

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT
-REZUMAT-**

***STUDIU
HISTOLOGIC, MORFOMETRIC,
IMUNOHISTOCHEMIC, EXPERIMENTAL
AL MODIFICĂRILOR VASELOR MENINGOCEREBRALE
INDUSE DE DIETA BOGATĂ ÎN ACIZI GRAȘI SATURAȚI***

**Conducător de Doctorat,
Prof. Univ. Dr. LAURENȚIU MOGOANTĂ**

**Student - Doctorand,
RADU STĂNESCU**

**CRAIOVA
2013**

CUPRINS

Introducere	3
-------------	---

PARTEA GENERALĂ

Capitolul I. Macro- și microvascularizația sistemului nervos central, fiziologie	3
--	---

Capitolul II. Ateroscleroza cerebrală	4
---------------------------------------	---

Capitolul III. Lipidele alimentare și acizii grași saturați	4
---	---

CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul IV. Studiul experimental	5
------------------------------------	---

Capitolul V. Studiul histologic	5
---------------------------------	---

Capitolul VI. Studiul imunohistochimic	6
--	---

Capitolul VII. Studiul morfometric	7
------------------------------------	---

CONCLUZII	8
-----------	---

Bibliografie selectivă	8
------------------------	---

CUVINTE CHEIE:

Acizi grași nesaturați, Acizi grași saturați, Ateroscleroza, Bariera hematoencefalică, Dietă bogată în grăsimi.

INTRODUCERE

Deși accidentul vascular cerebral, cunoscut în literatura internațională de specialitate drept “stroke”, este principala cauză de deces în mari țări din extremul orient, cum ar fi China și Japonia, în occident ocupă “abia” locul 3, ceea ce înseamnă, totuși, 1,5 milioane de decese anual (Wolinsky et al., 2009). În Statele Unite, datele statistice ale mortalității din 2007 evidențiază 1 deces prin stroke la fiecare 18 decese, față de numai 1 deces prin boli coronare la fiecare 6 decese (Roger et al., 2011). Mortalitatea prin stroke a scăzut în timp, de la 104,0 cazuri de deces/100,000 locuitori, în 1950 la 44,1 în 2008. Această evoluție descendentă se menține și astăzi, stroke evidențiindu-se pe locul 4 între cele 15 cauze de deces în 2010, după bolile cardiace, bolile neoplazice și bolile cronice respiratorii, clasificare asemănătoare și Uniunii Europene (Kunst et al., 2011).

În Europa de Est, inclusiv în România, dinamica mortalității prin stroke este evident diferită de Europa Centrală și de Vest. Astfel, rata mortalității prin stroke a fost semnificativ crescută între anii 1990-1996, urmată de scadere ușoară (Dolea et al., 2002). Totuși în 2005 mortalitatea prin stroke a surclasat mortalitatea prin boli cardiace coronare (30635 cazuri de deces prin infarct vs. 26633 cazuri deces prin boli cardiace coronare, din 123640 cazuri decese) (Allender et al., 2008).

Statisticile biroului Uniunii Europene Eurostat publicate pentru perioada 2001-2009 arată că, în România, mortalitatea prin boli cerebrovasculare egalează mortalitatea prin boli coronare cardiace, în timp ce în Europa Centrală și de Vest mortalitatea prin boli cerebrovasculare este în declin (European Commission, Eurostat, 2011). Este interesantă lipsa corelației acestor date cu variația valorilor colesterolului total, care la nivelul României a evoluat descrescent de la 5,4mmol/l în 1980 la mai puțin de 5mmol/l în 2004-2008 (World Health Organization, 2011).

Scopul nostru a fost de a efectua un studiu experimental pentru a evalua corelația dintre modificările arterelor meningocerebrale și dieta cu acizi grași saturați, dar și pentru a analiza modul în care calitatea dietei (acizi grași saturați/acizi grași nesaturați) influențează structura pereților arteriali.

CAPITOLUL I

MACRO- ȘI MICROVASCULARIZAȚIA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL, FIZIOLOGIE.

