

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Snežana Ž. Jovičić

**FAKTORSKA ANALIZA I POVEZANOST
LIPIDNIH, INFLAMATORNIH, SRČANIH I
BUBREŽNIH BIOMARKERA SA
C-REAKTIVNIM PROTEINOM U
KATEGORIZACIJI
KARDIOVASKULARNOG RIZIKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Snežana Ž. Jovičić

**FACTOR ANALYSIS AND ASSOCIATION
OF LIPID, INFLAMMATORY, CARDIAC
AND RENAL BIOMARKERS WITH C-
REACTIVE PROTEIN IN
CARDIOVASCULAR RISK
CATEGORIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Eksperimentalni deo disertacije je urađen u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitivane su zdrave osobe koje su dobrovoljno pristale da učestvuju.

Članovi komisije:

Mentor

Prof. dr Nada Majkić-Singh, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. dr Svetlana Ignjatović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. dr Zorana Vasiljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane:

Zahvaljujem se svom mentoru, Prof. dr Nadi Majkić-Singh, na nesebičnoj podršci, kako u planiranju i izradi ove disertacije, pruženim savetima i sugestijama, tako i u mom profesionalnom razvoju. Neizmerno sam joj zahvalna što mi je najpre ukazala poverenje i neposredno po završenim studijama pružila mogućnost da radim u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije, a kasnije neprekidno podsticala moj rad i napredovanje.

Posebnu zahvalnost dugujem Prof. dr Svetlani Ignjatović, na nesebično prenesenom znanju, prvo tokom studija na Farmaceutskom fakultetu, a kasnije tokom mog desetogodišnjeg rada u Službi za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, kada su mi njeno poverenje i podrška predstavljali neizmerni podsticaj. Njena pomoć u definisanju teme, planiranju istraživanja i izradi disertacije bila mi je od neprocenjive važnosti.

Moja iskrena zahvalnost je upućena Prof. dr Zorani Vasiljević što je prihvatila da učestvuje u izradi ove disertacije kao član komisije. Njene sugestije i korekcije su mi bile od velike pomoći.

Zahvaljujem se mojim dragim kolegicama, dr sc. Marijani Dajak i Ranki Kangrgi, na nesebičnoj pomoći u izradi ove disertacije, kao i na dugogodišnjem poverenju, razumevanju i prijateljstvu.

Zahvalnost dugujem i ostalim kolegama iz Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku Centra za medicinsku biohemiju, koji su mi na bilo koji način pomagali, kao i laboratorijskim tehničarima Odeljenja „C“ koji su učestvovali u eksperimentalnom delu rada.

Zahvaljujem se svim ispitanicima bez čijeg dobrovoljnog učešća izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Svojim roditeljima i sestri dugujem posebnu i iskrenu zahvalnost za strpljenje, razumevanje, istrajnost i podršku tokom izrade ove disertacije.

*U znak zahvalnosti za bezgraničnu ljubav,
bezrezervnu podršku i razumevanje,
ovaj rad posvećujem svojim roditeljima
Katerini i Životiju Jovičić*

FAKTORSKA ANALIZA I POVEZANOST LIPIDNIH, INFLAMATORNIH, SRČANIH I BUBREŽNIH BIOMARKERA SA C-REAKTIVNIM PROTEINOM U KATEGORIZACIJI KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

Rezime

U kliničkoj praksi koristi se nekoliko skorova za procenu rizika od pojave različitih oblika kardiovaskularnih bolesti (KVB) koji se zasnivaju na multivarijabilnim regresionim jednačinama izvedenim iz rezultata praćenja različitih kohortnih grupa. Na osnovu prisustva tradicionalnih faktora rizika [hiperholesterolemija, hipertenzija, pol, starost, porodična istorija KVB, dijabetes i pušenje] definisanim algoritmima se izračunava apsolutni 10-godišnji rizik za koronarnu bolest srca (KBS) na osnovu Framingamskog rizik skora (FRS), 10-godišnji rizik od svih oblika KVB – tzv. „globalni KVB rizik“ (globalni FRS), kao i dugoročni (30-godišnji) rizik za KVB.

Ateroskleroza je bolest uslovljena brojnim faktorima koju prati hronična inflamacija niskog intenziteta i dislipidemija. Zahvaljujući velikom broju postojećih dokaza da C-reaktivni protein (CRP) snažno i nezavisno predviđa pojavu kardiovaskularnih komplikacija, primena CRP-a u kliničkoj praksi definisana je od strane nekoliko organizacija. Za proces ateroskleroze karakteristična je hronična inflamacija gde su koncentracije CRP-a u cirkulaciji niže od granice detekcije konvencionalnih testova. Određivanje tako niskih nivoa CRP-a zahteva testove sa većom analitičkom osetljivošću, koji se označavaju kao visoko osetljivi (*high-sensitivity*, hs), a na ovaj način određena koncentracija CRP-a kao „visoko osetljivi CRP“ (hsCRP). Takođe, postoje podaci i o drugim faktorima koji doprinose održavanju inflamacije ili odražavaju intenzitet aterosklerotskih procesa i koji bi mogli da identifikuju doprinos kardiovaskularnom riziku koji ne potiče od tradicionalnih faktora rizika, kao što su mokraćna kiselina, jačina glomerularne filtracije procenjena na osnovu koncentracije kreatinina ili cistatina C (eGFR), amino-terminalni pro-natriuretički peptid tipa B (NT-proBNP), srčani troponin (cTn).

Cilj rada bio je da se ispita da li postoji povezanost između hsCRP-a, ustanovljenog biomarkera proaterogenog metaboličkog stanja, i drugih biomarkera inflamacije [serumski amiloid A (SAA), fibrinogen, α_1 -kiselni glikoprotein (A1AGP), haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa), metabolizma lipida [ukupan, HDL, non-HDL i LDL holesterol, trigliceridi, apolipoprotein A-I (apo A-I), apolipoprotein B (apo B), lipoprotein (a) (Lp(a))], bubrežne [kreatinin, cistatin C (Cys-C), procenjena jačina glomerularne filtracije (eGFR)] i srčane funkcije (NT-proBNP, cTnT), koji bi mogli da unaprede procenu kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji. Ispitane su i analitičke karakteristike i klinička efikasnost metode visoke osetljivosti koja se koristila za određivanje hsCRP-a. Faktorskom analizom ispitana je priroda uticaja svakog pojedinačnog biomarkera na kardiovaskularni rizik i eventualna povezanost sa vrednostima hsCRP-a, grupisanje ispitivanih biomarkera povezanih sa aterosklerozom i inflamacijom slabog intenziteta, kao i povezanost dobijenih faktora sa vrednostima hsCRP, kategorizacijom 10-godišnjeg rizika na osnovu FRS i globalnog FRS, kao i sa klasifikacijom 30-godišnjeg rizika.

Ispitivana populacija bile su zdrave osobe koje su dobrovoljno pristale da učestvuju. Ukupno je obuhvaćeno 242 osobe, 100 muškaraca i 142 žene, starosti između 20 i 80 godina, kojima nije dijagnostikovano nijedan vid KVB, diabetes mellitus, bubrežna, hepatična niti reumatološka oboljenja i koje nisu primale terapiju bilo koje vrste. Podaci o godinama starosti, visini i težini, o tome da li su pušači ili ne, da li redovno vežbaju ili se aktivno bave sportom, da li preventivno uzimaju aspirin, da li postoji porodična istorija KVB i, u slučaju žena, da li uzimaju oralna kontraceptivna sredstva, dobijeni su anketiranjem. Pre vađenja krvi, izmeren im je krvni pritisak.

Koncentracije ukupnog, non-HDL, HDL i LDL holesterola, triglicerida i hsCRP-a određene su na automatskom analizatoru Olympus AU2700 (Beckman Coulter). Za određivanje ukupnog holesterola i triglicerida korišćene su enzimске metode, za HDL holesterol direktna enzimska metoda, a LDL holesterol se izračunavao pomoći Friedewaldove formule i direktnom enzimskom metodom kod koncentracija triglicerida $>4,52$ mmol/L. Koncentracija non-HDL holesterola je izračunavana oduzimanjem koncentracije HDL-a od koncentracije ukupnog holesterola. hsCRP je određen imunoturbidimetrijskom metodom korišćenjem imunoturbidimetrijskog Olympus CRP (Latex) testa firme Beckman Coulter, na programu za senzitivnu aplikaciju. Analitičke karakteristike imunoturbidimetrijskog *Olympus* testa, procenjene su poređenjem sa imunonefelometrijskim određivanjem hsCRP-a *CardioPhase** testom (Siemens). Apo A-I, apo B, Lp(a), A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplemента su određene imunoturbidimetrijskim metodama (Abbott Diagnostics). Kreatinin je određen kinetičkom metodom sa alkalnim pikratom i mokraćna kiselina metodom sa urikazom (Abbott Diagnostics). SAA i Cys-C su takođe određivani korišćenjem imunonefelometrijskih metoda (Siemens). Koncentracije fibrinogena su određene izvođenjem iz protrombinskog vremena izmerenog na ACL 7000 analizatoru (Instrumentation Laboratory). NT-proBNP i cTnT su određeni elektrohemiluminescentim imunometrijskim metodama na analizatoru Cobas e601 (Roche Diagnostics). Procenjena jačina glomerularne filtracije je izračunavana pomoću jednačina zasnovanih na kreatininu (*Modification of diet in renal disease*, MDRD i *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, CKD-EPI) i cistatinu C (Hoek i sar.). Framinghamski rizik skor je izračunavan korišćenjem elektronskog kalkulatora „ATP III Risk Estimator ver. 2000“, globalni FRS pomoću elektronskog kalkulatora „CVD Risk Check“, a dugoročni 30-godišnji rizik pomoću interaktivnog kalkulatora „30-year risk of cardiovascular disease“.

Određivanje CRP *Olympus* visoko osetljivom metodom se može smatrati pouzdanim za određivanje niskih koncentracija CRP karakterističnih za hroničnu subkliničku inflamaciju na osnovu koeficijenata varijacije dobijenih iz rezultata analize osam serumskih *pool*-ova različitih koncentracija u opsegu 0,2–10,0 mg/L u seriji (Kv: 0,38–8,16%) i iz dana u dan (Kv: 3,75–9,63%). Dobijena vrednost granice detekcije je iznosila 0,11 mg/L.

Regresiona jednačina dobijena poređenjem rezultata dobijenih *Olympus* i imunonefelometrijskim metodama glasi $y=0,99x-0,002$ ($r=0,992$). Analizirana srednja vrednost relativnih razlika između dve metode pomoću Bland-Altman dijagrama iznosi -0,002% (95% CI=-0,082–0,078%). Student t-testom razlike parova određivanja pokazano je da razlika nije statistički značajna ($t=-0,421$; $P>0,05$).

Statistički značajne ($P<0,05$) vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije posle kontrolisanja uticaja starosti, pola, indeksa telesne mase (*body mass index*, BMI), hipertenzije i pušačkog statusa, dobijene su između koncentracije hsCRP i ukupnog

holesterola ($r=0,172$), non-HDL holesterola ($r=0,182$); LDL holesterola ($r=0,154$), apo B ($r=0,167$), fibrinogena ($r=0,411$), SAA ($r=0,493$), A1AGP ($r=0,462$), haptoglobina ($r=0,310$), C3 ($r=0,349$) i C4 ($r=0,371$). Postepenom multiplom linearnom regresionom analizom značajne ($P>0,05$) vrednosti regresionih koeficijenata dobijene su za BMI ($\beta=0,229$), fibrinogen ($\beta=0,250$), SAA ($\beta=0,293$), A1AGP ($\beta=0,272$) i non-HDL holesterol ($\beta=0,115$). Multinomialnom logističkom regresionom analizom BMI, fibrinogen, SAA i non-HDL holesterol su ostali snažni prediktori koncentracije hsCRP u serumu i posle korekcije za starost, pol, hipertenziju i pušenje.

Poređenjem vrednosti hsCRP sa koncentracijama mokraćne kiseline, srčanih i bubrežnih biomarkera značajne vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije posle kontrolisanja uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja dobijene su samo sa Cys-C ($r=0,151$; $P=0,016$) i $eGFR_{CysC}$ ($r=-0,126$; $P=0,046$). Postepenom multiplom linearnom regresionom analizom identifikovani su kreatinin ($\beta=-0,276$; $P=0,001$), Cys-C ($\beta=0,363$; $P<0,001$) i mokraćna kiselina ($\beta=0,293$; $P<0,001$) kao nezavisne determinante koncentracije hsCRP. Prediktivna vrednost dobijenog modela nije potvrđena logističkom regresijom, odnosno nijedan od izdvojenih parametara nije zadržao statističku značajnost.

Dobijeni apsolutni 10-godišnji rizik određen svim učesnicima je klasifikovan u kategorije sa $<10\%$, $10-20\%$ i $>20\%$. Rezultati Chi-kvadrat testa nezavisnosti pokazuju da je klasifikacija kardiovaskularnog rizika na osnovu vrednosti hsCRP nezavisna od kategorizacije primenom algoritma FRS ($\chi^2=7,079$; $P=0,1318$), dok ispitivane klasifikacije rizika na osnovu globalnog FRS i na osnovu koncentracije hsCRP nisu nezavisne jedna od druge ($\chi^2=13,295$; $P=0,0099$). Takođe, Chi-kvadrat test je pokazao da raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, $1-3$ mg/L i >3 mg/L nije nezavisna od raspodele u kategorijama 30-godišnjeg rizika i za „tešku KVB“ ($\chi^2=19,685$; $P=0,0001$) i za „kompletnu KVB“ ($\chi^2=15,559$; $P=0,0004$). Student t-test je pokazao statistički značajne razlike srednjih vrednosti aktuelne starosti i starosti srca/vaskularne starosti u pojedinim kategorijama koncentracije hsCRP ($P<0,05$). Takođe, ANOVA za jedan kriterijum klasifikacije je potvrdila statistički značajno povećanje razlike sa porastom koncentracije hsCRP ($P<0,001$).

Faktorskom analizom je od 19 polaznih parametara identifikovano 5 klastera, odnosno glavnih komponenti (faktora). Izdvojenim komponentama objašnjeno je 65,3% ukupne varijacije u ispitivanom sistemu, i to 29,0% faktorom 1; 13,2% faktorom 2; 9,0% faktorom 3; 8,5% faktorom 4 i 5,6% faktorom 5. Faktori su označeni kao 1) „sistemska inflamacija“ (fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponenta komplementa); 2) „kardiorenalni faktor“ (kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C, cTnT i pol); 3) „aterogeni holesterol“ (LDL i non-HDL holesterol); 4) „hemodinamski faktor“ (starost i NT-proBNP); i 5) „metabolički faktor“ (trigliceridi i HDL holesterol). Najbolju prediktivnu vrednost model sa svih pet faktora imao je za koncentracije hsCRP >1 mg/L, dok se značajnost potpuno izgubila ($P>0,05$) za „kardiorenalni faktor“ i „aterogeni holesterol“ u predikciji koncentracija >2 mg/L i >3 mg/L.

Poređenjem površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) tri logistička modela za ispitivane tri koncentracije hsCRP, logistički model 5 faktora sa $AUC=0,889$ nije se statistički značajno razlikovao u predviđanju koncentracije hsCRP >1 mg/L od modela sa 31 polaznih parametara ($AUC=0,922$) i od modela sa 19 parametara uključenih u faktorsku analizu ($AUC=0,915$) ($P=0,2113$ i $P=0,3359$, redom). Međutim, razlika između tri ispitivana logistička modela je bila statistički značajna u predviđanju vrednosti hsCRP >2 mg/L i hsCRP >3 mg/L.

U utvrđivanju povezanosti hsCRP i ispitivanih biomarkera sa algoritmima procene kratkoročnog i dugoročnog rizika, faktorskom analizom je od 18 polaznih parametara (među kojima nije bila prisutna ni multikolinearnost ni singularnost) identifikovano 5 klastera. Izdvojenim komponentama objašnjeno je 67,4% ukupne varijacije i to 29,7% faktorom 1; 12,5% faktorom 2; 11,0% faktorom 3, 7,6% faktorom 4 i 6,7% faktorom 5. Faktori su označeni kao 1) „sistemska inflamacija“ (hsCRP, fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponenta komplementa); 2) „aterogena dislipidemija“, (LDL i non-HDL holesterol, apo B i trigliceridi); 3) „kardiorenalni faktor“ (kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C i cTnT); 4) „hemodinamski faktor“ (NT-proBNP); i 5) „lipoproteinski faktor“ [apo A-I i Lp(a)].

U predikciji vrednosti povećanog rizika na osnovu FRS (>10%), faktor „sistemske inflamacije“ nije imao statistički značaj, dok je kod globalnog FRS to bio slučaj sa „lipoproteinskim faktorom“. Kod procene 30-godišnjeg rizika i od „kompletne“ i od „teške“ KVB, za vrednosti iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost „hemodinamski faktor“ nije imao statistički značajan prediktivni potencijal. Poređenjem AUC logističkog regresionog modela zasnovanog na izdvojenih pet faktora sa multivarijabilnim logističkim modelom sa 18 polaznih parametara koji nisu uključeni u algoritme procene rizika, u predikciji vrednosti FRS>10%, globalnog FRS>10% i povećanog 30-godišnjeg rizika za „kompletnu KVB“ i „tešku KVB“ nije dobijena statistički značajna razlika ni u jednom slučaju.

Rezultati su pokazali da su, među ispitivanim markerima inflamacije i lipidnog statusa povezanih sa aterosklerozom, posle serije regresionih analiza, samo BMI, non-HDL holesterol, fibrinogen i SAA ostali u nezavisnoj asocijaciji sa hsCRP. Dodatna informacija koju oni nose mogla bi da bude komplementarna prediktivnoj vrednosti hsCRP. Pokazana je i zavisnost između viših koncentracija hsCRP i većeg kratkoročnog i dugoročnog rizika od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija, kao i većeg dugoročnog rizika od pojave teških komplikacija KVB. Takođe, iz rezultata faktorske analize proizilazi da sistemska inflamacija, kardiorenalna funkcija, aterogeni lipidni profil, hemodinamski i metabolički status nezavisno doprinose patofiziologiji hronične, subkliničke inflamacije u aterosklerozi, koju oslikava koncentracija hsCRP. Aterogena dislipidemija, kardiorenalna funkcija i hemodinamski status nezavisno doprinose povećanom 10-godišnjem riziku procenjenom na osnovu standardnog FRS. Povećan globalni KVB rizik povezan je sa sistemskom inflamacijom, aterogenom dislipidemijom, kardiorenalnom funkcijom i hemodinamskim statusom. Dugoročnom, 30-godišnjem riziku iznad normalnog/optimalnog za pojavu teških komplikacija KVB i za pojavu svih oblika kardiovaskularnih komplikacija nezavisno doprinose sistemska inflamacija, aterogena dislipidemija, kardiorenalna funkcija i status lipoproteina.

Ključne reči: kardiovaskularna bolest, kardiovaskularni rizik, Framingamski rizik skor, C-reaktivni protein, inflamacija, lipidni status, bubrežna funkcija, srčani biomarkeri, faktorska analiza

Naučna oblast: Medicinske nauke - farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.112 : 616.1 : 612.46 (043.3)

FACTOR ANALYSIS AND ASSOCIATION OF LIPID, INFLAMMATORY, CARDIAC AND RENAL BIOMARKERS WITH C-REACTIVE PROTEIN IN CARDIOVASCULAR RISK CATEGORIZATION

Abstract

Several risk score algorithms for cardiovascular risk assessment based on multivariable regression equations derived from different cohorts are being used in clinical practice. According to presence of traditional risk factors [hypercholesterolemia, hypertension, gender, age, family history of premature cardiovascular disease (CVD), diabetes and cigarette smoking], absolute 10-year risk for coronary heart disease (CHD) according to Framingham risk score (FRS), 10-year risk for cardiovascular disease in general – „global CVD risk“ using global FRS, and long term (30-year) CVD risk are being calculated.

