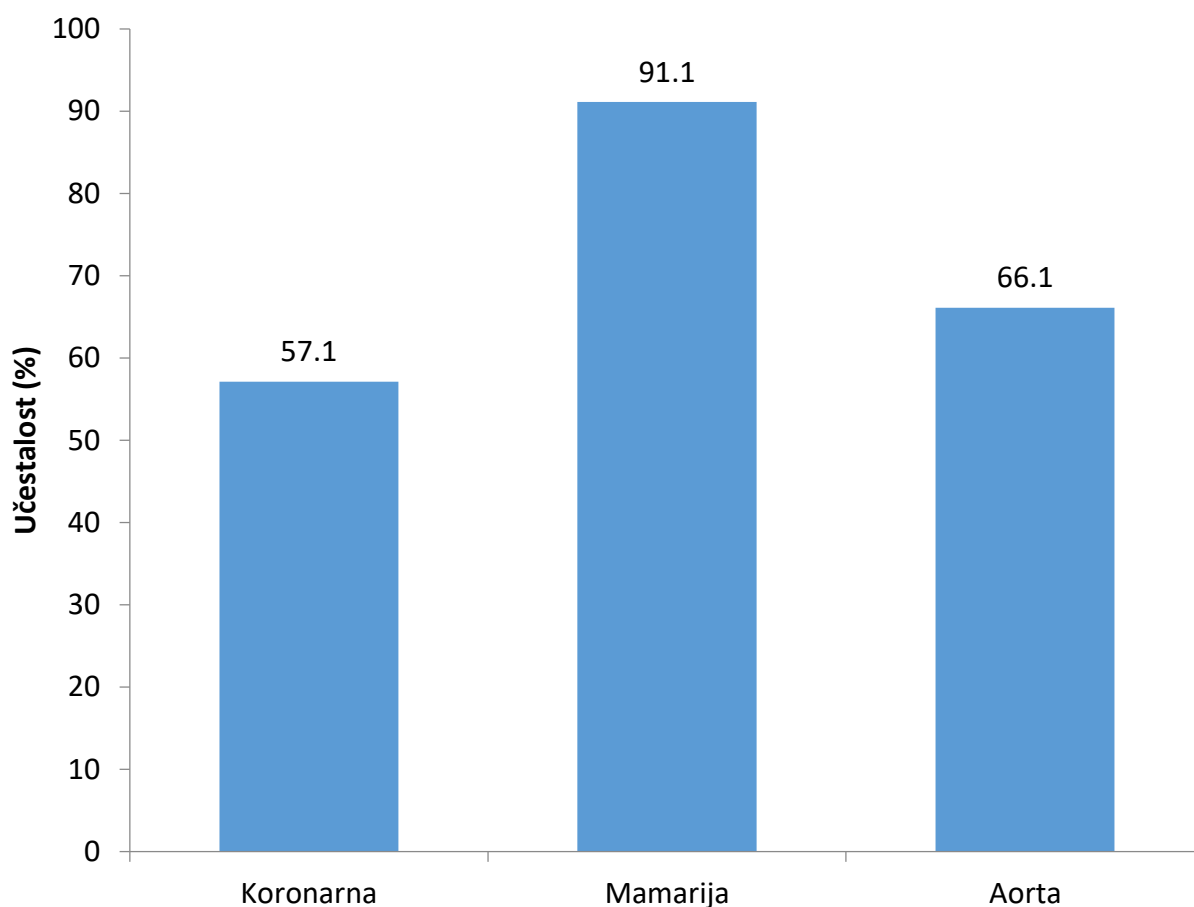


Grafikon 12. Struktura ispitanika prema broju postoperativnih komplikacija

Za analizu su tokom hirurške revaskularizacije miokarda uzeti mali uzorci distalnih delova dijagonalnih grana (grane leve prednje silazne koronarne arterije, eng. *left anterior descendens*, LAD), delova unutrašnje grudne arterije (lat. *a. mammaria interna*) koji se koriste za presađivanje (graft) i delova aorte bez makroskopski procenjene aterosklerotske degeneracije.

U najvećem broju slučajeva, uzeti su uzorci sve tri vrste krvnih sudova (41,1%) a u 32,1% slučajeva su uzeti uzorci dva od tri krvna suda.

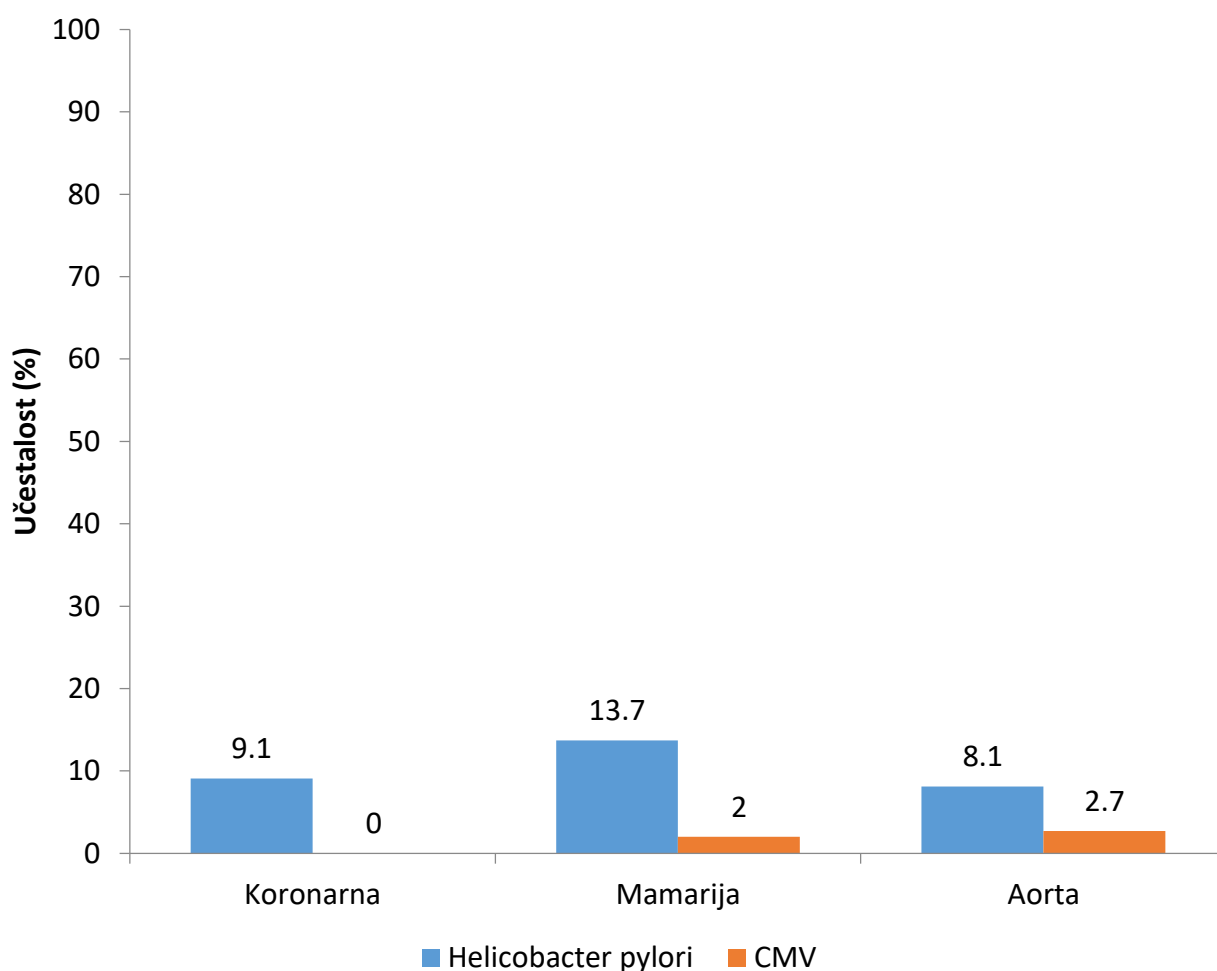
Najčešće je uspešno uzet uzorak unutrašnje grudne arterije (91,1%) koja i predstavlja krvni sud prvog izbora za hiruršku revaskularizaciju miokarda (Grafikon 13).



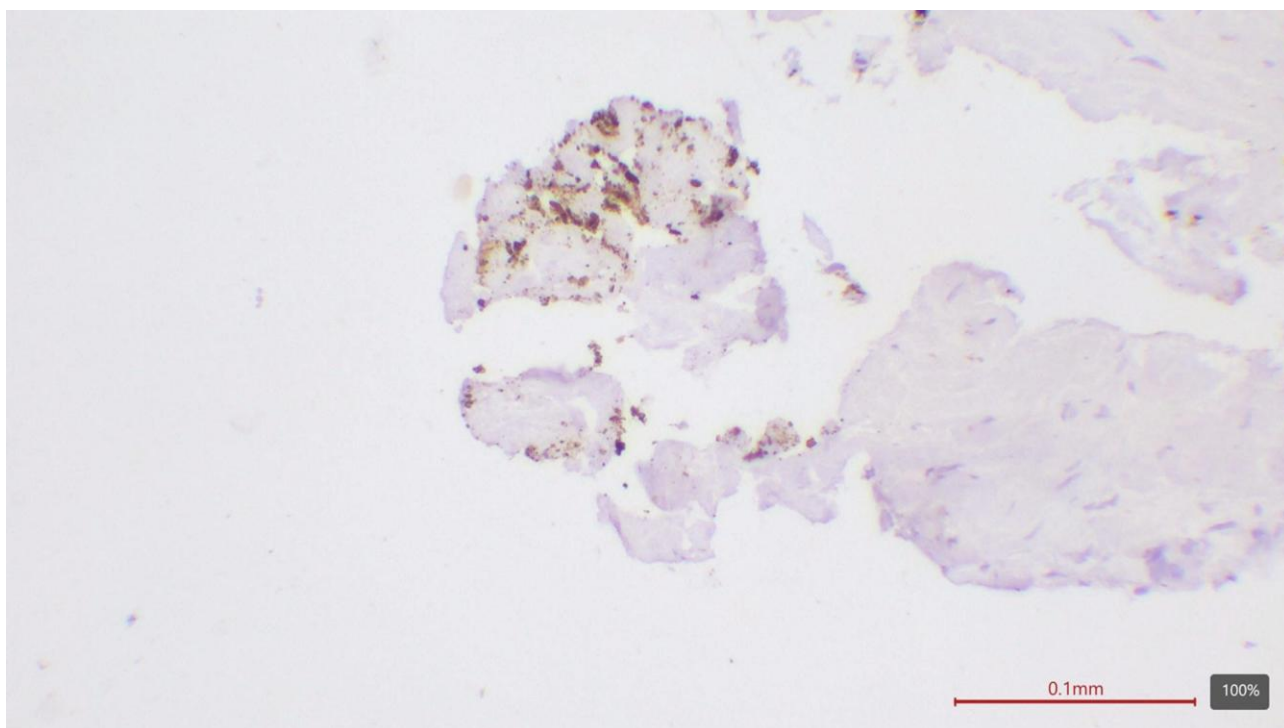
Grafikon 13. Struktura ispitanika prema vrsti uzorkovanog arterijskog krvnog suda

U cilju utvrđivanja prisustva infektivnih agenasa (Cytomegalovirus-a i *Helicobacter pylori*) urađena su imunohistohemijska bojenja na isečcima tkiva krvnih sudova pacijenata primenom anti-Cytomegalovirus i anti-*Helicobacter* antitela koja su pokazala prisustvo HP antigena na 13 uzoraka krvnih sudova, dominantno na uzorcima a.mammaria interne (13,7% ukupnog broja uzoraka). CMV antigen je nađen na dva uzorka (*a. mammaria interna*, aorta) (Grafikon 14, Slika 1-4).

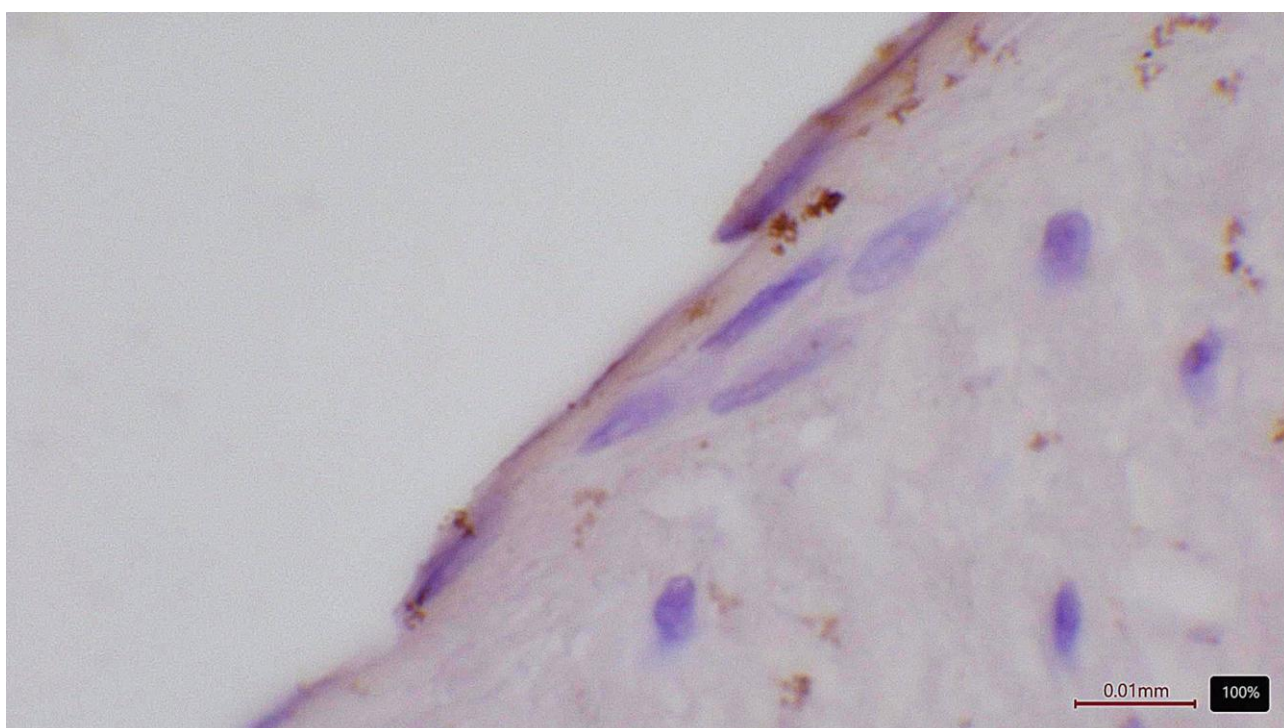
Kod dva pacijenta HP antigen je nađen na dva uzorka krvnih sudova (Ao i unutrašnja grudna arterija, tj. mamarija, odnosno LAD i mamarija).



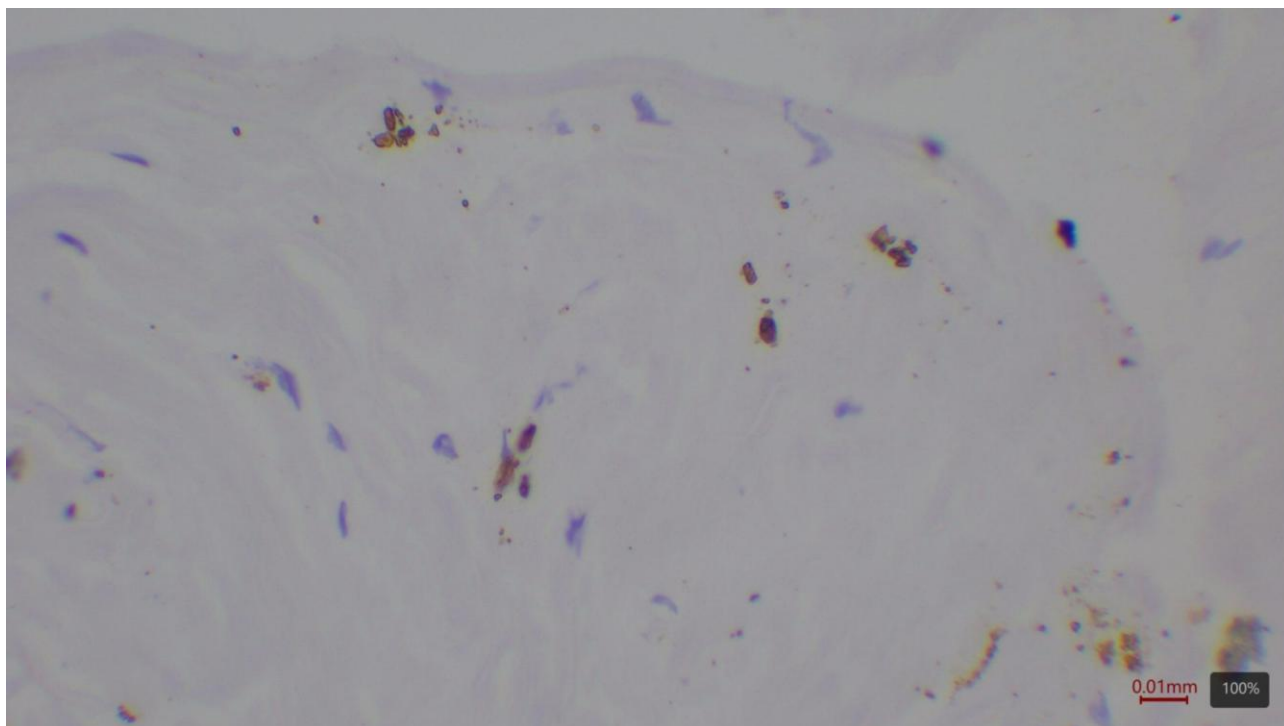
Grafikon 14. Imunohistohemijska lokalizacija detektovanih patogeni



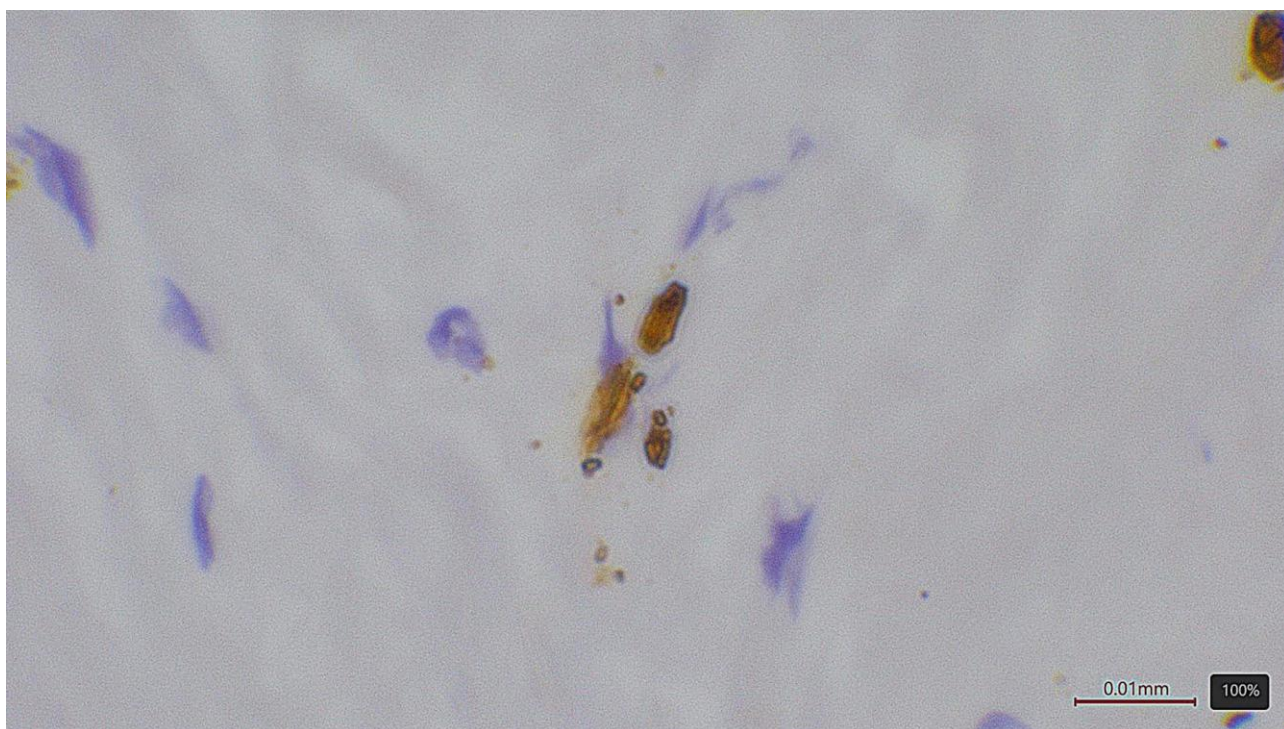
Slika 1. Imunohistohemijska identifikacija *Helicobacter pylori* u aorti, uveličanje x20



Slika 2. Imunohistohemijska identifikacija *Helicobacter pylori* u endotelu koronarne arterije , uveličanje x100



Slika 3. Imunohistohemijska detekcija proteina Cytomegalovirusa, uveličanje x40



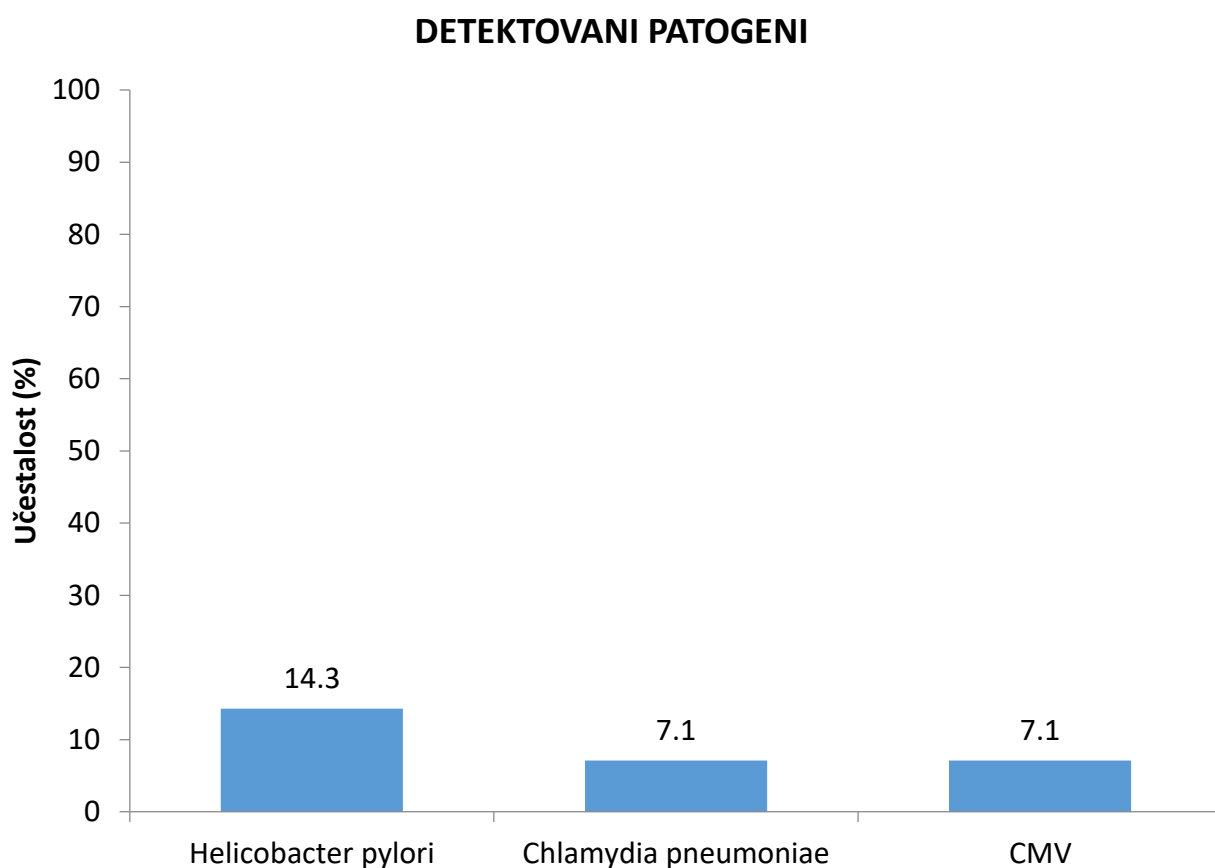
Slika 4. Imunohistohemijska detekcija proteina Cytomegalovirusa, uveličanje x100

4.2 PCR ANALIZA

Uzorkovanjem i PCR analizom makroskopski neaterosklerotičnih arterijskih segmenata utvrđeno je prisustvo DNK mikroorganizma kod 12 ispitanika (21,4%).