Vascularizația arterială cerebrală este derivată din două perechi de artere: arterele vertebrale și artere carotide interne. Arterele vertebrale confluează pe linia mediană pentru a forma artera vertebrală, care se bifurcă apoi pentru a forma arterele cerebrale posterioare. Arterele vertebrale și bazilară vascularizează prin ramurile lor maduva, puntea, cerebelul, mezencefalul, porțiunea caudală a diencefalului, lobul occipital și porțiunea inferioară a lobului temporal posterior.

Arterele carotide interne se divid în două ramuri terminale: artera cerebrală anterioară, care vascularizează porțiunea inferioară și medială din lobul frontal și porțiunea medială a lobului parietal, și artera cerebrală medie, care vascularizează porțiunea laterală a girusului orbital și lobul frontal, parietal și temporal. Ramurile subpiale ale arterelor cerebrale medii anastomozează pe suprafața laterală a creierului cu ramurile subpiale ale arterelor cerebrale anterioare și posterioare.

Între cele două sisteme se formează astfel o structură anastomotică de importanță deosebită numită Cercul Arterial al Creierului (Poligonul lui Willis). Constă în trei mari perechi de artere: arterele anteroare, medii și posterioare, o pereche de artere comunicante posterioare și o singură arteră comunicantă anterioară. (Crossman, 2005; Noback et al., 2005).

HISTOLOGIA ARTERELOR CEREBRALE

Arterele cerebrale au caracteristici diferite față de alte artere: peretele lor este mai subțire și lamina elastică externă este absentă. În schimb sunt prezente prelungirile astrocitelor la nivel parenchimos cerebral, precum și teaca reticulară perivasculară formată din trabecule arahnoidale, la nivel subpial (Afifi, 2005).

Din punct de vedere structural, capilarele cerebrale sunt asemănătoare altor capilare, dar sunt înconjurate de prelungiri astrocitare, împreună integrându-se în bariera hematoencefalică. Aceasta este formată din celule endoteliale ale creierului, pericite și astrocite. Împreună cu neuronii, formează unitatea neurovasculară (Hawkins and Davis, 2005).

FIZIOLOGIA VASCULARIZAȚIEI CEREBRALE

Bariera hematoencefalică protejează neuronii de fluctuațiile din compoziția plasmei având astfel un rol important în homeostazia micromediului neuronal. Specificitatea sa constă în joncțiunile strânse și sistemul de transport care reglează schimburile la nivel molecular (Abbot, 2002).

Lipsa redistribuirii capilare clasice, datorată tunicii medii mai subțiri, este suplinită de prezența redistribuirii funcționale. Cele mai importante caracteristici fiziologice sunt: difuziunea oxigenului și glucozei, heterogenitatea capilară, asocierea dintre curgerea vasculară cerebrală și metabolizarea cerebrală a glucozei. (Paulson et al., 2010).

CAPITOLUL II ATEROSCLEROZA CEREBRALĂ

Clasificarea actuală așa cum este ea propusă de American Heart Association cuprinde cinci tipuri, de fapt stadii ale evoluției aterosclerozei. Tipul I (leziunea inițială) și Tipul II (predispusă la progresie – evolutivă = tip Ia, predispusă la rezistență = Ib) corespund leziunilor inițiale, adică vacuolizări și benzi lipidice. Tipul III este o leziune intermediară (preaterom). Tipul IV reprezintă ateromul cu capișon fibros și tipul V cuprinde alte trei subtipuri Va (fibroateromul), Vb (placa calcificată) și Vc (placa fibroasă). Tipul VI include leziuni cu defecte de suprafață, hematom, hemoragii și depozite trombotice, toate acestea fiind cunoscute și ca placă cu complicații (leziune complicată) (Stary et al., 1994, 1995). Pe de altă parte, Virmani et al. (2000) propune o clasificare simplificată care se bazează pe morfologie descriptivă: leziuni nonaterosclerotice intimale (îngroșare intimală și xantomul intimal sau benzile lipidice), leziunile progresive aterosclerotice (îngroșarea intimală patologică, ateromul cu capișon fibros, fibroateromul cu capișon subțire, ruptura plăcii, noduli calcificați, placa fibrocalcificată).