Atherosclerosis is a disease conditioned with multiple factors followed by chronic low-grade inflammation and dyslipidemia. Thanks to substantial evidence that C-reactive protein (CRP) strongly and independently predicts cardiovascular complications, the use of CRP in clinical practice is recommended by several institutions. Atherosclerosis process is characterized with chronic inflammation where circulating CRP concentrations are lower than limit of detection of conventional assays. For measuring such low CRP levels high-sensitivity (hsCRP) assays have been developed. Also, there are evidence of other factors, contributing to and maintaining the intensity of atherosclerotic processes, which might identify cardiovascular risk contribution not originated from traditional risk factors. These are uric acid, estimated glomerular filtration rate (eGFR) based on creatinine or cystatin C, amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), cardiac troponin (cTn).

The aim of this study was to examine whether there is association between hsCRP, as the established marker of proatherogenic metabolic state, and other biomarkers of inflammation [serum amyloid A (SAA), fibrinogen, α_1 -acid glycoprotein (A1AGP), haptoglobin, C3 and C4 complement components), lipid metabolism [total, HDL, non-HDL and LDL cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A-I (apo A-I), apolipoprotein B (apo B), lipoprotein (a) (Lp(a))], renal [creatinine, cystatin C (Cys-S), estimated glomerular filtration rate (eGFR)] and cardiac function (NT-proBNP, cTnT), which might promote cardiovascular risk assessment in primary prevention. The analytical performance and clinical efficacy of high sensitivity method used for CRP determination were also evaluated. Using factor analysis, the nature of influence of every single examined biomarker on cardiovascular risk and their possible connection to hsCRP values, also clustering of examined biomarkers associated with atherosclerosis and low-grade inflammation, as well as relations of identified factors with hsCRP values, 10-year risk categorization based on FRS and global FRS, and 30-year risk classification, were analyzed.

The examined population were 242 healthy volunteers, 100 men and 142 women, 20–80 years old. They were free of diabetes mellitus and of any known cardiac, renal, hepatic and rheumatic disease, and were not taking any prescribed medication. Information about their age, smoking habits, body weight and height, physical activity,

family history of CVD, aspirin intake and, in case of women, if they were taking any oral contraceptives, were obtained through questionnaire. Blood pressure was measured prior to venipuncture.

Serum concentrations of total, non-HDL, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and hsCRP were measured on Olympus AU2700 automated analyzer (Beckman Coulter). Concentrations of total cholesterol and triglycerides were determined using enzymatic assays, of HDL cholesterol using direct enzymatic method and the concentration of LDL cholesterol was calculated by the Friedwald formula, but for samples with triglyceride concentrations >4.50 mmol/L, it was determined using direct enzymatic method. Non-HDL cholesterol concentration was calculated by subtraction of HDL cholesterol from total cholesterol concentration. Concentration of hsCRP was measured with the Olympus immunoturbidimetric latex assay (sensitive application) by Beckman Coulter. Analytical characteristics of Olympus immunoturbidimetric assay were evaluated by comparison with the immunonephelometric CardioPhase* hsCRP assay (Siemens). Apo A-I, apo B, Lp(a), A1AGP, haptoglobin, C3 and C4 complement components were determined by immunoturbidimetric procedures (Abbott Diagnostics). Creatinine concentration was measured by kinetic alkaline picrate method, and uric acid by uricase method (Abbott Diagnostics). SAA and Cys-C were also determined using immunonephelometric assays (Siemens). Fibrinogen concentration was measured by prothrombin time-based method on ACL 7000 analyzer (Instrumentation Laboratory). NT-proBNP and cTnT were determined by electrochemiluminescent immunometric method on Cobas e601 analyzer (Roche Diagnostics). Estimated glomerular filtration rate was calculated using serum creatinine based (Modification of diet in renal disease, MDRD, and Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CKD-EPI) and cystatin C based (Hoek et al.) formulas. FRS was calculated using electronic calculator „ATP III Risk Estimator version 2000“, global FRS using electronic calculator „CVD Risk Check“, and long-term 30-year risk using interactive calculator „30-year risk of cardiovascular disease“.

Determination of CRP using Olympus high sensitivity assay was found to be reliable for determination of low CRP concentrations, which is typical for chronic subclinical inflammation, based on coefficients of variation within-run (CV: 0.38–8.16%) and from day to day (CV: 3.75–9.63%), obtained from results of eight serum pools analysis with concentrations in the range of 0.2–10.0 mg/L. The obtained limit of detection was 0.11 mg/L.

Regression equation obtained by comparison of results of Olympus and immunonephelometric method was $y=0.99x-0.002$ ($r=0.992$). Mean difference between two methods analyzed with Bland-Altman plot was -0.002% (95% CI=-0.082–0.078%). Student t-test showed that the difference between paired determinations was not significant ($t=-0.421$; $P>0.05$).

Statistically significantly ($P<0.05$) different values of Pearson's correlation coefficients after controlling for age, gender, body mass index (BMI), hypertension, and smoking status were found between hsCRP concentration and total cholesterol ($r=0.172$), non-HDL cholesterol ($r=0.182$), LDL cholesterol ($r=0.154$), apo B ($r=0.167$), fibrinogen ($r=0.411$), SAA ($r=0.493$), A1AGP ($r=0.462$), haptoglobin ($r=0.310$), C3 ($r=0.349$), and C4 ($r=0.371$). Stepwise multiple linear regression analysis showed significant values of regression coefficients for BMI ($\beta=0.229$), fibrinogen ($\beta=0.250$), SAA ($\beta=0.293$), A1AGP ($\beta=0.272$), and non-HDL cholesterol ($\beta=0.115$). According to subsequent multinomial logistic regression analysis, BMI, fibrinogen, SAA, and non-

HDL cholesterol remained strong predictors of serum hsCRP concentration, even after adjustment for age, gender, hypertension, and smoking status.

By comparing hsCRP values with uric acid, cardiac and renal biomarker concentrations, statistically significant values of Pearson's coefficients of correlation, after controlling for age, gender, BMI, hypertension and smoking, were obtained only for Cys-C ($r=0.151$, $P=0.016$) and $eGFR_{CysC}$ ($r=-0.126$, $P=0.046$). Stepwise multiple linear regression analysis identified creatinine ($\beta=-0.276$, $P=0.001$), Cys-C ($\beta=0.363$, $P<0.001$), and uric acid ($\beta=0.293$, $P<0.001$) as independent determinants of hsCRP concentration. Predictive value of this model was not confirmed with logistic regression analysis, i.e. none of the selected parameters did not maintain its statistical significance.

Absolute 10-year risk was determined in all participants and classified into categories of <10%, 10–20%, and >20%. Results of Chi-square test of independence showed that cardiovascular risk classification based on hsCRP values was independent from classification according to FRS algorithm ($\chi^2=7.079$, $P=0.1318$), while examined risk classifications according to global FRS and hsCRP concentration were not independent from each other ($\chi^2=13.295$, $P=0.0099$). Also, Chi-square test showed that risk distribution among risk classes with hsCRP concentrations <1 mg/L, 1–3 mg/L, and >3 mg/L was not independent from distribution between categories of 30-year risk for both „hard CVD“ ($\chi^2=19.685$, $P=0.0001$) and „full CVD“ ($\chi^2=15.559$, $P=0.0004$). Student t-test showed statistically significant differences between mean values of actual age and heart/vascular age in individual hsCRP concentration categories ($P<0.05$). Also, one-way ANOVA confirmed statistically significant increase in differences across hsCRP concentration categories ($P<0.001$).

Factor analysis identified 5 clusters out of 19 original parameters, i.e. principal components (factors). These components explained 65.3% of the total variance (29.0% factor 1, 13.2% factor 2, 9.0% factor 3, 8.5% factor 4, and 5.6% factor 5). Factors were interpreted as 1) „systemic inflammation“ (fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 and C4 complement components); 2) „cardiorenal factor“ (creatinine, uric acid, Cys-C, cTnT and gender); 3) „atherogenic cholesterol“ (LDL and non-HDL cholesterol); 4) „hemodynamic factor“ (age and NT-proBNP); and 5) „metabolic factor“ (triglycerides and HDL cholesterol). Five factor model had the best predictive value for hsCRP concentrations >1 mg/L, while „cardiorenal factor“ and „atherogenic cholesterol“ completely lost their significance ($P>0.05$) for predicting hsCRP concentrations >2 mg/L and >3 mg/L.

The ability of the factor-based logistic regression model was compared with two multivariable logistic models, that included 31 original parameters and 19 parameters initially included in factor analysis, in predicting the presence of hsCRP concentrations >1 mg/L. The area under the ROC curve (AUC) of the five factor model was 0.889 and was not statistically significantly different from the 31 original parameters model (AUC=0.922) nor from the 19 parameters model (AUC=0.915) ($P=0.2113$ and $P=0.3359$, respectively). However, the differences between the three models examined were statistically significant in predicting the values of hsCRP>2 mg/L and hsCRP>3 mg/L.

In determining association of hsCRP and examined biomarkers with short-term and long-term risk assessment, factor analysis identified five clusters out of 18 original parameters (among which no multicollinearity nor singularity were observed). These components explained 67.4% of the total variance (29.7% factor 1, 12.5% factor 2, 11.0% factor 3, 7.6% factor 4, and 6.7% factor 5). Factors were interpreted as 1)

„systemic inflammation“ (hsCRP, fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 and C4 complement components); 2) „atherogenic dyslipidemia“, (LDL and non-HDL cholesterol, apo B, and triglycerides); 3) „cardiorenal factor“ (creatinine, uric acid, Cys-C and cTnT); 4) „hemodynamic factor“ (NT-proBNP); and 5) „lipoprotein factor“ [apo A-I and Lp(a)].

In predicting the values of increased risk according to FRS (>10%), „systemic inflammation“ factor had no statistical significance, while according to global FRS it was the case with „lipoprotein factor“. When estimating 30-year risk from both “full CVD” and “hard CVD”, „hemodynamic factor“ had no statistical significance in predicting potential for values above optimal/normal for corresponding gender and age. The ability of the factor-based logistic regression model was compared with multivariable logistic model of 18 original parameters not included into risk assessment algorithms. In predicting values of FRS>10%, global FRS>10% and increased 30-year risk for “full CVD” and “hard CVD” no statistically significant differences were obtained between the two models.

Results have shown that among the examined parameters of inflammation and lipid status associated with atherosclerosis, after the series of regression analysis, only BMI, non-HDL cholesterol, fibrinogen and SAA remained independently correlated with hsCRP concentration. The additional information they provide might complement the predictive value of hsCRP. Also, the dependence among higher hsCRP concentrations and higher short- and long-term risk for any of the CVD complications, as well as higher long-term risk for severe CVD complications, was demonstrated. Furthermore, from the factor analysis results follows the conclusion that systemic inflammation, cardiorenal function, atherogenic lipid profile, hemodynamic and metabolic status independently contributed to the pathophysiology of chronic, subclinical inflammation in atherosclerosis, which was reflected by hsCRP concentrations. Atherogenic dyslipidemia, cardiorenal function and hemodynamic status contributed independently to an increase in 10-year risk estimated according to standard FRS. Elevated global CVD risk was connected to systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, cardiorenal function and hemodynamic status. Long-term, 30-year risk above normal/optimal for hard CVD complications and for all kinds of cardiovascular complications was independently contributed by systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, cardiorenal function and lipoprotein status.

Key words: cardiovascular disease, cardiovascular risk, Framingham risk score, C-reactive protein, inflammation, lipid status, renal function, cardiac biomarkers, factor analysis

Scientific field: Medical sciences - Pharmacy

Subfield: Medical biochemistry

UDC number: 577.112 : 616.1 : 612.46 (043.3)

Skraćenice korišćene u tekstu:

- **CRP** C-reaktivni protein
- **hsCRP** C-reaktivni protein određen visoko-osetljivom metodom
- **KVB** Kardiovaskularna bolest
- **KBS** Koronarna bolest srca
- **AKS** Akutni koronarni sindrom
- **HDL** Lipoproteini velike gustine
- **LDL** Lipoproteini male gustine
- **VLDL** Lipoproteini vrlo male gustine
- **ATP III** Treći izveštaj ekspertske grupe o detekciji, evaluaciji i tretmanu povišene koncentracije holesterola (*Adult Treatment Panel III*)
- **NCEP** Nacionalni program edukacije o holesterolu (*National Cholesterol Education Program*)
- **FRS** Framingamski rizik skor (*Framingham risk score*)
- **Lp(a)** Lipoprotein (a)
- **Apo A-I** Apolipoprotein A-I
- **Apo B** Apolipoprotein B
- **SAA** Serumski amiloid A
- **A1AGP** α_1 -kiseli glikoprotein
- **NT-proBNP** Amino-terminalni pro-natriuretski peptid tip B
- **hs-cTnT** Srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom
- **eGFR** Procenjena jačina glomerularne filtracije (*estimated glomerular filtration rate*)
- **MDRD** *Modification of Diet in Renal Disease*
- **CKD-EPI** *Chronic Kidney Disease-Epidemiology*
- **Cys-C** Cistatin C

SADRŽAJ

1. UVOD	6
1.1. PROCENA KARDIOVASKULARNOG RIZIKA	6
1.1.1. NCEP ATP III PREPORUKE	9
1.1.2. ALGORITMI ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA U PRAKSI	15
1.1.3. KRATKOROČNI I DUGOROČNI RIZIK	20
1.2. KRITERIJUMI ZA EVALUACIJU NOVIH BIOMARKERA ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA	22
1.3. C-REAKTIVNI PROTEIN KAO BIOMARKER KARDIOVASKULARNOG RIZIKA	25
1.3.1. ULOGA INFLAMACIJE U ATEROSKLEROZI	25
1.3.2. C-REAKTIVNI PROTEIN KAO MEDIJATOR ATEROGENEZE	27
1.3.3. PROCENA KARDIOVASKULARNOG RIZIKA NA OSNOVU KONCENTRACIJA C- REAKTIVNOG PROTEINA	30
1.3.4. ODREĐIVANJE C-REAKTIVNOG PROTEINA ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA	34
1.4. DRUGI BIOMARKERI KARDIOVASKULARNOG RIZIKA	38
1.4.1. PARAMETRI LIPIDNOG STATUSA	38
1.4.1.1. Ukupan holesterol	38
1.4.1.2. LDL holesterol	39
1.4.1.3. Trigliceridi	40
1.4.1.4. Non-HDL holesterol	41
1.4.1.5. HDL holesterol	42
1.4.1.6. Lipoprotein (a)	44
1.4.1.7. Apolipoproteini A-I i B	45

1.4.2. PROTEINI OSETLJIVI NA INFLAMACIJU	47
1.4.2.1. Fibrinogen.....	47
1.4.2.2. Serumski amiloid A.....	48
1.4.2.3. Alfa-1 kiseli glikoprotein.....	49
1.4.2.4. Haptoglobin	50
1.4.2.5. C3 i C4 komponente komplemента.....	51
1.4.3. MOKRAĆNA KISELINA.....	52
1.4.4. SRČANI BIOMARKERI	53
1.4.4.1. Amino-terminalni pro-natriuretski peptid tip B	53
1.4.4.2. Srčani troponin.....	54
1.4.5. BIOMARKERI BUBREŽNE FUNKCIJE	55
1.4.5.1. Kreatinin u serumu i jednačine za procenu jačine glomerularne filtracije	56
1.4.5.2. Cistatin C	57
2. CILJ RADA	59
3. MATERIJALI I METODE	61
3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI.....	61
3.2. PRIBOR I APARATI	64
3.3. MATERIJAL.....	65
3.4. METODE.....	66
3.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE hsCRP	66
3.4.1.1. Imunoturbidimetrijska metoda.....	66
3.4.1.2. Imunonefelometrijska metoda	67
3.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG HOLESTEROLA.....	68
3.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HDL HOLESTEROLA.....	69
3.4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LDL HOLESTEROLA	70

3.4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE TRIGLICERIDA	72
3.4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE APO A-I.....	73
3.4.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE APO B.....	74
3.4.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE Lp(a)	75
3.4.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FIBRINOGENA.....	76
3.4.10. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SAA.....	76
3.4.11. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE A1AGP.....	78
3.4.12. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HAPTOGLOBINA	78
3.4.13. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE C3 KOMPLEMENTA	79
3.4.14. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE C4 KOMPLEMENTA	80
3.4.15. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MOKRAĆNE KISELINE	81
3.4.16. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KREATININA.....	82
3.4.17. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CISTATINA C.....	83
3.4.18. ODREĐIVANJE eGFR PRIMENOM FORMULA ZASNOVANIH NA KONCENTRACIJI KREATININA I CISTATINA C	84
3.4.19. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NT-proBNP	85
3.4.20. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE hs-cTnT	86
3.4.21. IZRAČUNAVANJE SKOROVA RIZIKA.....	87
3.5. ANALIZA PODATAKA.....	88
4. REZULTATI	90
4.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODE VISOKE OSETLJIVOSTI ZA ODREĐIVANJE CRP	90
4.1.1. Nepreciznost u seriji i iz dana u dan.....	90
4.1.2. Granica detekcije.....	91

4.1.3. Poređenje <i>Olympus</i> visoko osetljive metode za određivanje CRP sa imunofelometrijskom metodom.....	91
4.1.4. Slaganje metoda u proceni kardiovaskularnog rizika.....	93
4.2. POREĐENJE VREDNOSTI LIPIDNIH I INFLAMATORNIH BIOMARKERA SA hsCRP	95
4.3. POREĐENJE VREDNOSTI MOKRAĆNE KISELINE, SRČANIH I BUBREŽNIH BIOMARKERA SA hsCRP	104
4.4. POREĐENJE KATEGORIZACIJE RIZIKA NA OSNOVU SKOROVA I hsCRP.....	108
4.5. FAKTORSKA ANALIZA.....	112
5. DISKUSIJA.....	136
5.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODE VISOKE OSETLJIVOSTI ZA ODREĐIVANJE CRP	138
5.2. POREĐENJE VREDNOSTI LIPIDNIH I INFLAMATORNIH BIOMARKERA SA hsCRP	140
5.3. POREĐENJE VREDNOSTI MOKRAĆNE KISELINE, SRČANIH I BUBREŽNIH BIOMARKERA SA hsCRP	143
5.4. POREĐENJE KATEGORIZACIJE RIZIKA NA OSNOVU SKOROVA I hsCRP.....	147
5.5. FAKTORSKA ANALIZA.....	149
5.5.1. FAKTORSKI MODEL I KONCENTRACIJA hsCRP	150
5.5.1.1. Faktor sistemske inflamacije.....	150
5.5.1.2. Kardioresnalni faktor	152
5.5.1.3. Faktor aterogenog holesterola.....	153
5.5.1.4. Hemodinamski faktor	155
5.5.1.5. Metabolički faktor.....	156
5.5.1.6. Regresiona analiza	157
5.5.2. FAKTORSKI MODEL I SKOROV I RIZIKA	158

6. ZAKLJUČCI.....	162
7. LITERATURA.....	167

1. UVOD

1.1. PROCENA KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju veliku i heterogenu grupu oboljenja koja obuhvata akutnu reumatsku groznicu, hronične reumatske bolesti srca, bolesti prouzrokovane povišenim krvnim pritiskom, ishemijsku bolest srca (koronarnu bolest srca, KBS), bolesti srca plućnog porekla i bolesti krvnih sudova pluća, bolesti krvnih sudova mozga, bolesti arterija, malih arterija i kapilara, vena, limfnih sudova i limfnih čvorova, urođene bolesti srca i krvnih sudova i druge neoznačene bolesti srca i krvotoka (1).

Vodeći uzrok smrtnosti kako u svetu, tako i kod nas čine KVB. Iako je broj smrtnih slučajeva uzrokovanih KBS opao u poslednje dve decenije u svetu, ali ne kod nas, KVB ostaju glavni uzročnik smrti i procenjuje se da će do 2020. godine zadržati taj status na globalnom nivou. Praćenje sniženja mortaliteta od KBS od 1980. do 2000. godine analizom podataka američkog Nacionalnog centra za zdravstvenu statistiku pokazalo je da je do oko 47% ovog smanjenja došlo zahvaljujući primeni terapija zasnovanih na dokazima, dok su za smanjenje od oko 44% odgovorne promene u zastupljenosti faktora rizika u populaciji (2). Smanjenje mortaliteta od 79% je posledica sprovođenja programa primarne prevencije, a 21% je posledica sekundarne prevencije (3).