HP je pronađen u osam uzoraka (četiri iz koronarne arterije, četiri iz unutrašnje grudne arterije), Cpn je pronađen u četiri uzorka (jedan iz koronarne arterije, tri iz unutrašnje grudne arterije), a CMV je otkriven u četiri uzorka (jedan iz koronarne arterije, tri iz unutrašnje grudne arterije) (Grafikon 15).

Kod dva pacijenta PCR je pokazao istovremeno prisustvo dva različita patogena, dok su kod jednog ispitanika pronađena sva tri patogena.



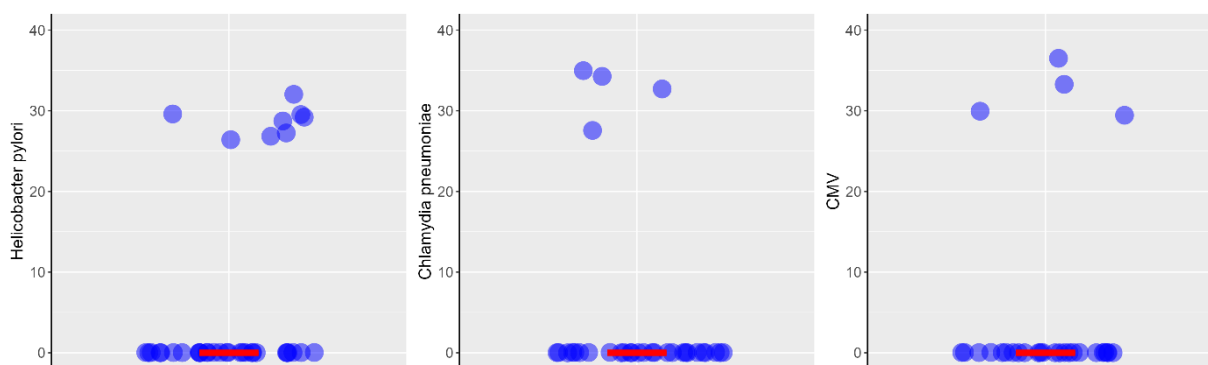
Grafikon 15. Struktura ispitanika prema utvrđenom prisustvu patogene DNK

4.2.1 KVANTITATIVNA PCR ANALIZA

Vrednosti dobijene kvantitativnom PCR su definisane nakon što je utvrđena prosečna vrednost duplikata uzoraka, a zatim urađena relativna kvantifikacija poređenjem vrednosti svakog mikroorganizma sa ekspresijom glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaze što je prikazano u tabeli 7. i na grafikonu 16.

Tabela 7. Vrednosti mikroorganizama dobijene kvantitativnom PCR analizom

Patogen	Aritmetička sredina	SD	Mediana	min	max
Helicobacter pylori	5,3	11,3	0,0	0,0	32,1
Chlamydia pneumoniae	2,2	8,5	0,0	0,0	34,9
Cytomegalovirus	3,2	9,6	0,0	0,0	36,5



Grafikon 16. Individualne vrednosti detektovanih patogena ispitanika u istraživanju (predstavljene plavim krugovima). Crvena crtica označava medijanu

4.2.2 UPOREDNA ANALIZA IMUNOHISTOHEMIJSKOG NALAZA (IHH) I PCR NALAZA

Senzitivnost IHH nalaza u odnosu na PCR nalaz kao zlatni standard za detekciju *Helicobacter pylori* iznosi 25%, dok je specifičnost 81,2% (Tabela 8).

Tabela 8. Mere dijagnostičke tačnosti *Helicobacter pylori* IHH nalaza u odnosu na PCR nalaz kao zlatni standard.

Mere dijagnostičke tačnosti	vrednost (95% CI)
Senzitivnost (Se)	25,0 (3,2 – 65,1)
Specifičnost (Sp)	81,2 (67,4 – 91,1)
Sveukupna tačnost	73,2 (59,7 – 84,2)
Pozitivna prediktivna vrednost (NPV)	18,2 (2,3 – 51,8)
Negativna prediktivna vrednost (PPV)	86,7 (73,2 – 94,9)
Odnos verodostojnosti pozitivnog testa (LR+)	1,33 (0,35 – 5,08)
Odnos verodostojnosti negativnog testa (LR-)	0,92 (0,61 – 1,41)

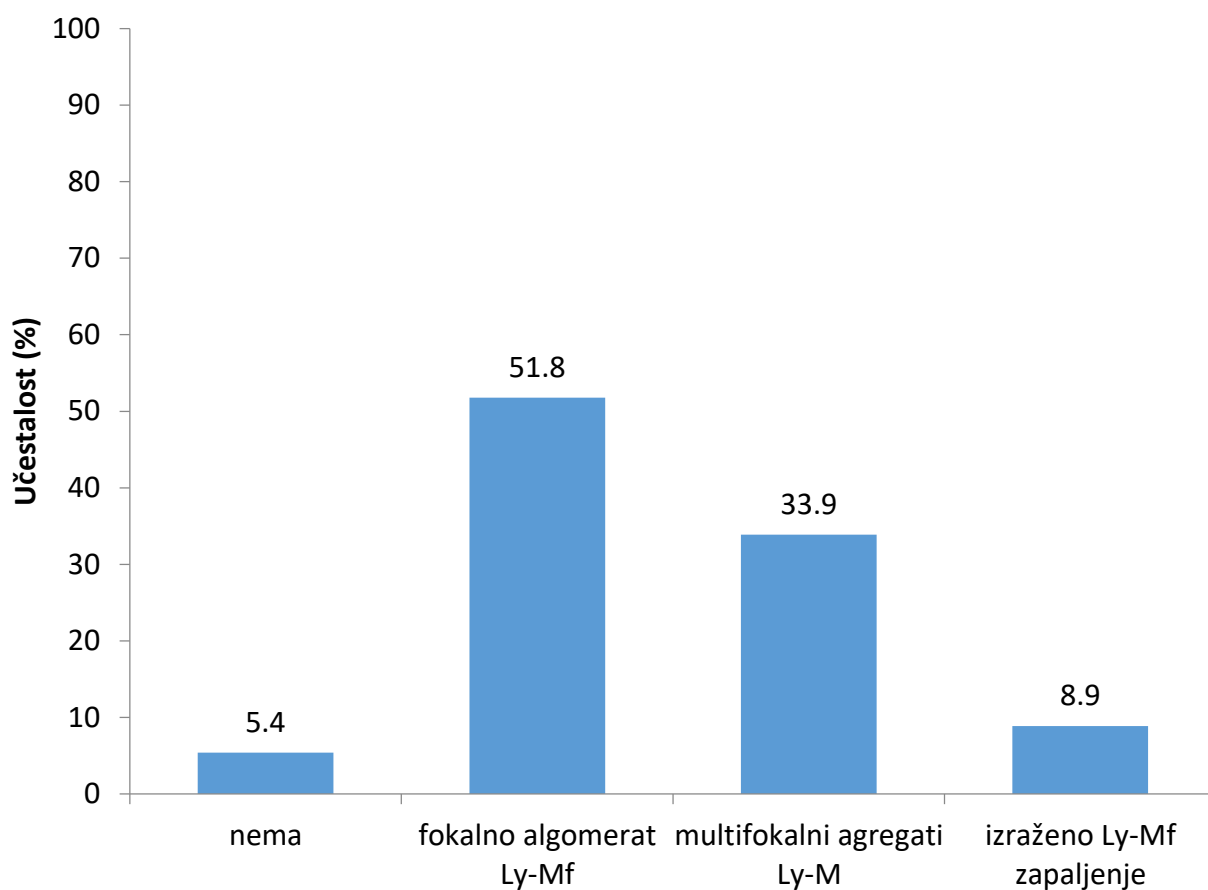
Senzitivnost IHH nalaza u odnosu na PCR nalaz kao zlatni standard za CMV iznosi 0%, dok je specifičnost 96,2% (Tabela 9).

Tabela 9. Mere dijagnostičke tačnosti CMV IHH nalaza u odnosu na PCR nalaz kao zlatni standard.

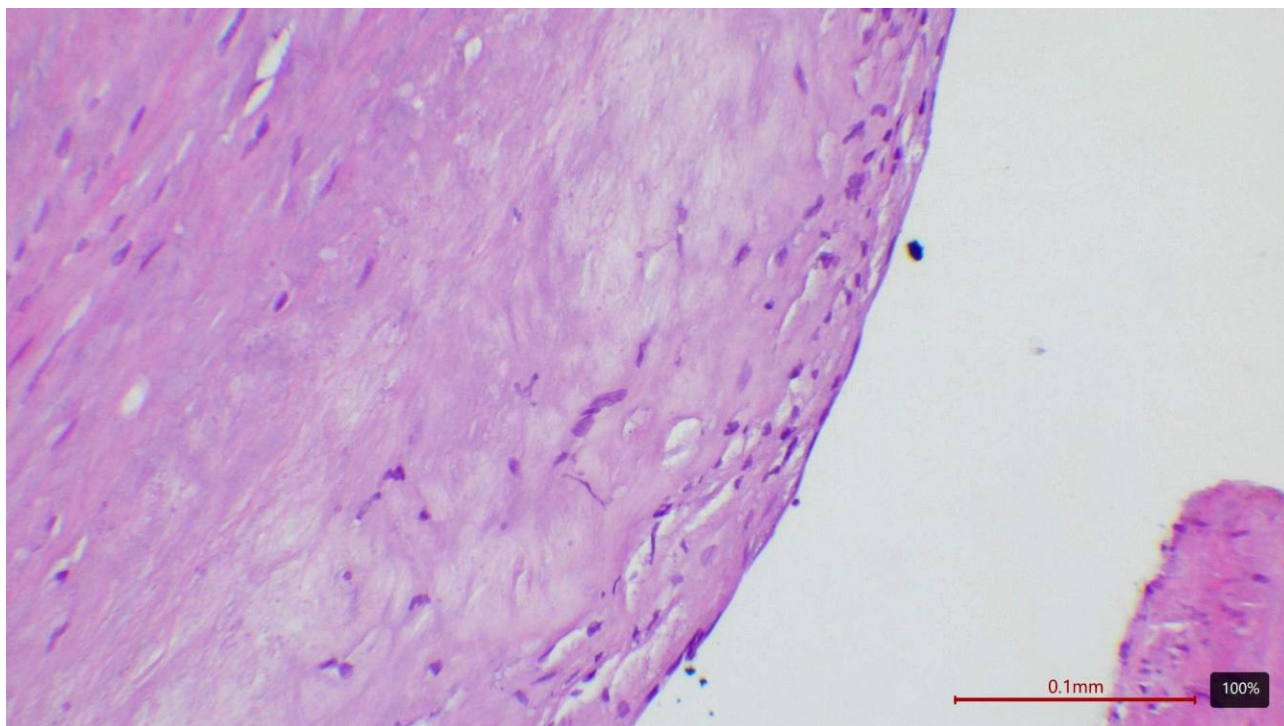
Mere dijagnostičke tačnosti	vrednost (95% CI)
Senzitivnost (Se)	0,0 (0,0 – 71,6)
Specifičnost (Sp)	96,2 (86,8 – 99,5)
Sveukupna tačnost	89,3 (78,1 – 96,0)
Pozitivna prediktivna vrednost (NPV)	0,0 (0,0 – 90,6)
Negativna prediktivna vrednost (PPV)	92,6 (82,1 – 97,9)
Odnos verodostojnosti pozitivnog testa (LR+)	0,0
Odnos verodostojnosti negativnog testa (LR-)	1,04 (0,98 – 1,10)

4.3 PATOHISTOLOŠKI NALAZ

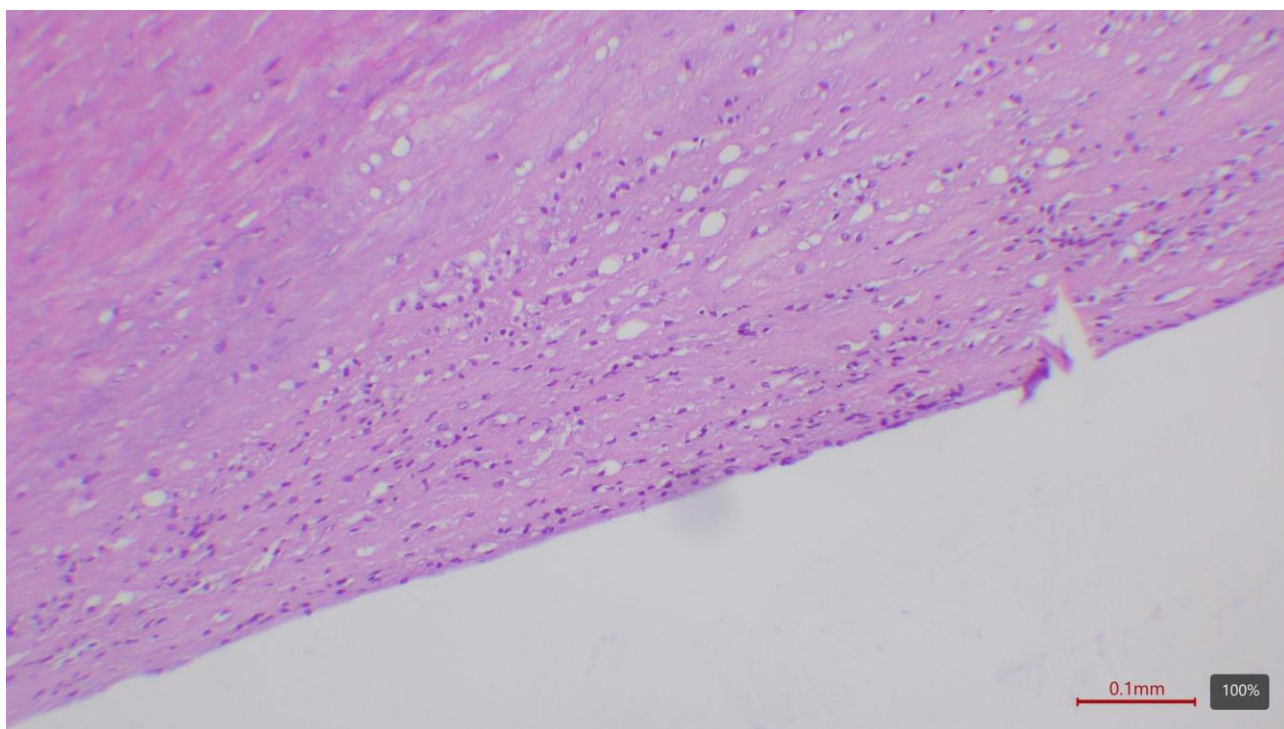
Posmatrajući histopatološke nalaze ispitivanih uzoraka u odnosu na stepen inflamacije najčešće su viđeni fokalni limfocitno makrofagni aglomerati (Ly-Mf) (51,8%), ali je u skoro 9% uzoraka nađena izražena Ly-Mf inflamacija (Grafikon 17, Slika 5-7).



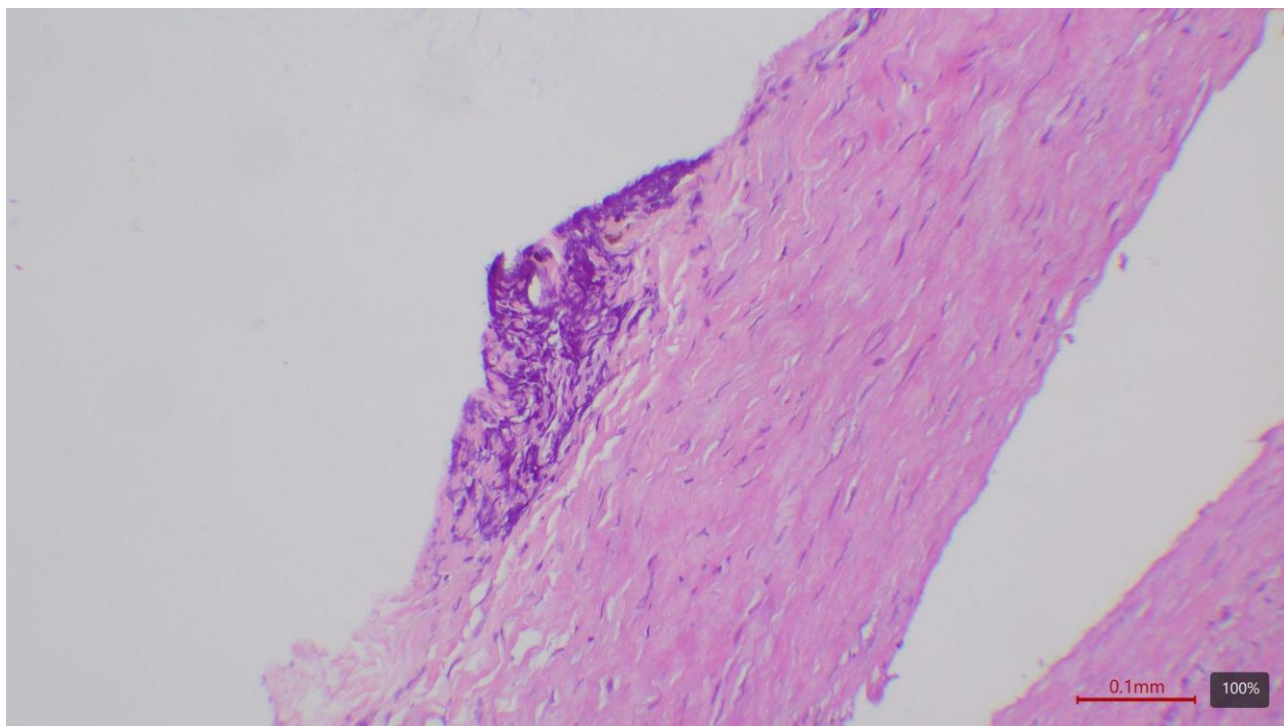
Grafikon 17. Struktura uzoraka u odnosu na histopatološki nalaz inflamacije



Slika 5. Bojenje hematoksilinom i eozinom; Blaga infiltracija u zidu koronarne arterije gradus 1+, uveličanje 20x



Slika 6. Bojenje hematoksilinom i eozinom; Inflamatorni infiltrat u zidu aorte, srednjeg stepena gradus 2+, uveličanje 10x

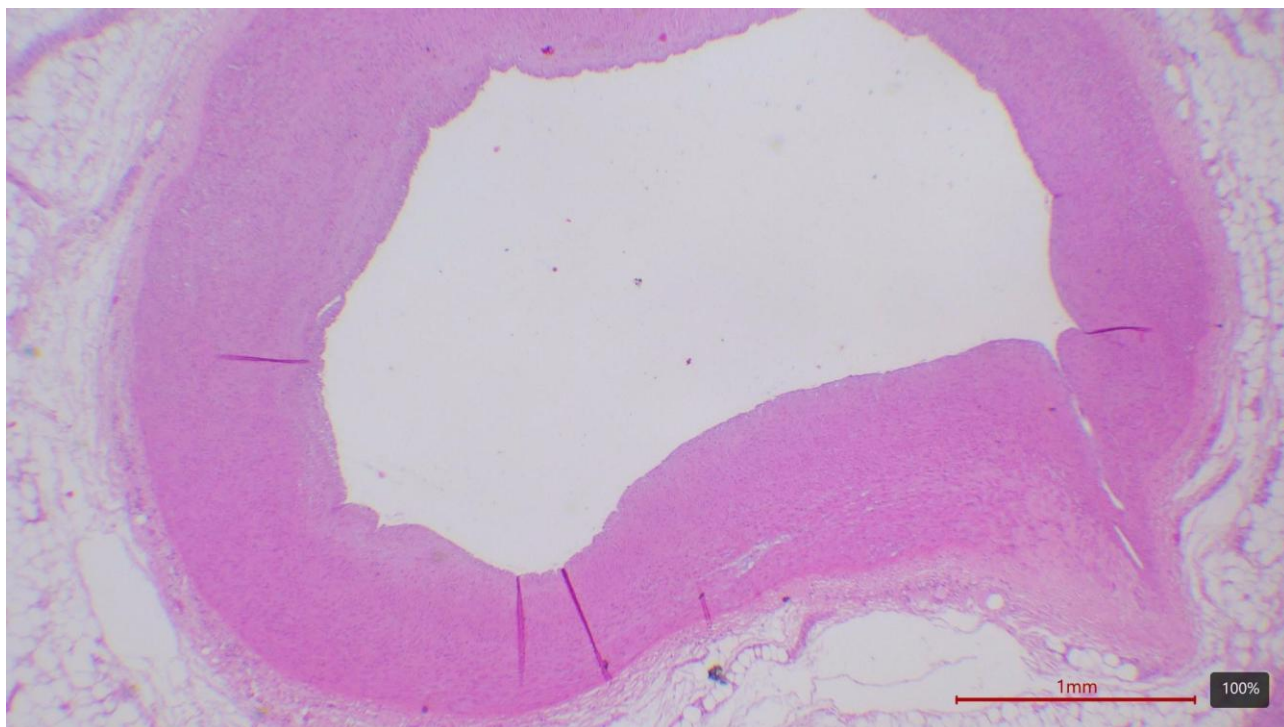


Slika 7. Bojenje hematoksilinom i eozinom; Inflamatorni infiltrat u zidu aorte, izražeo stepena gradus ,3+, uveličanje 10x

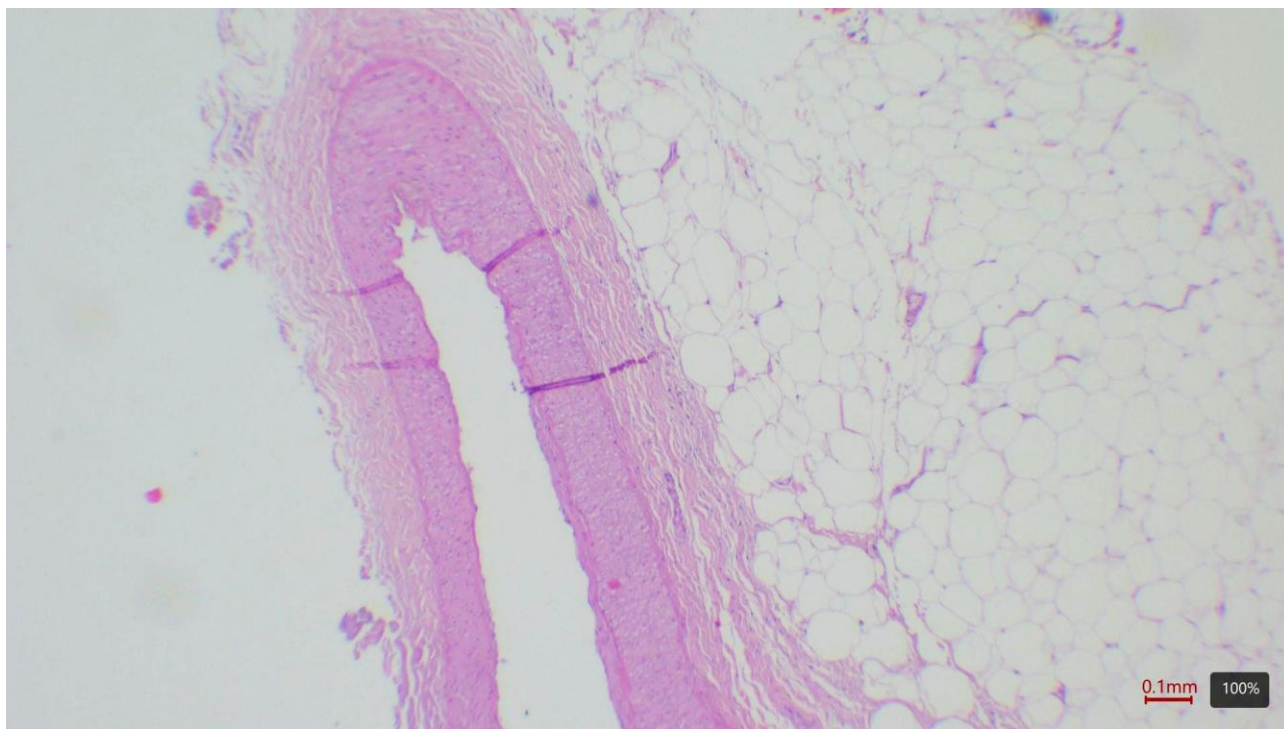
Kod ispitivanih uzoraka u istraživanju u odnosu na stepen ateroskleroze najčešće je bio zastupljen I (33,9%) i II stepen (33,9%), ali je u 1,8% makroskopski normalnih uzoraka nađena uznapredovala ateroskleroza V stepena. Ni u jednom uzorku nisu viđeni znaci disekcije zida tj. erozije endotela (Tabela 10, Slika 8-16).