CAPITOLUL III LIPIDELE ALIMENTARE SI ACIZII GRAȘI SATURAȚI

Acizii grași joacă un rol cheie în metabolism. Atât cei liberi, cât și cei care intră în componența lipidelor complexe, constituie un combustibil metabolic major, o formă de transport a energiei (prin lipoproteine se transportă în sânge trigliceridele cu coeficient caloric mare), o formă de depozit energetic (prin țesutul adipos), o componentă esențială în structura tuturor membranelor celulare (fosfolipide), un izolator (termic, mecanic și electric) și un regulator genetic (transcripție). Mai mult, acizii grași și sărurile lor pot acționa ca săpunuri și detergenți, datorită proprietăților lor amfifatice și formării de miceli (Rustan A., Dreven C, 2001).

Mecanismul prin care dieta bogată în acizi grași saturați poate afecta creierul constă în modificarea profilului lipidic care dezechilibrează parametrii metabolici și reduce oxidul nitric din creier rezultat în urma peroxidării lipidelor (Amin et al., 2011). Lipoproteinele anterogonice, așa cum este lipoproteina B, inițiază procesul anterogenezei. Aceste lipoproteine reținute induc un răspuns inflamator dominat de macrofage și celulele T (Tabas et al., 2007).

CAPITOL IV STUDIUL EXPERIMENTAL

Toate experimentele au fost efectuate conform directivele Comunității Europene (86/609/EEC) și au fost avizate de de Comisia pentru Probleme Juridice, Etice și Disciplină Universitară din cadrul Universitatii de Medicină și Farmacie din Craiova. (Nr 12/9.03.2012)

Au fost selecționați 72 de șobolani Wistar, cu greutatea între 200 și 300 de g, care au fost împărțiți aleatoriu în 7 grupuri: 1 grup alcătuit din 18 șobolani Wistar hrăniți cu dietă standard și 6 grupuri experimentale de câte 9 șobolani Wistar hrăniți cu dietă bogată în acizi grași saturați astfel: 6 șobolani din fiecare grup au fost hrăniți cu dietă bogată în acizi grași saturați (ulei de palmier), și 3 șobolani au fost hrăniți cu acizi grași nesaturați (untar).

Șobolani au avut acces liber la apă și hrană. Lotul martor și loturile experimentale au fost ținute în aceleași condiții de microclimat: Temperatură $21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, Umiditate relativă 45-65%, Ciclul de lumină 12/12. A fost respectată etica experimentului pe animale pe toată perioada experimentului.

Șobolani au fost sacrificați după 12, 18, 24, 30, 36 și respectiv un an.

Sacrificarea a fost făcută în conformitate cu normele Comisiei de Bioetică. Șobolani au fost aneștizați cu Narcocil 1ml/Kgcorp și Ketamina 3ml/Kgcorp subcutanat. Sacrificarea a fost efectuată apoi prin decapitare.

După sacrificare s-a recoltat encefalul în totalitate, care a fost supus fixării prin imersie în soluție de formalină 10% timp de 24 ore. Apoi encefalul a fost secționat în plan median, emisfera stângă a encefalului a fost secționată în plan frontal, în piese de 3 mm grosime, emisfera dreaptă a fost secționată paramedian, de asemenea în piese de 3 mm grosime.

În următoarele etape, a fost inclus în parafină și secționat în cupe histologice cu grosimea de 3-5 μm care au fost colorate cu hematoxilin-eozină (pentru examinare histologică generală), impregnație argentică Gomori (pentru fibrele de reticulină), precum și colorația tricromică Masson, pentru a distinge celulele de țesutul conjunctiv înconjurător. Alte secțiuni histologice necolorate au fost transferate pe lame cu polilisină și apoi prelucrate pentru evidențierea celulelor musculare netede din peretele vascular En Vision, markerul alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA).

Examinarea histologică a fost efectuată cu un microscop Nikon Eclipse 55i (Nikon, Apidrag, Romania). Imaginile au fost apoi prelucrate digital cu o cameră de 5 Megapixeli CCD, cu sistem de răcire, conectată la un computer cu software Image Proplus 7 AMS (Media Cybernetics. Inc. Buckinghamshire, UK).