Bolesti srca i krvnih sudova bile su uzrok 56% ukupnog mortaliteta u Srbiji u 2007. godini. U odnosu na prosečnu standardizovanu stopu mortaliteta u Evropi od 410,1 na 100 000 stanovnika, Srbija se nalazila u grupi zemalja sa visokim rizikom smrtnosti od KVB, sa standardizovanim stopom mortaliteta od 504,3 na 100 000 stanovnika (4). Ukupno opterećenje morbiditetom kako u Srbiji, tako i u ostalim zemljama Evrope, potiče najvećim delom od KBS, a njen najteži oblik, akutni koronarni sindrom (AKS), predstavlja jedan od najčešćih uzroka hitnog prijema i iznenadne smrti u razvijenim delovima sveta, a poslednjih decenija i u zemljama u razvoju (5).

Patofiziološku osnovu KBS čini ateroskleroza, čije napredovanje dovodi do značajnog suženja lumena arterija, rupture i erozije plaka i, usled toga, do različitog stepena koronarne tromboze, koronarnog vazospazma i distalne mikroembolizacije (6). Međutim, razvoj KBS karakteriše dug asimptomatski latentni period zato što proces ateroskleroze počinje u detinjstvu i napreduje do odraslog doba pod uticajem više faktora rizika, kao što su hiperlipidemija, hipertenzija, pušenje, dijabetes, genetska predispozicija i prekomerna telesna težina (7). Zahvaljujući tome moguća je primena ranih preventivnih mera kojima se progresija ateroskleroze usporava i kojima je cilj sprečavanje pojave prve epizode KBS.

Uloga holesterola u patogenezi ateroskleroze i KBS ustanovljena je u eksperimentalnim, populacionim i randomiziranim kontrolisanim studijama. *Framingham Heart Study* (FHS) (8), *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT) (9) i *Lipid Research Clinics Trial* (LRC) (10, 11) studije su pokazale direktnu povezanost koncentracije holesterola i brzine nastanka KBS kod osoba bez znakova bolesti na početku ispitivanja. Ustanovljeno je da između koncentracije holesterola i razvoja KBS postoji kontinualna, ali log-linearna zavisnost. Rizik od nastanka KBS se naglo povećava kako raste koncentracija holesterola, što je posebno izraženo pri koncentracijama holesterola većim od 5,18–6,21 mmol/L, kada intenzitet porasta rizika počinje značajno da se ubrzava (12).

Holesterol se, kao hidrofobna supstanca, u cirkulaciji nalazi u obliku lipoproteinskih čestica. U serumu dobijenom natašte nalaze se tri klase lipoproteina: lipoproteini male gustine (*low density lipoproteins, LDL*), lipoproteini velike gustine (*high density lipoproteins, HDL*) i lipoproteini vrlo male gustine (*very low density lipoproteins, VLDL*). Četvrta klasa lipoproteina, hilomikroni, predstavljaju trigliceridima bogate lipoproteine. Sintetišu se u tankom crevu iz masti unetih hranom i nalaze se u cirkulaciji postprandijalno. LDL holesterol obično čini 60–70% ukupnog holesterola u plazmi. Rezultati fundamentalnih istraživanja, ispitivanja na eksperimentalnim životinjama, epidemioloških i kontrolisanih kliničkih studija, kao i simptomi i znaci porodične hiperholesterolemije (gde je koncentracija LDL holesterola značajno povišena, dok se ubrzana ateroskleroza i

prevremena pojava KBS obično javljaju u odsustvu drugih faktora rizika) (8–11), ukazuju da je povišena koncentracija LDL frakcije holesterola glavni uzrok KBS.

Veza između povišene koncentracije LDL holesterola i razvoja KBS mora da se posmatra kao višestepeni proces koji počinje rano u životu sa nastankom prvih aterosklerotskih promena – masne tačke i pruge, koje se sastoje uglavnom od makrofaga ispunjenih LDL holesterolom, nastavlja se njihovim prelaskom u fibrozni plak/fibroaterom, a komplikuje razvojem nestabilnog plaka koji je sklon rupturi i formiranju luminalne tromboze (13). Ruptura ili erozija plaka je odgovorna za većinu AKS (14). Povišena koncentracija LDL holesterola ima važnu ulogu u razvoju zrelog koronarnog plaka, koji je supstrat za nestabilni plak. Dokazi takođe govore da povišena koncentracija LDL holesterola doprinosi i nestabilnosti plaka, a nasuprot tome, snižavanje koncentracije LDL holesterola stabilizuje plakove i smanjuje verovatnoću od pojave AKS (15). Takođe, snižavanje koncentracije LDL holesterola ranije u životu usporava razvoj aterosklerotskog plaka. Konačno, ulogu LDL holesterola kao uzročnika ateroskleroze potvrdila su klinička ispitivanja lekova za snižavanje njegove koncentracije. U poslednjih pet decenija sproveden je veliki broj kliničkih ispitivanja lekova za snižavanje koncentracije holesterola (16, 17) koja su pokazala da se incidencija KBS, mortalitet od KBS, pa čak i ukupan mortalitet smanjuju primenom terapije za snižavanje holesterola. Iz tih razloga dokumenti zasnovani na dokazima kojima se definiše strategija primarne prevencije KBS prepoznaju LDL holesterol kao primarni cilj terapije u smanjenju rizika od nastanka i komplikacija KBS. Najpoznatiji je Treći izveštaj ekspertske grupe o detekciji, evaluaciji i tretmanu povišene koncentracije holesterola u odraslih (*Adult Treatment Panel III, ATP III*), koji predstavlja klinički vodič američkog Nacionalnog programa edukacije o holesterolu (*National Cholesterol Education Program, NCEP*) objavljen 2002. godine (18). Dokument je ažuriran 2004. godine (16), po objavljivanju rezultata pet velikih kliničkih studija o terapiji statinima (19–23).

1.1.1 NCEP ATP III PREPORUKE

Osnovni princip kliničkog pristupa prevenciji KBS podrazumeva da intenzitet terapije za smanjenje rizika treba prilagoditi apsolutnom riziku svake osobe pojedinačno. Prema tome, prvi korak u redukciji rizika smanjivanjem koncentracije LDL holesterola predstavlja procena kardiovaskularnog rizika u konkretnom slučaju. Za procenu rizika neophodno je određivanje LDL holesterola i identifikacija pratećih determinanti rizika.

Log-linearna zavisnost između koncentracija holesterola i KBS rizika važi i za LDL holesterol, pošto je koncentracija LDL holesterola tesno povezana sa koncentracijom ukupnog holesterola i najveći deo ukupnog holesterola čini upravo LDL holesterol. Prema tome, veza između nivoa LDL holesterola i KBS rizika je kontinualna u širokom opsegu koncentracija. Pošto su koncentracije LDL holesterola $<2,58$ mmol/L u toku života povezane sa veoma malim rizikom od pojave KBS, one se mogu nazvati *optimalnim*. Čak i kada su koncentracije LDL holesterola *blizu optimalnih* (2,58–3,35 mmol/L), može se javiti aterogeneza, pa se ove koncentracije takođe moraju označiti i kao *iznad optimalnih*. Pri koncentracijama koje su *granično visoke* (3,36–4,11 mmol/L) aterogeneza brzo napreduje, dok je kod *visokih* (4,12–4,90 mmol/L) i *vrlo visokih* koncentracija ($\geq 4,91$ mmol/L) izrazito ubrzana.

Ostale determinante rizika, pored nivoa LDL holesterola, uključuju prisustvo ili odsustvo KBS, drugih kliničkih oblika aterosklerotske bolesti (bolest perifernih arterija, aneurizma trbušne aorte, simptomatska bolest karotidnih arterija), dijabetesa i ostalih glavnih faktora rizika [starost, hipertenzija ($>140/90$ mmHg ili upotreba antihipertenziva), pušenje, pozitivna porodična anamneza za ranu pojavu KBS u muških ($<55.$ godine) ili ženskih ($<65.$ godine) rođaka u prvom kolenu i nizak HDL holesterol ($<1,03$ mmol/L)]. Na osnovu navedenih determinanti, ATP III identifikuje četiri kategorije rizika koje određuju ciljnu (preporučenu) koncentraciju LDL holesterola i indikuju odgovarajući tretman za njegovo smanjenje (*Tabela 1*). Kako je cilj primarne prevencije smanjenje i dugoročnog (>10 godina) i kratkoročnog (≤ 10 godina) rizika, ciljne koncentracije LDL holesterola u

primarnoj prevenciji zavise od apsolutnog rizika osobe za KBS, odnosno od verovatnoće pojave komplikacija KBS u kraćem ili dužem vremenskom periodu. Što je rizik veći, to će biti niža poželjna koncentracija LDL holesterola.

Tabela I Algoritam klasifikacije rizika prema ažuriranom NCEP ATP III

Kategorija rizika	Definicija
Visok rizik	<ul style="list-style-type: none"> • KBS* • Ekvivalenti KBS** • ≥ 2 faktora rizika[†] i 10-godišnji rizik[‡] za KBS >20%
Umereno visok rizik	≥ 2 faktora rizika i 10-godišnji rizik za KBS 10–20%
Umeren rizik	≥ 2 faktora rizika i 10-godišnji rizik za KBS <10%
Niži rizik	0–1 faktor rizika

* KBS – koronarna bolest srca

** Ekvivalenti KBS uključuju kliničke manifestacije nekoronarnih oblika aterosklerotske bolesti (bolest perifernih arterija, aneurizma trbušne aorte, simptomatska bolest karotidnih arterija – tranzitorni ishemijski atak, šlog karotidnog porekla, ili opstrukcija karotidne arterije >50%) ili diabetes mellitus.

† Faktori rizika uključuju starost (≥ 45 godina za muškarce, ≥ 55 godina za žene), hipertenziju (krvni pritisak >140/90 mmHg ili upotreba antihipertenziva), pušenje, pozitivna porodična anamneza za ranu pojavu KBS u muških (<55. godine) ili ženskih (<65. godine) rođaka u prvom kolenu, i nizak HDL holesterol (<1,03 mmol/L).

‡ Izračunat primenom Framingamskog rizik skora.

U kategoriji visokog rizika nalaze se KBS i ekvivalenti KBS, koji nose rizik od pojave koronarnih komplikacija jednak ustanovljenoj KBS. KBS podrazumeva simptomatsku ishemijsku bolest srca, uključujući infarkt miokarda, stabilnu ili nestabilnu anginu pektoris, ishemijsku bolest srca dokazanu neinvazivnim testovima i istoriju hirurških intervencija na koronarnim arterijama. U ekvivalente KBS spadaju:

- kliničke manifestacije nekoronarnih oblika aterosklerotske bolesti (bolest perifernih arterija, aneurizma trbušne aorte, simptomatska bolest karotidnih arterija – tranzitorni ishemijski atak, šlog karotidnog porekla, ili opstrukcija karotidne arterije >50%) i
- diabetes mellitus.

Za osobe sa visokim rizikom po originalnim NCEP ATP III preporukama, objavljenim 2002. godine, preporučuje se najniža koncentracija LDL holesterola (<2,56 mmol/L). Međutim, rezultati pet velikih kliničkih studija (19–23) o terapiji statinima objavljenih posle finalnog ATP III izveštaja pokazale su opravdanost uvođenja farmakoterapije i njenu efikasnost u smanjenju KBS rizika kod pacijenata sa veoma visokim rizikom da bi se postigla ciljna koncentracija LDL holesterola <1,81 mmol/L. U kategoriji veoma visokog rizika nalaze se osobe sa ustanovljenom KBS i 1) više glavnih faktora rizika (dijabetes npr.), 2) izraženim i loše kontrolisanim faktorima rizika (naročito pušenje), 3) više faktora rizika metaboličkog sindroma (naročito visokom koncentracijom triglicerida $\geq 2,26$ mmol/L i niskim HDL holesterolom <1,03 mmol/L) i 4) pacijenti sa AKS.

Osobama bez KBS ili ekvivalenta KBS, a sa više od dva prisutna faktora rizika, apsolutni 10-godišnji rizik za KBS se procenjuje korišćenjem Framingamskog rizik skora (*Framingham risk score*, FRS) (8). Procenjen rizik se kategorizuje u diskretne kategorije, čime se usmerava donošenje odluka u vezi primarne prevencije. Ako je uz dva faktora rizika identifikovan 10-godišnji rizik za KBS >20% (što znači da će se kod više od 20 od 100 ovih osoba razviti KBS ili ponoviti koronarni događaj u toku 10 godina), osoba se svrstava u kategoriju visokog rizika. Kada je 10-godišnji rizik 10–20%, to se smatra umereno visokim rizikom, a ako je uz prisustvo više od dva faktora rizika 10-godišnji rizik <10% osoba spada u kategoriju umerenog rizika. Ciljna koncentracija LDL holesterola u obe ove kategorije umerenog rizika treba da je <3,36 mmol/L, a razlikuju se po cut-off vrednosti pri kojoj treba otpočeti terapiju za snižavanje rizika.

Osobe sa nijednim ili jednim faktorom rizika svrstavaju se u kategoriju nižeg rizika. Uz retke izuzetke, ove osobe imaju 10-godišnji rizik <10%. Njihova ciljna koncentracija LDL holesterola je <4,16 mmol/L.

Tabela II Procena apsolutnog 10-godišnjeg rizika za žene (Framingamski skor poeni)

starost	poeni	ukupan	poeni za	poeni za	poeni za	poeni za	poeni za
20–34	-7	holesterol	20-39 godina	40-49 godina	50-59 godina	60-69 godina	70-79 godina
35–39	-3	<4,14	0	0	0	0	0
40–44	0	4,14–5,15	4	3	2	1	1
45–49	3	5,16–6,19	8	6	4	2	1
50–54	6	6,20–7,23	11	8	5	3	2
55–59	8	≥7,24	13	10	7	4	2
60–64	10		poeni za	poeni za	poeni za	poeni za	poeni za
65–69	12		20-39 godina	40-49 godina	50-59 godina	60-69 godina	70-79 godina
70–74	14	nepušači	0	0	0	0	0
75–79	16	pušači	9	7	4	2	1

HDL	poeni	Sistolni krvni pritisak	bez terapije	sa terapijom
≥1,55	-1	<120	0	0
1,30–1,54	0	120–129	1	3
1,03–1,29	1	130–139	2	4
<1,03	2	140–159	3	5
		≥160	4	6

ukupni poeni	10-godišnji rizik	ukupni poeni	10-godišnji rizik
<9	<1%	20	11%
9	1%	21	14%
10	1%	22	17%
11	1%	23	22%
12	1%	24	27%
13	2%	≥25	≥30%
14	2%		
15	3%		
16	4%		
17	5%		
18	6%		
19	8%		

Tabela III Procena apsolutnog 10-godišnjeg rizika za muškarce (Framingamski skor poeni)

starost	poeni	ukupan	poeni za 20-	poeni za 40-	poeni za 50-	poeni za 60-	poeni za 70-
20–34	-9	holesterol	39 godina	49 godina	59 godina	69 godina	79 godina
35–39	-4	<4,14	0	0	0	0	0
40–44	0	4,14–5,15	4	3	2	1	0
45–49	3	5,16–6,19	7	5	3	1	0
50–54	6	6,20–7,23	9	6	4	2	1
55–59	8	≥7,24	11	8	5	3	1
60–64	10		poeni za	poeni za 40-	poeni za 50-	poeni za 60-	poeni za 70-
65–69	11		20-39 godina	49 godina	59 godina	69 godina	79 godina
70–74	12	nepušači	0	0	0	0	0
75–79	13	pušači	8	5	3	1	1
HDL	poeni	Sistolni krvni pritisak	bez terapije		sa terapijom		
≥1,55	-1	<120	0		0		
1,30–1.54	0	120–129	0		1		
1,03–1.29	1	130–139	1		2		
<1,03	2	140–159	1		2		
		≥160	2		3		
		ukupni poeni	10-godišnji rizik	ukupni poeni	10-godišnji rizik		
		<0	<1%	11	8%		
		0	1%	12	10%		
		1	1%	13	12%		
		2	1%	14	16%		
		3	1%	15	20%		
		4	1%	16	25%		
		5	2%	≥17	≥30%		
		6	2%				
		7	3%				
		8	4%				
		9	5%				
		10	6%				

Faktori rizika uključeni u izračunavanje FRS su: starost, ukupan holesterol, HDL holesterol, sistolni krvni pritisak, antihipertenzivna terapija i pušenje. Prvi korak je izračunavanje broja poena za svaki faktor rizika.

Tabela IV Ciljne koncentracije LDL holesterola i cut-off vrednosti za početak sprovođenja promena u načinu života i farmakoterapije u različitim kategorijama rizika

Kategorija rizika	Ciljna koncentracija LDL holesterola (mmol/L)	Nivo LDL holesterola pri kome počinje primena promena načina života (mmol/L)	Nivo LDL holesterola pri kome se razmatra uvođenje farmakoterapije* (mmol/L)
<i>Visok rizik:</i> KBS ili ekvivalenti KBS (10-godišnji rizik >20%)	<2,56 (<1,81)†	≥2,56	≥2,56†† (<2,56)‡
<i>Umereno visok rizik:</i> >2 faktora rizika (10-godišnji rizik 10–20%)	<3,36§	≥3,36	≥3,36 (2,56–3,35)‡‡
<i>Umeren rizik:</i> >2 faktora rizika (10-godišnji rizik <10%)	<3,36	≥3,36	≥4,16
<i>Nizak rizik:</i> 0–1 faktor rizika	<4,16	≥4,16	≥4,92 (4,16–4,91)§§

* Kada se uvodi terapija za snižavanje koncentracije LDL holesterola, preporuka je da intenzitet terapije bude dovoljan da se postigne redukcija nivoa LDL holesterola od najmanje 30–40%.

† Za osobe sa veoma visokim rizikom, što podrazumeva osobe sa ustanovljenom KBS i 1) više glavnih faktora rizika (dijabetes npr.), 2) izraženim i loše kontrolisanim faktorima rizika (naročito pušenje), 3) više faktora rizika metaboličkog sindroma (naročito visokom koncentracijom triglicerida ≥2,26 mmol/L i niskim HDL holesterolom <1,03 mmol/L) i 4) pacijenti sa AKS.

†† Ako je koncentracija LDL holesterola ≥2,56 mmol/L, lekovi za snižavanje LDL holesterola su indikovani simultano sa promenom načina života. Ako osoba ima visoke trigliceride ili nizak HDL holesterol, može da se razmatra uvođenje fibrata ili nikotinske kiseline zajedno sa lekom za snižavanje LDL holesterola.

‡ Ako je polazna koncentracija <2,56 mmol/L, postoji opcija da se primeni lek za snižavanje LDL holesterola i postigne ciljna koncentracija od <1,81 mmol/L.

§ Opcionalno, ciljna koncentracija LDL holesterola u ovoj kategoriji može biti <2,56 mmol/L na osnovu dokaza iz kliničkih studija.

‡‡ Kada je koncentracija LDL holesterola 2,56–3,35 mmol/L bazalno ili posle promene načina života, inicijacija terapije lekovima za snižavanje LDL holesterola na nivo <2,56 mmol/L je terapijska opcija zasnovana na dokazima o dodatnoj efikasnosti dobijenih iz kliničkih studija.

§§ Opcionalno uvođenje leka za snižavanje koncentracije LDL holesterola kada je koncentracija LDL holesterola 4,16–4,91 mmol/L bazalno ili posle promene načina života.

Ukupan rizik skor je zbir poena dodeljenih svakom faktoru rizika. Iz ukupnog broja poena se dobija apsolutni 10-godišnji rizik, na osnovu koga se vrši navedena kategorizacija. FRS se izračunava korišćenjem tablica prikazanih u *Tabelama II i III*.