Tabela 10. Struktura uzoraka u odnosu na histopatološki definisan stepen ateroskleroze

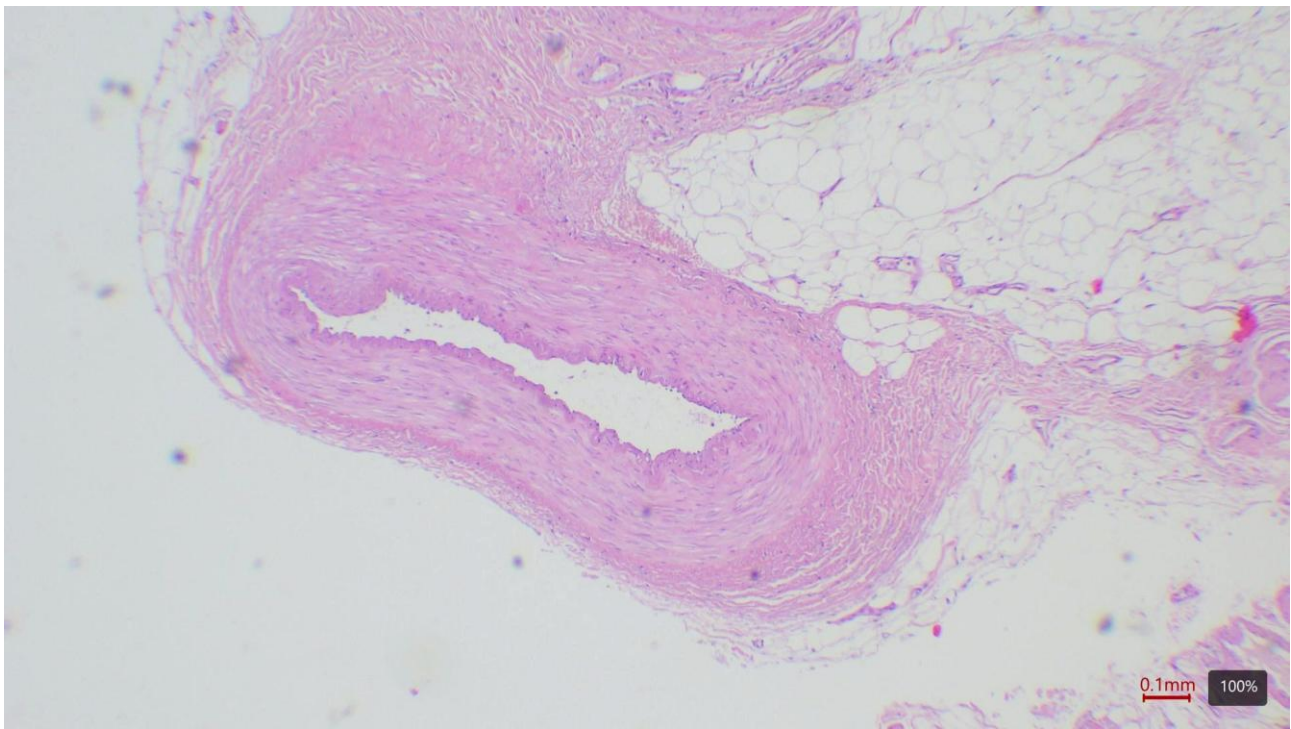
Stepen ateroskleroze	n	%
nema	5	8,9
I	19	33,9
II	19	33,9
III	7	12,5
IV	5	8,9
V	1	1,8
Ukupno	56	100,0



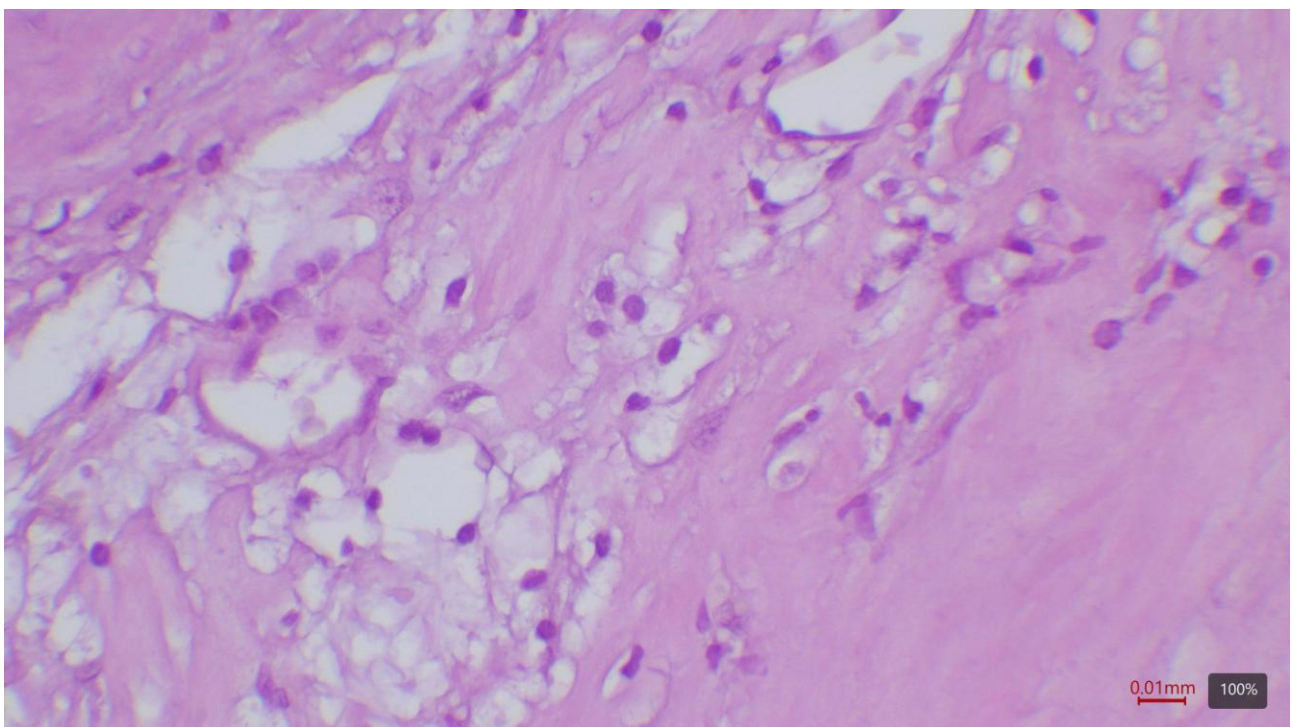
Slika 8. Bojenje hematoksilinom i eozinom;. desna koronarna arterija bez patoloških promena, uveličanje 4x



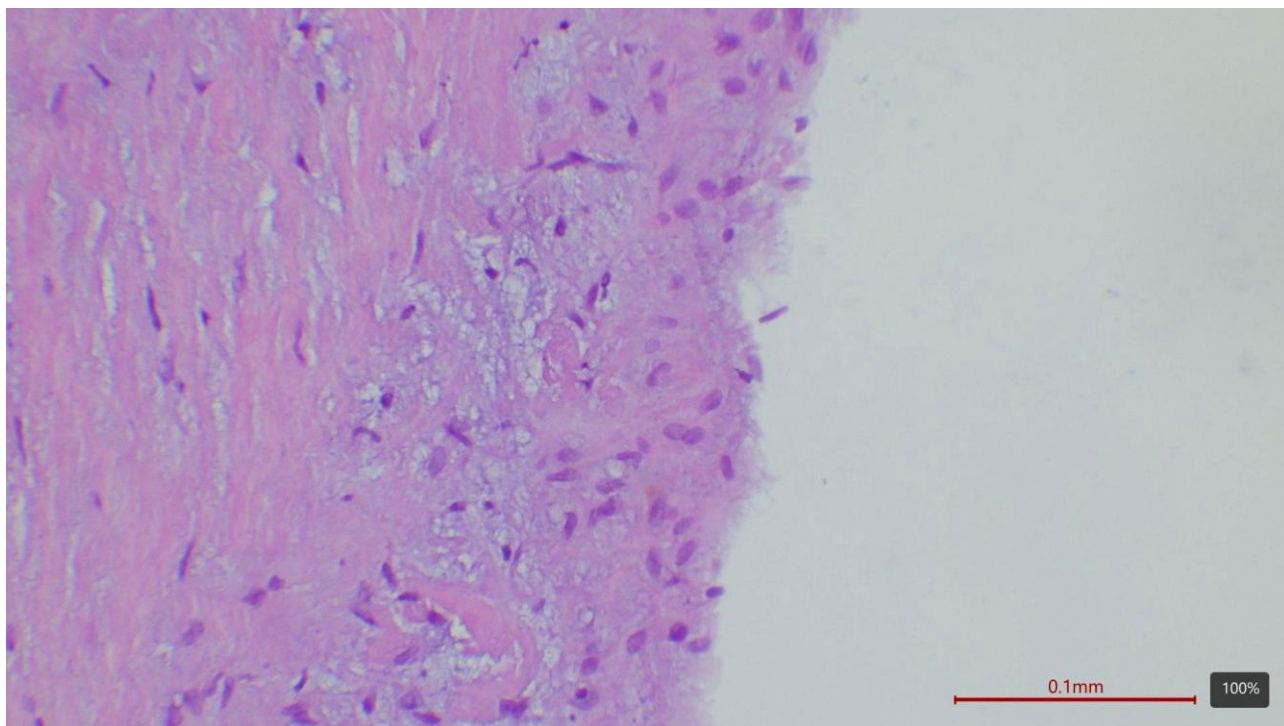
Slika 9. Bojenje hematoksilinom i eozinom; unutrašnja grudna arterija bez patoloških promena, uveličanje 4x



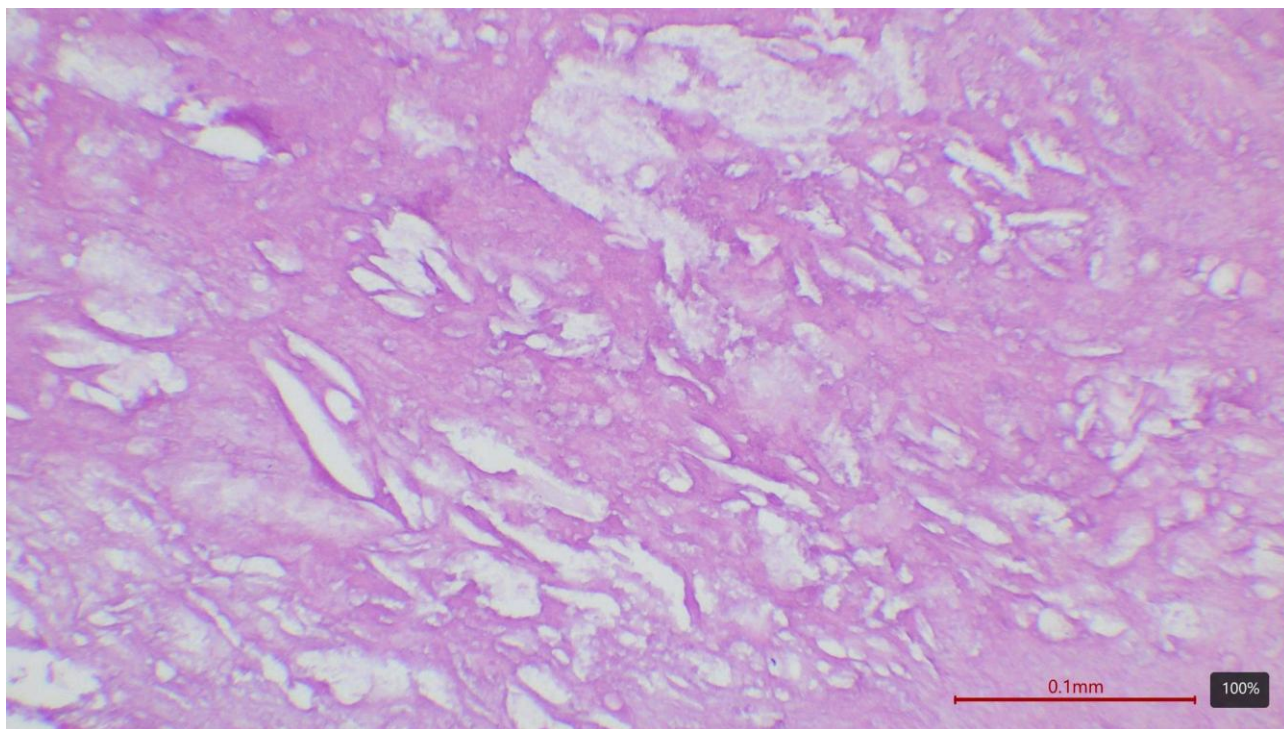
Slika 10. Bojenje hematoksilinom i eozinom; prednja nishodna grana leve koronarne arterije bez patoloških promena, uveličanje 4x



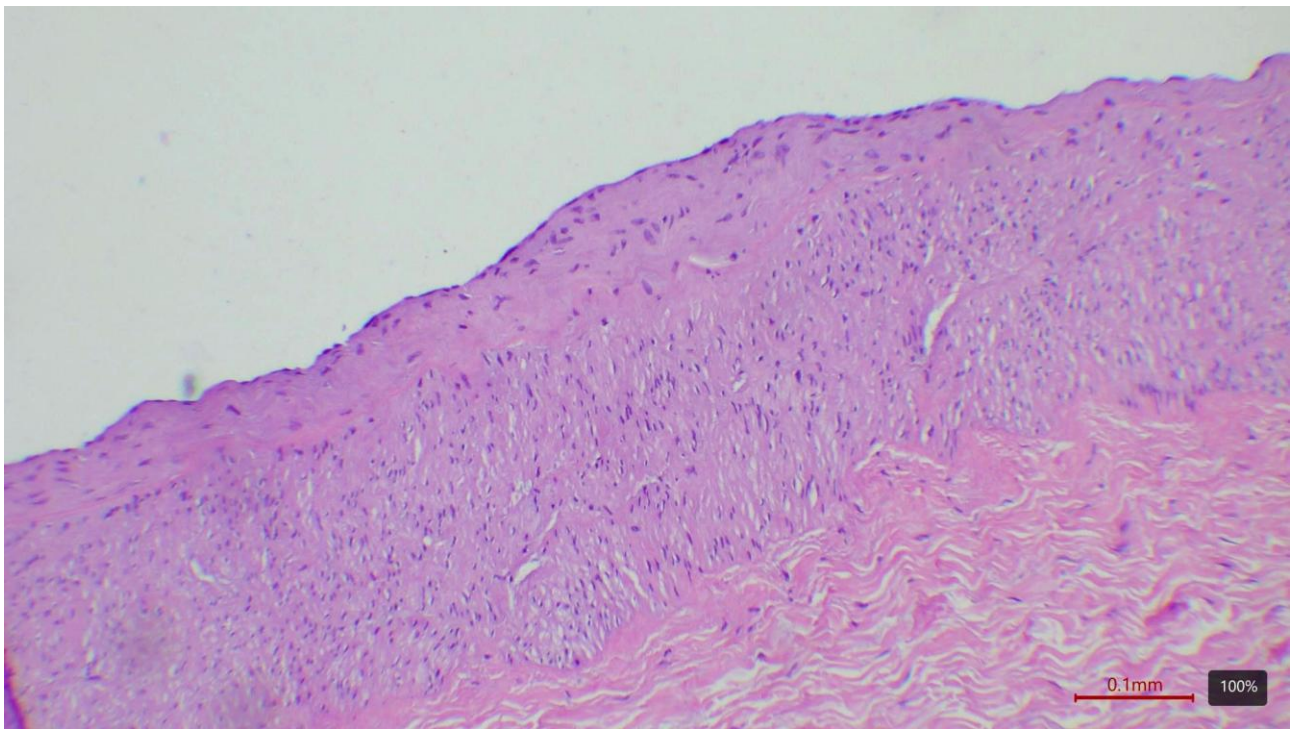
Slika 11. Bojenje hematoksilinom i eozinom; aorta sa brojnim penušavim makrofagima, uveličanje x40



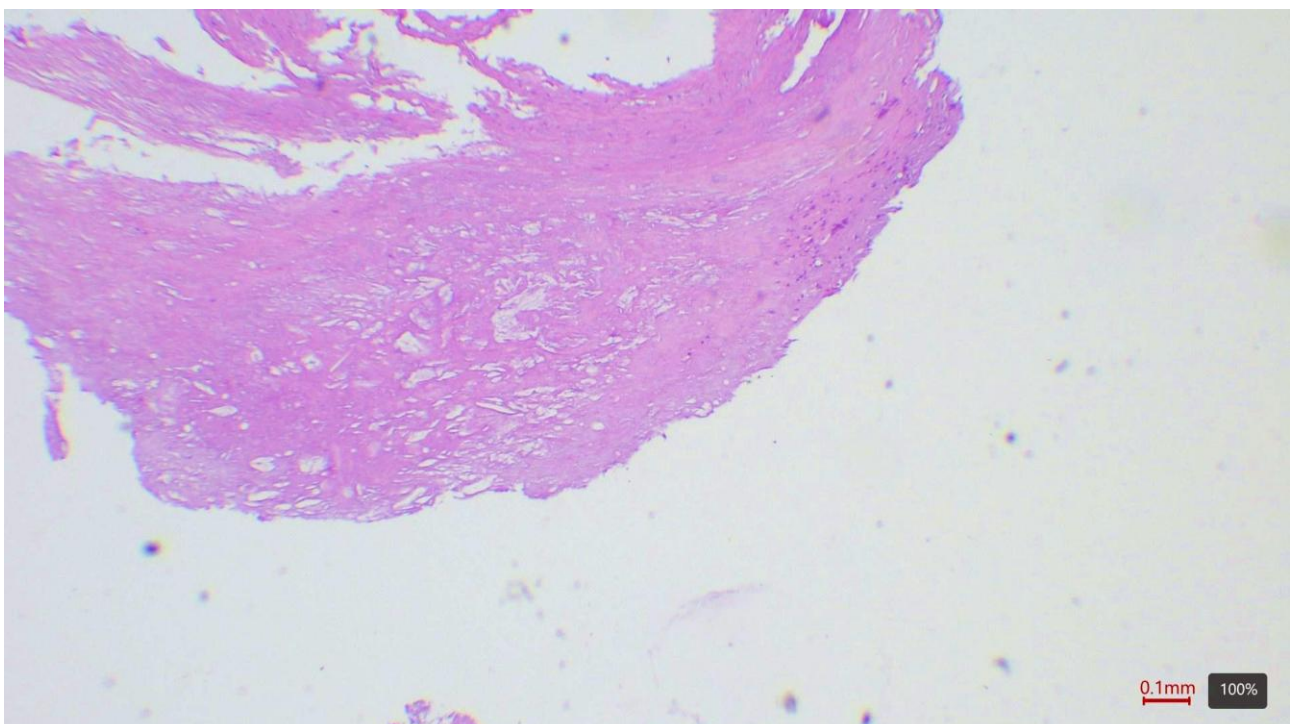
Slika 12. Bojenje hematoksilinom i eozinom; lezija tipa II masne ćelije i fibrointimalna proliferacija, uveličanje 20x



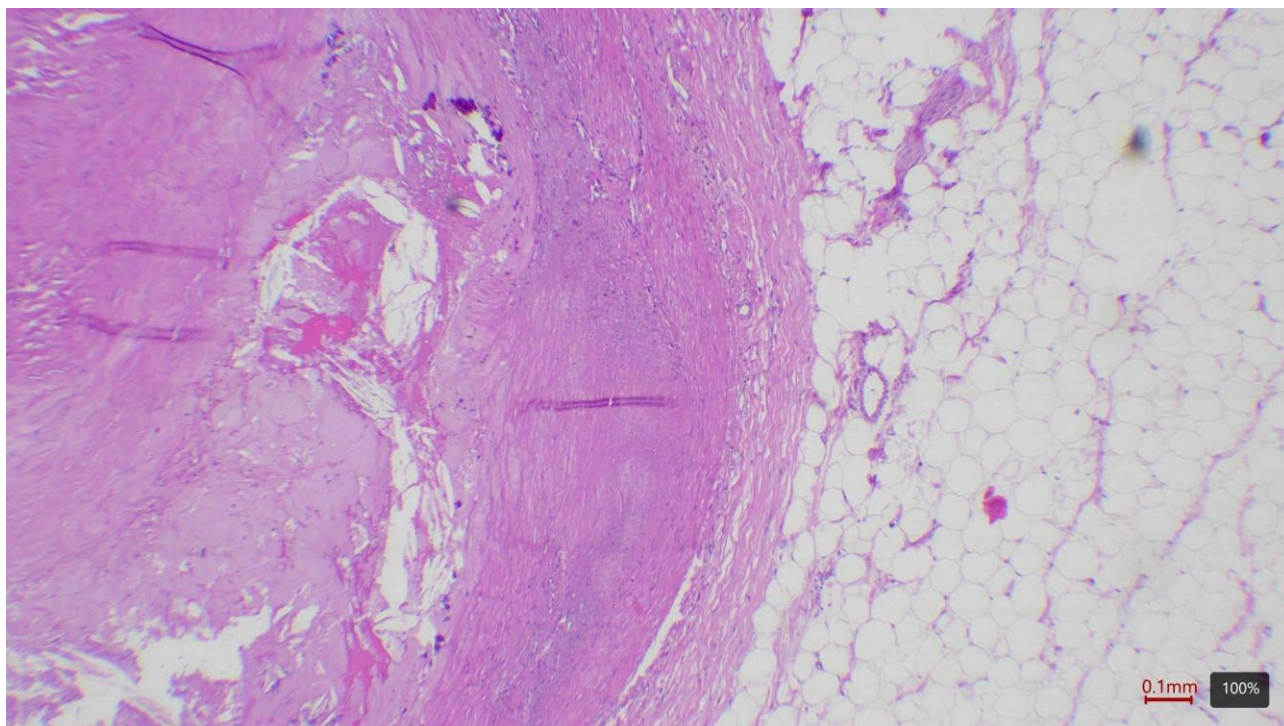
Slika 13. Bojenje hematoksilinom i eozinom; kristali holesterola u zidu aorte, uveličanje 20x



Slika 14. Bojenje hematoksilinom i eozinom; fibrointimalna proliferacija unutrašnje grudne arterije, uveličanje 10x

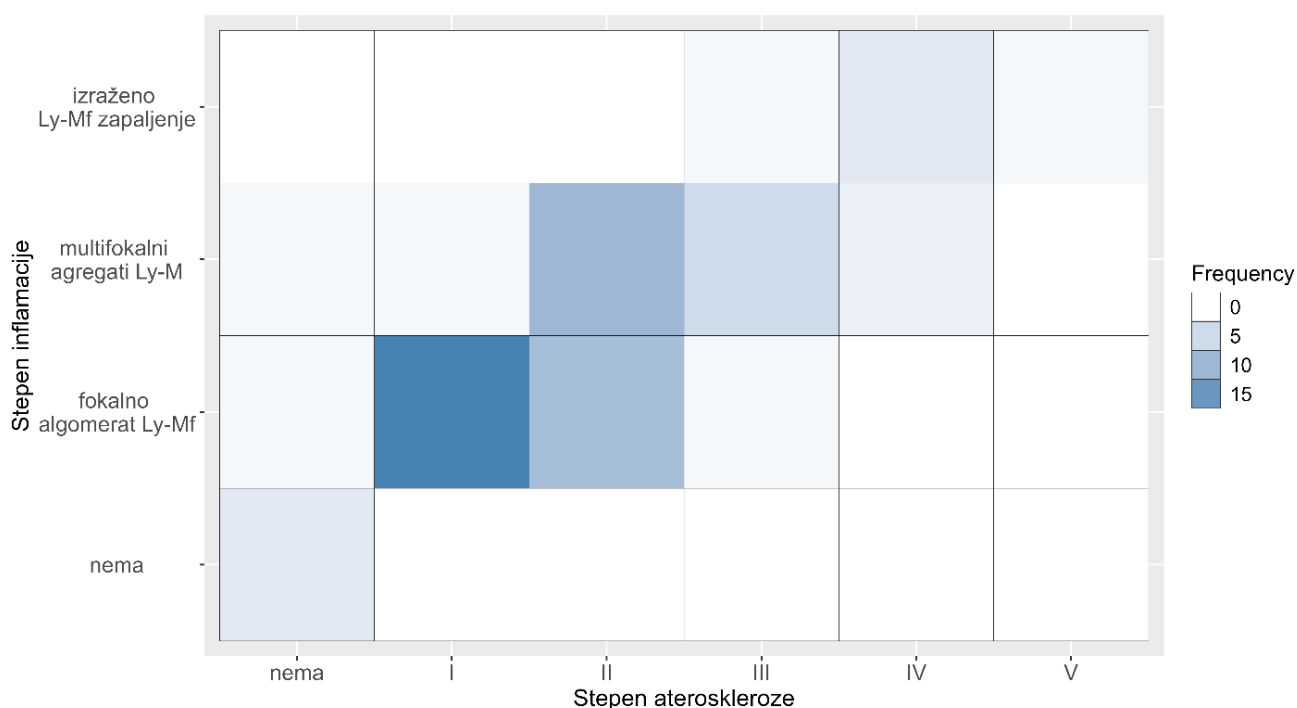


Slika 15. Bojenje hematoksilinom i eozinom; aorta sa fibroateromom, uveličanje 4x



Slika 16. Bojenje hematoksilinom i eozinom; prednja nishodna grana koronarne arterije sa aterosklerotskim lezijama tipa V, uveličanje 4x

Postoji statistički značajna jaka pozitivna povezanost stepena inflamacije i stepena ateroskleroze ($r_s=0,73$; $p<0,001$). Viši stepen inflamacije povezan je sa višim stepenom ateroskleroze (Grafikon 18).