CAPITOL V STUDIUL HISTOLOGIC

Primul lot experimental a fost sacrificat la 12, apoi la 18 săptămâni de la începutul experimentului.

În cazul șoarecilor supuși dietei cu acizi grași saturați, la examinarea histologică am observat că primele leziuni apar la nivelul vaselor subpiale. Ocazional, am observat și hemoragii subpiale, hematii extravazate în spațiul subarahnoidian. De asemenea, am mai observat și mici vacuole, localizate la nivelul intimei și mediei peretelui superficial (pial) al arterelor. Aceste vacuole, sunt în general mari și unice, inegale de-a lungul circumferinței, în exteriorul laminei elastice interne. Prezența acestor leziuni microscopice denotă apariția vacuolizărilor lipidice în peretele arterelor, în special al arteriolelor, atât în tunica intimă cât și în tunica medie.

Considerăm ca dieta bogată în acizi grași saturați determină pătrunderea lipidelor, în special a acizilor grași saturați, prin endoteliu în învelișul intimal și subintimal, până la nivelul mușchiului neted din media arteriolară.

Câteva leziuni progresive au fost de asemenea observate la parenchimul cerebral. Datorită îngroșării arteriale modice, tunica medie fiind aproape inexistentă, leziunile intraparietale au fost observate cu dificultate. Totuși, am observat uneori prezența trombozelor intraluminale și a edemului perivascular, sub aspectul de manșon optic liber. Acest edem perivascular se întindea de-alungul capilarelor.

În studiul nostru, am observat deseori edem perivascular, de-alungul arteriolelor, venulelor și capilarelor. Am considerat că nu este un artefact, având în vedere distribuția sa inegală bi- și tridimensional, precum și datorită învecinării cu arteriole care nu aveau edem perivascular. Acest aspect denotă prezența unor leziuni microscopice în bariera hematoencefalică, probabil la nivelul joncțiunilor endoteliale. Credem că edemul perivascular are o origine vasogenă, datorată modificărilor biochimice apărute în special la nivelul intimei.

La șobolanii sacrificați la 24 și 30 săptămâni după începutul experimentului, am observat mai multe leziuni importante, evidențiate atât pe circumferința peretelui arterial cât și în profunzime, precum și îngroșarea evidentă a peretelui arterial.

La unii șobolani din grupul hrănit cu dieta bogată în acizi grași saturați am observat cele trei tipuri de leziuni evidențiate și anterior, vacuolizare, trombozare și edem perivascular, dar mult mai pronunțate. Arterele intraparenchimotoase au prezentat hematii aglutinate sau lizate, uneori cu tendință spre tromboză parietală. Vacuole au fost găsite în toate tuniciile peretelui arteriolar (intimă, medie și adventiție), cu o dispunere inegală circumferențială. Edemul circumferențial perivascular a produs o distanțare a arterelor chiar și față de venele lor satelite.

Relația dintre modificările peretelui arteriolar și hemoragie este complexă. Hemoragia s-ar putea datora îngroșării peretelui pial arteriolar consecutiv vacuolizării cu sau fără prezența fragilizării. Astfel, apare o hemoragie meningeală difuză. De data aceasta nu erau prezente doar câteva hematii în zona subpială, ci o hemoragie subarahnoidiană masivă.

Având în vedere că arteriolele erau separate de parenchimul înconjurător de către hematiile extravazate, am considerat că magnitudinea hemoragiei, la început subpială, a determinat leziuni în piamater și apoi o inundare succesivă în spațiul subarahnoidian.

La șobolanii supuși unei diete bogate în acizi grași nesaturați, leziunile par să evolueze mai degrabă către un model fibros decât către o dilacerare cu hemoragie succesivă. Chiar dacă vacuolizarea subintimală a fost prezentă, aceasta nu a condus la o dilacerare a fibrelor de collagen; dimpotrivă, a intervenit o fibroză intramurală. Chiar dacă s-a putut observa un polimorfism lezional, vacuolizările intramurale au fost însoțite de fibroză adventițială, evidențiată prin colorația tricromică Masson.