Dva oblika terapije za snižavanje koncentracije LDL holesterola su promene načina života i farmakoterapija. Promena načina života podrazumeva smanjenje unosa zasićenih masti i holesterola ishranom, a kada su prisutni metabolički sindrom ili sa njim povezani lipidni faktori rizika (povišena koncentracija triglicerida i niska koncentracija HDL holesterola), takođe zahteva smanjenje telesne težine i povećanje fizičke aktivnosti. U *Tabeli IV* navedene su ciljne koncentracije LDL holesterola i cut-off vrednosti za početak sprovođenja promena u načinu života i uzimanja lekova za osobe u četiri kategorije rizika definisane u ažuriranoj verziji preporuka iz 2004. godine.

1.1.2. ALGORITMI ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA U PRAKSI

Pored FRS inkorporiranog u NCEP ATP III preporuke, u kliničkoj praksi se koristi još nekoliko skorova za procenu rizika od pojave različitih oblika KVB koji se zasnivaju na multivarijabilnim regresionim jednačinama izvedenim iz rezultata praćenja različitih kohortnih grupa.

Framingamski sistem je najpoznatiji i najčešće korišćen. Pored originalne verzije uključene u NCEP ATP III preporuke, modifikovan je za primenu u nekoliko nacionalnih i intrenacionalnih vodiča za prevenciju KVB – Kanadskog društva za kardiovaskularne bolesti (*Canadian Cardiovascular Society, CCS*) (24), Novozelandskog vodiča za procenu rizika od KVB (25), u evropskim preporukama iz 1998. godine (26). Izveden je iz rezultata Framingamske studije (FHS) dobijenih praćenjem 5345 dobrovoljaca, 30–75 godina starosti, u toku 12 godina. Kao krajnji ishodi praćenja definisani su smrtni ishod kao posledica KBS, infarkt miokarda, stabilna i nestabilna angina pektoris (8), odnosno FRS procenjuje 10-godišnji rizik od navedenih događaja.

Najnovije Evropske smernice za prevenciju KVB u kliničkoj praksi (27), koje je objavio Komitet Evropskog udruženja kardiologa za kliničke vodiče (*Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice*) preporučuju upotrebu SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*) sistema (28) za procenu ukupnog rizika. U okviru SCORE projekta analizirani su rezultati 12 prospektivnih studija iz 11 evropskih zemalja. Praćeno je preko 200 000 osoba, 40–65 godina starosti, izabranih uglavnom randomizacijom iz opšte populacije, a manji broj je predstavljao pripadnike kohortnih grupa određenog zanimanja. Učesnici su praćeni u proseku 13 godina, a kao krajnja tačka definisan je samo smrtni ishod KVB. Zahvaljujući tome, SCORE sistem se može prilagoditi različitim evropskim populacijama koje imaju različitu incidenciju koronarne i ne-koronarne KVB. Pošto svaka zemlja ima podatke o nacionalnoj stopi mortaliteta u zavisnosti od uzroka, oni se mogu iskoristiti za procenu osnovnog rizika populacije. Odatle se može procenjivati rizik za različite nivoe faktora rizika. Tako je moguće definisati nacionalne SCORE tablice na osnovu nacionalnih podataka o mortalitetu od KVB i SCORE funkcija rizika sa odgovarajućim podešavanjima, iako nisu sprovedene prospektivne studije za konkretnu populaciju. U Srbiji, Nacionalni vodiči dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja (29) i za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca (5) preporučuju procenu individualnog rizika primenom SCORE sistema.

PROCAM skor (30) se zasniva na podacima dobijenim iz PROCAM prospektivne studije (*Prospective Cardiovascular Münster Study*) u kojoj je učestvovalo 26 975 dobrovoljaca 20–75 godina starosti, zaposlenih u industriji, zbog čega uzorak nije reprezentativan za opštu populaciju. PROCAM definiše dva odvojena skor sistema, jedan za izračunavanje 10-godišnjeg rizika od smrti usled KBS i od nastanka nefatalnog infarkta miokarda, a drugi od cerebralnih ishemijskih događaja. Njegovu primenu preporučuje Međunarodna operativna grupa za prevenciju koronarne bolesti (*International Task Force for Prevention of Coronary Disease*).

ASSIGN (*ASsessing cardiovascular risk using SIGN guidelines to assign potential patients to preventive treatment*) skor (31) preporučuju škotske SIGN (*Scottish Intercollegiate*

Guidelines Network) smernice. Izveden je iz rezultata SHHEC prospektivne studije (*Scottish Heart Health Extended Cohort*) sprovedene na slučajno odabranom uzorku od 13 297 osoba iz opšte populacije Škotske 30–74 godina starosti. Izračunava 10-godišnji rizik od komplikacija KVB u bilo kom obliku.

QRISK skor (32) preporučuju britanske NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) preporuke za modifikaciju lipidnog statusa (33). Dobijen je analizom 1,28 miliona podataka dobijenih iz elektronskih zdravstvenih kartona osoba 35–74 godine starosti iz ordinacija lekara opšte prakse (QRESEARCH baza podataka) (uzorak nije randomizovan). Kao krajnji ishod definisan je 10-godišnji rizik od svih komplikacija KVB (KBS, šloga i tranzitornog ishemijskog ataka).

Tabela V Poeni globalnog KVB rizika za žene

Poeni	Starost, godine	HDL holesterol, mmol/L	Ukupan holesterol, mmol/L	Sistolni krvni pritisak bez terapije	Sistolni krvni pritisak sa terapijom	Pušenje	Dijabetes
-3				<120			
-2		1,55+					
-1		1,30–1,54			<120		
0	30–34	1,16–1,29	<4,14	120–129		Ne	Ne
1		0,91–1,15	4,14–5,17	130–139			
2	35–39	<0,91		140–149	120–129		
3			5,18–6,21		130–139	Da	
4	40–44		6,22–7,24	150–159			Da
5	45–49		7,25+	160+	140–149		
6					150–159		
7	50–54				160+		
8	55–59						
9	60–64						
10	65–69						
11	70–74						
12	75+						

Ukupni poeni	Rizik, %	Ukupni poeni	Rizik, %
≤-2	<1	10	6,3
-1	1,0	11	7,3
0	1,2	12	8,6
1	1,5	13	10,0
2	1,7	14	11,7
3	2,0	15	13,7
4	2,4	16	15,9
5	2,8	17	18,5
6	3,3	18	21,5
7	3,9	19	24,8
8	4,5	20	28,5
9	5,3	21+	>30

Svi navedeni sistemi za procenu kardiovaskularnog rizika se razlikuju po vrsti rizika koji predviđaju, a koji je specificiran krajnjim ishodom studija iz kojih su izvedeni. Nijedan od njih ne procenjuje rizik od svih oblika KVB i za procenu 10-godišnjeg rizika od specifičnih komplikacija KVB (KBS, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest i srčana insuficijencija) obično se koriste posebni multivarijabilni algoritmi procene rizika (34). Nova verzija FRS iz 2008. godine (35), izvedena iz podataka rezultata FHS i *Framingham Offspring Study* (36), izračunava 10-godišnji rizik od svih oblika KVB – tzv. „globalni KVB rizik“, uključujući smrtni ishod KVB, pojavu svih oblika KBS, šlog, srčanu insuficijenciju i intermitentne klaudikacije. Označava se i kao globalni FRS.

Tabela VI Poeni globalnog KVB rizika za muškarce

Poeni	Starost, godine	HDL holesterol, mmol/L	Ukupan holesterol, mmol/L	Sistolni krvni pritisak bez terapije	Sistolni krvni pritisak sa terapijom	Pušenje	Dijabetes
-2		1,55+		<120			
-1		1,30–1,54					
0	30–34	1,16–1,29	<4,14	120–129	<120	Ne	Ne
1		0,91–1,15	4,14–5,17	130–139			
2	35–39	<0,91	5,18–6,21	140–159	120–129		
3			6,22–7,24	160+	130–139		Da
4			7,25+		140–159	Da	
5	40–44				160+		
6	45–49						
7							
8	50–54						
9							
10	55–59						
11	60–64						
12	65–69						
13							
14	70–74						
15	75+						

Ukupni poeni	Rizik, %	Ukupni poeni	Rizik, %
≤-3	<1	8	6,7
-2	1,1	9	7,9
-1	1,4	10	9,4
0	1,6	11	11,2
1	1,9	12	13,2
2	2,3	13	15,6
3	2,8	14	18,4
4	3,3	15	21,6
5	3,9	16	25,3
6	4,7	17	29,4
7	5,6	18+	>30

U *Tabelama V i VI* predstavljeni su poeni koji se dodeljuju pojedinačnim faktorima rizika i globalni 10-godišnji rizik na osnovu zbira poena za muškarce i žene. Ovaj algoritam daje i mogućnost drugačije kvantifikacije rizika u obliku starosti srca odnosno vaskularne starosti (*Tabela VII*). Time se KVB rizik osobe transformiše u starost osobe sa istim rizikom, ali svim ostalim faktorima rizika u nivou preporučenih vrednosti (netretirani sistolni krvni pritisak 125 mmHg, ukupan holesterol 4,7 mmol/L, HDL holesterol 1,16 mmol/L, nepušač, bez dijabetesa).

Tabela VII Starost srca/vaskularna starost za žene i muškarce

Žene		Muškarci	
Poeni	Starost srca, godine	Poeni	Starost srca, godine
<1	<30	<0	<30
1	31	0	30
2	34	1	32
3	36	2	34
4	39	3	36
5	42	4	38
6	45	5	40
7	48	6	42
8	51	7	45
9	55	8	48
10	59	9	51
11	64	10	54
12	68	11	57
13	73	12	60
14	79	13	64
15+	>80	14	68
		15	72
		16	76
		≥17	>80

Modelima kojima se procenjuje globalni rizik od KVB, a ne samo od KBS, trebalo bi da se identifikuje više osoba sa visokim kratkoročnim rizikom. Ovo ima posebnog značaja u proceni rizika za žene, pošto su one ranije u životu pod većim rizikom od pojave šloga i srčane insuficijencije nego od KBS, za razliku od muškaraca (37).

1.1.3. KRATKOROČNI I DUGOROČNI RIZIK

Cilj primarne prevencije je da spreči pojavu nove KBS. Osnovni pristup primarnoj prevenciji je smanjenje faktora rizika. Klinička primarna prevencija se može podeliti na dugoročnu i kratkoročnu prevenciju. Dugoročnom prevencijom se smanjuje rizik za KBS koja se može javiti bilo kada u toku života. Njen cilj je da spreči pojavu i progresiju ateroskleroze. Kratkoročna prevencija bi trebalo da smanji rizik od pojave nove KBS, uglavnom AKS, u toku narednih nekoliko godina, odnosno ≤ 10 godina. Usmerena je ka osobama koje najverovatnije već imaju uznapredovalu koronarnu aterosklerozu i koje su pod velikim rizikom od pojave AKS.

Navedeni algoritmi za procenu rizika odnose se na period od 10 godina, odnosno procenjuju kratkoročni rizik. Međutim, pošto je starost promenljiva kojoj se dodeljuje najveći broj poena u modelima 10-godišnjeg rizika izvedenim iz studija na populacijama zrelog doba, kod muškaraca <45 godina i žena <65 godina umerena povećanja vrednosti faktora rizika imaju malo efekta na ukupan 10-godišnji rizik. Takođe, mlađe osobe sa značajnim opterećenjem faktorima rizika i dalje imaju procenjen 10-godišnji rizik daleko ispod 10%, iako njihov dugoročni rizik može biti $>50\%$. Npr. 50-godišnji muškarac, nepušač, koji nije dijabetičar, sa koncentracijom ukupnog holesterola od 6,17 mmol/L, HDL holesterolom od 1,55 mmol/L i netretiranim sistolnim krvnim pritiskom od 160 mmHg ima procenjen 10-godišnji rizik od komplikacija KBS od skoro 7%. Suprotno tome, njegov prosečan rizik od pojave KVB u toku celog ostatka života iznosi skoro 70%, a medijana preživljavanja je za više od 11 godina kraća nego kod muškaraca istih godina sa optimalnim vrednostima faktora rizika. Takođe, žena od 50 godina sa identičnim vrednostima faktora rizika ima procenjen 10-godišnji rizik od samo 2%, dok je njen dugoročni rizik od KVB do kraja života 50%, a medijana preživljavanja je za više od 8 godina kraća u poređenju sa ženom istih godina i optimalnim faktorima rizika (38). Štaviše, za skoro sve kombinacije faktora rizika, čak i sa ekstremnim vrednostima, muškarci nepušači <45 godina i praktično sve žene <65 godina imaju procenjen 10-godišnji rizik $<10\%$. Prema tome, mnoge mlađe osobe sa značajnim opterećenjem faktorima rizika ne

dostižu vrednost procenjenog rizika kada se počinje tretman na osnovu aktuelnih NCEP ATP III preporuka (39). Kod njih se neće primeniti terapija za snižavanje nivoa lipida uprkos velikoj verovatnoći da će doći do oštećenja organa od aterosklerotske bolesti u kasnijem periodu života. Čak i ako počnu sa terapijom za snižavanje koncentracije lipida, saznanje da su pod niskim 10-godišnjim rizikom neće ih motivisati da se pridržavaju preporuka o zdravom načinu života ili terapije (40).

Kada se posmatra ažuriran Framingamski profil rizika za globalni KVB rizik, dobijaju se slični rezultati, mada upotreba proširenih krajnjih ishoda KVB omogućava da više muškaraca, a naročito žena u svojim 50-im godinama pređe granicu od 10% i 20% procenjenog 10-godišnjeg rizika (37). Podaci *National Health and Nutrition Examination Survey* pokazuju da većina odraslih osoba u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (56%) ili 87 000 000 ljudi ima nizak 10-godišnji rizik, ali visok dugoročni rizik za pojavu KVB (41). Pencina i sar. (42) su nedavno objavili kvantitativni metod za procenu dugoročnog (30-godišnjeg) rizika za KVB. Zasniva se na rezultatima *Framingham Offspring Study*, u kojoj je kohortna grupa pažljivo praćena preko 35 godina za pojavu KVB. Autori su formirali dva sistema izračunavanja rizika. Jedan se zasniva na standardnim faktorima rizika (pol, starost, sistolni krvni pritisak, terapija antihipertenzivima, ukupan i HDL holesterol, pušenje i dijabetes), a drugi, jednostavniji, umesto lipidnih parametara koristi vrednost indeksa telesne mase (*body mass index*, BMI). Oba algoritma su prilagođena proceni dugoročnog, 30-godišnjeg rizika kroz dva modela, primarni i sekundarni. Primarni model procenjuje rizik od pojave teških komplikacija KVB („teška KVB“), koje uključuju teške manifestacije KBS (srčana smrt, infarkt miokarda), fatalni i nefatalni šlog. Sekundarnim modelom se izračunava rizik od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija („kompletna KVB“), koja pored teške KBS obuhvata i srčanu insuficijenciju i anginu pektorisa, pored šloga i tranzitorni ishemijski atak, zatim intremitentne kludikacije i kongestivnu srčanu insuficijenciju, kao krajnjih ishoda.

1.2. KRITERIJUMI ZA EVALUACIJU NOVIH BIOMARKERA ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

Značajan broj osoba sa rizikom ne može da se identifikuje samo na osnovu tradicionalnih faktora rizika (43). Skoro polovina svih budućih vaskularnih komplikacija desiće se kod osoba bez izražene hiperlipidemije (44). Takođe, skoro polovina osoba kod kojih se javi KBS imaju nijedan ili samo jedan od tradicionalnih faktora rizika, i za njih bi se, na osnovu algoritama procene rizika, smatralo da su pod niskim rizikom (43). Oni najverovatnije neće biti ciljna grupa preventivnih terapija, ali u celini, kod njih se dešava najveći broj kardiovaskularnih događaja. Štaviše, prevalencija tradicionalnih faktora rizika je skoro ista u populaciji bez bolesti kao i među pogođenim osobama (45). Prema tome, postoji važna potreba za novim načinima koji će modifikovati informaciju dobijenu tradicionalnom procenom rizika tako da preventivne mere mogu da se primene na osobe kod kojih će se komplikacije najverovatnije javiti. Ispituju se različiti biomarkeri krvi relevantni za patofiziologiju aterotromboze (npr. markeri inflamatornog odgovora, koagulacije, agregacije trombocita, lipoproteini), genetski markeri ili markeri subkliničke bolesti (46).

Identifikacija tradicionalnih faktora rizika, kao što su hiperholesterolemija, hipertenzija, pol, starost, porodična istorija KVB, dijabetes i pušenje, je prvi korak u određivanju rizika za KVB. Određivanje globalnog rizika na osnovu tradicionalnih faktora rizika omogućava kategorizaciju na visok (>20%), nizak (<10%) ili umeren/intermedijerni (10–20%) 10-godišnji rizik. Osobama sa visokim rizikom preporučuje se promena načina života ili farmakoterapija. Rizik osoba u kategoriji niskog rizika treba ponovo proceniti posle 3–5 godina. Osobe sa intermedijernim rizikom, međutim, koje čine i do 40% populacije sa rizikom, nisu kandidati za intenzivan tretman, iako kod njih jedan ili više faktora rizika izlazi iz preporučenih okvira. Njima bi se savetovala promena načina života, a neki bi bili kandidati za terapiju lekovima za snižavanje holesterola. Takve osobe imale bi najviše koristi od dodatnih ispitivanja kojima bi se njihov rizik redefinisao u nižu ili višu kategoriju i time bliže odredio adekvatan tretman (47).

Napori da se ovaj problem reši su uglavnom fokusirani na upotrebu novih određivanja, ili biomarkera, koji mogu da se koriste uz tradicionalne faktore rizika. Radna grupa *National Institutes of Health* je 2001. godine predložila definiciju biomarkera kao „karakteristike koja se objektivno meri i procenjuje kao indikator normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapijsku intervenciju“ (48). Ova definicija ističe činjenicu da biomarkeri nisu ograničeni na parametre krvi, iako je to kontekst u kom se najčešće pominju u literaturi. Prema tome, biomarker može da predstavlja bilo kakav indikator bioloških procesa, uključujući molekule u cirkulaciji, genetske markere, ćelijske markere, rezultate dijagnostičkih procedura ili nalaze lekarskog pregleda. Koji će od biomarkera biti najinformativniji delimično zavisi od faze bolesti. Danas je poznato da manifestnoj KVB prethodi dug period subkliničkog oblika bolesti. Npr. subklinička ateroskleroza može biti prisutna decenijama pre infarkta miokarda. „*Imaging*“ dijagnostičke procedure, kao biomarkeri, detektuju prisustvo subkliničke KVB, ali imaju mali značaj za detekciju ranijih faza, kada se subklinička bolest još nije razvila. Suprotno, genetski biomarkeri obezbeđuju uvid u predispoziciju bolesti, ali informacija koju oni nose je statična, ne daje indikaciju da li se subklinička bolest razvila ili nije. Biomarkeri u cirkulaciji mogu da nose informaciju ili o ranoj ili o kasnoj fazi bolesti, gde neki biomarkeri reflektuju aktivnost bioloških puteva koji prethode bolesti, a drugi se javljaju u prisustvu subkliničke KVB (49).

Kriterijumi za evaluaciju novih biomarkera predloženi su od strane nekoliko grupa (50–53). Ovi predlozi imaju nekoliko zajedničkih ključnih elemenata. Prvi korak u evaluaciji biomarkera je procena da li se njegove koncentracije razlikuju kod osoba sa i bez bolesti. Drugi korak je sakupljanje dokaza iz slučaj-kontrola i prospektivnih studija koje su ispitivale novi test. U ovoj fazi je neophodno utvrditi i da li su efekti novog biomarkera i dalje prisutni u multivarijantnoj statističkoj analizi posle odgovarajućih korekcija za promenljive kao što su starost, pol, etnička pripadnost, prisustvo drugih bolesti i tip i težina KVB. Treći korak podrazumeva procenu da li se novim testom bolje razlikuju osobe kod kojih će se u budućnosti razviti bolest od onih kod kojih neće, kao i da li test ima aditivnu vrednost u odnosu na postojeće algoritme procene rizika, kao što je FRS. Konačno, treba da

postoje pouzdane analitičke metode za određivanje ispitivanog biomarkera, koje se pored odgovarajućih zahteva u smislu preanalitičkih i analitičkih karakteristika, odlikuju visokom protočnošću, kratkim obrtnim vremenom i razumnom cenom. Dodatni kriterijumi koji se predlažu uključuju odnos cene i efektivnosti, bezbednost i ponavljanje rezultata koji pokazuju prediktivnu vrednost biomarkera u različitim prospektivnim kohortnih grupama.