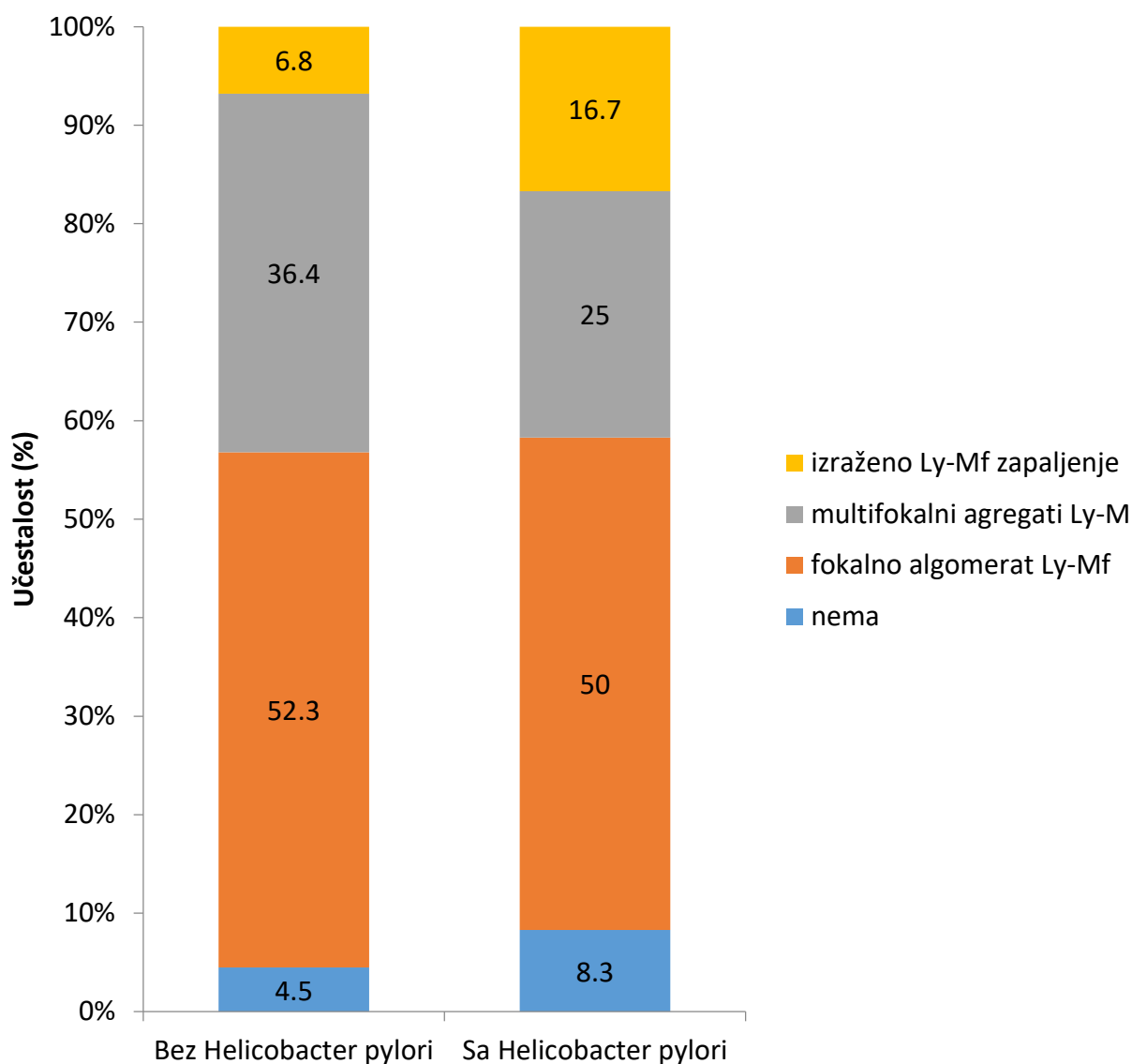


Grafikon 18. Slaganje stepena inflamacije sa stepenom ateroskleroze u uzorcima za HP analizu

4.4 POVEZANOST STEPENA INFLAMACIJE SA PRISUSTVOM DNK PATOGENIH MIKROORGANIZAMA

Kod uzoraka bez patogena i sa patogenom najčešće je detektovan fokalno aglomerat Ly-Mf stepen inflamacije (52,3% prema 50,0%, respektivno), prikazano na grafikonu 19 i Slika 13,14,15.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu inflamacije u odnosu na detekciju patogena na PCR (U=262,0; p=0,965).



Grafikon 19. Distribucija ispitanika prema stepenu inflamacije i PCR detekciji patogenih mikroorganizama

4.5 POVEZANOST STEPENA ATEROSKLEROZE SA PRISUSTVOM DNK PATOGENIH MIKROORGANIZAMA

Kod uzoraka bez patogena najčešće je detektovan I stepen ateroskleroze (40,9%), dok je kod uzoraka sa patogenom najčešće detektovan II stepen ateroskleroze (50,0%) što je prikazano u tabeli 11.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu ateroskleroze u odnosu na detekciju patogena ($U=175,0$; $p=0,064$).

Tabela 11. Distribucija ispitanika prema stepenu ateroskleroze i PCR detekciji patogenih mikroorganizama

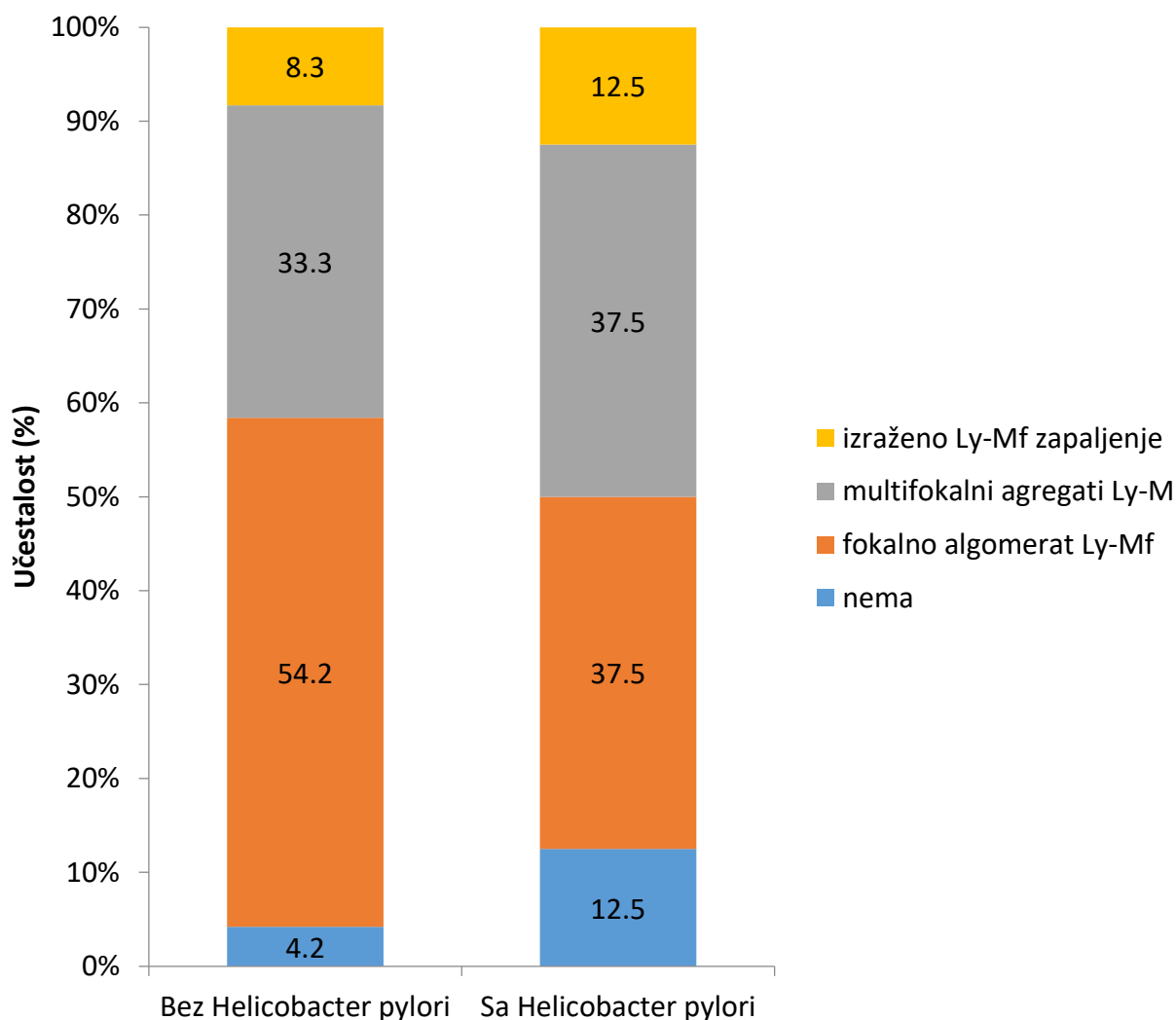
Stepen ateroskleroze	PCR bez patogena		PCR sa patogenom		p-vrednost
	n	%	n	%	
nema	4	9,1	1	8,3	0,064
I	18	40,9	1	8,3	
II	13	29,5	6	50,0	
III	6	13,6	1	8,3	
IV	3	6,8	2	16,7	
V	0	0,0	1	8,3	
Ukupno	44	100,0	12	100,0	

4.6 POVEZANOST POJEDINAČNIH PATOGENA (HELICOBACTER PYLORI, CHLAMYDIA PNEUMONIAE, CMV) SA STEPENOM INFLAMACIJE I ATEROSKLEROZE

4.6.1 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom Helicobacter pylori

Kod uzoraka bez Helicobacter pylori najčešće je detektovan fokalno aglomerat Ly-Mf stepen inflamacije (54,2%), dok su kod uzoraka sa Helicobacter pylori podjednako detektovani fokalno aglomerat Ly-Mf i multifokalni agregati Ly-M (po 37,5%), što je predstavljeno na grafikonu 20.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu inflamacije u odnosu na detekciju Helicobacter pylori na PCR ($U=184,0$; $p=0,836$).



Grafikon 20. Distribucija ispitanika prema stepenu inflamacije i PCR detekciji H. pylori

4.6.2 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom *Helicobacter pylori*

Kod uzoraka bez *Helicobacter pylori* najčešće je detektovan I stepen ateroskleroze (37,5%), dok je kod uzoraka sa *Helicobacter pylori* najčešće detektovan II stepen ateroskleroze (37,5%)., što je prikazano u tabeli 12.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu ateroskleroze u odnosu na detekciju *Helicobacter pylori* ($U=147,0$; $p=0,272$).

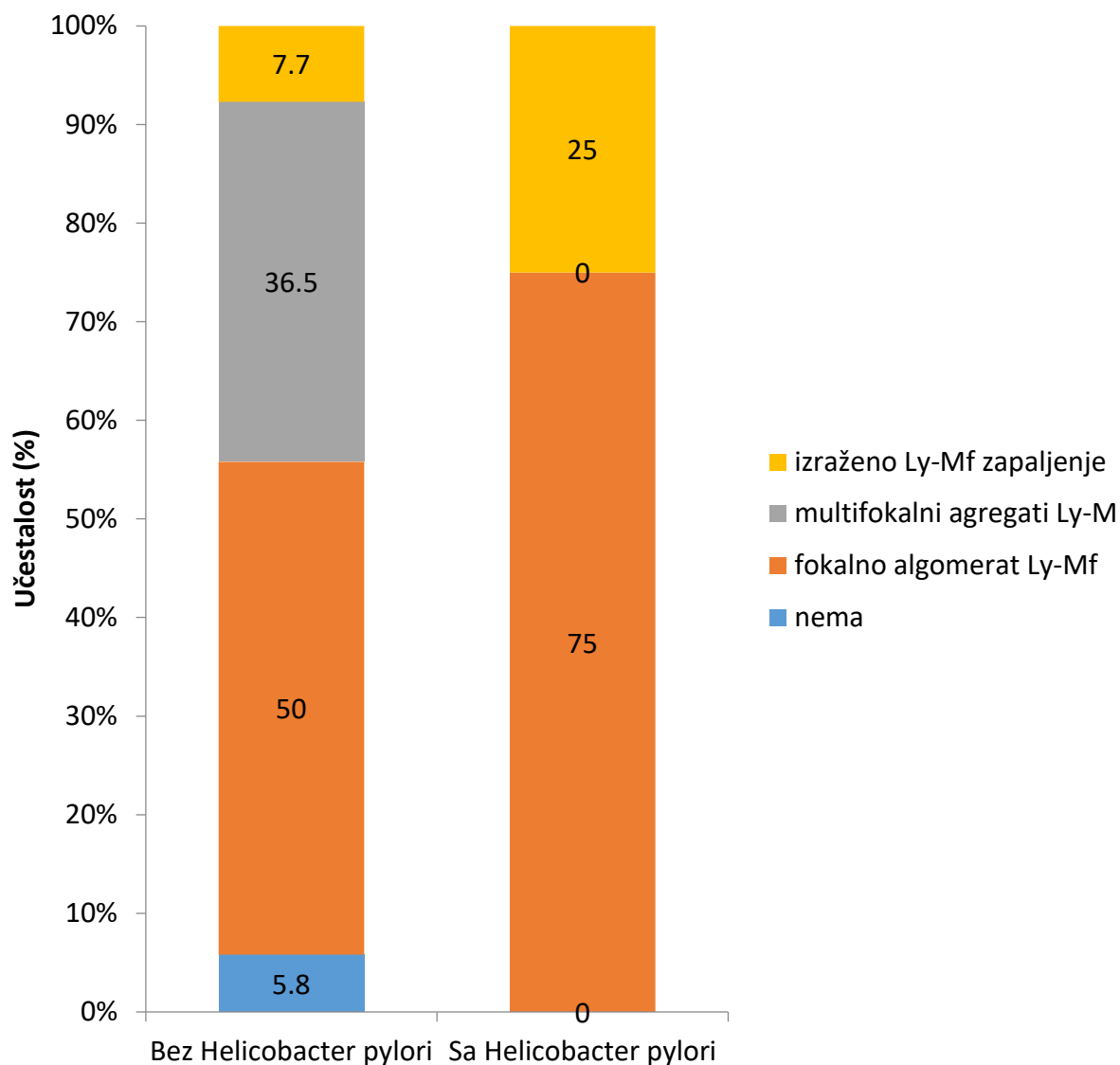
Tabela 12. Distribucija ispitanika prema stepenu ateroskleroze i PCR detekciji *H. pylori*

Stepen ateroskleroze	PCR bez <i>Helicobacter pylori</i>		PCR sa <i>Helicobacter pylori</i>		p-vrednost
	n	%	n	%	
nema	4	8,3	1	12,5	0,272
I	18	37,5	1	12,5	
II	16	33,3	3	37,5	
III	6	12,5	1	12,5	
IV	3	6,3	2	25,0	
V	1	2,1	0	0,0	
Ukupno	48	100,0	8	100,0	

4.6.3 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom Chlamydia pneumonia

Kod uzoraka bez Chlamydia pneumoniae i kod uzoraka sa Chlamydia pneumoniae najčešće je detektovan fokalno aglomerat Ly-Mf stepen inflamacije (50,0% prema 75,0%, respektivno), prikazano na grafikonu 21.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu inflamacije u odnosu na detekciju Chlamydia pneumoniae na PCR ($U=98,0$; $p=0,833$).



Grafikon 21. Distribucija ispitanika prema stepenu inflamacije i PCR detekciji C. pneumoniae

4.6.4 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom Chlamydia pneumoniae

Kod uzoraka bez Chlamydia pneumoniae najčešće je detektovan I stepen ateroskleroze (36,5%), dok je kod uzoraka sa Chlamydia pneumoniae najčešće detektovan II stepen ateroskleroze (75,0%), prikazano u tabeli 13.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu ateroskleroze u odnosu na detekciju Chlamydia pneumoniae (U=63,0; p=0,174).

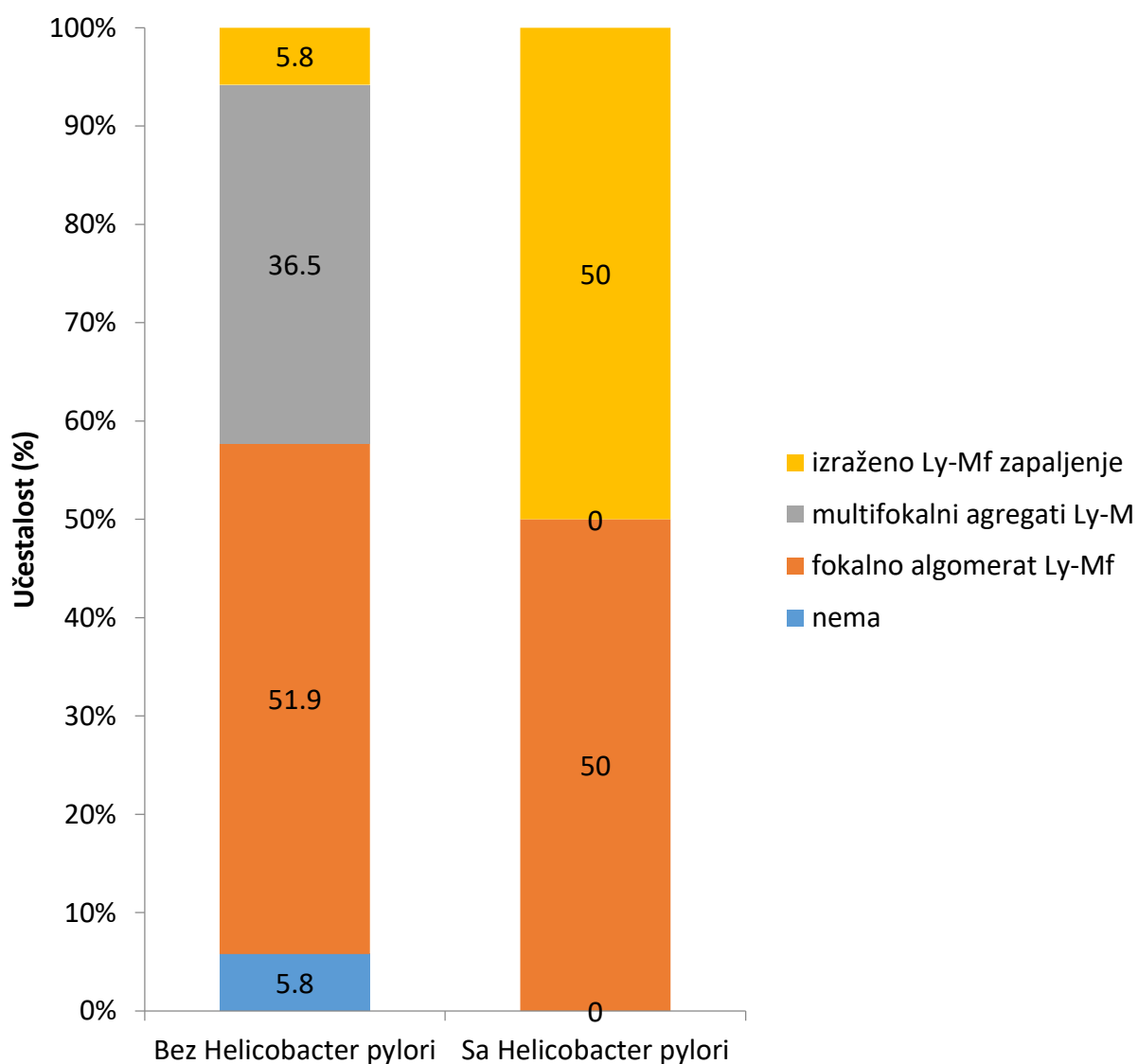
Tabela 13. Distribucija ispitanika prema stepenu ateroskleroze i PCR detekciji C. pneumoniae

Stepen ateroskleroze	PCR bez Chlamydia pneumoniae		PCR sa Chlamydia pneumoniae		p-vrednost
	n	%	n	%	
nema	5	9,6	0	0,0	0,174
I	19	36,5	0	0,0	
II	16	30,8	3	75,0	
III	7	13,5	0	0,0	
IV	4	7,7	1	25,0	
V	1	1,9	0	0,0	
Ukupno	52	100,0	4	100,0	

4.6.5 Povezanost stepena ateroskleroze sa prisustvom CMV

Kod uzoraka bez CMV najčešće je detektovan fokalno aglomerat Ly-Mf stepen inflamacije (51,9%), dok su kod ispitanika sa CMV podjednako bili zastupljeni fokalno aglomerat Ly-Mf i izraženo Ly-Mf zapaljenje (po 50,0%), predstavljeno na grafikonu 22.

Ne postoji statistički značajna razlika u stepenu inflamacije u odnosu na detekciju CMV ($U=74,0$; $p=0,292$).



Grafikon 22. Distribucija ispitanika prema stepenu inflamacije i PCR detekciji CMV

4.6.6 Povezanost stepena inflamacije sa prisustvom CMV

Kod uzoraka bez CMV najčešće je detektovan I stepen ateroskleroze (36,5%), dok je kod uzoraka sa CMV najčešće detektovani II stepen ateroskleroze (po 50,0%), predstavljeno u tabeli 14.

Postoji statistički značajna razlika u stepenu ateroskleroze u odnosu na detekciju CMV ($U=41,0$; $p=0,037$).

Ispitanici sa prisutnim CMV imaju značajno viši stepen ateroskleroze.

Tabela 14. Distribucija ispitanika prema stepenu ateroskleroze i PCR detekciji CMV

Stepen ateroskleroze	PCR bez CMV		PCR sa CMV		p-vrednost
	n	%	n	%	
Nema	5	9,6	0	0,0	0,037
I	19	36,5	0	0,0	
II	17	32,7	2	50,0	
III	7	13,5	0	0,0	
IV	4	7,7	1	25,0	
V	0	0,0	1	25,0	
Ukupno	52	100,0	4	100,0	

4.7 KORELACIJE DETEKTOVANIH VREDNOSTI PATOGENA SA STEPENOM INFLAMACIJE I ATEROSKLEROZE

Postoji statistički značajna slaba pozitivna povezanost detektovane vrednosti CMV i stepena ateroskleroze ($r_s=0,28$; $p=0,038$), prikazano u tabeli 15.

Više detektovane vrednosti CMV povezane su sa višim stepenom ateroskleroze.