CAPITOL VI

STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC

Examinarea imunohistochimică a fost efectuată doar pe animalele sacrificate la finalul experimentului, după 1 an. La șobolanii supuși unei diete bogate în acizi grași nesaturați, markeri alfa-SMA au evidențiat tromboze intraluminale complete, urmate de o reorganizare a trombului cu multiple capilare căptușite cu celule endoteliale. Nu a fost cazul unei „restitutio ad integro”, deoarece tunica medie a fost discret marcată cu antoanticorpii alfa-SMA. Astfel, noua structurare de la nivelul vaselor în trombul nou format a permis reducerea circulației sângelui, dar această circulație se efectua dificil, în principal datorită frecării parietale și a lipsei unei reglări dinamice.

CAPITOL VII STUDIUL MORFOMETRIC

Morfometria arterelor mari, în special grosimea carotidelor este des folosită în sondajele randomizate ce folosesc tehnici bazate pe ultrasunete (Bots et al., 2003; Finn et al 2010). În schimb este mai puțin cunoscută degenerarea arterelor cerebrale mici datorată îmbătrânirii. Imaginile captate au fost procesate cu programul Lucia Net pentru analiza morfometrică.

Pentru fiecare arteră, am identificat și măsurat prin intermediul software-ului: d_i = diametru minim interior, D_i = diametrul maxim interior, d_o = diametru minim exterior, D_o = diametru maxim exterior, t_w = îngroșarea minimă a peretelui, T_w = îngroșarea maximă a peretelui, A_i = aria internă (intraluminală) a secțiunii arteriale, A_o = aria externă (totală) a secțiunii arteriale.

Aceste măsurători au fost folosite pentru a calcula anumiți parametri : indicele de uniformitate a îngroșării: $T_i = t_w/T_w$, aria secțiunii peretelui: $A_w = A_o - A_i$, raportul de grosime secțională: $T_r = A_w / A_o$.

Deviația medie și deviația standard au fost calculate pentru toate măsurătorile și indicii, respectând loturile și momentele de sacrificare ale experimentului.

Lamele supuse colorației cu hematoxylin eosină au fost mai accesibile analizei morfometrice decât cele impregnate argentic. Caracteristicile inegale ale fibrelor reticulare, în special a arterelor aterosclerotice, îngreunează identificarea limitelor interne și externe ale peretelui arterial.

O altă dificultate a fost cauzată de caracterul aleator al secțiunilor în raport cu traiectoria arterelor din vecinătate hipocampului. De aceea, numărul arterelor potrivite pentru analiză morfometrică, cele secționate transversal, a fost diferit de la un caz la altul.

Analizele morfometrice și analizele statistice nu arată modificări sugestive corelate cu dieta sau timpii de sacrificare. Chiar dacă o medie pare să se modifice semnificativ, deviația standard este prea mare pentru ca media să fie luată în considerație. Parametrul uniformității îngroșării variază de la 0.34 ± 0.03 la 0.29 ± 0.03 , în dieta normală, respective de la 0.34 ± 0.05 la 0.30 ± 0.04 în dieta bogată în acizi grași saturați. Mult mai folositori sunt parametrii legați de arie: raportul de grosime secțională crește de la 0.77 ± 0.01 după trei luni de dietă normală la 0.82 ± 0.02 după 5 luni. Loturile supuse unei diete bogate în acizi grași saturați au aceeași tendință, prezentând chiar o diferență mai mare: de la 0.77 ± 0.02 după trei luni la 0.84 ± 0.01 după 5 luni. Raportul dintre aria secțiunii transversale a peretelui și aria secțiunii transversale a lumenului este cel mai sugestiv argument pentru evaluarea modificărilor structurale ale arterelor cerebrale în condiții normale și patologice.

Experimentul nostru este concordantă cu studiile umane (O'Leary et al., 2010) privind evoluția "naturală" a îngroșării peretelui arterial. Impactul asupra permeabilității endoteliale este cu mult mai îngrijorător decât modificările structurale. În schimb, efectele dietei bogate în acizi grași asupra arterelor cerebrale nu se manifestă atât de evident.