Pitanje da li biomarker nosi dodatnu informaciju je komplikovanije nego što izgleda. Statistički značajna veza između biomarkera i ishoda, čak i u multivarijabilnom modelu, je neophodna ali nije dovoljna za utvrđivanje njegove prediktivne vrednosti. *Odds ratio* ili *hazard ratio* mogu biti statistički značajni čak i ako postoji veliko preklapanje u distribuciji biomarkera kod onih kod kojih se ne razvija i kod onih kod kojih se razvije bolest. Prema tome, za bilo koju vrednost biomarkera može da postoji značajna verovatnoća da osoba pripada i jednoj i drugoj grupi, umanjujući tako njegovu prediktivnu vrednost.

Pored statističke značajnosti, predložena su još tri kriterijuma za evaluaciju novog biomarkera, a to su diskriminacija, kalibracija i reklasifikacija (49, 54). **Diskriminacija** predstavlja verovatnoću da algoritam za procenu rizika razlikuje pacijente sa većim rizikom od onih sa nižim rizikom. Matematički se opisuje izračunavanjem C indeksa ili C statistike, parametra koji je analogan površini ispod ROC (*receiver operating characteristic curve*) krive (AUC). Ovi statistički parametri definišu verovatnoću da će slučajno odabrana osoba iz „pogođene grupe“ imati veći test skor od slučajno odabrane osobe iz „nepogođene grupe“. Test koji nema sposobnost diskriminacije će imati vrednost C statistike 0,5, a savršeni test 1,0. (savršena diskriminacija). Vrednost C statistike za FRS, zasnovan na tradicionalnim faktorima kardiovaskularnog rizika, dostiže $\approx 0,75$ (8). Prema tome, jedan pristup u proceni novih kardiovaskularnih biomarkera je procena da li povećavaju vrednost C statistike iznad vrednosti koja se dobija samo primenom FRS.

Kalibracija se odnosi na sposobnost testa da ispravno proceni udeo osoba u okviru bilo koje date grupe, kod kojih će se javiti manifestacije bolesti. Među pacijentima za koje je procenjeno da su pod većim rizikom, doći će do većeg broja manifestacija bolesti, dok će

među pacijentima identifikovanim kao sa nižim rizikom doći do manjeg broja slučajeva bolesti. Kalibracija se najbolje predstavlja prikazom primećenih prema očekivanim stopama oboljevanja među kvartilima procenjenog rizika za modele koji uključuju i ne uključuju novi biomarker rizika.

Odluka o tretmanu se teško donosi kod osoba u uskom opsegu intermedijernog rizika. Da bi se utvrdio uticaj novog biomarkera na donošenje kliničke odluke, treba utvrditi da li njegovo dodavanje dovodi do pomeranja (**reklasifikacije**) značajnog broja osoba preko cut-off vrednosti za početak tretmana. Preporuke se odnose na osobe sa intermedijernim rizikom na osnovu premise da se osobe sa visokim rizikom odmah podvrgavaju preventivnim merama (uključujući farmakološku terapiju), dok osobama sa niskim rizikom nije potrebna specifična intervencija. Reklasifikacija osoba sa intermedijernim rizikom u višu ili nižu kategoriju rizika može olakšati donošenje odluke o tretmanu.

Veliki panel biomarkera je na raspolaganju, ali većina njih nije primenljiva u kliničkoj praksi. Prema preporukama za laboratorijsku medicinu Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (*National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines*, NACB LMPG) za upotrebu novih laboratorijskih biomarkera kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji, samo je C-reaktivni protein (CRP) zadovoljio sve navedene kriterijume (53).

1.3. C-REAKTIVNI PROTEIN KAO BIOMARKER KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

1.3.1. ULOGA INFLAMACIJE U ATEROSKLEROZI

Inflamacija ima vodeću ulogu u svim fazama ateroskleroze, od početnih promena u obliku masnih pruga do konačnih komplikacija u vidu AKS. Najraniji događaj u razvoju ateroskleroze je disfunkcija endotela, koju podstiču gojaznost, hipertenzija, dijabetes, pušenje i dislipidemija. Disfunkcija endotelne ćelije se primarno manifestuje kao

deficijencija azot (II) oksida (NO) i povećanje koncentracija endotelina-1 (ET-1), angiotenzina II (Ang II), plazminogen aktivator inhibitora-1 (PAI-1), ćelijskih adhezionih molekula i citokina, odnosno hemokina. Na početku se mononuklearne ćelije – monociti i T limfociti, vezuju za endotel i kotrljaju duž njega. Vezivanje je u početku slabo, a kasnije ove ćelije čvrsto prijanjaju za endotel i prolaze u subendotelni prostor diapedezom između endotelnih ćelija na njihovim spojevima. Kotrljanje i vezivanje leukocita na endotelu je omogućeno zahvaljujući prisustvu adhezionih molekula – intercelularni adhezioni molekul-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) i adhezivni molekul vaskularnih ćelija-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), i integrina. Hemotaksu i ulazak monocita u subendotelni prostor olakšavaju hemoatraktantni protein monocita-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), interleukin-8 (IL-8) i fraktalkin. Zatim, faktor stimulacije kolonija makrofaga (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) pokreće diferencijaciju monocita u makrofage. Makrofage preuzimaju lipide iz LDL čestica, koje mogu da podlegnu oksidacionim ili enzimskim modifikacijama (OxLDL ili E-LDL), a preuzimaju ih posredstvom *scavenger* receptora (SR) [CD36, SR-A, CD68, lektinu sličan receptor za OxLDL (LOX-1), SR-B1]. Tako makrofage postaju penaste ćelije, koje su osnovno obeležje ranih lezija u obliku masnih pruga. Posle formiranja masnih pruga, glatke mišićne ćelije migriraju u intimu, gde proliferišu i formiraju fibroznu kapu. Aktuelno je mišljenje da makrofage opterećene lipidima, u toku stimulacije citokinima, vezivanja za CD40 ligand (CD40L), nekroze i apoptoze, oslobađaju matriks metaloproteinaze (MMP), koje dovode do istanjivanja endotelnog sloja. Zato što makrofage opterećene lipidima sadrže više tkivnog faktora (TF), on se oslobađa iz makrofaga i aktivira faktor VII, što inicira kaskadu koagulacije krvi. To dovodi do formiranja tromba i pojave AKS (nestabilne angine i infarkta miokarda). Makrofage takođe interaguju sa T limfocitima i drugim ćelijama putem aktivacije CD40–CD40L signalnog sistema, što dovodi do nastanka lezije koja je manje fibrozna i sklona rupturi. Brojna istraživanja sa genetski izmenjenim eksperimentalnim životinjama istakla su značaj različitih citokina, hemokina i adhezivnih molekula u aterogenezi, ističući time vodeću ulogu inflamacije u aterosklerozi (55, 56).

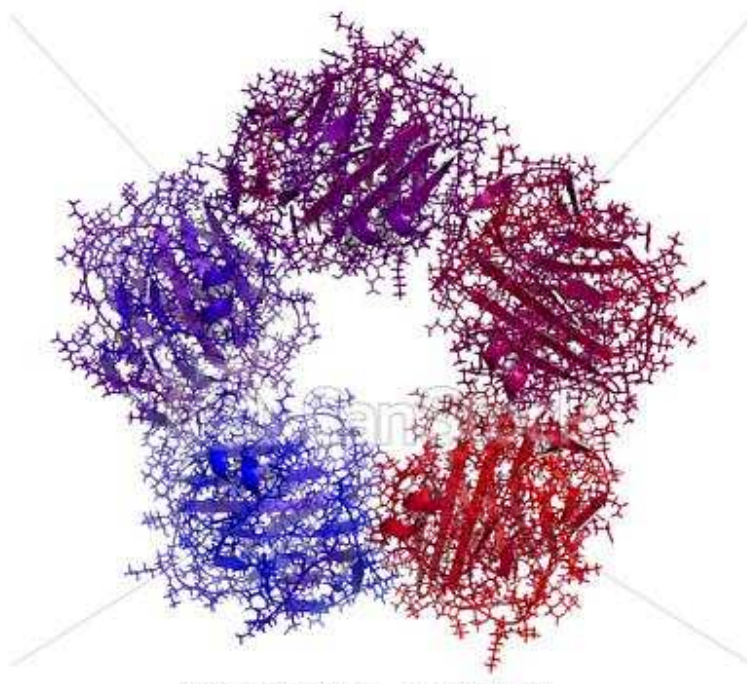
Različite studije su pokazale da brojni biomarkeri inflamacije mogu da predvide komplikacije KVB. Tu spadaju adhezivni molekuli, citokini, hemokini i proteini akutne faze kao što su fibrinogen, serumski amiloid A (SAA) i CRP. Najviše publikacija ide u prilog CRP-u kao snažnom i nezavisnom markeru KVB rizika. Međutim, pored toga što je utvrđena njegova uloga kao markera rizika, postoje dokazi koji ukazuju na njegovu ulogu u samoj patogenezi ateroskleroze (57).

1.3.2. C-REAKTIVNI PROTEIN KAO MEDIJATOR ATEROGENEZE

CRP pripada familiji visoko konzerviranih proteina koji se nazivaju pentraksini. Sastoji se od pet identičnih, nekovalentno vezanih subjednica organizovanih simetrično oko centralne šupljine, od kojih svaka sadrži 206 aminokiselinskih ostataka i ima molekulsku masu od 23 027 Da, odnosno ukupna molekulsku masu CRP-a iznosi ~115 000 Da (58). Struktura CRP-a je prikazana na Slici 1. Kod ljudi, to je neglikozilirani protein i gen koji kodira njegovu sintezu se nalazi na proksimalnom dugom kraku hromozoma 1. Gen za CRP kodira 206 aminokiselinskih ostataka i sastoji se od dva egzona i jednog introna. Prve dve aminokiseline su kodirane na prvom, dok su ostale kodirane na drugom egzonu (59). Dokumentovana je značajna veza između genotipova CRP-a i njegovih koncentracija u cirkulaciji. Ispitivanje 1059G/C polimorfizma u egzonu 2 i T/A supstitucije u intronu humanog gena za CRP je pokazalo značajno nižu koncentraciju CRP-a među nosiocima 1059G/C polimorfizma i kod TT genotipa (60, 61). Takođe, rezultati *Family Heart Study* su pokazali da je bazna koncentracija CRP-a 35–40% uslovljena naslednim činiocima (62).

CRP je odavno poznat kao protein akutne faze, sa važnom ulogom u prepoznavanju i aktivaciji inflamatornih procesa, i kao aktivni učesnik u urođenom imunitetu. Po povredi tkiva, koncentracija CRP-a počinje da raste u toku 4–6 h i nastavlja da se povećava eksponencijalno, udvostručujući vrednost svakih 8–9 h i dostižući maksimum u toku 24–48 h. Koncentracija se normalizuje tek kada se integritet tkiva obnovi. Poluvreme biološkog života iznosi 19 h, pa su mu koncentracije u plazmi u velikoj meri određene brzinom sinteze, što ga čini jednim od proteina akutne faze koji najbrže reaguju (63). Sintaza CRP-a,

stimulisana citokinima – IL-6, IL-1 β i faktorom nekroze timora- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α), počinje u hepatocitima kao odgovor na povredu tkiva ili infekciju. U prisustvu jona kalcijuma, CRP se vezuje za polisaharide mnogih bakterija, gljivica i nekih parazita. Pored toga, CRP se takođe vezuje za fosforilholin, fosfatidilholine i nukleinske kiseline, dok je vezivanje za katjonske molekule, kao što su protamin, heparin i histoni, nezavisno od kalcijuma. Ovo omogućava uklanjanje raspadnih produkata tkiva nastalih u toku inflamatornog procesa, jer kada se veže za svoje ligande, CRP postaje snažan aktivator klasičnog puta sistema komplementa što se završava opsonizacijom i fagocitozom, čime se uklanjaju strane supstance (antimikrobno dejstvo) i ostaci ćelija nastalih nekrozom i apoptozom (64). Pored aktivacije sistema komplementa i olakšavanja fagocitoze od strane makrofaga, funkcija CRP-a u urođenom imunitetu sastoji se i u indukciji ekspresije adhezivnih molekula i promociji aktivacije leukocita. Poslednja saznanja povezuju CRP sa razvojem KVB, odnosno bazni nivoi u odsustvu infekcije i vidljive povrede tkiva, koriste se za procenu kardiovaskulanog rizika (63).



Slika 1. Pentamerna struktura C-reaktivnog proteina.

Receptori za CRP su identifikovani na mononuklearnim ćelijama, neutrofilima i endotelnim ćelijama humane aorte. Glavni receptor za CRP na leukocitima je Fc γ receptor II (CD32) (65). Na endotelnim ćelijama CRP ostvaruje svoje efekte vezivanjem za CD32 i CD64, što podrazumeva povećanu ekspresiju adhezivnih molekula i smanjenu ekspresiju endotelne NO-sintaze (eNOS) (66).

Nedavno je dovedena u pitanje dogma da se CRP isključivo sintetiše u jetri, već nova saznanja ukazuju da može da se produkuje ekstrahepatično, u različitim tipovima ćellija, uključujući one prisutne u aterosklerotskim lezijama, gde ga, pre svega, sintetišu glatke mišićne ćelije i makrofage (67–69). Imunohistohemijskim bojenjem je dokazano prisustvo informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) i CRP-a u tkivu arterijskog plaka. Osim toga, u poređenju sa tkivom normalne arterije, tkivo plaka sadrži deset puta veće količine i proteina i iRNK (69). Takođe je pokazano da endotelne ćelije humane aorte sintetišu i sekretuju CRP (70). U humanom adipoznom tkivu pokazano je prisustvo iRNK za sintezu CRP, a takođe i svojstvo adipocitokina da utiču na sintezu CRP-a. Naime, adiponektin dovodi do značajnog smanjenja količine iRNK za sintezu CRP i samog proteina, dok leptin povećava sintezu CRP-a u endotelnim ćelijama inkubiranim sa IL-1 i IL-6 (71, 72).

Ulogu medijatora aterogeneze CRP ostvaruje kroz uticaj na ključne elemente ovog procesa – endotelne ćelije, monocite/makrofage, uključujući i preuzimanje OxLDL-a, i vaskularne glatke mišićne ćelije. Time ispoljava proaterogene efekte u svim fazama aterogeneze, od endotelne disfunkcije, preko inicijalnog formiranja i razvoja plaka, do njegove rupture. Na nivou endotela, CRP inhibira transkripciju iRNK za eNOS, kao i stvaranje vazodilatatora – NO i prostaciklina. S druge strane, stimuliše apoptozu endotelnih ćelija i produkciju vazokonstriktora ET-1 i proinflamatornog citokina IL-6. Konačan efekat je smanjenje vazoreaktivnosti. U endotelnim ćelijama CRP aktivira proinflamatorni transkripcioni faktor, nuklearni faktor κ B (NF- κ B), što stimuliše produkciju proinflamatornih molekula, IL-6 i IL-8, i ekspresiju adhezivnih molekula – ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina. To omogućava adheziju monocita i njihovo prianjanje za endotel. Takođe, CRP stimuliše ekspresiju MCP-1 u endotelnim ćelijama, koji je neophodan za transmigraciju monocita u

zid arterije, čime počinje formiranje plaka. U zidu, CRP stimuliše diferencijaciju monocita u makrofage i njihovu proliferaciju povećanim oslobađanjem M-CSF, olakšava preuzimanje OxLDL-a od strane makrofaga (ali ne i nativnog LDL-a, zbog skrivenih fosfolipinskih epitopa), što promoviše formiranje penastih ćelija, i stvaranje i oslobađanje reaktivnih radikala kiseonika, kao što je superoksidni anjon, i proinflamatornih citokina, što sve omogućava dalje uvećavanje lezije. Stimulacijom proliferacije i migracije glatkih mišićnih ćelija preko receptora za angiotenzin I, čiju ekspresiju promoviše, CRP olakšava remodelovanje i sazrevanje plaka. U makrofagama, CRP stimuliše i aktivnost MMP, koje razgrađuju kolagen i destabilizuju plak. Dalje, inhibicijom oslobađanja NO i prostaciklina i promocijom disfunkcije endotela, a stimulacijom oslobađanja TF iz makrofaga i sinteze PAI-1, CRP podstiče protrombotičko okruženje koje pogoduje rupturi plaka i nastanku tromboze (63, 73).

1.3.3. PROCENA KARDIOVASKULARNOG RIZIKA NA OSNOVU KONCENTRACIJA C-REAKTIVNOG PROTEINA

Interesovanje za ulogu CRP-a u KVB intenzivirano je pre dve decenije objavljivanjem rezultata studija koje su opisale povišenu koncentraciju CRP-a među pacijentima sa „aktivnom“ KBS, nestabilnom anginom i hroničnom aterotrombozom (74). Kasnije, rezultati *Physicians Health Study* (PHS), u kojoj su učestvovali zdravi muškarci, pokazuju da su bazalne koncentracije CRP-a značajno više kod osoba kod kojih će se kasnije pojaviti infarkt miokarda ili šlog nego kod onih kod kojih do ovih komplikacija neće doći. Značajno je da su koncentracije CRP-a ukazivale na rizik i kod nepušača i kod osoba bez drugih faktora rizika (75). Daljim ispitivanjem ove kohortne grupe nađeno je da su koncentracije CRP-a nosile aditivnu vrednost u odnosu na prognostičku informaciju koncentracija ukupnog i HDL holesterola, da su bile nezavisne od lipidnih i nelipidnih faktora rizika i da su imale prediktivnu vrednost u proceni rizika od pojave bolesti perifernih arterija i iznenadne smrti (76–78). Takođe, rezultati PHS su pokazali da CRP može biti koristan u određivanju efikasnosti terapija koje se obično koriste za redukciju kardiovaskularnog rizika. Naime, smanjenje rizika uzimanjem 325 mg aspirina svakog drugog dana bilo je

najveće među osobama sa najvišom koncentracijom CRP-a, odnosno kod osoba sa najvećim stepenom inflamacije (75).

Rezultati PHS potvrđeni su i kod žena, u *Women's Health Study* (WHS), gde je takođe dodatno određivanje CRP-a u okviru skrininga na osnovu nivoa lipida poboljšalo identifikaciju osoba sa rizikom od kardiovaskularnih bolesti, pre svega smrti od KBS, nefatalnog infarkta miokarda, šloga ili od potrebe za postupcima koronarne revaskularizacije (79).

Kasnije počinju da se objavljuju podaci o tome da CRP nije samo novi biomarker kardiovaskularnog rizika, već da određivanje CRP-a zaslužuje pažnju i za praćenje farmakoterapije za prevenciju i lečenje KVB. Prvo su rezultati CARE studije (*Cholesterol and Recurrent Events*) pokazali da je efekat statina u smislu redukcije pojave komplikacija bio veći kod osoba sa povišenim CRP-om i da je terapija pravastatinom dovela do smanjenja koncentracije CRP-a nezavisno od koncentracije LDL holesterola (80, 81). Ovo je kasnije potvrđeno za sve vrste statina (82, 83).

Kod učesnika AFCAPS/TexCAPS studije (*Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*) terapija statinima je smanjila stopu pojave vaskularnih komplikacija među osobama sa povišenom koncentracijom CRP-a i koncentracijama LDL holesterola ispod prosečnih vrednosti u ispitivanoj populaciji ($<3,86$ mmol/L). Sa druge strane, kod učesnika sa niskim CRP-om i niskim LDL holesterolom nisu primećeni korisni efekti statina u smislu redukcije rizika, uprkos smanjenju nivoa holesterola (84). Ovakvi rezultati imali su potencijalni značaj za prevenciju KVB, naročito pošto su zaključci WHS da osobe sa niskom koncentracijom holesterola ali visokim vrednostima CRP-a predstavljaju grupu pacijenata sa visokim rizikom koji nisu obuhvaćeni aktuelnim vodičima za primenu terapije statinima (85).