Tabela 15. Distribucija ispitanika prema stepenu ateroskleroze i inflamacije i kvantitativnoj PCR detekciji i parametrima inflamacije

Variable		Stepen inflamacije	Stepen ateroskleroze
Helicobacter pylori	rs	0,02	0,14
PCR vrednost	p	0,892	0,318
Chlamydia pneumoniae	rs	-0,04	0,18
PCR vrednost	p	0,784	0,187
CMV	rs	0,14	0,28
PCR vrednost	p	0,318	0,038
CRP	rs	0,09	0,09
	p	0,514	0,489
Fibrinogen	rs	0,08	0,20
	p	0,548	0,136
SE	rs	0,19	0,20
	p	0,151	0,139

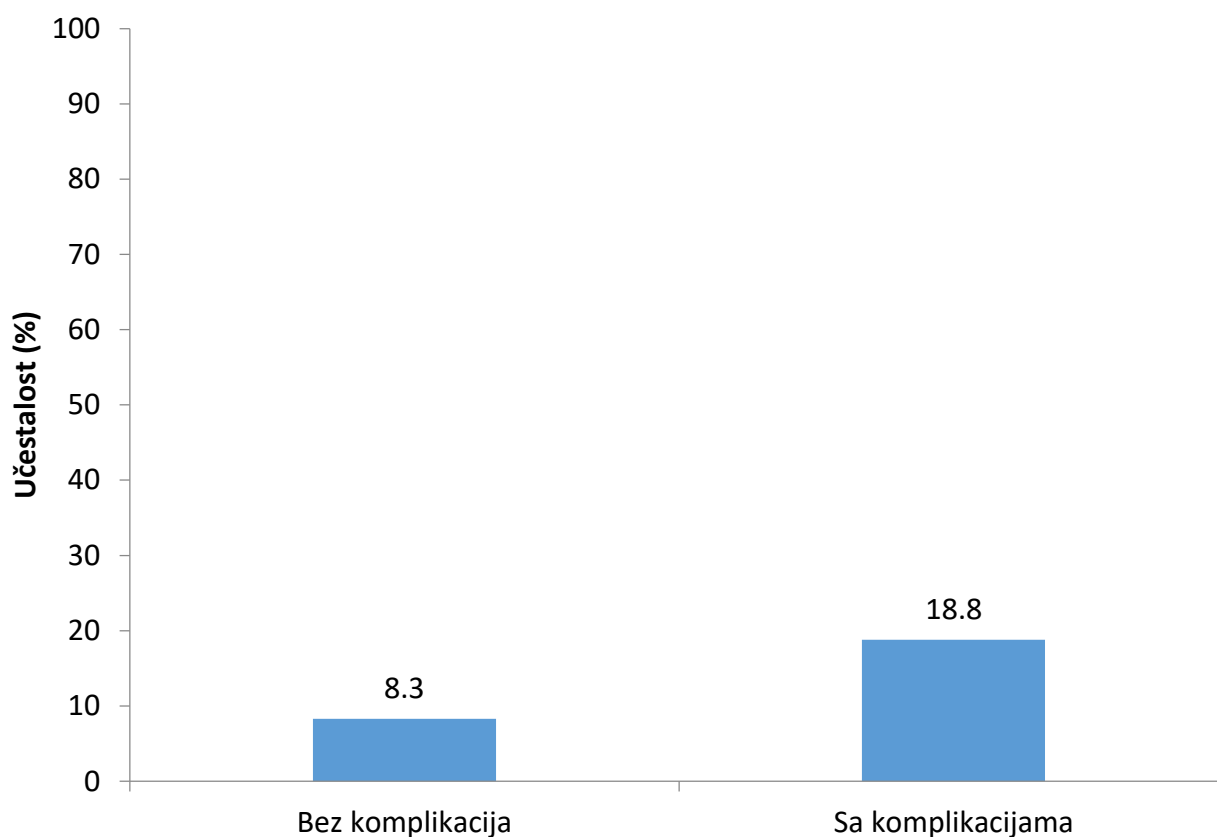
4.8 POVEZANOST PRISUSTVA PATOGENA SA POSTOPERATIVNIM KOMPLIKACIJAMA I SMRTNIM ISHODOM

4.8.1 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK H.pylori

Prisustvo DNK H.pylori imalo je 8,3% ispitanika bez komplikacija i 18,8% sa komplikacijama, što nije statistički značajna razlika (Fisherov test tačne verovatnoće; $p=0,444$), predstavljeno u tabeli 16 i na grafikonu 23.

Tabela 16. Distribucija ispitanika prema detekciji H. Pylori i prisustvu komplikacija

H.Pylori	Bez komplikacija		Sa komplikacijama	
	n	%	n	%
nema	22	91,7	26	81,3
ima	2	8,3	6	18,8
Ukupno	24	100,0	32	100,0



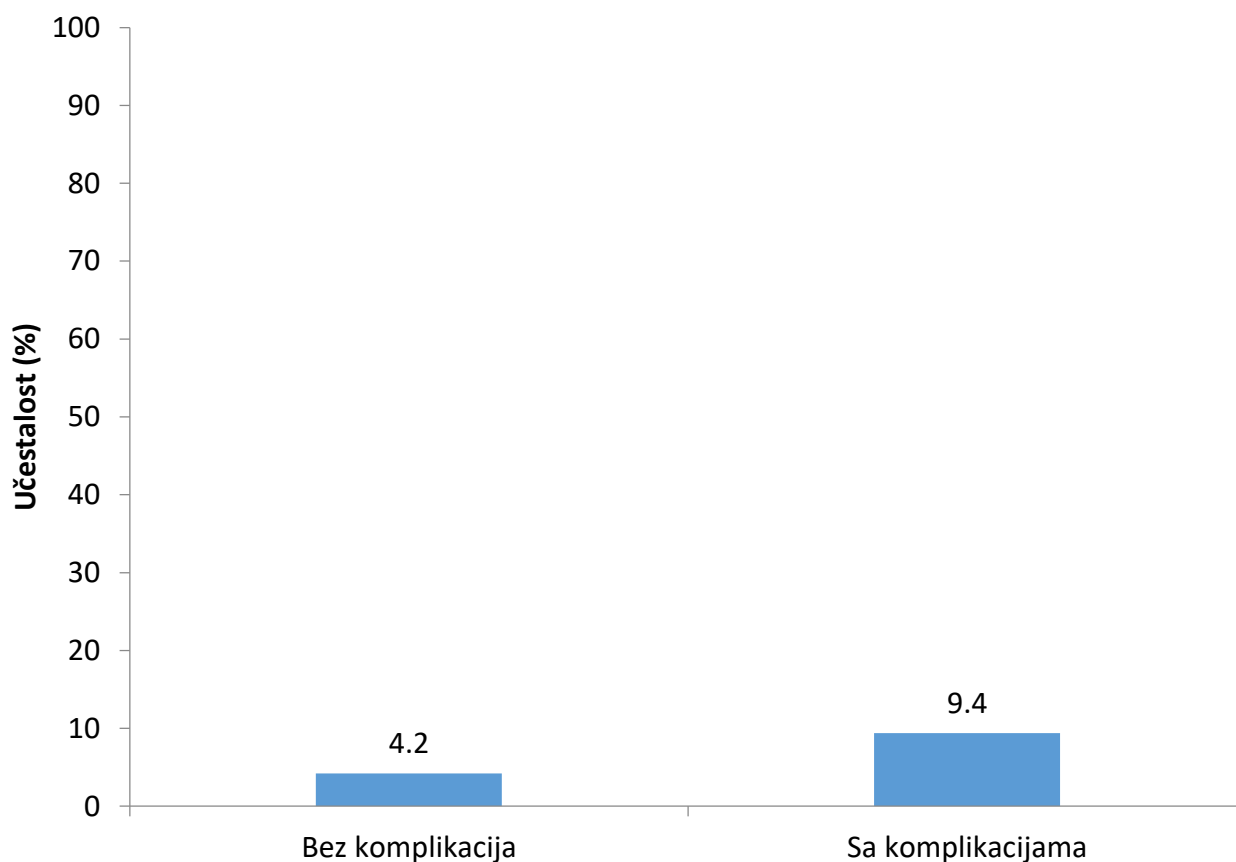
Grafikon 23. Distribucija ispitanika prema prisustvu komplikacija i PCR detekciji H. pylori

4.8.2 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK Chlamydia pneumoniae

Prisustvo DNK Chlamydia pneumoniae imalo je 4,2% ispitanika bez komplikacija i 9,4% sa komplikacijama, što nije statistički značajna razlika (Fisherov test tačne verovatnoće; $p=0,627$), prikazano u tabeli 17 i na grafikonu 24.

Tabela 17. Distribucija ispitanika prema detekciji Cpn i prisustvu komplikacija

Chlamydia pneumoniae	Bez komplikacija		Sa komplikacijama	
	n	%	n	%
nema	23	95,8	29	90,6
ima	1	4,2	3	9,4
Ukupno	24	100,0	32	100,0



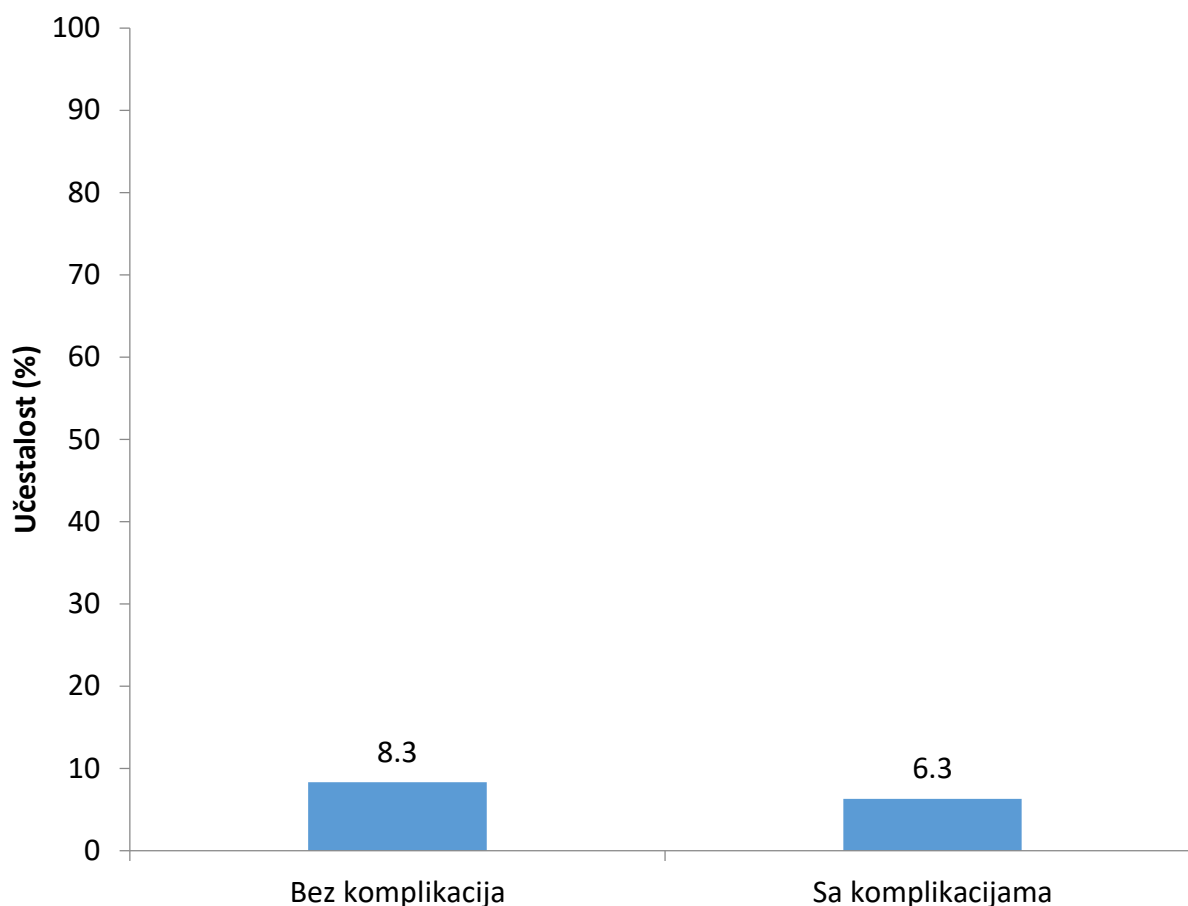
Grafikon 24. Distribucija ispitanika prema prisustvu komplikacija i PCR detekciji C. pneumoniae

4.8.3 Povezanost pojave komplikacija sa prisustvom DNK CMV

Prisustvo DNK CMV imalo je 8,3% ispitanika bez komplikacija i 6,3% sa komplikacijama, što nije statistički značajna razlika (Fisherov test tačne verovatnoće; $p=1,000$), prikazano u tabeli 18 i grafikonu 25.

Tabela 18. Distribucija ispitanika prema detekciji CMV i prisustvu komplikacija

CMV	Bez komplikacija		Sa komplikacijama	
	n	%	n	%
nema	22	91,7	30	93,8
ima	2	8,3	2	6,3
Ukupno	24	100,0	32	100,0



Grafikon 25. Distribucija ispitanika prema prisustvu komplikacija i PCR detekciji CMV

Od svih ispitanika uključenih u istraživanje, smrtni ishod imao je 1 (1,8%).

Zbog nepovoljnog odnosa broja ishoda i potencijalnih prediktora, ovaj ishod nije dodatno analiziran (Grafikon 26).



Grafikon 26. Distribucija ispitanika prema pojavi smrtnog ishoda

4.9 REGRESIONI MODELI

U linearnim regresionim modelima zavisne varijable su vrednosti laboratorijskih parametara, a nezavisne prisustvo *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* ili CMV (Tabela 19).

Tabela 19. Linearni regresioni modeli sa laboratorijskim parametrima kao zavisnim varijablama i prisustvom mikroorganizama kao nezavisnim varijablama

Zavisna varijabla	<i>Helicobacter pylori</i> prisustvo	<i>Chlamydia pneumoniae</i> prisustvo	CMV prisustvo
CRP	B=24,344 p=0,159	B=24,584 p=0,349	B=7,656 p=0,761
Fibrinogen	B=0,989 p=0,016*	B=-1,509 p=0,016*	B=1,136 p=0,057
SE	B=7,734 p=0,352	B= -37,796 p=0,004*	B=42,571 p=0,001*
Holesterol	B= -0,020 p=0,972	B= 0,314 p=0,708	B= -0,691 p=0,394
HDL	B=0,252 p=0,066	B= -0,252 p=0,225	B=0,070 p=0,726
LDL	B=-0,217 p=0,712	B= 0,364 p=0,685	B=-0,815 p=0,347
Trigliceridi	B=-0,380 p=0,346	B= 0,374 p=0,543	B=-0,071 p=0,904
Urea	B=1,693 p=0,064	B= 3,037 p=0,031*	B=-3,816 p=0,005*
Kreatinin	B=25,492 p=0,055	B= -5,641 p=0,777	B=-13,395 p=0,485
eGFR	B=-8,887 p=0,016*	B= 2 031 p=0,710	B= 5,088 p=0,335

U linearnim regresionim modelima sa laboratorijskim parametrima kao zavisnim varijablama i prisustvom mikroorganizama kao nezavisnim varijablama:

- Prisustvo *Helicobacter pylori* statistički značajno je povezano sa višim vrednostima fibrinogena (B=0,989; p=0,016) i nižim vrednostima eGFR (B=-8,887; p=0,016).
- Prisustvo *Chlamydia pneumoniae* statistički značajno je povezano sa nižim vrednostima fibrinogena (B=-1,509; p=0,016), nižim vrednostima SE (B=-37,796; p=0,004) i višim vrednostima uree (B=3,037; p=0,031).
- Prisustvo CMV statistički značajno je povezano sa višim vrednostima SE (B=42,571; p=0,001) i nižim vrednostima uree (B=-3,816; p=0,005).

Da bi se isključili mogući confounding faktori u regresionim modelima u sledećem koraku su u linearnim regresionim modelima gde su zavisne varijable vrednosti laboratorijskih parametara i nezavisne prisustvo *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* ili CMV kontrolisane za Starost, Pol i BMI (Tabela 20).

Tabela 20. Linearni regresioni modeli sa laboratorijskim parametrima kao zavisnim varijablama i prisustvom mikroorganizama kao nezavisnim varijablama kontrolisano za starost, pol i BMI

Zavisna varijabla	<i>Helicobacter pylori</i> prisustvo	<i>Chlamydia pneumoniae</i> prisustvo	CMV prisustvo
CRP	B=23,173 p=0,189	B=26,667 p=0,321	B=12,980 p=0, 610
Fibrinogen	B=1,070 p=0,010*	B=-1,288 p=0,039*	B=1,180 p=0,046*
SE	B=7,272 p=0,396	B= -37,045 p=0,006*	B=44,636 p=0,001*
Holesterol	B= -0,226 p=0,681	B= 0,099 p=0,906	B= -0,456 p=0,568
HDL	B=0,238 p=0,075	B= -0,227 p=0,261	B=0,119 p=0,533
LDL	B=-0,362 p=0,542	B= 0,270 p=0,766	B=-0,580 p=0,502
Trigliceridi	B=-0,476 p=0,242	B= 0,296 p=0,632	B=0,087 p=0,882
Urea	B=1,796 p=0,048*	B= 2,914 p=0,037*	B=-4,223 p=0,002*
Kreatinin	B=26,484 p=0,050*	B= -7,377 p=0,716	B=-17,143 p=0,375
eGFR	B=-9,447 p=0,014*	B= 1,122 p=0,844	B= 5,438 p=0,318

U linearnim regresionim modelima sa laboratorijskim parametrima kao zavisnim varijablama i prisustvom mikroorganizama kao nezavisnim varijablama, kontrolisano za starost, pol i BMI:

- Prisustvo *Helicobacter pylori* statistički značajno je povezano sa višim vrednostima fibrinogena (B=1,070; p=0,010), višim vrednostima uree (B=1,796; p=0,048), višim vrednostima kreatinina (B=26,484; p=0,050) i nižim vrednostima eGFR (B=-9,447; p=0,014).
- Prisustvo *Chlamydia pneumoniae* statistički značajno je povezano sa nižim vrednostima fibrinogena (B=-1,288; p=0,039), nižim vrednostima SE (B=-37,045; p=0,006) i višim vrednostima uree (B=2,914; p=0,037).
- Prisustvo CMV statistički značajno je povezano sa višim vrednostima fibrinogena (B=1,180; p=0,046), višim vrednostima SE (B=44,636; p=0,001) i nižim vrednostima uree (B=-4,223; p=0,002).

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji je izvršeno detaljno ispitivanje prisustva patogenih mikroorganizama u makroskopski aterosklerotski neizmenjenim segmentima krvnih sudova koji se najčešće koriste kao materijal za graft pri hirurškoj revaskularizaciji miokarda kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom bolešću. Nakon sprovedenih histopatoloških, imunohistohemijskih i PCR analiza, u određenom broju uzoraka koronarnih arterija, aorte i unutrašnjih grudnih arterija je utvrđeno prisustvo HP, Cpn i CMV.

Prisustvo mikroroganizama bilo je statistički značajno povezano sa nivoom inflamatornog odgovora kod ispitanika. Naime, nalaz DNK HP u krvnom sudu bio je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom fibrinogena, a negativno je korelirao sa eGFR. Sa druge strane, Cpn prisustvo bilo je u negativnoj korelaciji sa nivoom fibrinogena i ESR, a pozitivno povezano sa nivoom uree. Identifikovani CMV je bio u pozitivnoj korelaciji sa nivoom fibrinogena, ESR i uree kod ispitanika.

Rezultati studije su učvrstili pretpostavku da je ateroskleroza u osnovi hronični inflamatorni proces [38,162], kao i ideju da infektivni agensi mogu imati značajan uticaj na razvoj i napredovanje ateroskleroze [128].

Ispitanici uključeni u studiju su bili pacijenti sa potvrđenom dijagnozom višesudovne koronarne arterijske bolesti kojima je indikovana hirurška revaskularizacija miokarda. U uzorku su dominirali muškarci, starije životne dobi što je u skladu sa epidemiološkim podacima za ishemijsku bolest srca i hiruršku revaskularizaciju miokarda navedenim u velikim studijama, kao i u nacionalnim registrima za akutni koronarni sindrom [11,163].

Ishemijska bolest srca je oboljenje koje se u proseku kod muškaraca javlja u mlađoj životnoj dobi u odnosu na žene, i učestalost i težina bolesti su u porastu u starijim uzrastnim grupama, pre svega zbog produžene izloženosti faktorima rizika i razvoja komorbiditeta. Sa druge strane, učestalost kardiovaskularnih oboljenja kod osoba ženskog pola je često potcenjena, kako zbog uvreženog mišljenja (pacijenata i zdravstvenih radnika) da se ishemijska bolest srca retko viđa kod ženskih osoba, tako i zbog neprepoznatih simptoma kod mlađih žena, ili atipične prezentacije u postmenopauzalnom periodu [164,165].

Još jedan pokazatelj moguće potcenjenosti teških formi koronarne bolesti kod osoba ženskog pola predstavlja i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti na globalnom nivou [8], gde se uočava da je ishemijska bolest srca odgovorna za procentualno više smrtnih ishoda kod žena nego kod muškaraca (45% nasuprot 39%).

Pored neadekvatnog prepoznavanja, veliki izazov u Srbiji je i pravilna registracija akutnih koronarnih događaja, pa se u izveštaju Instituta za javno zdravlje Batut za period 2006-2022 [166] navodi da su glavni uzrok KVB smrtnosti druga kardiovaskularna oboljenja, dok se ishemijska bolest srca i arterijska hipertenzija pojedinačno navode samo u oko 20% slučajeva, što je značajno niže nego u drugim zemljama Evrope i sveta. U okviru IBS, akutni koronarni sindrom je odgovoran za približno polovinu smrtnih ishoda. Muškarci u većini uzrastnih kategorija čine 75% od ukupnog broja novoobolelih i umrlih od AKS.

Najčešći komorbiditeti u ovoj studiji su bili arterijska hipertenzija, mitralna i trikuspidalna regurgitacija, kao i kongestivna srčana slabost. U većini slučajeva, kod ispitanika je bila ustanovljena prekomerna telesna težina tj gojaznost, a oko 40% su bili aktivni pušači u vreme revaskularizacije miokarda. Trećina ispitanika je imala potvrđen dijabetes, a petina je imala oštećenja bubrežne funkcije.

Arterijska hipertenzija je jedan od osnovnih promenljivih faktora rizika za razvoj i progresiju ishemijske bolesti srca, gde sa porastom mehaničkog stresa na zidove arterija dolazi do endotelne disfunkcije, inflamacije i ubrzanja ateroskleroze, sa posledičnom hipertrofijom leve komore, i disbalansom potreba i raspoloživosti kiseonika u miokardu [167]. U poslednjih 30 godina došlo je

do značajnog porasta incidence i prevalence arterijske hipertenzije, pre svega u zemljama istočne Evrope, jugoistočne Azije i zapadnog Pacifika. Uprkos postojanju mera primarne sekundarne i tercijarne prevencije, bolest često ostaje dugo nedijagnostikovana ili neprepoznata zbog minimalnih ili nespecifičnih simptoma i niske stope zdravstvene prosvete stanovništva [168]. Smatra se da u Srbiji približno 40% odrasle populacije ima povišeni krvni pritisak ali samo 60% od njih koristi terapiju [169].

U našem uzorku oko 45% ispitanika je imalo prekomernu telesnu težinu (44,6%) ili su spadali u kategoriju gojaznih (21,4%) prema BMI kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije [159]. Nivo BMI nije bio značajno povezan sa stepenom stenoze koronarnih krvnih sudova.

Prema podacima iz istraživanja zdravlja stanovništva Srbije [170], 2019. godine je samo 40% osoba starijih od 15 godina imalo normalnu telesnu težinu, dok je više od 50% imalo prekomernu telesnu težinu. U istom istraživanju, oko 12 % predgojaznih i 18% gojaznih je navelo da boluje od kardiovaskularnih oboljenja. Veza između gojaznosti i stepena težine koronarne bolesti, kako u pogledu nivoa stenoze tako i broja zahvaćenih sudova, je pokazana u više istraživanja ali je upitna vrednost BMI kao najboljeg parametra gojaznosti, stoga naši rezultati ne predstavljaju iznenađenje [171-174].

Diabetes mellitus je bio prisutan kod trećine ispitanika u našem istraživanju, što je u skladu sa istraživanjima u svetu, koja su pokazala da je učestalost dijabetesa u populaciji CABG pacijenata 30-40% [175]. U studiji sprovedenoj u Pakistanu, nađeno je da čak dve trećine CABG pacijenata boluje i od dijabetesa [176].

Dijabetes je čest pratilac ishemijske bolesti srca i odgovoran je za razvoj koronarne ateroskleroze, veću učestalost stenoze LAD i infarkta miokarda, i čak tri puta veći mortalitet od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na opštu populaciju. Značajno utiče i na pojavu perioperativnih komplikacija kod pacijenata sa hirurškom revaskularizacijom miokarda, pre svega na pojavu infekcije, poremećaja bubrežne funkcije i poremećaja srčanog ritma (atrijalna fibrilacija) [177-179].

Procenjuje se da u R. Srbiji od dijabetesa boluje oko 700.000 osoba (12,2% odraslog stanovništva), pri čemu oko trećina obolelih nema postavljenu dijagnozu. Učestalost dijabetesa raste nakon 65. godine života, ali tada se i teže otkriva i češće je praćen KV komplikacijama [180].

U našoj studiji stenoza koronarnih arterija najčešće je konstatovana na LAD (94,6% slučajeva), pri čemu je 44 ispitanika imalo zahvaćene tri ili četiri koronarne arterije. Najznačajnije promene (stenoza preko 90% lumena) su primećene na RCA (37,5% ispitanika) i LAD (16,1% ispitanika).

Hirurška revaskularizacija miokarda (eng. *Coronary artery bypass grafting, CABG*) spada u najčešće kardiohirurške procedure i predstavlja zlatni standard u terapiji višesudovne koronarne bolesti, posebno u slučajevima trosudovne bolesti ili zahvatanja glavnog stabla leve koronarne arterije [181]. Više studija je pokazalo prednosti u odnosu na perkutane koronarne intervencije, pre svega u preživljavanju i učestalosti neželjenih događaja. Danas se smatra da će hibridni pristup, tj primena CABG za LAD promene i PCI za ne-LAD arterije još više olakšati terapiju višesudovne bolesti, sa istom prognozom uz manje komplikacija i brži oporavak pacijenta [182-185].