Dieta bogată în acizi grași afectează peretele arterial într-o manieră vagă, comparativ cu îmbătrânirea arterială.

CONCLUZII:

- Dieta bogată în acizi grași saturați determină apariția vacuolelor probabil lipidice, în peretele arteriolar, deobicei subintimal, asociată cu tromboză, microhemoragie și edem perivascular.
- În primele faze ale experimentului, modificările vasculare menigocerebrale au fost de intensitate medie.
- Intensitatea procesului ateromatos a crescut în ultima fază a experimentului, datorită creșterii cantitative a consumului de acizi grași saturați din dietă.
- Dieta bogată în acizi grași saturați produce leziuni mai extinse decât dieta bogată în acizi grași nesaturați.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. **Abbott J.** *Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability.* J Anat. 2002 June; 200(6): 629–638.
2. **Afifi A., Bergman R.** *Functional Neuroanatomy: Text and Atlas*, 2nd Edition. McGraw-Hill, 2005: 348-354
3. **Allender S., Scarborough P., Peto V., Rayner M., Leal J., Luengo-Fernandez R., Gray .** *European cardiovascular disease statistics 2008*, University of Oxford, 2008.
4. **Amin K., Kamel H., Abd Eltawab M.** *The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid.* Lipids in Health and Disease, 2011, 10:74-84
5. **Bots M, Evans G, Riley W, Grobbee D.** *Carotid Intima-Media Thickness Measurements in Intervention Studies.* Stroke, 34: 2985-2994, 2003.
6. **Crossman A.R.,** *Vascular supply of the brain.* Gray's Anatomy The Thirtieth-Ninth Edition, Susan Standring editor in chief, Elsevier Edition, 2005, pp 295-303
7. **Dolea C., Nolte E., McKee M.** *Changing life expectancy in Romania after the transition.* J Epidemiol Community Health 2002;56:444–449.
8. **European Commission, Eurostat. Health statistics. 2011.** © European Union, 2011 ISBN: 978-92-79-18757-5.
9. **Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R.** *Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30:177-81, 2010.
10. **Hawkins B.T., Davis T.P.** *The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease.* Pharmacological Reviews June 2005 vol. 57 no. 2 173-185
11. **Kunst AE, Amiri M, Janssen F.** *The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries.* Stroke. 2011,42(8):2126-30.
12. **Noback C, Strominger N, Ruggiero D, Demarest R.** *The human nervous system: structure and function.* 6th ed. Humana Press Inc. 2005: 77-88.
13. **O'Leary D, Bots M.** *Imaging of atherosclerosis: carotid intima–media thickness.* Eur Heart J, 31: 1682-1689, 2010.
14. **Paulson OB, Hasselbalch SG, Rostrup E, Moos Knudsen G, Pelligrino D.** *Cerebral blood flow response to functional activation.* Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2010) 30, 2–14

15. **Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J;** on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association.* *Circulation.* 2011;123:e18–e209
16. **Rustan A., Drevon C.** *Fatty Acids: Structures and Properties.* *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES /* & 2001 Nature Publishing Group :1-7.
17. **Sтары HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis,* American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep 1995;15(9):1512-31
18. **Sтары HC, Chandler B, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis,* American Heart Association. *Circulation* 1994; 89:2462-2478.
19. **Tabas I, Williams KJ, Borén J.** Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. Update and therapeutic implications. *Circulation* 2007;116:1832-1844.
20. **Virmani R., Kolodgie F., Burke A., Farb A., Schwartz S.** *Lessons From Sudden Coronary Death : A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:1262-1275.
21. **Wolinsky F, Suzanne Bentler, Elizabeth Cook, Elizabeth Chrischilles, Li Liu, Kara Wright, Geweke J, Obrizan M, Claire Pavlik, Ohsfeldt R, Jones M, Wallace R, Rosenthal G.** *A 12-year prospective study of stroke risk in older Medicare beneficiaries.* *BMC Geriatrics* 2009, 9:17.
22. **World Health Organization - NCD Country Profiles, Romania 2011**