Na osnovu rezultata studija koje su usledile, sprovedenih na preko 30 kohortnih grupa u različitim populacijama, potvrđeno je da je CRP prediktor pojave komplikacija KVB u

budućnosti, nezavisan od prisustva ostalih faktora rizika, i da poboljšava procenu globalnog rizika na osnovu Framingamskog rizik skora, naročito kod osoba sa intermedijernim rizikom (86–95). Na osnovu doslednosti ovih podataka, definisani su klinički algoritmi procene rizika poznati kao Rejnoldsov rizik skor (*Reynolds Risk Score*, RRS) za žene i muškarce, koji pored tradicionalnih faktora rizika uključenih u Framingamski rizik skor, uključuju i informacije o stepenu inflamacije (CRP) i genetiku (porodičnu istoriju pojave infarkta miokarda pre 60. godine). Na ovaj način se 20–30% osoba sa intermedijerni rizikom ispravno reklasifikuje u višu ili nižu kategoriju (96, 97). Model procene rizika koji koristi vrednosti CRP-a pokazao se uspešnijim u identifikaciji osoba sa rizikom na osnovu kriterijuma diskriminacije, kalibracije i reklasifikacije i odnosu na model bez CRP-a, što je potvrđeno i na populaciji FHS (95, 98).

I pored svih ovih dokaza, da bi CRP mogao da se primenjuje u rutinskoj kliničkoj praksi bilo je neophodno dokazati njegov značaj u smanjivanju rizika. Prvi dokazi dobijeni su iz rezultata studija koje su ispitivale efekat statina – PROVE IT-TIMI 22 studije (*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction 22*) i „A do Z“ studije (*Aggrastat-to-Zocor*), gde je pokazano da se najbolji klinički ishod terapije statinima postiže kada se pored sniženja koncentracije LDL holesterola $<1,81$ mmol/L, postigne i smanjenje nivoa CRP-a na vrednosti <2 mg/L (99, 100). Takođe, u REVERSAL studiji (*Reversing Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering*), regresija ateroskleroze terapijom statinima, praćena intravaskularnim ultrazvukom, primećena je samo kod osoba kod kojih je postignuto sniženje i CRP-a i LDL holesterola (101). Ovo je naročito značajno za prevenciju šloga, gde samo redukcija LDL holesterola terapijom statinima nije dovoljna, dok je kod osoba kod kojih je postignuta i niska koncentracija CRP-a istom terapijom primećena značajno manja incidencija šloga (102).

Na osnovu pokazane sposobnosti CRP-a da ukaže na pojavu vaskularnih komplikacija u budućnosti i efekta statina da snižavaju nivo CRP-a, kao i dokaza da je efekat terapije statinima veći kada se postigne redukcija nivoa i LDL holesterola i CRP-a, uz *post hoc* analizu rezultata AFCAPS/TexCAPS studije koja je pokazala da zdrave osobe sa

povišenom vrednostima CRP-a i normalnim koncentracijama LDL holesterola mogu imati koristi od terapije statinima, dizajnirana je multicentrična JUPITER studija (*Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*). Randomizirana, dvostruko-slepa, placebom kontrolisana, multicentrična studija sprovedena je na 17 802 osobe sa 1315 lokacija u 26 zemalja. Bili su uključeni muškarci stariji od 50 godina i žene starije od 60 godina koji nisu imali istoriju koronarne arterijske bolesti, šloga ili dijabetesa, sa koncentracijama LDL-holesterola $<3,36$ mmol/L i CRP-a $\geq 2,0$ mg/L. Učesnici su dvostruko slepo i nasumično podeljeni u 2 grupe, jedna je primala 20 mg/dan rosuvastatina, druga placebo. Iako je planirano da studija traje 5 godina, kada je pokazano da kod pacijenata u grupi koja je primala rosuvastatin ima značajno manje smrtnih slučajeva nego u kontrolnoj grupi, nezavisni nadzorni odbor za bezbednost studije je izveo analizu efikasnosti i studija je prekinuta posle prosečnog vremena praćenja pacijenata od 1,9 godina. Rosuvastatin je smanjio pojavu nefatalnog infarkta miokarda za 54%, nefatalnog šloga za 48% i potrebu za postupkom revaskularizacije arterija i hospitalizacijom zbog nestabilne angine za 47%. Konačno, postojala je i redukcija ukupnog mortaliteta od oko 20%. Dakle, studija je sprovedena na učesnicima sa optimalnim koncentracijama lipida prema aktuelnim preporukama. Takođe, pojava krajnjih ishoda smanjena je za 37% u podgrupi učesnika koji osim povišenih vrednosti CRP-a nisu imali nijedan drugi faktor rizika osim starosti. Zbog randomiziranog dizajna JUPITER studije, dobijeni dokazi doprinose učvršćivanju stanovišta da CRP treba da se uključi u procenu rizika u primarnoj prevenciji KVB kao indikator osoba koje će imati koristi od farmakoterapije, a ne mogu se identifikovati na osnovu preporuka aktuelnih vodiča. Procenjuje se da bi primena strategije skrininga CRP-a i uvođenje terapije statinima na osnovu dobijenih vrednosti sprečilo pojavu više od 250 000 slučajeva srčanog udara, šloga, revaskularizacije i prevremene smrti od vaskularnih komplikacija samo u Sjedinjenim Američkim Državama (74, 103–105).

Zahvaljujući velikom broju postojećih dokaza, primena CRP-a u kliničkoj praksi definisana je od strane nekoliko organizacija. Prve kliničke preporuke za upotrebu CRP-a kao dodatak globalnoj proceni rizika definisali su Američka asocijacija za srce (*American Heart*

Association, AHA) i Centar za kontrolu bolesti i prevenciju (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) 2003. godine. Na osnovu AHA/CDC preporuka, CRP kao nezavisan marker rizika može da se koristi kod osoba sa intermedijernim rizikom na osnovu globalne procene rizika (10-godišnji rizik od pojave KBS između 10% i 20%), kao pomoć u daljoj evaluaciji stanja pacijenta i izboru terapije u primarnoj prevenciji. Koncentracije CRP-a <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L se interpretiraju kao nizak, umeren i visok rizik od pojave KVB (106). Ove preporuke su sadržane i u NACB LMPG preporukama za upotrebu novih laboratorijskih biomarkera kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji, s tim što je ovde uvedena i dodatna kategorija veoma visokog rizika za koncentracije CRP>10 mg/L (53). Posle objavljivanja rezultata JUPITER studije, Fondacija američkog koledža kardiologa (*American College of Cardiology Foundation, ACCF*) i AHA, u svojim preporukama za procenu kardiovaskularnog rizika kod asimptomatskih odraslih osoba iz 2010. godine, definiše da određivanje CRP-a kod muškaraca starih ≥ 50 ili žena ≥ 60 godina sa koncentracijama LDL holesterola <2,59 mmol/L; koji ne primaju hormonsku supstitucionu ili imunosupresivnu terapiju; bez klinički manifestovane KBS, dijabetesa, hronične bolesti bubrega, teških inflamatornih stanja, ili kontraindikacija za terapiju statinima, može biti korisno u odabiru pacijenata za terapiju statinima. Takođe, određivanje se preporučuje i kod asimptomatskih muškaraca ≤ 50 ili žena ≤ 60 godina sa procenjenim intermedijernim rizikom (54).

1.3.4. ODREĐIVANJE C-REAKTIVNOG PROTEINA ZA PROCENU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

Zbog brzine i intenziteta odgovora, CRP se dugo koristi za postavljanje dijagnoze, praćenje i prognozu ishoda različitih infektivnih, inflamatornih i nekrotskih procesa, kao i za procenu efikasnosti tretmana u ovim stanjima. Koncentracija CRP-a u serumu može da se poveća i do 1000 puta usled infekcija, trauma, hirurških intervencija i drugih akutnih inflamatornih procesa. Uobičajena *cut off* vrednost za CRP je <10 mg/L. Blaga inflamacija i virusne infekcije dovode do porasta koncentracija CRP-a do vrednosti ~10 do 50 mg/L, dok su aktivna inflamacija i bakterijske infekcije obično uzrok povećanja vrednosti CRP-a

između 50 i 200 mg/L (107). Koncentracije >200 mg/L se sreću u težim infekcijama i traumama. Kod poremećaja koje prati hronična inflamacija, uključujući autoimune bolesti i maligne procese, stalno je prisutna povišena koncentracija CRP-a u serumu. Analitičke metode koje su se koristile za određivanje koncentracija CRP-a reda veličine onih prisutnih u akutnim inflamatornim procesima odlikuje donja granica kvantifikacije od 3–5 mg/L.

Koncentracije CRP-a koje se koriste za procenu kardiovaskularnog rizika su mnogo niže nego u akutnoj inflamaciji i bakterijskim infekcijama. Za proces ateroskleroze karakteristična je hronična inflamacija čiji intenzitet uslovljava koncentracije CRP-a u cirkulaciji koje su niže od granice detekcije konvencionalnih testova. Za određivanje tako niskih nivoa CRP-a razvijeni su testovi sa većom analitičkom osetljivošću, koji se označavaju kao visoko osetljivi (*high-sensitivity*, hs), a na ovaj način određena koncentracija CRP-a kao „visoko osetljivi CRP“ (hsCRP). „Visoka osetljivost“ se definiše kao dovoljna preciznost pri određivanju niskih koncentracija CRP-a da omogući stratifikaciju rezultata naizgled zdravih osoba u tercile, kvartile ili kvintile. Prospektivne studije su pokazale da se korigovan relativni rizik od pojave KVB, bolesti perifernih arterija ili ishemijskih komplikacija kreće između 2,1 i 4,8 u najvišem tercilu, kvartilu ili kvintilu vrednosti hsCRP-a u odnosu na najniži (75, 86). Prvi algoritmi za procenu rizika za pojavu koronarnih komplikacija u budućnosti bili su zasnovani primarno na kvintilima vrednosti hsCRP (108). Međutim, na osnovu raspodele hsCRP vrednosti u 12 različitih populacija koje su uključivale >19 000 ljudi i distribucije frekvencija hsCRP-a u 22 403 odraslih Amerikanaca, CDC/AHA preporuke definišu jednostavnije *cut off* vrednosti zasnovane na tercilima u navedenim populacijama. Preporučene *cut off* vrednosti za procenu rizika su <1,0 mg/L (nizak rizik), 1–3 mg/L (umeren rizik) i >3,0 mg/L (visok rizik) (106, 109).

Neophodna standardizacija hsCRP testova podrazumeva adekvatnu preciznost u opsegu koncentracija 0,2–10 mg/L kako bi *cut off* vrednosti za procenu rizika izvedene iz populacionih studija mogle da se primene na pojedinačnog pacijenta. Praktično, to znači da bi donja granica kvantifikacije (*limit of quantification*, LoQ) trebalo da bude ≤0,3 mg/L i nepreciznost <10% pri određivanju koncentracije CRP-a <0,5 do 1,0 mg/L, mada precizni

zahtevi nisu definisani (110). Neki autori smatraju da granica detekcije (*limit of detection*, LoD) hsCRP testova za određivanje niskih koncentracija karakterističnih za kardiovaskularni rizik treba da iznosi ~0,1 mg/L, a LoQ 0,2 mg/L sa nepreciznošću <10% (111).

CRP je veoma stabilan u preanalitičkom smislu. Uzorci pune krvi stabilni su 3 dana na sobnoj temperaturi, a u frižideru najmanje 7 dana. Na temperaturi od 4 °C uzorci seruma i plazme stabilni su 60 dana, a zamrznuti na -70 °C duže od 20 godina. Vrednosti ne zavise od pola, starosti, rase, uzimanja hrane i godišnjeg doba. Međutim, pokazano je da fizičko vežbanje, pušenje, gojaznost, konzumiranje alkohola, uzimanje antiinflamatornih lekova i hormonska terapija utiču na koncentraciju CRP-a (112).

Prve CDC/AHA preporuke su, zbog velike intra-individualne varijacije, definisale da se hsCRP određuje u metabolički stabilnom stanju, u odsustvu inflamatornih ili infektivnih bolesti, kao srednja vrednost dva merenja u razmaku od 2 nedelje. Ako se dobije koncentracija hsCRP>10 mg/L, trebalo bi potražiti uzrok infekcije ili inflamacije koji bi mogli da dovedu do pogrešne procene kardiovaskularnog rizika. Vrednost >10 mg/L zatim treba odbaciti i ponoviti određivanje hsCRP-a za 2 nedelje, kada se stanje pacijenta stabilizuje (106). Po aktuelnim preporukama NACB LMPG, hsCRP treba da se određuje takođe u metabolički stabilnom stanju, u odsustvu infekcije i akutnih bolesti. Međutim, ako je dobijena koncentracija <3 mg/L, nije potrebno ponovno određivanje. Ako je koncentracija hsCRP>3 mg/L, određivanje treba ponoviti posle najmanje 2 nedelje pod istim uslovima u smislu odsustva infekcije i akutnih bolesti. Validnom vrednošću smatra se niža od dve dobijene koncentracije. Pokazano je i da koncentracije hsCRP ≥10 mg/L mogu biti povezane sa kardiovaskularnim rizikom ako ne postoje znaci i simptomi aktivne infekcije ili inflamatornih poremećaja. U odsustvu drugih bolesti, ponovljeno dobijanje vrednosti ≥10 mg/L tumači se kao veoma visok rizik (53, 113).

Iako je CRP podložan izrazitim i brzim promenama u stanjima koja dovode do reakcije akutne faze, pokazano je da postoji prilična stabilnost njegovih vrednosti u toku vremena,

čak i za povišene vrednosti, u odsustvu akutnih bolesti. Stabilnost vrednosti određivanja hsCRP-a u toku vremena je čak veća od stabilnosti koncentracija ukupnog holesterola, koji predstavlja standardni parametar za procenu kardiovaskularnog rizika (114, 115). Postavlja se pitanje kakve osobine treba da imaju hsCRP testovi u smislu analitičke preciznosti da bi mogli da se koriste za procenu kardiovaskularnog rizika. Idealno bi bilo da su ti zahtevi zasnovani na biološkoj varijaciji analita i validirani u kliničkoj praksi. Dozvoljena ukupna analitička greška pri određivanju nekog analita iznosi do 50% vrednosti intraindividualne biološke varijacije. Ukupna analitička greška podrazumeva zbir sistematske i slučajne greške. Sistematska greška predstavlja netačnost određivanja, a slučajna greška je jednaka 1,96 puta nepreciznost određivanja. Intraindividualna biološka varijacija za CRP iznosi 30–63%, pa prema tome ukupna analitička greška treba da bude 15–32%. Ako je netačnost hsCRP određivanja $\pm 10\%$, tada je dozvoljena nepreciznost 2,6–11%, ako se primenjuje jedno merenje. Kod više puta ponavljanih određivanja hsCRP-a, dozvoljena nepreciznost je veća. Ako se uzima srednja vrednost dva merenja, dozvoljena nepreciznost testa će biti 3,7–15,6% (110).

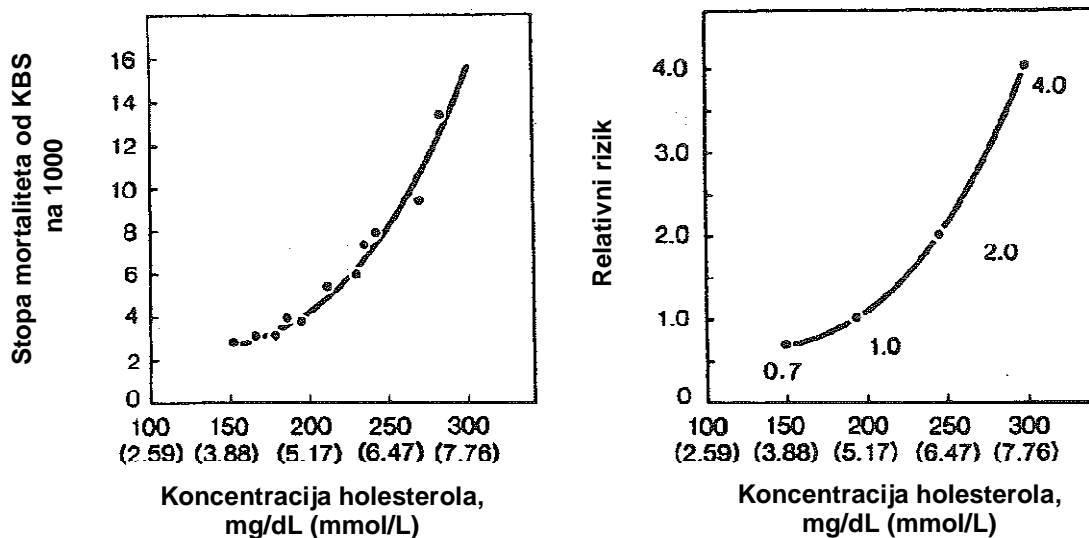
Slaganje između različitih metoda za određivanje hsCRP-a je od esencijalnog značaja, pošto se rezultati dobijeni za pacijente interpretiraju u kontekstu jedinstveno ustanovljenih *cut off* vrednosti. Zato je CDC pokrenuo program standardizacije. U prvoj fazi je identifikovan pogodan primarni referentni materijal – sertifikovani referentni materijal 470 (*Certified Reference Material 470, CRM470*) (116). Koncentracija CRP-a u CRM470 iznosi 39,3 mg/L, što je visoko za hsCRP određivanja. Kao sekundarni referentni materijal proizvođači koriste njegovo razblaženje, a nedavno je, u drugoj fazi standardizacije, definisan jedinstveni protokol transfera vrednosti, čime je obezbeđena sledivost do primarnog referentnog materijala (117). Ovo bi trebalo da doprinese harmonizaciji rezultata dobijenih različitim imunometrijskim metodama, koje se uglavnom zasnivaju na imunonefelometrijskom i imuniturbidimetrijskom principu. Veća osetljivost se postiže uvođenjem lateks čestica kovalentno vezanih za specifično antitelo u sastavu reagenasa (112).

1.4. DRUGI BIOMARKERI KARDIOVASKULARNOG RIZIKA

1.4.1. PARAMETRI LIPIDNOG STATUSA

1.4.1.1. Ukupan holesterol

Povišen holesterol je jedan od uzroka aterosklerostke bolesti. Windhaus je još 1910. godine opisao prisustvo holesterola u lezijama obolelih arterija. Kasnije su mnoge studije potvrdile da se slobodan i esterifikovan holesterol akumuliraju u aorti, koronarnim arterijama i cerebralnim krvnim sudovima i da brzina akumulacije varira kod različitih osoba. Takođe, studije su pokazale da kada je koncentracija ukupnog holesterola visoka, visoke su i incidencija i prevalencija KBS. Veza između koncentracije holesterola i KBS je krivolinijska. Prema MRFIT studiji, ako je relativni rizik 1,0 arbitrarno dodeljen vrednosti holesterola od 5,17 mmol/L, on se povećava na 2,0 pri koncentraciji od 6,47 mmol/L, a na 4,0 za nivo holesterola od 7,76 mmol/L (Slika 2.).



Slika 2. Veza između koncentracije holesterola i smrtnosti od koronarne bolesti srca (KBS), izražene kao godišnja stopa na 1000, i relativnog rizika (12).

Rezultati patoloških studija su objasnili ovu krivolinijsku zavisnost. Kada je 60% površine koronarnih arterija zahvaćeno plakom, počinje kritična faza kada će povišena koncentracija

u serumu izrazito povećati rizik od KBS. Rezultati *Coronary Primary Prevention Trial* (CPPT) studije su pokazali da je korišćenje 95. percentila populacionih vrednosti neadekvatno za definisanje hiperholesterolemije. Podaci iz ove i drugih studija ukazuju da rizik raste sa povećanjem nivoa holesterola. Kod koncentracija od 5,17 do 6,47 mmol/L rizik počinje ubrzano da raste većim intenzitetom. U proseku, sa smanjenjem koncentracije holesterola za 1% (0,05–0,08 mmol/L) dolazi do redukcije od oko 2% u incidenciji KBS, što ima klinički i značaj za javno zdravlje. Pored toga, *Cholesterol-Lowering Atherosclerosis Study* (CLAS) studija je pokazala korisne efekte snižavanja holesterola čak i kod ljudi sa normalnim ili umereno povišenim koncentracijama holesterola (4,79 mmol/L–6,47 mmol/L) i kod onih sa ustanovljenom bolešću (12).