Postoperativne komplikacije su nastale kod 57,1% ispitanika, obično u ranoj fazi oporavka (48,2%). Pleuralni izliv je dijagnostikovao kod 16 ispitanika (28,6%), a atrijalna fibrilacija kod 11 ispitanika (19,6%). Smrtni ishod se desio kod jednog ispitanika.

Hirurška revaskularizacija miokarda je visoko rizična procedura koja u prvih 30 dana po operaciji može biti praćena visokim stopama morbiditeta (14%) i mortaliteta (2%).

U ranom postoperativnom periodu moguća je respiratorna insuficijencija, CVI, infekcija urinarnog trakta, bubrežna insuficijencija, koagulopatija, ishemija ekstremiteta, pleuralni izliv, dehiscencija rane kao i poremećaji srčanog ritma (atrijalna fibrilacija) [186].

Atrijalna fibrilacija se registruje kod 5-40% pacijenata uglavnom u prvih 4 dana postoperativnog oporavka, sa najvišom incidencijom tokom drugog dana od operacije. AF dovodi do značajnog

poremećaja hemodinamike i porasta rizika od kongestivne srčane insuficijencije i tromboembolije, kao i do smanjenog petogodišnjeg preživljavanja. Rizik od nastanka AF je veći kod starijih pacijenata, sa HTA, HOBP, pre ili postoperativnom bubrežnom insuficijencijom [187-190].

U studijama koje su pratile rane i kasne postoperativne komplikacije hirurške revaskularizacije miokarda, nađeno je da preoperativni faktori rizika, poput arterijske hipertenzije, dislipidemija, dijabetesa i pozitivne porodične anamneze imaju veliki uticaj na pojavu komplikacija. Ovi faktori rizika se češće uočavaju kod kandidata za CABG ženskog pola, što utiče i na češću pojavu neželjenih kardiovaskularnih događaja (eng. *major adverse cardiovascular events, MACE*), ali ne i niže stope preživljavanja [163,185].

Prethodne studije su dale dokaze da su HP, Cpn i CMV značajno povezani sa progresijom aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti, pre svega koronarne arterijske bolesti [75].

Istraživači su se u početku fokusirali na indirektnu detekciju patogena (specifična IgM i IgG antitela u telesnim tečnostima), u akutnoj ili hroničnoj infekciji, a kasnije su primenom različitih tehnika, pre svega, imunohistohemijskih bojenja (IHH), PCRa, in situ hibridizacije (ISH) i elektronske mikroskopije dokazale prisustvo mikroba direktno u aterosklerotskim plakovima i (u manjem obimu) u arterijskim segmentima bez klinički detektovanih aterosklerotskih lezija.

PCR metoda detekcijom DNK/RNK mikroorganizama pokazuje visoki stepen senzitivnosti i specifičnosti, sa mogućnošću brze dijagnostike i kvantifikacije rezultata. Ograničenja su vezana za lažno pozitivne rezultate (usled kontaminacije, prisustva mrtvih mikroorganizama) ili lažno negativne rezultate (prisustvo inhibitora PCR amplifikacije) [192].

Sa druge strane, IHH detekcijom antigena ukazuje na prisustvo vijabilnih mikroorganizama, i pokazati lokaciju u segmentima arterija, ali ima nižu senzitivnost u odnosu na PCR metode [193].

U našem istraživanju HP DNK je pronađena kod 14%, CMV kod 7%, a Cpn kod 7% ispitanika, sa sličnom distribucijom u koronarnim arterijama i unutrašnjim grudnim arterijama, ali ne i u segmentima aorte bez vidljivih aterosklerotskih promena. Sa druge strane, imunohistohemijska analiza na CMV i HP je pokazala HP antigena na 13 uzoraka krvnih sudova, dominantno na uzorcima a.mammaria interna-e (13,7% ukupnog broja uzoraka). CMV antigen je nađen na dva uzorka (a. mammaria interna, aorta). Kod dva pacijenta HP antigen je nađen na dva uzorka krvnih sudova (Ao i IMA, odnosno LAD i IMA).

Cpn je u velikom broju istraživanja detektovana u aterosklerotskim plakovima pacijenata sa simptomatskom CAD. IHH je pokazala najveći broj pozitivnih nalaza, praćena PCR i drugim tehnikama. Često je viđena neusaglašenost između IHH i PCR nalaza, sa preklapanjem u samo 40% slučajeva. Razlog je verovatno nejednaka distribucija Cpn, kao i prisustvo tkivnog inhibitora PCR u aterosklerotskim plakovima. U slučaju CMV, moguće da je latentna forma virusa izmiče detekciji [194,195].

U velikoj meta-analizi 44 studije o prevalenciji mikroorganizama u aterosklerotskim plakovima koronarnih arterija kod pacijenata sa CAD, HP je prepoznat u 19%, CMV u 29% i Cpn u skoro 43% ateroma [155].

Metaanaliza iz 2020. godine otkrila je da je prevalencija Cpn, HP i CMV kod pacijenata sa CAD iznosila 25,1%, 2,8% i 64,4% respektivno [75]. Kovalski i dr. identifikovao HP u aterosklerotskim lezijama kod 48% pacijenata sa CAD [196].

Reszka i saradnici su analizirali uzorke neaterosklerotičnih segmenata aorte kod pacijenata sa trosudovnom koronarnom bolešću u poređenju sa segmentima aorte pacijenata sa oboljenjem aortnog zaliska i utvrdili veoma visoku prevalenciju HP DNK u obe grupe (80% naspram 85%). Cpn je nađena u 25% uzoraka kandidata za zamenu aortne valvule nasuprot 27,5% uzoraka pacijenata sa CAD. CMV je viđen u 50% nasuprot 55% uzoraka, što ih je dovelo do zaključka da prisustvo DNK HP, CMV i Cpn u naizgled zdravim segmentima aorte nije od značaja za CAD [197].

Iriz i saradnici su analizirali uzorke biopsije uzetih iz aorte i unutrašnje grudne arterije za CABG kod pacijenata sa CAD u poređenju sa kontrolnom grupom bez CAD [198]. PCR u realnom vremenu je pokazao da 26% ovih pacijenata ima *Helicobacter pylori* DNK u aorti, ali ne i u segmentima unutrašnje grudne arterije, niti u segmentima aorte u kontrolnoj grupi. Većina HP-pozitivnih pacijenata zahtevala je hitnu CABG i imali su povišen CRP, broj leukocita u krvi, holesterol i LDL-C i HDL-C holesterol u poređenju sa HP-negativnim pacijentima i kontrolama [198]. U drugoj studiji iste istraživačke grupe [199], istraživano je prisustvo DNK Cpn, CMV i *Mycoplasma pneumoniae* kod pacijenata kod kojih je rađen CABG, i pronađena je DNK C. *pneumoniae* u uzorkovanim segmentima aorte, kao i veza sa stepenom periferne arterijske bolesti kod ovih pacijenata. Nisu nađeni drugi mikroorganizmi, posebno ih nije bilo u segmentima unutrašnjih grudnih arterija. Autori su pretpostavili da unutrašnja grudna arterija nije bila zahvaćena zbog potencijalne otpornosti na aterosklerozu koja se pripisuje povišenoj sintetazi azot oksida, enzima koji konvertuje angiotenzin i ekspresiji receptora endotelina A u ovoj arteriji.

Izadi i saradnici su analizirali aterosklerotski izmenjene segmente koronarnih arterija i segmente unutrašnjih grudnih arterija 105 pacijenata koji su prošli CABG i došli do sličnog rezultata, 29,5% aterosklerotskih plakova je bilo pozitivno na HP DNK, dok segmenti unutrašnje grudne arterije kod istih pacijenata nisu imali identifikovanu HP DNK [97]. Njihova drugo istraživanje se fokusiralo na detekciju CMV DNK kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom i otkrila je da je 27% uzoraka koronarnih arterija sa aterosklerozom pozitivno, dok segmenti grudnih arterija svi bili negativni na prisustvo CMV. Prisustvo CMV je značajno koreliralo sa pojavom akutnog koronarnog sindroma [135].

Kilić i saradnici su analizirali post mortem uzorke koronarnih arterija, karotidnih arterija i abdominalne aorte pacijenata sa aterosklerozom III stepena na prisustvo DNK HP i CMV. Pronašli su HP DNK u 48,2% aterosklerotičnih uzoraka i u 19,6% zdravih vaskularnih uzoraka, sa značajno većim stopama u ateromatozno izmenjenim koronarnim arterijama i aorti, ali sličnim stopama u karotidnim arterijama sa i bez plakova. Takođe su otkrili visoke stope CMV u oba tipa uzoraka (38% nasuprot 33%), bez statistički značajne razlike. Osnovni zaključak je bio da postoji potencijalna povezanost prisustva HP u zidu arterija i progresije ateroskleroze [200].

Heybar i saradnici su poredili pacijente kandidate za CABG sa značajnom koronarnom stenozom i znacima ateroskleroze luka aorte sa pacijentima sa valvularnim manama bez ateroskleroze i koronarne stenozе na prisustvo DNK Citomegalovirusa. Otkrili su CMV DNK u 14,5% uzoraka aterosklerotične aorte pacijenata sa CAD i 4% uzoraka neaterosklerotične aorte kontrola, što sugerise da je CMV povezan sa visokim rizikom od ateroskleroze. Nije otkrivena CMV DNK u zdravim uzorcima aorte kod pacijenata sa CAD [138].

Meta-analiza Jia i saradnika iz 2017 je obuhvatila 30 do tada publikovanih istraživanja iz oblasti veze CMV infekcije i rizika od ateroskleroze, i pokazala je da su pozitivne stope CMV IgG, IgM, genomske DNK i proteina pp65 bile veće kod ispitanika sa aterosklerozom i da postoji statistički značajna povezanost CMV infekcije i rizika od razvoja i progresije ateroskleroze [201].

Taylor-Robinson i saradnici analizirali su prisustvo Cpn DNK u krvnim sudovima pacijenata koji su prošli CABG, i utvrdili su veću učestalost Cpn u aterosklerotski izmenjenim segmentima ascendentne aorte, unutrašnje grudne arterije i vene safene magne (lat v) u odnosu na neizmenjene arterijske i venske segmente sa zaključkom da postoji značajna asocijacija prisustva DNK Cpn i prisustva ateroskleroze u krvnim sudovima [202].

Adiloglu i saradnici su, sa druge strane, dokazali Cpn DNK u 14% uzoraka aterosklerotski izmenjenih koronarnih krvnih sudova, dok je HP DNK nađena u 21% koronarnih aterosklerotičnih plakova ali i u 7% zdravih segmenata unutrašnje grudne arterije, pokazujući da ova arterija nije potpuno bezbedna od HP infekcije, što je u skladu sa rezultatima u našoj studiji [203].

Slično, Pucar et al. [158] analizirali su segmente koronarnih arterija sa aterosklerozom i unutrašnje grudne arterije bez aterosklerotske degeneracije kod ispitanika sa koronarnom bolešću na prisustvo

mikroorganizama koji izazivaju periodontitis, CMV i Cpn, i otkrili da je CMV DNK bila prisutna u 67% zahvaćenih arterija, ali i u 47% uzoraka aterosklerozom nezahvaćenih segmenata unutrašnje grudne arterije. Cpn DNK je bila češće prisutna u zdravim (40%) u odnosu na aterosklerozom zahvaćene segmente koronarnih arterija (33%). Mikroorganizmi koji izazivaju periodontitis su nađeni samo u aterosklerozom izmenjenim krvnim sudovima.

Nedavna studija [204] koja je uključivala zdrave odrasle osobe sa ili bez aktivne HP infekcije (potvrđene putem brzog ureaza testa) koristila je multidetektorsku kompjuterizovanu tomografiju srca za identifikaciju subkliničkih aterosklerotskih lezija koronarnih arterija i pokazala da HP-pozitivne osobe imaju značajno niže vrednosti HDL i čak trostruko veće šanse za ranu aterosklerotsku bolest nego HP negativni subjekti. Samim tim, postoji mogućnost da eradikaciona terapija za HP dovede do usporenja razvoja ateroskleroze tj pojave manifestne bolesti u ovoj populaciji.

Jedno od mogućih objašnjenja je povezano sa efektima HP na endotelnu disfunkciju (preko vakuolizirajućeg citotoksina A) kroz povećan oksidativni stres, inflamatorni odgovor, citokine (IL 6), agregaciju trombocita, smanjenu sintezu NO, promene u metabolizmu lipida i glukoze i puteve posredovane egzozomima. Moguće je da prisustvo HP u neaterosklerotskim segmentima arterija predstavlja prediktor buduće endotelne disfunkcije i ateroskleroze [98,205].

U našoj studiji, subjekti kod kojih je potvrđeno prisustvo HP, CMV i Cpn obično su bili prekomerne telesne težine ili gojazni, ali samo za HP pozitivne pacijente odnos je dostigao statistički značaj. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama u kojima je HP bio u pozitivnoj korelaciji sa BMI [206].

Sa druge strane, nijedan od identifikovanih agenasa nije pokazao značajan uticaj na lipidni profil naših ispitanika u regresionim modelima.

To najviše iznenađuje upravo u slučaju HP, gde je u više istraživanja utvrđeno da je jedan od osnovnih mehanizama dejstva HP na nastanak ateroskleroze upravo izmena lipidnog statusa, sa deficitom HDL kao protektivnog faktora [204,205,207].

U našoj studiji, prisustvo Cpn je negativno uticalo na nivo HDL u krvi pacijenata, ali ne dostižući nivo statističke značajnosti. U velikoj meta-analizi objavljenoj 2022. godine, Cpn infekcija kod zdravih ispitanika nije bila značajno povezana sa lipidnim statusom, dok je kod pacijenata sa koronarnom bolešću bila značajno povezana sa višim trigliceridima, ali ne i sa holesterolom, HDL-C ili LDL-C [208]. U slučaju infekcije CMV, u nekim istraživanjima je pokazana povezanost sa prisustvom dislipidemija kod pacijenata sa CAD, dok u drugim slučajevima ta veza, kao i u našoj studiji, nije potvrđena, pre svega zbog uticaja CMV na inflamatornu komponentu koronarne bolesti [209].

U ovoj studiji smo pokazali da je prisustvo HP i CMV značajno i pozitivno povezano sa nivoom fibrinogena i sedimentacije eritrocita, dok je Cpn negativno povezan, ali korelacija sa CRP nije dostigla statistički značaj. Prethodne studije su dale oprečne rezultate, pri čemu su neke pokazale jasnu korelaciju, a neke, poput naše, nisu pokazale značajan uticaj na nivo CRP. Iriz i saradnici su našli dvostruko veće nivoe CRP kod CABG pacijenata sa Cpn u uzorcima aorte [199], dok su u slučaju HP, potvrđene povišene vrednosti kod CagA pozitivnih pacijenata, sa padom nakon eradikacije, ali ne u svim istraživanjima [205]. U slučaju C. pneumoniae, prisustvo IgA antitela kod ispitanika sa aterosklerozom je bilo povezano sa povišenim vrednostima hsCRP, fibrinogena, IL 6 [210,211], a DNK Cpn detektovana u uzorcima karotidnih arterija je bila povezana sa višim vrednostima CRP [212]. Sa druge strane PCR om detektovana DNK Cpn u uzorcima aterosklerotičnih koronarnih arterija nije ukazivala na više vrednosti CRP u studiji Izadi i saradnika [213].

Kada je u pitanju fibrinogen, naše istraživanje, kao i istraživanje Jusufa i sar. [214], je pokazalo da je HP infekcija (detektovana urea testom) bila povezana sa višim nivoima fibrinogena kod starijih

pacijenata sa ishemijskom bolešću srca, a tretman eradikacije HP doveo je do normalizacije nivoa fibrinogena. Slične rezultate i preporuke predložili su Kounturas et al. [215].

Naša studija je takođe otkrila značajnu negativnu povezanost između prisustva Cpn u neaterosklerotskim segmentima i fibrinogena i ESR. Ovo je neobičan nalaz, pošto je Cpn infekcija prepoznata kao proinflamatorni faktor kod ateroskleroze, zajedno sa porastom CRP, fibrinogena i drugih markera upale [210]. Filardo i dr. izvršili su meta-analizu studija o Cpn-posredovanoj inflamaciji kod ateroskleroze, a rezultati su pokazali da su seropozitivni subjekti imali viši nivo fibrinogena, hsCRP i IL-6 u poređenju sa seronegativnim pacijentima [211].

Naša studija je otkrila neobičnu, ali značajnu negativnu korelaciju između prisustva HP-a i očekivane brzine glomerularne filtracije, kao i pozitivnu korelaciju sa nivoima ureje i kreatinina, koja je opstala nakon kontrole starosti, pola i BMI. Moguće objašnjenje je da je HP infekcija povezana sa bubrežnom disfunkcijom.

Studije su izvestile o vezi između HP-pozitivnog gena A koji je povezan sa citotoksinom i dijabetičke nefropatije, IgA nefropatije, membranske nefropatije i drugih poremećaja bubrega [216]. S druge strane, sistematski pregledi i meta-analize poslednjih godina nisu potvrdili efekat HP infekcije na hronične bubrežne poremećaje, gde su neke studije pokazale inverznu vezu, sa bubrežnim pacijentima koji imaju niže stope HP (verovatno zbog efekata eradikacionog lečenja HP) [217,218].

Jedno od mogućih objašnjenja može biti činjenica da je 19% naših ispitanika imalo istoriju hronične bubrežne bolesti stadijuma 2 ili 3, ali ova povezanost nije primećena posebno u ovoj subpopulaciji.

Prethodne studije fokusirane na opštu populaciju nisu pronašle značajnu povezanost HP infekcije sa nivoima uree i kreatinina, eGFR [219,220]. Nedavno su Vang et al. objavili su svoje nalaze o prevalenciji HP infekcije i njenoj povezanosti sa eGFR u kineskoj populaciji, gde su, baš kao i u našoj studiji, učesnici sa nižim eGFR imali veću prevalenciju HP infekcije, ali je snaga ove korelacije bila oslabljena, kada su rezultati korigovani u odnosu na uzrast i pol [221].

U odnosu na pojavu komplikacija CABG, naše istraživanje je pokazalo češće prisustvo genetskog materijala *H. pylori* i *C. pneumoniae* kod pacijenata koji su imali komplikacije, ali nije dosegnut statistički nivo značajnosti.

Istraživanje Rahel i saradnika [222] je ukazalo da je pozitivan nalaz na antiCpn antitela klase IgA (ali ne i anti CMV antitela) kod CAD pacijenata koji su podvrgnuti primarnoj PCI bio češće povezan sa pojavom neželjenih kardiovaskularnih komplikacija (MACE). Slični rezultati su prikazani u studiji Xue i saradnika, gde je viši nivo IgA anti CPn antitela bio povezan sa težinom ateroskleroze i pojavom neželjenih događaja kod pacijenata nakon pPCI [223].

Veza između HP infekcije i pojave i progresije kardiovaskularnih oboljenja je pokazana u velikom broju istraživanja, ali nema puno podataka o vezi HP infekcije i pojave komplikacija CABG [224].

U slučaju CMV infekcije, Radke i saradnici [225] su pokazali da je prisustvo virusne DNK u ateromatozno izmenjenim segmentima koronarnih arterija ispitanika podvrgnutih CABG koreliralo sa većim stepenom restenoze i kalcifikacije i predlagali su aktivnu primenu antivirusne terapije kao preventivne mere. Izadi i saradnici su ukazali na veću učestalost akutnog koronarnog sindroma kod pacijenata sa pozitivnim CMV aterosklerotskim plakovima [135].

Ograničenja

Glavno ograničenje ove studije je veličina uzorka i nedostatak naknadnih podataka o dugoročnim kliničkim ishodima, ali uzimajući u obzir specifičnu prirodu lokacije uzorkovanja, bilo je veoma teško prikupiti čak i ovu količinu uzoraka.

Postoji nekoliko značajnih ograničenja za našu studiju osim veličine uzorka. Iako je prisustvo HP, CMV i Cpn u aterosklerotskim lezijama potvrđeno u mnogim studijama, bilo bi od pomoći kada

bismo imali priliku da uzmemo paralelne uzorke iz zahvaćenih i nezahvaćenih arterija, kao i uzorke od subjekata koji nemaju CAD. podržavaju kvalitet naših rezultata i možda nam pomognu da razjasnimo neke rezultate.

Takođe, početne vrednosti CRP u našem uzorku bile su veće od očekivanih kod pacijenata bez značajnog akutnog procesa. U vreme inicijalne konsultacije, nijedan od pacijenata nije pokazao ili prijavio znake akutne bakterijske/virusne infekcije niti je koristio antibiotike. Na veće vrednosti CRP-a zabeležene u većini uzoraka moglo bi da utiče nekoliko karakteristika našeg uzorka, kao što su prosečna starost (srednja starost oko 65 godina), prisustvo gojaznosti, više hroničnih poremećaja, upotreba lekova, ranija HOBP, egzacerbacija, venska tromboza ili hematom. Naravno, inflamatorna komponenta ASCVD može biti jedan od krivaca, kao i infekcije uzrokovane HP, CMV ili Cpn, kao što je navedeno u našem rukopisu. Svi ovi faktori su u literaturi prepoznati kao potencijalni neinfektivni uzroci povišenog CRP-a [226].

6. ZAKLJUČAK

U skladu sa definisanim ciljevima istraživanja, a na osnovu predstavljenih rezultata mogu se doneti sledeći zaključci::

1. Utvrđeno je prisustvo DNK infektivnih mikroorganizama *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Cytomegalovirus* u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.
2. DNK *Helicobacter pylori* pronađena je kod 14%, *Cytomegalovirusa* kod 7%, i *Chlamydia pneumoniae* kod 7% ispitanika, sa sličnom distribucijom u koronarnim arterijama i unutrašnjim grudnim arterijama, ali ne i u segmentima aorte.
3. Imunohistohemijska analiza pokazala je prisustvo HP antigena na 13 uzoraka krvnih sudova (pretežno na uzorcima *a.mammaria interna*). CMV antigen je nađen na dva uzorka (*a. mammaria interna*, aorta).
4. Prisustvo i kvantitativni sadržaj DNK *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Cytomegalovirus* u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte je koreliralo sa inflamatornom komponentom ateroskleroze i težinom ateroskleroze kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.
5. CMV pokazuje statistički značajnu povezanost sa višim stepenom ateroskleroze i povišenom sedimentacijom eritrocita, potvrđujući njegovu potencijalnu ulogu u progresiji vaskularne patologije.
6. HP je povezan sa višim vrednostima fibrinogena, što ukazuje na mogući proinflamatorni efekat, iako bez direktne korelacije sa histopatološkim stepenom inflamacije.
7. Cpn pokazuje neočekivanu povezanost sa nižim vrednostima fibrinogena, što otvara pitanje specifičnih imunoloških mehanizama ili različitih faza infekcije.
8. Prisustvo DNK mikroorganizama u vaskularnom tkivu nije u direktnoj vezi sa histopatološkim stepenom inflamacije, ali jeste sa sistemskim markerima inflamacije (fibrinogen, SE).
9. Utvrđena je značajna negativna korelacija između prisustva HP i očekivane brzine glomerularne filtracije, kao i pozitivna korelacija sa nivoima uree i kreatinina, nezavisno od starosti, pola i BMI. Ovi nalazi ukazuju da HP infekcija može biti povezana sa bubrežnom disfunkcijom kod pacijenata indikovanih za CABG.
10. Prisustvo patogenih mikroorganizama (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Cytomegalovirus*) u makroskopski neizmenjenim segmentima koronarnih arterija, unutrašnje grudne arterije i aorte nije bilo značajno povezano sa postoperativnim tokom (pojava komplikacija- atrijska fibrilacija, pleuralni izlivi, pneumonija, pneumotoraks, itd.) i ishodom (preživljavanje ili smrtni ishod) kod pacijenata sa uznapredovalom koronarnom arterijskom bolešću.
11. Pokazano je češće prisustvo DNK *H. pylori* i *C. pneumoniae*, ali ne i CMV kod pacijenata koji su imali komplikacije, pri čemu ni u jednom slučaju nije dosegnut statistički nivo značajnosti.
12. Smrtni ishod je zabeležen kod jednog ispitanika, pa zbog nepovoljnog odnosa broja ishoda i potencijalnih prediktora, ovaj ishod nije dodatno analiziran.