1.4.1.2. LDL holesterol

LDL lipoproteinske čestice nastaju u jetri iz VLDL-a uklanjanjem triglicerida i apolipoproteina, tako da pre izlučivanja u cirkulaciju sadrže samo apolipoprotein B-100 i holesterol. Sadrže najveći procenat holesterola od svih lipoproteinskih čestica (LDL holesterol obično čini 60–70% ukupnog holesterola u serumu) i uloga im je da transportuju holesterol do ćelija. Brojne studije su ukazale na snažnu pozitivnu asocijaciju između LDL čestica i rizika od KBS. Prekretnicu u ovim istraživanjima predstavlja 4S studija (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*), prva randomizirana kontrolisana studija koja je ubedljivo pokazala smanjenje incidencije koronarnih komplikacija i ukupnog mortaliteta redukcijom koncentracije LDL holesterola (118). U toku prethodne dve decenije, velike kliničke studije, koje su uključile preko 30 000 učesnika, pokazale su važnost smanjivanja koncentracije LDL holesterola, bez obzira na način na koji je to postignuto – različitim lekovima (statini, fibrati, sekvestranti žučnih kiselina), dijetom, promenama načina života ili hirurškim putem (ilealni bajpas) (119). Vrednosti LDL holesterola imaju prediktivnu vrednost za kardiovaskularne komplikacije, pošto LDL predstavlja glavni aterogeni lipoprotein. Iz tog razloga, odavno ga je NCEP identifikovao kao primarni cilj terapije za snižavanje holesterola (18).

1.4.1.3. Trigliceridi

Pitanje da li je povezanost triglicerida sa rizikom od komplikacija KVB u budućnosti nezavisna od ostalih lipidnih parametara dugo je bilo kontroverzno. Podaci iz studija dizajniranih po slučaj-kontrola modelu idu u prilog koncentraciji triglicerida kao nezavisnom faktoru kardiovaskularnog rizika (120). S druge strane, zaključak meta-analize 68 prospektivnih studija je bio da za procenu vaskularnog rizika u opštoj populaciji određivanje triglicerida ne nosi dodatnu informaciju u odnosu na HDL i ukupan holesterol (121). Međutim, u studiji koja je obuhvatila mlade ljude, 36 do 45 godina starosti, koji su praćeni 10 godina, pokazana je direktna korelacija između povećanih nivoa triglicerida i kardiovaskularnog rizika, čak i posle korekcije za druge faktore rizika, uključujući i HDL holesterol (122). U mnogim kliničkim studijama, kod osoba sa povišenom koncentracijom triglicerida došlo je do smanjenja rizika primenom terapije prvenstveno zato što je istovremeno bio povišen LDL holesterol i snižen HDL holesterol, a ta kombinacija (tzv. aterogena dislipidemijska trijada) je bila povezana sa najvećim rizikom. U svakom slučaju, nezavisnost nivoa triglicerida, kao uzročnog faktora u promociji KVB ostaje i dalje sporna (120).

Međutim, trigliceridima bogati lipoproteini (TGBL), pre svega remnanti lipoproteina, su aterogeni, što je potvrđeno i eksperimentima na životinjama i kliničkim studijama (123–127). Ti lipoproteini podrazumevaju VLDL čestice i lipoproteine srednje gustine (*intermediate density lipoproteins*, IDL). VLDL su trigliceridima-bogate čestice (čine 55% njihove mase) koje sadrže još apo B-100, apo E, malu količinu apo C-I, C-II i C-III, i 10–15% ukupnog serumskog holesterola. Pod dejstvom endotelne lipoproteinske lipaze, dolazi do hidrolize triglicerida u sastavu VLDL-a, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i ostaci/remnanti VLDL-a. Neke od njih preuzima jetra, a ostali se konvertuju u manje, gušće IDL čestice (12). Slobodne masne kiseline se koriste kao izvor energije za miocite ili se skladište u adipocitima, dok remnanti VLDL-a, kao relativno bogatiji holesterolom od samog VLDL-a, mogu dovesti do formiranja penastih ćelija slično kao modifikovani LDL. Takođe, rezultati ispitivanja eksperimentalnih modela su pokazali da TGBL mogu povećati ekspresiju inflamatornih proteina, adhezivnih molekula i faktora koagulacije, što uslovljava

njihov aterogeni potencijal (120). Zato se određivanje triglicerida posmatra u kontekstu markera prisustva aterogenih remnanta lipoproteina i nalaženje povišene koncentracije triglicerida pomaže u identifikaciji osoba kojima je neophodna terapija radi smanjenja kardiovaskularnog rizika. Prisustvo aterogenih remnanta lipoproteina koje je ekvivalentno koncentraciji triglicerida $\geq 2,26$ mmol/L može povećati rizik značajno iznad onog određenog samo na osnovu koncentracije LDL holesterola. Za osobe sa visokim koncentracijama triglicerida u serumu, NCEP ATP III preporučuje da prisutne povišene koncentracije aterogenih remnanta lipoproteina treba da budu sekundarni cilj terapije, posle snižavanja koncentracije LDL holesterola (18).

1.4.1.4. Non-HDL holesterol

Zbir VLDL i LDL holesterola se naziva non-HDL holesterol. Rutinski se izračunava kao razlika ukupnog i HDL holesterola. Praktično, vrednost non-HDL holesterola odgovara ukupnom holesterolu u sastavu lipoproteina koji sadrže apo B-100, a koji su potencijalno aterogeni. Vrednosti non-HDL holesterola povezane su sa nastankom masnih pruga i uznapredovalih lezija u koronarnim arterijama (128), sa kalcifikacijom koronarnih arterija i progresijom KVB (129, 130). Prospektivne studije su pokazale snažnu povezanost koncentracija non-HDL holesterola i kardiovaskularnih komplikacija (120).

Kod većine osoba sa koncentracijom triglicerida $< 2,26$ mmol/L, koncentracija VLDL holesterola nije značajno povišena i non-HDL holesterol je u korelaciji sa LDL holesterolom. Zato, dodavanje VLDL holesterola LDL holesterolu, pri nižim koncentracijama triglicerida, ima malu dodatnu prediktivnu vrednost. Kada je koncentracija triglicerida $\geq 2,26$ mmol/L, koncentracija VLDL holesterola je značajno povišena, pa sam LDL holesterol neadekvatno definiše rizik povezan sa svim aterogenim lipoproteinima. Tada će non-HDL holesterol bolje predstaviti koncentraciju svih aterogenih lipoproteina nego sam LDL holesterol (18).

"Normalna" koncentracija VLDL holesterola može da se definiše kao ona koja odgovara koncentraciji triglicerida $< 1,70$ mmol/L i obično iznosi $\leq 0,78$ mmol/L. Kada je koncentracija triglicerida $> 1,70$ mmol/L, koncentracija VLDL holesterola je obično $> 0,78$

mmol/L. Prema tome, logično je da ciljna koncentracija non-HDL holesterola bude ona koja je za 0,78 mmol/L viša od ciljne koncentracije LDL holesterola. NCEP ATP III preporuke nisu definisale specifičnu ciljnu koncentraciju triglicerida koja bi trebalo da se postigne terapijom zato što koncentracije triglicerida podležu većoj varijabilnosti iz dana u dan u poređenju sa koncentracijom non-HDL holesterola, pa su zbog toga manje pouzdane. Preporuka ATP III je da kod osoba sa koncentracijom triglicerida $>2,26$ mmol/L treba određivati VLDL holesterol zajedno sa LDL holesterolom, odnosno non-HDL holesterol. Non-HDL holesterol je "aterogeni holesterol" i trebalo bi da bude sekundarni cilj terapije (18). Nedavna meta-analiza kliničkih studija je potvrdila vezu između procentualnog smanjenja koncentracije non-HDL holesterola i procenta redukcije kardiovaskularnih bolesti (131).

1.4.1.5. HDL holesterol

HDL čestice sadrže 50% proteina, 30% fosfolipida i 20% holesterola. To su najmanje lipoproteinske čestice sa najvećom gustinom. Glavni apolipoproteini, koji čine oko 90% svih proteina u njihovom sastavu, su A-I i A-II, čiji je odnos približno 3:1. U metabolizmu lipoproteina dve najznačajnije funkcije HDL-a su da predstavlja izvor apolipoproteina za hilomikrone i VLDL i da posreduje reverzni transport holesterola iz perifernih tkiva u jetru, odakle se izlučuje u žuč (132).

Koncentracije HDL holesterola su inverzno povezane sa incidencijom KBS u observacionim studijama (121, 133). Epidemiološki podaci pokazuju da smanjenje koncentracije HDL holesterola za 1% povećava rizik od KBS za 2–3% (134). Uzročno-posledična veza niske koncentracije HDL holesterola i pojave KBS nije potpuno objašnjena. Zna se da HDL pokreće efluks holesterola iz penastih ćelija u aterosklerotskim lezijama u sklopu reverznog transporta holesterola, ali studije pokazuju da i antioksidativne, antiinflamatorne, antiagregacione, antikoagulantne i pro-fibrinolitike osobine HDL-a takođe inhibiraju aterogenezu. Naime, HDL inhibira hemotaksu monocita, adheziju leukocita za endotel, disfunkciju endotela i apoptozu, oksidaciju LDL čestica,

aktivaciju komplementa, stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija i glatkih mišićnih ćelija, sintezu prostaciklina i aktivaciju proteina C i S (135–137).

Prisustvo niske koncentracije HDL holesterola obično je praćeno povišenom koncentracijom triglicerida, odnosno remnanata lipoproteina (138), a zatim i sa prisustvom malih, gustih LDL čestica (139) što se označava kao aterogena lipidna trijada.

Populacione studije (8) su pokazale kontinuirani porast rizika za KBS kako se koncentracija HDL-a snižava. Iz tog razloga, svaka kategorizacija niske koncentracije HDL holesterola mora biti arbitrarna. Preporuka NCEP ATP III je da se koncentracija HDL holesterola $<1,03$ mmol/L smatra niskom i za muškarce i za žene. Nije određena viša granična vrednost za žene, iako one imaju više koncentracije HDL holesterola od muškaraca, zato što bi se tako mnoge žene sa inače niskim rizikom svrstale u grupu kojoj je potrebna terapija lekovima za snižavanje holesterola (18).

Koncentracije HDL holesterola $\geq 1,55$ mmol/L su povezane sa smanjenim KBS rizikom (8). Zato su u NCEP ATP III preporukama definisane kao negativan faktor rizika, čije prisustvo uklanja jedan faktor rizika iz zbira faktora rizika kojim se određuje ciljna koncentracija LDL holesterola u terapiji (18).

Na osnovu rezultata kliničkih studija (140, 141), povećanje koncentracije HDL holesterola će smanjiti rizik za KBS. Međutim, nije jasno da li će povećanje koncentracije HDL holesterola nezavisno od drugih promena lipidnih i/ili nelipidnih faktora rizika, smanjiti rizik za KBS. Zbog toga, specifična ciljna koncentracija HDL holesterola koju treba postići terapijom za povećavanje koncentracije HDL holesterola nije identifikovana. Međutim, prema NCEP ATP III preporukama da treba sprovoditi promene načina života i terapiju lekovima koji će dovesti do povećanja koncentracije HDL holesterola u sklopu tretiranja drugih lipidnih i nelipidnih faktora rizika (18).

1.4.1.6. Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) [Lp(a)] je specifična klasa lipoproteina u plazmi koja se sastoji od jednog molekula apolipoproteina B povezanog sa apolipoproteinom (a), po čemu se razlikuje od LDL holesterola. Apolipoprotein (a) se odlikuje velikom heterogenošću u veličini, što otežava njegovo tačno određivanje. Ponavljane antigenske determinante, plazminogenu-slična kringl IV tip 2 ponavljanja, se nalaze u različitom broju u različitim Lp(a) česticama i imunoreaktivnost antitela usmerenih ka ovim ponavljanim epitopima može da varira u zavisnosti od veličine apo (a). Određivanje Lp (a) nije standardizovano, pošto različiti proizvođači koriste antitela na različite epitope apo (a) ili na apo B komponentu Lp(a). Iako je IFCC definisao referentne materijale za komercijalno dostupne metode za određivanje Lp(a), to je omogućilo samo harmonizaciju, a ne i potpunu standardizaciju, koja se može postići jedino uvođenjem odgovarajućih jedinstvenih antitela usmerenih na regione van kringl IV tip 2 domena (12).

Lp(a) se snažno vezuje za endotelne ćelije, makrofage, fibroblaste, trombocite i subendotelni matriks, čime promoviše proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i hemotaksu monocita. Smatra se i da inhibira fibrinolizu na mestu povrede tkiva, zbog svoje strukturne homologije sa plazminogenom, kada se takmiči sa plazminogenom za vezivanje za njegove receptore, fibrinogen i fibrin. Zahvaljujući ovim osobinama, i tome što donosi velike količine holesterola na mesta oštećenja vaskularnog zida, jer holesterol predstavlja skoro 40% njegove mase, Lp(a) se smatra jako aterogenim lipoproteinom (142).

Skoro sve retrospektivne slučaj-kontrola studije su pokazale snažnu povezanost između povišenih vrednosti Lp(a) i rizika od KBS. Međutim, rezultati prospektivnih studija su kontradiktorni – koliko je onih koji pokazuju pozitivnu asocijaciju između visokih vrednosti Lp(a) i KBS, toliko je i onih koje to nisu dokazale (12, 143). Ovo može biti posledica problema u standardizaciji različitih testova koji su se koristili u različitim studijama. Randomizirana kontrolisana klinička ispitivanja kojima bi se pokazala direktna uloga Lp(a) u patogenezi KVB je teško sprovesti, zato što na njegovu koncentraciju ne utiče konvencionalna terapija za snižavanje lipida, osim jako visokih doza nikotinske kiseline

koje se teško podnose. Iz ovih razloga, ni NCEP ATP III niti NACB LMPG preporuke ne preporučuju određivanje Lp(a) u opštoj populaciji kao skrining u primarnoj prevenciji i proceni kardiovaskularnog rizika. Određivanje može biti korisno kod pacijenata sa intermedijernim rizikom da bi se utvrdila eventualna potreba za terapijom statinima ili aspirinom. Takođe, Lp(a) može da se određuje i posle globalne procene rizika kod osoba sa izrazitom porodičnom istorijom prevremene pojave KBS radi eventualne identifikacije osoba sa genetskom predispozicijom za KVB. Ako se nađu jako povišene vrednosti i Lp(a) i LDL holesterola, lekar može, na osnovu sopstvene procene, da pokuša da snizi vrednost Lp(a) snižavanjem povišenog LDL holesterola (18, 53). Naime, pokazano je da agresivno snižavanje koncentracija LDL holesterola smanjuje rizik povezan sa prisustvom povišenog Lp(a) i da su povišene koncentracije Lp(a) imale prediktivnu vrednost za povišen kardiovaskularni rizik kod osoba sa visokom koncentracijom LDL holesterola (143).

1.4.1.7. Apolipoproteini A-I i B

Apolipoproteini su proteini u sastavu lipoproteinskih čestica. Njihova uloga nije samo u solubilizaciji lipida, već je njihovo prisustvo kritično za regulaciju transporta lipida i lipoproteina u plazmi. Apolipoprotein B (apo B) je neophodan za sekreciju VLDL, IDL i LDL čestica sintetisanih u jetri u cirkulaciju i za vezivanje LDL-a za svoje receptore. Apolipoprotein A-I (apo A-I) ulazi u sastav HDL čestica, gde predstavlja značajnu strukturnu komponentu i ima ulogu kofaktora enzima lecitinholesterol-aciltransferaze (LCAT), odgovornog za formiranje holesterol-estara u plazmi (132).

Nekoliko studija je pokazalo su kod osoba sa KBS promene u koncentraciji apo A-I i apo B u serumu slične promenama u koncentracijama HDL i LDL holesterola. Vrednosti apo B su bile povišene, a apo A-I snižene kod osoba sa KBS u poređenju sa osobama bez bolesti. U većini studija, apo A-I i apo B su bolje izdvajali osobe sa KBS od koncentracije holesterola odgovarajućeg lipoproteina. Pošto svaka od lipoproteinskih čestica u čijem sastavu se nalazi apo B sadrži samo jedan molekul ovog proteina, apo B predstavlja direktnu meru broja prisutnih aterogenih čestica u cirkulaciji. Ako je koncentracija LDL holesterola

normalna ili blago povišena, a vrednost apo B jako povećana, verovatno je prisutan veliki broj malih, aterogenijih i gušćih LDL čestica (12).

U poslednjih deset godina veliki broj dokaza povezuje visoke koncentracije apoB i niske koncentracije apo A-I sa patogeneozom KBS. U nekoliko studija je pokazano da njihovo određivanje može biti superiornije u tom smislu od određivanja tradicionalnih lipidnih parametara u proceni rizika od pojave KBS (144–146). Međutim, rezultati nisu dosledni, pošto u drugim studijama nije pokazana prednost apo B i apo A-I u odnosu na tradicionalne lipidne parametre u proceni rizika (121, 147–149).

Iako su apo B i non-HDL holesterol u korelaciji, njihova povezanost se razlikuje u zavisnosti od osnovnog poremećaja u metabolizmu lipida i terapije. Naime, korelacija kvantifikuje tendenciju da se promena jedne promenljive reflektuje na promenu druge, dok slaganje kvantifikuje stepen u kome promene jedne promenljive reflektuju istu promenu u drugoj. Non-HDL holesterol i apo B su u snažnoj korelaciji, ali se samo delimično slažu. To znači da će procenjen rizik za jednu osobu jednom metodom često da se razlikuje od rizika procenjenog drugom metodom (150).

Mnoge epidemiološke studije su uporedile prediktivnu vrednost apo B sa non-HDL holesterolom za pojavu KBS. U najvećem broju slučajeva je pokazano da je apo B ili superioran u odnosu non-HDL holesterol ili su ekvivalentni. Ipak, u studijama koje su pokazale statistički značajne razlike između apo B i non-HDL holesterola, razlike u procenjenom riziku su često bile vrlo male i prema tome bilo je malo verovatno da bi imale uticaja na kliničku praksu (120).

NCEP ATP III preporuke su dale prednost određivanju non-HDL holesterola u odnosu na apo B, odnosno HDL holesterola u odnosu na apo A-I. Ovo je bila posledica retkog određivanja apolipoproteina u rutinskim kliničkim laboratorijama, veće cene i problema u standardizaciji testova (18). Međutim, u kasnijim NACB LMPG preporukama, za određivanje apolipoproteina se preporučuju testovi sledivi do definisanih referentnih

materijala. Određivanje apolipoproteina se i dalje ne preporučuje u rutinskom određivanju, ali je ostavljena mogućnost određivanja apo B za praćenje efikasnosti terapije za snižavanje koncentracije lipida kao alternativa non-HDL holesterolu. Takođe, umesto uobičajenog određivanja odnosa ukupnog i HDL holesterola, u proceni kardiovaskularnog rizika vezanog za lipoproteine ostavljena je opcija korišćenja odnosa apo B/apo A-I (53).

1.4.2. PROTEINI OSETLJIVI NA INFLAMACIJU

1.4.2.1. Fibrinogen

Fibrinogen je cirkulišući glikoprotein molekulske težine 134 kDa, koji predstavlja glavni protein koagulacije krvi i prekursor fibrina. Pored učešća u formiranju krvnog ugruška, fibrinogen ima i brojne druge funkcije zbog kojih se pretpostavlja njegova uloga u KVB. To podrazumeva regulaciju adhezije, hemotakse i proliferacije ćelija, vazokonstrikciju na mestima oštećenja zida krvnog suda, stimulaciju agregacije trombocita i uslovljavanje viskoziteta krvi. Fibrinogen je i reaktant akutne faze, čija se sinteza u jetri povećava do 4 puta kao odgovor na inflamatorne ili infektivne stimulse (142).