7. LITERATURA

1. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):1736-1788.
2. Victor G, Shishani K, Vellone E, Froelicher ES. The Global Burden of Cardiovascular Disease in Adults: A Mapping Review. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 2024 Oct 1:10-97.
3. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2025. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed 31 July 2025.
4. Nedkoff L, Briffa T, Zemedikun D, Herrington S, Wright FL. Global trends in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clinical therapeutics*. 2023 Nov 1;45(11):1087-91.
5. Luengo-Fernandez R, Walli-Attaei M, Gray A, Torbica A, Maggioni AP, Huculeci R, Bairami F, Aboyans V, Timmis AD, Vardas P, Leal J. Economic burden of cardiovascular diseases in the European Union: a population-based cost study. *European heart journal*. 2023 Dec 1;44(45):4752-67.
6. Chong B, Jayabaskaran J, Jauhari SM, Chan SP, Goh R, Kueh MT, Li H, Chin YH, Kong G, Anand VV, Wang JW. Global burden of cardiovascular diseases: projections from 2025 to 2050. *European journal of preventive cardiology*. 2024 Sep 13: zwae281.
7. Makover ME, Shapiro MD, Toth PP. There is urgent need to treat atherosclerotic cardiovascular disease risk earlier, more intensively, and with greater precision: A review of current practice and recommendations for improved effectiveness. *American Journal of Preventive Cardiology*. 2022 Dec 1; 12:100371.
8. Murray CJ. Findings from the global burden of disease study 2021. *The Lancet*. 2024 May 18;403(10440):2259-62
9. Dattani S, Samborska V, Ritchie H, Roser M. OurWorldInData.org. 2023. Cardiovascular Diseases. <https://ourworldindata.org/cardiovascular-diseases> Accessed July 31, 2025
10. Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: executive summary. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2022;8(4):377–382.
11. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(2):133–143
12. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2023. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, 2024
13. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021 Apr 22;592(7855):524-33.
14. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138: 271–81. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
15. Standl E, Khunti K, Hansen TB, Schnell O. The global epidemics of diabetes in the 21st century: current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(2_suppl): 7–14
16. Eurostat. Statistics explained: Overweight and obesity -BMI statistics. Available at: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics#Highlights

17. Yang X, Chen H, Li S, Pan L, Jia C. Association of sleep duration with the morbidity and mortality of coronary artery disease: a meta-analysis of prospective studies. *Heart Lung Circ.* 2015;24(12):1180–1190.
18. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MS, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet respiratory medicine.* 2019 Aug 1;7(8):687-98.
19. Lechat B, Appleton S, Melaku YA, Hansen K, McEvoy RD, Adams R, Catcheside P, Lack L, Eckert DJ, Sweetman A. The association of co-morbid insomnia and sleep apnea with prevalent cardiovascular disease and incident cardiovascular events. *Journal of sleep research.* 2022 Oct;31(5):e13563.
20. Tong J, Yu Q, Li Y, Du J, Qiu J. Obstructive sleep apnea and cardiovascular events in acute coronary syndrome: a meta-analysis. *Coronary Artery Disease.* 2023 May 1;34(3):177-84.
21. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular disease in chronic kidney disease: pathophysiological insights and therapeutic options. *Circulation.* 2021;143(11):1157–1172. doi:<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686>.
22. Cebrian A, Escobar C, Aranda U, et al. The 2021 European Society of Cardiology Cardiovascular Disease Prevention Guidelines: adding albuminuria to the SCORE scale increases the prevalence of very high/high cardiovascular risk among patients with chronic kidney disease. *Lancet Reg Health Eur* [Internet]. 2022;15(6):1204–1208. doi:<https://doi.org/10.1093/ckj/sfac019>.
23. European Environment Agency briefing. Preventing cardiovascular disease through a healthy environment. Available at: <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/publications/preventing-cardiovascular-disease-through-a-healthy-environment>
24. European Environment Agency. Environmental noise in Europe — 2025 report. Available at: <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/publications/environmental-noise-in-europe-2025>
25. de Bont J, Jaganathan S, Dahlquist M, Persson Å, Stafoggia M, Ljungman P. Ambient air pollution and cardiovascular diseases: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Journal of internal medicine.* 2022 Jun;291(6):779-800.
26. Meer M, Meer M, Mumtaz M, Jawed U. Role of Genetics in Early-Onset Cardiovascular Disease. *Cureus.* 2025 Jun 14;17(6).
27. Sun J, Qiao Y, Zhao M, Magnussen CG, Xi B. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases in youths and young adults aged 15–39 years in 204 countries/territories, 1990–2019: a systematic analysis of Global Burden of Disease Study 2019. *BMC medicine.* 2023 Jun 26;21(1):222.
28. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014; 5(8):927-46
29. Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and inflammation: insights from the theory of general pathological processes. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023 Apr 26;24(9):7910.\
30. Jovin DG, Sumpio BE, Greif DM. Manifestations of human atherosclerosis across vascular beds. *JVS-vascular insights.* 2024 Jan 1;2:100089.
31. Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell.* 2022; 185(10):1630-45

32. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, Weng J, Ge J. Mechanisms of oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction and its consequences for the development of atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2022 Jun 1; 9:925923.
33. Ross R, Glomset J. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973; 180(4093):1332-9.
34. Williams K, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(5):551-61.
35. Williams K, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherosclerosis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998; 9(5):471-4.
36. Goldstein J, Ho Y, Basu S, Brown M. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(1):333-7.
37. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(1):36-46
38. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*, 2003; 108(16):1930-2
39. Wilcox J, Smith K, Schwatz S, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86(8):2839-43
40. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr W, 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.
41. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 May;20(5):1262-75.
42. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2):115-26.
43. Li, D.; Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal. Transduct. Target. Ther*. 2021, 6, 291.
44. Gusev, E.Y.; Zotova, N.V. Cellular stress and general pathological processes. *Curr. Pharm. Des*. 2019, 25, 251–297
45. Batty, M.; Bennett, M.R.; Yu, E. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells* 2022, 11, 3843
46. Duer, M.; Cobb, A.M.; Shanahan, C.M. DNA Damage Response: A Molecular Lynchpin in the Pathobiology of Arteriosclerotic Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2020, 40, e193–e202.
47. Chan, Y.H.; Ramji, D.P. Investigation of Mitochondrial Bioenergetic Profile and Dysfunction in Atherosclerosis. *Methods Mol. Biol*. 2022, 2419, 301–311
48. Ren, J.; Bi, Y.; Sowers, J.R.; Hetz, C.; Zhang, Y. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Cardiol*. 2021, 18, 499–521
49. Cinoku, I.I.; Mavragani, C.P.; Moutsopoulos, H.M. Atherosclerosis: Beyond the lipid storage hypothesis. The role of autoimmunity. *Eur. J. Clin. Investig*. 2020, 50, e13195

50. Poznyak, A.V.; Nikiforov, N.G.; Wu, W.K.; Kirichenko, T.V.; Orekhov, A.N. Autophagy and Mitophagy as Essential Components of Atherosclerosis. *Cells* 2021, 10, 443
51. Man, S.M.; Karki, R.; Kanneganti, T.-D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 2017, 277, 61–75
52. Takahashi, M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2022, 118, 372–385.
53. Barbu E; Popescu MR, Popescu AC, Balanescu SM. Inflammation as A Precursor of Atherothrombosis, Diabetes and Early Vascular Aging. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(2):963.
54. Fasolo, F.; Di Gregoli, K.; Maegdefessel, L.; Johnson, J.L. Non-coding, RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2019, 115, 1732–1756.
55. Vartak, T.; Kumaresan, S.; Brennan, E. Decoding microRNA drivers in atherosclerosis. *Biosci. Rep.* 2022, 42, BSR20212355.
56. Wang, J.; Gan, Y.; Cao, J.; Dong, X.; Ouyang, W. Pathophysiology of stress granules: An emerging link to diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2022, 49, 44.
57. Alquraini, A.; El Khoury, J. Scavenger receptors. *Curr. Biol.* 2020, 30, R790–R795
58. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017;377:111–121. doi: 10.1056/NEJMoa1701719
59. Jebari-Benslaïman, S.; Galicia-García, U.; Larrea-Sebal, A.; Olaetxea, J.R.; Alloza, I.; Vandenbroeck, K.; Benito-Vicente, A.; Martín, C. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3346.
60. Niu, N.; Xu, S.; Xu, Y.; Little, P.J.; Jin, Z.G. Targeting Mechanosensitive Transcription Factors in Atherosclerosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 2019, 40, 253–266.
61. Duval, C.; Chinetti, G.; Trottein, F.; Fruchart, J.C.; Staels, B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol. Med.* 2002, 8, 422–430
62. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9(5):441-8
63. Lusta KA, Poznyak AV, Sukhorukov VN, Eremin II, Nadelyaeva II, Orekhov AN. Hypotheses on atherogenesis triggering: does the infectious nature of atherosclerosis development have a substruction?. *Cells.* 2023 Feb 23;12(5):707.
64. Kotlyarov S, Kotlyarova A. Involvement of Fatty Acids and Their Metabolites in the Development of Inflammation in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(2):1308. 16.
65. Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):131
66. Ridker, P.M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003, 107,363–369.
67. Tishkowski, K.; Gupta, V. Erythrocyte Sedimentation Rate. In *SatPearls; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA*, 2023.
68. Valera Gasparoto, A.L.; da Rocha Martinez, T.L. Fibrinogen as a Cardiovascular Risk Marker. *J. Intern. Med. Cardiovasc. Res.* 2021,1, 1–9.

69. Adam CA, Şalaru DL, Prisacariu C, Marcu DTM, Sascău RA, Stătescu C. Novel Biomarkers of Atherosclerotic Vascular Disease - Latest Insights in the Research Field. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(9):4998.22.
70. Cao H, Zhu Y, Hu G, Zhang Q, Zheng L. Gut microbiome and metabolites, the future direction of diagnosis and treatment of atherosclerosis? *Pharmacol Res.* 2023; 187:106586.
71. Fabricant CG, Fabricant J, Minick CR, Litrenta MM. Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens. *Fed Proc.* 1983;42:2476–9
72. Zou, Y.; Huang, Y.; Liu, S.; Yang, J.; Zheng, W.; Deng, Y.; Zhang, M.; Yan, Z.; Xie, H. Periodontopathic Microbiota and Atherosclerosis: Roles of TLR-Mediated Inflammation Response. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2022, 2022, 9611362.
73. Xu, Z.; Li, J.; Wang, H.; Xu, G. Helicobacter Pylori Infection and Atherosclerosis: Is There a Causal Relationship? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017, 36, 2293–2301.
74. Ciarambino, T.; Crispino, P.; Minervini, G.; Giordano, M. Role of Helicobacter pylori Infection in Pathogenesis, Evolution, and Complication of Atherosclerotic Plaque. *Biomedicines* 2024, 12, 400.
75. Dadashi, M.; Hajikhani, B.; Ghazi, M.; Yazdani, S.; Goudarzi, M.; Nasiri, M.J.; Shokouhi, S.; Owlia, P.; Yaslianifard, S. The global prevalence of Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Cytomegalovirus and Herpes simplex virus in patients with coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.* 2021, 152, 104572.
76. Berquist, V.; Hoy, J.F.; Trevillyan, J.M. Contribution of Common Infections to Cardiovascular Risk in HIV-Positive Individuals. *AIDS Rev.* 2017, 19, 72–80.
77. Wu, Y.P.; Sun, D.D.; Wang, Y.; Liu, W.; Yang, J. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Infection Increases Atherosclerosis Risk: Evidence Based on a Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 2630865.
78. Dhakal, B.P.; Sweitzer, N.K.; Indik, J.H.; Acharya, D.; William, P. SARS-CoV-2 Infection and Cardiovascular Disease: COVID-19 Heart. *Heart Lung Circ.* 2020, 29, 973–987.
79. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2000 Jun;20(6):1417-20.
80. Tomita, S.; Komiya-Ito, A.; Imamura, K.; Kita, D.; Ota, K.; Takayama, S.; Makino-Oi, A.; Kinumatsu, T.; Ota, M.; Saito, A. Prevalence of Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, Porphyromonas Gingivalis and Tannerella Forsythia in Japanese Patients with Generalized Chronic and Aggressive Periodontitis. *Microb. Pathog.* 2013, 61, 11–15
81. Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Journal of general internal medicine.* 2008 Dec;23(12):2079-86.
82. Larvin, H.; Kang, J.; Aggarwal, V.R.; Pavitt, S.; Wu, J. Risk of Incident Cardiovascular Disease in People with Periodontal Disease:A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Exp. Dent. Res.* 2021, 7, 109–122.
83. Lobo, M.G.; Schmidt, M.M.; Lopes, R.D.; Dipp, T.; Feijó, I.P.; Schmidt, K.E.S.; Gazeta, C.A.; Azeredo, M.L.; Markoski, M.; Pellanda, L.C.; et al. Treating Periodontal Disease in Patients with Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *Eur. J. Intern. Med.* 2020, 71, 76–80.
84. Tonetti, M.S.; D’Aiuto, F.; Nibali, L. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *Jpn. J. Chest Dis.* 2008, 67, 353.

85. Hooi, J.K.; Lai, W.Y.; Ng, W.K.; Suen, M.M.; Underwood, F.E.; Tanyingoh, D.; Malfertheiner, P.; Graham, D.Y.; Wong, V.W.; Wu, J.C.; et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017, 153, 420–429.
86. Duan, M.; Li, Y.; Liu, J.; Zhang, W.; Dong, Y.; Han, Z.; Wan, M.; Lin, M.; Lin, B.; Kong, Q.; et al. Transmission routes and patterns of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2023, 28, e12945.
87. Elbehiry, A.; Marzouk, E.; Aldubaib, M.; Abalkhail, A.; Anagreyah, S.; Anajirih, N.; Almuzaini, A.M.; Rawway, M.; Alfadhel, A.; Draz, A.; et al. *Helicobacter pylori* Infection: Current Status and Future Prospects on Diagnostic, Therapeutic and Control Challenges. *Antibiotics* 2023, 12, 191.
88. Franceschi, F.; Gasbarrini, A.; Polyzos, S.A.; Kountouras, J. Extragastric Diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2015, 20 (Suppl. S1), 40–46.
89. Baj, J.; Forma, A.; Sitarz, M.; Portincasa, P.; Garruti, G.; Krasowska, D.; Maciejewski, R. *Helicobacter pylori* Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells* 2020, 10, 27.
90. Sharndama, H.C.; Mba, I.E. *Helicobacter pylori*: An up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. *Braz. J. Microbiol.* 2022, 53, 33–50.
91. Saviano A, Morabito Loprete MR, Pignataro G, Piccioni A, Gasbarrini A, Franceschi F, Candelli M. *Helicobacter pylori*, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease: A Narrative Review. *Medicina*. 2025 Feb 16;61(2):346.
92. Fang Y, Fan C, Xie H. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the risk of acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2019 Dec 1;98(50):e18348.
93. Wang B, Yu M, Zhang R, Chen S, Xi Y, Duan G. A meta-analysis of the association between *Helicobacter pylori* infection and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *Helicobacter*. 2020 Dec;25(6):e12761.
94. Liu J, Wang F, Shi S. *Helicobacter pylori* infection increase the risk of myocardial infarction: a meta-analysis of 26 studies involving more than 20,000 participants. *Helicobacter*. 2015 Jun;20(3):176-83.
95. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE. Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2001 Feb;32(2):385-91.
96. Farsak B, Yildirim A, Akyön Y, Pinar A, Öç M, Böke E, Kes S, Tokgözoğlu L. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 Dec 1;38(12):4408-11.
97. Izadi M, Fazel M, Sharubandi SH, Saadat SH, Farahani MM, Nasserli MH, Dabiri H, SafiAryan R, Esfahani AA, Ahmadi A, Jafari NJ. *Helicobacter* species in the atherosclerotic plaques of patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Pathology*. 2012 Jul 1;21(4):307-11.
98. Xia X, Zhang L, Xu C, Hong H, Liu Z. *Helicobacter pylori* Infection and Endothelial Dysfunction [Internet]. *Helicobacter pylori - From First Isolation to 2021*. IntechOpen; 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97260>
99. Gautam J, Krawiec C. *Chlamydia Pneumonia*. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan
100. Gitsels A., Sanders N., Vanrompay D. (2019). Chlamydial Infection From Outside to Inside. *Front Microbiol.* 10, 2329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02329>

101. Kozusnik T., Adams S.E., Greub G. (2024). Aberrant Bodies: An Alternative Metabolic Homeostasis Allowing Survivability? Microorganisms. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030495>
102. Filardo S, Di Pietro M, Romano S, Sessa R. Updating the relationship of Chlamydia pneumoniae with atherosclerotic cardiovascular diseases: a systematic review of reviews. *New Microbiologica*. 2024 Sep 1;47(3):217-26.
103. Koca Ö. The Laboratory Diagnosis of Chlamydia Infections [Internet]. *Infectious Diseases*. IntechOpen; 2023. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.110464>
104. Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkaniemi J, Naukkarinen A, Saikku P. Importance of smoking for Chlamydia pneumoniae seropositivity. *International journal of epidemiology*. 1994 Dec 1;23(6):1315-21.
105. Saikku P., Leinonen M., Mattila K., Ekman M.R., Nieminen M.S., Mäkelä P.H., Huttunen J.K., Valtonen V. (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*. 2, 983-6. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)90741-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)90741-6)
106. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B, ROXIS Study Group. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. *European Heart Journal*. 1999 Jan 1;20(2):121-7.
107. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):404-7.
108. Anderson JL, Muhlestein JB. The ACADEMIC study in perspective (Azithromycin in coronary artery disease: elimination of myocardial infection with Chlamydia). *The Journal of infectious diseases*. 2000 Jun 1;181(Supplement_3):S569-71.
109. O'Connor C.M., Dunne M.W., Pfeffer M.A. et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* (2003) 290 1459–1466.
110. Grayston J.T., Kronmal R.A., Jackson L.A. et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N. Engl. J. Med.* (2005) 352 1637–1645.
111. Jespersen C.M., Als-Nielsen B., Damgaard M. et al. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease: CLARICOR trial. *BMJ* (2006) 332 22–27.
112. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *Journal of Infectious Diseases*. 1993 Apr 1;167(4):841-9.
113. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, Woods ML, Anderson JL. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996 Jun 1;27(7):1555-61.
114. Ozkan HS, Kayikcioglu M. Atherosclerosis associated with Chlamydia pneumoniae: Dissecting the etiology: Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *European Atherosclerosis Journal*. 2024 Aug 31;3(2):30-7.
115. Zhao X, Miao G, Zhang L, Zhang Y, Zhao H, Xu Z, Wang B, Zhang L. Chlamydia pneumoniae infection induces vascular smooth muscle cell migration and atherosclerosis

through mitochondrial reactive oxygen species-mediated JunB-Fra-1 activation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022 Apr 12;10:879023.

116. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* (2013) 153(6):1194–217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
117. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? a review of potential options for therapeutic intervention. *Front Immunol* (2019) 10:2247. doi: 10.3389/fimmu.2019.02247
118. Teissier T, Boulanger E, Cox LS. Interconnections between inflammaging and immunosenescence during ageing. *Cells* (2022) 11(3). doi: 10.3390/cells11030359
119. Martínez I, García-Carpizo V, Guijarro T, García-Gomez A, Navarro D, Aranda A, et al. Induction of DNA double-strand breaks and cellular senescence by human respiratory syncytial virus. *Virulence* (2016) 7(4):427–42. doi: 10.1080/21505594.2016.1144001
120. Britt, W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: Proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008, 325, 417–470.
121. Fowler, K.; Mucha, J.; Neumann, M.; Lewandowski, W.; Kaczanowska, M.; Grys, M.; Schmidt, E.; Natenshon, A.; Talarico, C.; Buck, P.O.; et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: Possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health* 2022, 22, 1659
122. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 2011 May;121(5):1673-80. doi: 10.1172/JCI45449.
123. La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol.* 2012 Mar 1;7(3):279-293. doi: 10.2217/fvl.12.8.
124. Gupta M, Shorman M. Cytomegalovirus Infections. [Updated 2025 May 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
125. Spyridopoulos I, Martin-Ruiz C, Hilkens C, Yadegarfar ME, Isaacs J, Jagger C, et al. CMV seropositivity and T-cell senescence predict increased cardiovascular mortality in octogenarians: results from the Newcastle 85+ study. *Aging Cell* (2016) 15(2):389–92. doi: 10.1111/accel.12430
126. Savva GM, Pachnio A, Kaul B, Morgan K, Huppert FA, Brayne C, et al. Cytomegalovirus infection is associated with increased mortality in the older population. *Aging Cell* (2013) 12(3):381–7. doi: 10.1111/accel.12059
127. Melnick, J.L.; Petrie, B.L.; Dreesman, G.R.; Burek, J.; McCollum, C.H.; DeBakey, M.E. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet* 1983, 2, 644–647.
128. Szwed, P.; Gałsecka, A.; Zawadka, M.; Eyileten, C.; Postuła, M.; Mazurek, T.; Szarpak, Ł.; Filipiak, K.J. Infections as Novel Risk Factors of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases: Pathophysiological Links and Therapeutic Implications. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 2539
129. Cristescu CV, Alain S, Ruță SM. The Role of CMV Infection in Primary Lesions, Development and Clinical Expression of Atherosclerosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11(13):3832. <https://doi.org/10.3390/jcm11133832>
130. Wang, H.; Peng, G.; Bai, J.; He, B.; Huang, K.; Hu, X.; Liu, D. Cytomegalovirus infection and relative risk of cardiovascular disease (ischemic heart disease, stroke, and cardiovascular

- death): A meta-analysis of prospective studies up to 2016. *J. Am. Heart Assoc.* 2017, 6, e005025.
131. Lv, Y.L.; Han, F.F.; Gong, L.L.; Liu, H.; Ma, J.; Yu, W.Y.; Wan, Z.R.; Jia, Y.J.; Zhang, W.; Shi, M.; et al. Human Cytomegalovirus Infection and Vascular Disease Risk: A Meta-Analysis. *Virus Res.* 2017, 227, 124–134.
 132. Nikitskaya, E.; Lebedeva, A.; Ivanova, O.; Maryukhnich, E.; Shpektor, A.; Grivel, J.C.; Margolis, L.; Vasilieva, E. Cytomegalovirus-Productive Infection Is Associated with Acute Coronary Syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* 2016, 5, e003759.
 133. Zhang, J.; Liu, Y.Y.; Sun, H.L.; Li, S.; Xiong, H.R.; Yang, Z.Q.; Jiang, X.J. High Human Cytomegalovirus IgG Level is Associated with Increased Incidence of Diabetic Atherosclerosis in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Med. Sci. Monit.* 2015, 21, 4102–4110.
 134. Xenaki, E.; Hassoulas, J.; Apostolakis, S.; Sourvinos, G.; Spandidos, D.A. Detection of cytomegalovirus in atherosclerotic plaques and nonatherosclerotic arteries. *Angiology* 2009, 60, 504–508.
 135. Izadi, M.; Fazel, M.; Saadat, S.H.; Nasser, M.H.; Ghasemi, M.; Dabiri, H.; Aryan, R.S.; Esfahani, A.A.; Ahmadi, A.; Kazemi-Saleh, D.; et al. Cytomegalovirus localization in atherosclerotic plaques is associated with acute coronary syndromes: Report of 105 patients. *Methodist. DeBakey Cardiovasc. J.* 2012, 8, 42.
 136. Lebedeva, A.; Maryukhnich, E.; Grivel, J.-C.; Vasilieva, E.; Margolis, L.; Shpektor, A. Productive Cytomegalovirus Infection Is Associated with Impaired Endothelial Function in ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am. J. Med.* 2019, 133, 133–142.
 137. Nikitskaya, E.A.; Grivel, J.C.; Maryukhnich, E.V.; Lebedeva, A.M.; Ivanova, O.I.; Savvinova, P.P.; Shpektor, A.V.; Margolis, L.B.; Vasilieva, E.Y. Cytomegalovirus in Plasma of Acute Coronary Syndrome Patients. *Acta Nat.* 2016, 8, 102–107.
 138. Heybar, H.; Alavi, S.M.; Nejad, M.F.; Latifi, M. Cytomegalovirus Infection and Atherosclerosis in Candidate of Coronary Artery Bypass Graft. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015, 8, e15476.
 139. Wang, Z.; Cai, J.; Zhang, M.; Wang, X.; Chi, H.; Feng, H.; Yang, X. Positive Expression of Human Cytomegalovirus Phosphoprotein 65 in Atherosclerosis. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 4067685.
 140. Ibrahim, A.I.; Obeid, M.T.; Jouma, M.J.; Moasis, G.A.; Al-Richane, W.L.; Kindermann, I.; Boehm, M.; Roemer, K.; Mueller-Lantzsch, N.; Gärtner, B.C. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J. Clin. Virol.* 2005, 32, 29–32.
 141. Lee, K.K.; Stelzle, D.; Bing, R.; Anwar, M.; Strachan, F.; Bashir, S.; Newby, D.E.; Shah, J.S.; Chung, M.H.; Bloomfield, G.S.; et al. Global Burden of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in People with Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Modelling Study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 4, 794–804. [CrossRef] *J. Clin. Med.* 2021, 10, 2539 71.
 142. Wen, D.; Du, X.; Dong, J.Z.; Ma, C.S. Hepatitis C Virus Infection and Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis. *Eur. J. Intern. Med.* 2019, 63, 69–73
 143. Petta S, Adinolfi LE, Fracanzani AL, Rini F, Caldarella R, Calvaruso V, et al. Hepatitis c virus eradication by direct-acting antiviral agents improves carotid atherosclerosis in patients with severe liver fibrosis. *J Hepatol* (2018) 69(1):18–24. doi: 10.1016/j.jhep.2018.02.015

144. Cacoub P, Nahon P, Layese R, Blaise L, Desbois AC, Bourcier V, et al Prognostic value of viral eradication for major adverse cardiovascular events in hepatitis c cirrhotic patients. *Am Heart J* (2018) 198:4–17. doi: 10.1016/j.ahj.2017.10.024
145. Singer A, Osinusi A, Brainard D, Chokkalingam A. Risk of cardiovascular and cerebrovascular events in hepatitis c patients following completion of directacting antiviral therapy: a retrospective cohort study. *J Hepatol* (2017) 1(66):S282– S3. doi: 10.1016/S0168-8278(17)30882-6
146. Ghamar Talepoor A, Doroudchi M. Immunosenescence in atherosclerosis: A role for chronic viral infections. *Frontiers in immunology*. 2022 Aug 17;13:945016.
147. Zhao, Y.-H.; Zhao, L.; Yang, X.-C.; Wang, P. Cardiovascular Complications of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rev. Cardiovasc. Med*. 2021, 22, 159.
148. Gasecka, A.; Pruc, M.; Kukula, K.; Gilis-Malinowska, N.; Filipiak, K.J.; Jaguszewski, M.J.; Szarpak, L. Post-Covid-19 Heart Syndrome. *Cardiol. J*. 2021, 28, 353–354
149. Vrints C, Andreotti F, Koskinas KC, Rossello X, Adamo M, Ainslie J, Banning AP, Budaj A, Buechel RR, Chiariello GA, Chieffo A, Christodorescu RM, Deaton C, Doenst T, Jones HW, Kunadian V, Mehili J, Milojevic M, Piek JJ, Pugliese F, Rubboli A, Semb AG, Senior R, Ten Berg JM, Van Belle E, Van Craenenbroeck EM, Vidal-Perez R, Winther S; ESC Scientific Document Group. 2024 0. *Eur Heart J*. 2024 Sep 29;45(36):3415-3537. doi: 10.1093/eurheartj/ehae177. Erratum in: *Eur Heart J*. 2025 Apr 22;46(16):1565. doi: 10.1093/eurheartj/ehaf079.
150. Scarsini R, Fezzi S, Leone AM, De Maria GL, Pighi M, Marcoli M, et al. Functional patterns of coronary disease: diffuse, focal, and serial lesions. *JACC Cardiovasc Interv* 2022; 15:2174–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2022.07.015>
151. Del Buono MG, Montone RA, Camilli M, Carbone S, Narula J, Lavie CJ, et al. Coronary microvascular dysfunction across the spectrum of cardiovascular diseases: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2021;78:1352–71. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.07.042>
152. Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol*. 2014; 11:276–89.
153. Peeters D, Woelders E, Jansen T, Konst R, Crooijmans C, van de Hoef T, Mensink F, Los J, Pellegrini D, Cornel JH, Ong P. Association between coronary artery spasm and atherosclerotic disease. *Cardiovascular Imaging*. 2025 Feb 1;18(2):226-39.
154. Kucharska-Newton A, Griswold M, Yao ZH, Foraker R, Rose K, Rosamond W, Wagenknecht L, Koton S, Pompeii L, Windham BG. Cardiovascular disease and patterns of change in functional status over 15 years: findings from the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:e004144. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004144>.
155. Razeghian-Jahromi I, Elyaspour Z, Zibaeenezhad MJ, Hassanipour S. Prevalence of Microorganisms in Atherosclerotic Plaques of Coronary Arteries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022;2022(1):8678967
156. Wong YK, Thomas M, Tsang V, Gallagher PJ, Ward ME. The prevalence of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic and nonatherosclerotic blood vessels of patients attending for redo and first time coronary artery bypass graft surgery. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999 Jan;33(1):152-6.

157. Shadrin IY, Holmes DR, Behfar A. Left internal mammary artery as an endocrine organ: insights into graft biology and long-term impact following coronary artery bypass grafting. *In* Mayo Clinic Proceedings 2023 Jan 1 (Vol. 98, No. 1, pp. 150-162). Elsevier.
158. Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, et al. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):677-82.
159. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. WHO Technical Report Series 894, Geneva, 2000
160. Hutchins GG, Grabsch HI. Molecular pathology--the future? *Surgeon.* 2009 Dec;7(6):366-77. doi: 10.1016/s1479-666x(09)80112-1. PMID: 20681381.
161. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 2001, 25, 402–408
162. Alfarisi, H.A.H.; Mohamed, Z.B.H.; Ibrahim, M. Bin. Basic Pathogenic Mechanisms of Atherosclerosis. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 2020, 7, 116–125
163. Sattartabar B, Ajam A, Pashang M, Jalali A, Sadeghian S, Mortazavi H, Mansourian S, Bagheri J, Karimi AA, Hosseini K. Sex and age difference in risk factor distribution, trend, and long-term outcome of patients undergoing isolated coronary artery bypass graft surgery. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021 Sep 23;21(1):460. doi: 10.1186/s12872-021-02273-2
164. Daponte-Codina A, Knox EC, Mateo-Rodriguez I, Seims A, Regitz-Zagrosek V, Maas AHEM, White A, Barnhoorn F, Rosell-Ortiz F. Gender and Social Inequalities in Awareness of Coronary Artery Disease in European Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022; 19(3):1388. <https://doi.org/10.3390/ijerph1903138>
165. Pathak LA, Shirodkar S, Ruparelia R, Rajebahadur J. Coronary artery disease in women. *Indian Heart J.* 2017;69(4):532–8. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.05.023>.
166. Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic Batut”. Incidence and mortality of acute coronary syndrome in Serbia 2006 2022. Serbian Acute Coronary Syndrome Registry. Belgrade: IPHS; 2022. Available from: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/AKS2022.pdf> Accessed (15 February 2025).
167. Masenga SK, Kirabo A. Hypertensive heart disease: risk factors, complications and mechanisms. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1205475. doi: 10.3389/fcvm.2023.1205475.
168. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet.* 2021;398(10304):957-980. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1.
169. Šipetić Grujičić S, Miljuš D, Soldatović I, Nikolić A, Vujčić I. Prehypertension and hypertension prevalence and risk factors among adult population in Republic of Serbia: A cross-sectional study. *Vojnosanit Pregl* 2020; 77(6): 590–600. doi.org/10.2298/VSP180330114S.
170. Milic N, Stanisavljevic D, Krstic M, Jovanovic V, Brcanski J, Kilibarda J, et al. The 2019 Serbian national health survey. Belgrade: OMNIA BGD; 2021. Available from: <https://publikacije.stat.gov.rs/G2021/pdfE/G20216003.pdf>. Accessed
171. Šašić BM, Čanković DK, Mijatović JV, Ukropina SN, Ostojić ZZ, Milijašević DS, Stamenković KD, Čanković SI. Socio-demographic differences in the prevalence of cardiovascular diseases and the association with risk factors in the population of Serbia. *Hospital Pharmacology-International Multidisciplinary Journal.* 2024;11(3):1555-64.

172. Lind L, Markstad H, Ahlström H, Angerås O, Brandberg J, Brunström M, Engström G, Engvall JE, Eriksson MJ, Eriksson M, Gottsäter A. Obesity is associated with coronary artery stenosis independently of metabolic risk factors: the population-based SCAPIS study. *Atherosclerosis*. 2022 Dec 1;362:1-0.
173. Hayajneh AA, Alhusban IM, Rababa M. The role of traditional obesity parameters in predicting the number of stenosed coronary arteries ($\geq 60\%$) among patients undergoing cardiac catheterization. *Scientific Reports*. 2022 Aug 15;12(1):13830.
174. Gregory AB, Lester KK, Gregory DM, Twells LK, Midodzi WK, Pearce NJ. The relationship between body mass index and the severity of coronary artery disease in patients referred for coronary angiography. *Cardiology Research and Practice*. 2017;2017(1):5481671
175. Santos JMG, Ruiz MC. Coronary artery surgery in diabetic patients. *Revista Espanola De Cardiologia*. 2002;55(12):1311–1322. doi: 10.1016/s0300-8932(02)76803-6.
176. Khan B, Rehman MU, Islam MU, Ahmad I. Prevalence of diabetes mellitus in patients undergoing coronary artery bypass grafting in a Tertiary Care Hospital. *Pak J Med Sci*. 2023 Jul-Aug;39(4):1091-1094. doi: 10.12669/pjms.39.4.7250.
177. Suman S, Biswas A, Kohaf N, Singh C, Johns R, Jakkula P, Hastings N. The Diabetes-Heart Disease Connection: Recent Discoveries and Implications. *Curr Probl Cardiol*. 2023;48(11):101923. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2023.101923.
178. Mak KH, Vidal-Petiot E, Young R, Sorbets E, Greenlaw N, Ford I, Tendera M, Ferrari R, Tardif JC, Udell JA, Escobedo J. Prevalence of diabetes and impact on cardiovascular events and mortality in patients with chronic coronary syndromes, across multiple geographical regions and ethnicities. *European journal of preventive cardiology*. 2021 Dec 1;28(16):1795-806.
179. Pakzad R, Tayebi Z, Kashkooli RI, Abdi F. Clinical outcomes of off-pump coronary artery bypass graft in patients with diabetes and non-diabetics: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022 Nov 1;16(11):102643.
180. Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic Batut”. Incidence and mortality of diabetes in Serbia 2022. Belgrade: IPHS; 2022. Available from: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/IncidencijaIMortalitetOdDijabetesaUSrbiji2022.pdf>
181. Melly L, Torregrossa G, Lee T, Jansens JL, Puskas JD. Fifty years of coronary artery bypass grafting. *J Thorac Dis*. 2018 Mar;10(3):1960-1967. doi: 10.21037/jtd.2018.02.43.
182. Matkovic M, Tutus V, Bilbija I, Lazovic JM, Savic M, Cubrilo M, et al. Long term outcomes of the off-pump and on-pump coronary artery bypass grafting in a high-volume center. *Sci Rep*. 2019;9(1):8567.
183. Shahian DM, O'Brien SM, Sheng S, et al. Predictors of long-term survival after coronary artery bypass grafting surgery: results from the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery Database (the ASCERT study). *Circulation* 2012;125:1491-500. 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066902
184. Farkouh ME, Domanski M, Sleeper LA, et al. Strategies for multivessel revascularization in patients with diabetes. *N Engl J Med* 2012;367:2375-84. 10.1056/NEJMoa1211585
185. Mohr FW, Morice MC, Kappetein AP, et al. Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomised, clinical SYNTAX trial. *Lancet* 2013;381:629-38. 10.1016/S0140-6736(13)60141-5

186. Montrief T, Koyfman A, Long B. Coronary artery bypass graft surgery complications: A review for emergency clinicians. *The American journal of emergency medicine*. 2018 Dec 1;36(12):2289-97.
187. Maisel WH, Rawn JD, Stevenson WG. Atrial fibrillation after cardiac surgery. *Ann Intern Med*. 2001;135(12):1061-73.
188. Villareal RP, Hariharan R, Liu BC, et al. Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:742–8.
189. Taha A, Nielsen SJ, Bergfeldt L, Ahlsson A, Friberg L, Björck S, Franzén S, Jeppsson A. New-onset atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting and long-term outcome: a population-based nationwide study from the SWEDEHEART registry. *Journal of the American Heart Association*. 2021 Jan 5;10(1):e017966.
190. Seo EJ, Hong J, Lee HJ, Son YJ. Perioperative risk factors for new-onset postoperative atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: a systematic review. *BMC cardiovascular disorders*. 2021 Sep 3;21(1):418.
191. Nalysnyk L, Fahrbach K, Reynolds MW, Zhao SZ, Ross S. Adverse events in coronary artery bypass graft (CABG) trials: a systematic review and analysis. *Heart*. 2003 Jul 1;89(7):767-72.
192. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004 Jun;4(6):337-48. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01044-8.
193. Oumarou Hama H, Aboudharam G, Barbieri R, Lepidi H, Drancourt M. Immunohistochemical diagnosis of human infectious diseases: a review. *Diagnostic Pathology*. 2022 Jan 30;17(1):17.
194. Kuo CC, Campbell LA. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *The Journal of infectious diseases*. 2000 Jun 1;181(Supplement_3):S432-6.
195. Ouchi K. Detection of infective agents in atherosclerotic tissues. In *International Congress Series* 2004 May 1 (Vol. 1262, pp. 434-437). Elsevier
196. Kowalski M. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol*. 2001 Aug;52(1 Suppl 1):3-31. PMID: 11795863.
197. Reszka E, Jegier B, Wasowicz W, Lelonek M, Banach M, Jaszewski R. Detection of infectious agents by polymerase chain reaction in human aortic wall. *Cardiovascular Pathology*. 2008 Sep 1;17(5):297-302.
198. Iriz E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, Ozdogan ME, Turet S, Yener A. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in aortic and left internal mammary artery biopsies. *Tex Heart Inst J*. 2008;35(2):130-5.
199. Iriz, E., Cirak, M. Y., Zor, M. H., Engin, D., Oktar, L., & Unal, Y. Differential identification of atypical pneumonia pathogens in aorta and internal mammary artery related to ankle brachial index and walking distance. *Journal of Surgical Research*, 2013,183(2), 537-541.
200. Kilic A, Onguru O, Tugcu H, Kilic S, Guney C, Bilge Y. Detection of cytomegalovirus and *Helicobacter pylori* DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR. *Pol J Microbiol*. 2006;55(4):333-7. PMID: 17416070.
201. Jia YJ, Liu J, Han FF, Wan ZR, Gong LL, Liu H, Zhang W, Wardell T, Lv YL, Liu LH. Cytomegalovirus infection and atherosclerosis risk: a meta-analysis. *Journal of medical virology*. 2017 Dec;89(12):2196-206.

202. Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Goldin R, et al. Chlamydia pneumoniae in infrequently examined blood vessels. *Journal of Clinical Pathology*, 2002;55:218-220.
203. Adiloglu AK, Ocal A, Can R, Duver H, Yavuz T, Aridogan BC. Detection of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae DNA in human coronary arteries and evaluation of the results with serologic evidence of inflammation. *Saudi Med J*. 2005 Jul;26(7):1068-74. PMID: 16047055.
204. Lee M, Baek H, Park JS, Kim S, Kyung C, et al. Current Helicobacter pylori infection is significantly associated with subclinical coronary atherosclerosis in healthy subjects: A cross-sectional study. *PLOS ONE*, 2018, 13(3): e0193646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193646>
205. Karbasi-Afshar R, Khedmat H, Izadi M. Helicobacter Pylori Infection and Atherosclerosis: a Systematic Review. *Acta Med Iran*. 1;53(2):78-88.
206. Xu C, Yan M, Sun Y, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection and its relation with body mass index in a Chinese population. *Helicobacter*. 2014;19(6):437–442. doi:10.1111/hel.12153
207. Riad M. Association of Helicobacter pylori infection with coronary artery disease: is it an independent risk factor? *Egypt Heart J*. 2021 Jul 3;73(1):61. doi: 10.1186/s43044-021-00185-2.
208. Mohammadzadeh, E., Jalali-Jalalabadi, H., Abdolahinia, E. D., & Narimisa, N. The effect of Chlamydia pneumoniae infection on serum lipid profile: A systematic review and meta-analysis. *Gene Reports*, 2022, 27, 101585
209. Vasilieva E, Gianella S, Freeman ML. Novel Strategies to Combat CMV-Related Cardiovascular Disease. *Pathog Immun*. 2020 Sep 20;5(1):240-274. doi: 10.20411/pai.v5i1.382.
210. Khoshbayan, A., Taheri, F., Moghadam, M. T., Chegini, Z., & Shariati, A. The association of Chlamydia pneumoniae infection with atherosclerosis: review and update of in vitro and animal studies. *Microbial pathogenesis*, 2021, 154, 104803.
211. Filardo S, Di Pietro M, Farcomeni A et al. Chlamydia pneumoniae-Mediated Inflammation in Atherosclerosis: A Meta-Analysis. Hindawi Publishing Corporation. *Mediators Inflamm* 2015: Article ID 378658. <https://doi.org/10.1155/2015/378658>
212. Johnston SC, Messina LM, Browner WS, Lawton MT, Morris C, Dean D. C-reactive protein levels and viable Chlamydia pneumoniae in carotid artery atherosclerosis. *Stroke*. 2001 Dec 1;32(12):2748-52. doi: 10.1161/hs1201.099631.
213. Izadi M, Fazel M, Akrami M, Saadat SH, Pishgoo B, Nasserri MH, Dabiri H, SafiAryan R, Esfahani AA, Ahmadi A, Kazemi-Saleh D, Kalantar-Motamed MH, Taheri S. Chlamydia Pneumoniae in the Atherosclerotic Plaques of Coronary Artery Disease Patients. *Acta Med Iran*. 1;51(12):864-870.
214. Yusuf, S. W., & Mishra, R. M. Effect of Helicobacter pylori infection on fibrinogen level in elderly patients with ischaemic heart disease. *Acta Cardiologica*, 2002, 57(5), 317–322. <https://doi.org/10.2143/AC.57.5.2005446>
215. Kountouras J, Polyzos SA, Katsinelos P, Zeglinas C, Artemaki F, Tzivras D, Vardaka E, Gavalas E, Romiopoulou I, Simeonidou C, Grigoriadis N, Kountouras C, Dardiotis E, Deretzi G. Cardio-cerebrovascular disease and Helicobacter pylori-related metabolic syndrome: We consider eradication therapy as a potential cardio-cerebrovascular prevention strategy. *Int J Cardiol*. 2017 Feb 15;229:17-18. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.265. Epub 2016 Nov 19. PMID: 27887801.

216. Pan, W., Zhang, H., Wang, L., Zhu, T., Chen, B., & Fan, J. Association between *Helicobacter pylori* infection and kidney damage in patients with peptic ulcer. *Renal failure*, 2019, 41(1), 1028-1034
217. Wijarnpreecha, K., Thongprayoon, C., Nissaisorakarn, P., Jaruvongvanich, V., Nakkala, K., Rajapakse, R. and Cheungpasitporn, W. Association of *Helicobacter pylori* with chronic kidney diseases: a meta-analysis. *Digestive diseases and sciences*, 2017, 62, pp.2045-2052.
218. Shin SP, Bang CS, Lee JJ, Baik GH. *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gut Liver*. 2019 Nov 15;13(6):628-641. doi: 10.5009/gnl18517.
219. Lu LJ, Hao NB, Liu JJ, Li X, Wang RL. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and metabolic abnormality in general population: A cross-sectional study. *Gastroenterology research and practice*. 2018;2018(1):7410801.
220. Oruç M, Köroğlu E. *Helicobacter pylori* infection and kidney damage: Is there an association? *Cerrahpaşa Med J*. 2022;46(1):50-55.
221. Wang X, Jia Z, Zhang Y, Kou C, Jiang J. Association of *Helicobacter pylori* infection with estimated glomerular filtration rate in a Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021 Dec 1;96:105102.
222. Rahel BM, Visseren FL, Suttorp MJ, Plokker TH, Kelder JC, de Jongh BM, Diepersloot RJ, Verkooyen RP, Bouter KP. Cytomegalovirus and *Chlamydia pneumoniae* as predictors for adverse events and angina pectoris after percutaneous coronary intervention. *American Heart Journal*. 2004 Oct 1;148(4):670-5.
223. Xue L, Liang YH, Gao YY, Wang XJ. Clinical study of *chlamydia pneumoniae* infection in patients with coronary heart disease. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2019 May 14;19(1):110.
224. Yaslianifard, S., Sameni, F., Kazemi, K. et al. Beyond the gut: a comprehensive meta-analysis on *Helicobacter pylori* infection and cardiovascular complications. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 24, 18 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12941-025-00788-6>
225. Radke, P., Merkelbach-Bruse, S., Dörge, H., Naami, A., Vogel, G., Messmer, B., Handt, S., & Hanrath, P. (2001). [Direct evidence of cytomegalovirus in coronary atheromas of patients with advance coronary heart artery disease].. *Medizinische Klinik*, 96 3, 129-34.
226. Landry, A.; Docherty, P.; Ouellette, S.; Cartier, L.J. Causes and outcomes of markedly elevated C-reactive protein levels. *Can. Fam. Physician* 2017, 63, e316–e323.

Publikovani radovi iz teze:

1. Šaćić D, Tomić U, Milašin J, Putnik S, Jovanović M, Radojević Škodrić S, Glumac S. The Detection of Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori and Cytomegalovirus in Non-Atherosclerotic Arteries of Patients with Coronary Artery Disease. Pathogens. 2024 Oct 25;13(11):927. doi: 10.3390/pathogens13110927.
2. Šaćić D, Glumac S, Radojević-Škodrić S. The significance of inflammation in pathogenesis, diagnosis and treatment of atherosclerosis. Medicinski podmladak. 2025; 76(1):42-7, doi:10.5937/mp76-48564

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dalila Šaćić Osmanović, rođena 16.01.1991. godine u Novom Pazaru.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala 2009., a završila u maju 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,61.

U toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i obrazovanja, zbog postignutog uspeha. Takođe, bila je stipendista Fonda za mlade talente „Dositeja“ za stipendiranje 800 najboljih studenata završnih godina osnovnih akademskih studija u Republici Srbiji, 2014/2015. godine.

Na doktorskim je studijama Univerziteta u Beogradu iz molekularne medicine.

Mentor je prof. dr Sofija Glumac, komentori su prof. dr Svetozar Putnik i prof. dr Jelena Milašin.

Zaposlena je u Univerzitetskom kliničkom centru Srbije na Klinici za kardiologiju od 2018. godine na određeno vreme, a od 2019. na neodređeno odlukom Ministarstva zdravlja za 100 najboljih diplomiranih studenata medicine.

Položen specijalistički ispit iz interne medicine 28. juna 2021. godine sa odličnim uspehom.

Ispit iz uže specijalizacije (kardiologije) položila u decembru 2022. godine sa ocenom 10.

Odbranjen rad iz uže specijalizacije (kardiologije) pod nazivom „Prediktori intrahospitalnog mortaliteta u infektivnom endokarditisu“ 10.07.2023.

Uspešno je završila edukaciju iz ehokardiografije na Klinici za kardiologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije 2024. godine kod prof. dr Danijele Zamaklar Trifunović.

Redovno učestvuje na kongresima interne medicine i kardiologije.

Autor i koautor je više naučno-istraživačkih radova.

Član je Evropskog udruženja kardiologa i Srpskog lekarskog društva

Govori engleski jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Далила Шачић Османовић**

Број индекса: ММ 06/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИНФЕКТИВНИХ АГЕНАСА У НЕАТЕРОСКЛЕРОТСКИМ ДЕЛОВИМА КОРОНАРНИХ АРТЕРИЈА, УНУТРАШЊЕ ГРУДНЕ АРТЕРИЈЕ И АОРТЕ КОД БОЛЕСНИКА СА КОРОНАРНОМ БОЛЕШЋУ ”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Далила Шачић Османовић**

Број индекса ММ 06/15

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада “ **ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИНФЕКТИВНИХ АГЕНАСА У НЕАТЕРОСКЛЕРОТСКИМ ДЕЛОВИМА КОРОНАРНИХ АРТЕРИЈА, УНУТРАШЊЕ ГРУДНЕ АРТЕРИЈЕ И АОРТЕ КОД БОЛЕСНИКА СА КОРОНАРНОМ БОЛЕШЋУ** ”

Ментор

Проф. др Софија Глумац

Проф. др Светозар Путник

Проф. др Јелена Милашин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“ ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИНФЕКТИВНИХ АГЕНАСА У НЕАТЕРОСКЛЕРОТСКИМ ДЕЛОВИМА КОРОНАРНИХ АРТЕРИЈА, УНУТРАШЊЕ ГРУДНЕ АРТЕРИЈЕ И АОРТЕ КОД БОЛЕСНИКА СА КОРОНАРНОМ БОЛЕШЋУ ”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.