Mnogobrojne studije u toku poslednje decenije pokazuju da su povišene koncentracije fibrinogena povezane sa razvojem ili prisustvom subkliničke aterosklerotske bolesti i rizikom od pojave KBS, šloga i smrti izazvane vaskularnim ili nevaskularnim uzrocima (151–153). Takođe je pokazana njegova aditivna vrednost u proceni kardiovaskularnog rizika, u odnosu na hsCRP i tradicionalne faktore rizika. Rezultati WHS studije pokazuju da je prediktivna vrednost fibrinogena slična po jačini onoj za hsCRP, a zajednički efekat je veći od individualnog za svaki od njih pojedinačno (154). Analizom podataka iz 52 prospektivne studije ispitivana je vrednost dodavanja koncentracije hsCRP-a ili fibrinogena konvencionalnim parametrima u proceni kardiovaskularnog rizika, u smislu diskriminacije i reklasifikacije rizika. Rezultati su pokazali da bi kod osoba sa intermedijernim rizikom na osnovu važećih preporuka, dodatno određivanje hsCRP-a ili fibrinogena moglo da spreči pojavu jednog događaja u toku 10 godina na svakih 400 do 500 osoba koje su prošle ovakav skrining (155).

Iako danas postoji dovoljno dokaza da je fibrinogen nezavisni marker rizika za pojavu KBS, njegovo određivanje u svrhu procene kardiovaskularnog rizika još uvek nije preporučeno od strane relevantnih organizacija (CDC, AHA, NACB), zbog heterogenosti svih metoda koje se koriste za njegovo određivanje i nepostojanja adekvatne standardizacije. Takođe, nisu definisane ni strategije za terapiju kod povišenih vrednosti (53).

1.4.2.2. Serumski amiloid A

Serumski amiloid A (SAA) je amfipatični protein sa strukturom α -heliksa koji se najvećim delom sintetiše u jetri. Predstavlja protein akutne faze i njegova koncentracija u cirkulaciji može brzo da se poveća 100–1000 puta (za manje od 4 dana) u akutnoj inflamaciji. Vrednosti se obično normalizuju u toku 2 nedelje. U stanjima koje prati hronična inflamacija nalaze se umereno povišene koncentracije SAA. Epidemiološki podaci su pokazali da su ovako povišene vrednosti SAA povezane sa povećanim kardiovaskularnim rizikom i sa indikatorima subkliničke ateroskleroze (156–159).

SAA se ponaša kao apolipoprotein u sastavu HDL čestica, gde u toku odgovora akutne faze postaje glavni apolipoprotein, istiskujući apo A-I. Jedna od glavnih ateroprotektivnih funkcija HDL-a jeste reverzni transport holesterola. Međutim, u inflamaciji je reverzni transport holesterola otežan, što može biti posledica promenjene funkcije HDL-a pod uticajem SAA (160). Analiza proteoma HDL-a pokazala je značajnu promenu u sastavu prisutnih proteina kod pacijenata sa AKS, sa povećanim prisustvom SAA, C3 komponente komplementa i drugih inflamatornih proteina. To ukazuje da se proteinski sastav HDL-a pomera ka inflamatornom profilu čime se menjaju protektivni efekti HDL-a u aterosklerotskom plaku (161). Pokazana je i pozitivna korelacija između količine SAA vezanog za HDL i smanjenog antiinflamatornog kapaciteta HDL-a (162). Postoje podaci da SAA nije prisutan samo u HDL česticama, već da formira kompleks i sa apolipoproteinima koji sadrže apo B – LDL i VLDL. Pokazana je korelacija sa prisustvom ovih kompleksa i komplikacija kod pacijenata sa stabilnom bolešću koronarnih arterija (163, 164).

Pored interakcije sa lipoproteinima, sve je više podataka o potencijalnoj ulozi SAA kao medijatora aterotromboze. Pokazano je da promovira hemotaksu monocita i neutrofila, stimulaciju produkcije proinflamatornih citokina IL-1 β i TNF- α , indukciju aktivnosti matriks metaloproteinaza. Takođe, rezultati ukazuju da SAA stimuliše i trombozu povećanjem tkivnog faktora (160, 165). Postoje podaci i da SAA može imati vodeću ulogu u razvoju ateroskleroze posredovanjem interakcije lipoproteina i proteoglikana, molekula ekstracelularnog matriksa u zidu krvnog suda. Retencija lipoproteina posredovana proteoglikanima predstavlja jednu od najranijih faza ateroskleroze, koja se javlja pre influksa makrofaga i drugih inflamatornih ćelija (160, 164).

1.4.2.3. Alfa-1 kiseli glikoprotein

Alfa-1 kiseli glikoprotein (A1AGP) sadrži visok procenat ugljenih hidrata i veliki broj ostataka sijalinske kiseline. Sastoji se od polipeptidnog lanca sa 181 aminokiselinom i ukupnom molekulskom masom 40 kDa, od čega je oko 45% ugljenih hidrata, uključujući i 11–12% sijalinske kiseline. Sintetiše se primarno u hepatocitima, a u sepsi i u granulocitima i monocitima. Fiziološka uloga nije potpuno jasna. Kao pripadnik grupe lipokalina vezuje i inaktivira lipofilne supstance, kao što su hormoni i mnogi lekovi. Takođe, smatra se da suprimira imunski odgovor, fagocitozu neutrofila i da inhibira agregaciju trombocita, utiče na formiranje kolagena i da je kofaktor lipoproteinske lipaze (64).

Uloga A1AGP u aterosklerozi ispitivana je u sklopu inflamatornog profila i pojedinačno. Rezultati *Malmö Preventive Study* pokazali su da su povišene vrednosti pet proteina osetljivih na inflamaciju (fibrinogen, ceruloplazmin, A1AGP, haptoglobin, α_1 -antitripsin) povezane sa hiperholesterolemijom. Profil sa više od dva inflamatorna proteina u prisustvu hiperholesterolemije bio je povezan sa većom incidencijom komplikacija infarkta miokarda i šloga. Takođe, porast pojedinačnih vrednosti A1AGP u kvartilima bio je povezan sa većim relativnim rizikom od kardiovaskularnih komplikacija (166). Isti skor od pet proteina osetljivih na inflamaciju povezan je sa dugoročnom incidencijom hospitalizacije zbog atrijske fibrilacije kod sredovečnih muškaraca (167). Ispitivanjem povezanosti koncentracije

A1AGP sa sastavom lipoproteina u cirkulaciji i volumenom karotidnog plaka, pokazana je snažna asocijacija povišenih vrednosti A1AGP sa većom količinom TGBL i niskim HDL-om, glavnom karakteristikom proaterogenog metaboličkog profila. Multifaktorskom analizom potvrđeno je da je povezanost nezavisna od tradicionalnih faktora rizika. Više vrednosti A1AGP bile su u korelaciji sa većim volumenom aterosklerotskog plaka u karotidnim arterijama, a takođe postojala je i granično značajna povezanost sa sastavom plaka, odnosno sa prisustvom vulnerabilnog plaka bogatog lipidima i sklonog rupturi (168).

1.4.2.4. Haptoglobin

Haptoglobin se odlikuje genetskim polimorfizmom zbog postojanja dva glavna alela *Hp* gena: *Hp1* i *Hp2*, tako da se sreću tri fenotipa Hp 1-1, Hp 2-1 i Hp 2-2. Glavna funkcija haptoglobina je vezivanje hemoglobina oslobođenog intravaskularnom hemolizom eritrocita. Haptoglobin-hemoglobin kompleksi su dovoljno veliki da spreče ili umnogome smanje renalni gubitak hemoglobina i gvožđa u njegovom sastavu, a takođe njihovim formiranjem tkiva se štite od oksidativnog stresa do koga može dovesti slobodno gvožđe iz hema. Kompleksi se brzo uklanjaju iz cirkulacije preuzimanjem od strane Kupferovih ćelija jetre vezivanjem za CD163 receptore. Takođe, kompleksi haptoglobin-hemoglobin ili slobodan haptoglobin imaju značajnu ulogu i u kontroli lokalnih inflamatornih procesa. Haptoglobin-hemoglobin kompleks je snažna peroksidaza sposobna da hidrolizuje perokside oslobođene u toku fagocitoze, čime se sprečava lipidna peroksidacija. Haptoglobin modulira proliferaciju ili aktivnost limfocita, monocita i granulocita, verovatno vezivanjem za integrine. Sinteza haptoglobina je stimulisana prisustvom inflamacije, a ne hemolizom, što ukazuje da mu je uloga i funkcija u inflamaciji primarna. Ostale funkcije haptoglobina ili haptoglobin-hemoglobin kompleksa uključuju inhibiciju sinteze prostaglandina, NO i time modulaciju endotel-zavisne vazodilatacije, kao i kontrolu funkcije limfocita i neutrofila (64, 169, 170).

Istraživanja su pokazala da kombinacija proteina akutne faze, među kojima je bio i haptoglobin, u koncentracijama koje odgovaraju najvišem kvartilu nose dodatnu prediktivnu informaciju za procenu rizika od budućih kardiovaskularnih komplikacija

(166). Takođe, ispitivana je kombinacija inflamatornih markera, pre svega ukupnog broja leukocita i haptoglobina, kao prediktora pojave infarkta miokarda, srčane insuficijencije ili šloga u populaciji od preko 65 000 učesnika AMORIS studije. Pokazano je da koncentracija haptoglobina, pojedinačno ili u sklopu inflamatornih skorova, nosi dodatnu i nezavisnu prediktivnu informaciju u odnosu na klasične lipidne parametre, kao što su ukupan holesterol i trigliceridi, ali i u poređenju sa odnosom apo B/apo A-I (169). Kod osoba sa diabetes melitusom tip 2 više studija je pokazalo značaj fenotipizacije haptoglobina u proceni i stratifikaciji kardiovaskularnog rizika. Naime, prisustvo Hp 2-2 fenotipa povezuje se sa većom incidencijom subkliničke ateroskleroze i mortalitetom od KVB kod u populaciji sa dijabetesom, što nije pokazano u studijama u koje nisu bili uključeni dijabetičari (170–173).

1.4.2.5. C3 i C4 komponente komplementa

C3 komponenta sistema komplementa predstavlja funkcionalnu vezu između klasičnog i alternativnog puta aktivacije. Takođe je i prisutna u najvećoj koncentraciji u poređenju sa svim komponentama komplementa u plazmi. Sintetiše se najviše u hepatocitima, a prisustvo bakterijskog endotoksina indukuje sintezu u monocitima i fibroblastima. Aktivacija oba puta komplementa dovodi do cepanja C3 na C3b i C3a. C3a se oslobađa u cirkulaciju i deluje kao anafilatoksin i hemotaksin. C3b se vezuje za membrane i zatim aktivira sledeće faktore u membranskom atak kompleksu. Takođe, C3b deluje kao opsonin, vezujući se za receptore na fagocitima. C4 je, za razliku od ostalih komponenti komplementa, relativno otporan na toplotu. Većinom se sintetiše u hepatocitima, a neku količinu mogu da stvaraju monociti ili druge ćelije. C4, u obliku kompleksa C4b2b predstavlja aktivirajući enzim za C3 i ima esencijalnu ulogu u aktivaciji klasičnog puta komplementa. C4b2b vezan za imunske komplekse sprečava njihovu precipitaciju i promovise klirens (64).

Postoje podaci da do aktivacije komplementa dolazi i u humanoj i u eksperimentalnoj aterosklerozi. Sazrevanje aterosklerotske lezije posle faze penastih ćelija zavisi od intaktnog sistema komplementa. Pretpostavlja se da je krajnji C5b-9 kompleks odgovoran

za lizu ćelija, ali i da sublitička forma indukuje aktivaciju i proliferaciju glatkih mišićnih i endotelnih ćelija (174). Pokazano je i da su koncentracije C3 i C4 komponenti sistema komplementa u plazmi povezani sa incidencijom infarkta miokarda, aatrijalnih fibrilacija i aritmijama posle kardiohirurških intervencija (175–177).

1.4.3. MOKRAĆNA KISELINA

Mokraćna kiselina, krajnji proizvod metabolizma purina, povezuje se sa genezom KVB još od XIX veka. Međutim, njegova uloga kao markera ili faktora rizika je i dalje kontroverzna. Snažna korelacija između vrednosti mokraćne kiseline i ustanovljenih faktora kardiovaskularnog rizika, kao što su hipertenzija, gojaznost i disfunkcija bubrega, otežavaju da se utvrdi uzročna veza u epidemiološkim studijama. Eksperimentalni podaci su pokazali da je čak i blaga hiperurikemija povezana sa inflamatornom aktivnošću, aktivacijom renin-angiotenzin-aldosteron sistema, disfunkcijom endotela, proliferacijom glatkih mišićnih ćelija i povećanjem krvnog pritiska. Važno je da ove sve posledice hiperurikemije slabe redukcijom nivoa mokraćne kiseline u serumu inhibitorom ksantin-oksidade ili urikozuričnim agensom (178, 179).

Rezultati meta-analize 26 prospektivnih kohortnih studija su pokazali značajnu, ali umerenu povezanost hiperurikemije i komplikacija KBS, nezavisno od tradicionalnih faktora rizika. Povezanost je bila snažnija kod žena nego kod muškaraca. Takođe, u dve kliničke studije pokazano je da smanjenje koncentracije mokraćne kiseline u toku terapije atorvastatinom, odnosno losartanom, smanjuje kardiovaskularni rizik (180).

Sve više dokaza pokazuje da mokraćna kiselina može imati ulogu i u metaboličkom sindromu, kome je priznata prediktivna uloga u proceni kardiovaskularnog rizika. Smatralo se da je povišena koncentracija mokraćne kiseline u metaboličkom sindromu posledica hiperinsulinemije, pošto insulin smanjuje renalnu ekskreciju mokraćne kiseline. Međutim, hiperurikemija često prethodi razvoju hiperinsulinemije, gojaznosti i dijabetesa. Najsnajzniji dokazi o ulozi mokraćne kiseline u razvoju metaboličkog sindroma dobijeni su

ispitivanjima životinjskih modela gde je smanjenje nivoa mokraćne kiseline moglo da spreči nastanak odnosno poništi već razvijene karakteristike metaboličkog sindroma (178, 179). Povišena koncentracija mokraćne kiseline je povezana i sa promenjenim metabolizmom lipoproteina i prisustvom malih, gustih LDL čestica, jedne od osnovnih karakteristika aterogene dislipidemije, i manjim, gušćim HDL česticama čije se prisustvo povezuje sa razvojem ateroskleroze (181).

1.4.4. SRČANI BIOMARKERI

1.4.4.1. Amino-terminalni pro-natriuretski peptid tip B

Natriuretski proteini se oslobađaju u hemodinamskom stresu i snažno deluju kao diuretici, natriuretici i relaksiraju vaskularne glatke mišićne ćelije. Tu spadaju atrijalni natriuretski peptid (ANP) i moždani (ili tip B) natriuretski peptid (BNP) i njihovi amino terminalni (NT) metabolički peptidi označeni kao NT-proANP i NT-proBNP. Zbog svoje centralne patofiziološke uloge u kardiovaskularnom sistemu, natriuretski peptidi su povišeni u svim stanjima sa istezanjem zida srca, dilatacijom komora i povišenim pritiskom zbog zadržavanja viška tečnosti. Aktivacijom natriuretskog sistema smanjuje se volumen krvi i krvni pritisak (182).

Pokazano je da BNP ima najveću prediktivnu vrednost kao indikator srčane insuficijencije u odnosu na ANP. Takođe, u proceni ventrikularne disfunkcije i predikciji mortaliteta kod pacijenata sa teškom srčanom insuficijencijom, pokazano je da je BNP bolji biomarker. Prema tome, BNP i NT-proBNP su se istakli kao preporučeni biomarkeri za procenu stresa povezanog sa funkcijom srca i promenu fiziologije srčanih komora. BNP se sintetiše u miocitima u obliku prekursora od 134 aminokiseline, preproBNP. Pod dejstvom stimulusa za njegovo oslobađanje odvaja se signalna peptidna sekvenca od 26 aminokiselina sa N-terminusa i nastaje proBNP. U toku oslobađanja u cirkulaciju, od proBNP-a se pod dejstvom membranske serin-proteaze korina odvaja amino-terminalni fragment – NT-proBNP i ostaje aktivni peptid od 32 amino kiseline označen kao BNP (182).

Dokazi ukazuju da određivanje BNP i NT-proBNP nosi dodatnu prognostičku informaciju o mortalitetu i pojavi prve manifestacije kardiovaskularne bolesti u odnosu na tradicionalne faktore rizika (183, 184). Pokazano je i da su vrednosti NT-proBNP u najvišem kvartilu bile povezane sa većim dugoročnim rizikom od iznenadne srčane smrti u populaciji asimptomatskih žena, nezavisno od tradicionalnih faktora rizika (185). I NT-proBNP i BNP se ekvivalentno ponašaju u smislu detekcije ventrikularne disfunkcije i oba imaju potencijalni značaj u proceni rizika, pa njihovo određivanje može da ukaže na remodelovanje srčanog mišića koje se nalazi u osnovi različitih entiteta KVB (186). Pošto ne postoje dokazi da bi terapija započeta na osnovu povećanog rizika na koji ukazuju vrednosti ovih biomarkera dovela do boljeg ishoda, NACB LMPG vodič ne preporučuje njihovo rutinsko određivanje u oštoj populaciji za procenu kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji (53).

Pošto i BNP i NT-proBNP imaju istu prognostičku vrednost, izbor će u velikoj meri biti određen preanalitičkim uslovima. Naime, NT-proBNP je stabilniji *in vitro* od BNP-a. NT-proBNP je stabilan do 7 dana na sobnoj temperaturi i 10 dana u frižideru, dok se na sobnoj temperaturi BNP razgrađuje ubrzo po sakupljanju uzorka, a na temperaturi frižidera je stabilan svega 4 sata (187).

1.4.4.2. Srčani troponin

Troponinski kompleks se sastoji od tri proteinske subjedinice – troponina C (komponenta koja vezuje kalcijum), troponina I (inhibitorna komponenta) i troponina T (komponenta koja se vezuje za tropomiozin), i predstavlja kontraktilni protein miofibrila. Postoje brojne izoforme ovih subjedinica koje su raspoređene između srčanog mišića i sporo i brzo kontrahujućih skeletnih mišića. I dok se srčano-specifične izoforme troponina T (cTnT) i troponina I (cTnI) razlikuju od mišićnih, srčana izoforma troponina C je identična onoj u sporo kontrahujućim mišićima. Troponin je lokalizovan primarno u miofibrilima (94–97%), a u manjem procentu u citoplazmi (3–6%). Subjedinice I i T srčanog troponina se razlikuju po svojoj aminokiselinskoj sekvenci, koje su kodirane različitim genima (182).

Oslobađanje srčanog troponina u cirkulaciju je karakteristično za akutni infarkt miokarda i prisutne koncentracije se koriste za stratifikaciju rizika kod pacijenata sa AKS (188, 189). Povremeno troponin može da se detektuje u krvi osoba iz opšte populacije i tada se povezuje sa izrazito velikim rizikom od teških kardiovaskularnih komplikacija (190). Zbog niske prevalencije detektabilnog troponina kada se koriste standardni testovi, njegov doprinos proceni kardiovaskularnog rizika u opštoj populaciji nije bio značajan. Međutim, uvođenje visoko osetljivih (*high sensitivity*, hs) testova za određivanje srčanog troponina (hs-cTnI; hs-cTnT) omogućilo je određivanje veoma niskih koncentracija, sa LoD i do 10 puta nižim od konvencionalnih testova i odličnom preciznošću ($K_v \leq 10\%$) za vrednosti 99. percentila i niže. Tako je omogućen skrining asimptomatske populacije gde konvencionalni testovi ne mogu da generišu signal ispod njihovog LoD (191).

Od pojave visoko osetljivih testova za određivanje srčanog troponina pojavilo se mnogo dokaza koji idu u prilog dodavanju određivanja hs-cTnI ili hs-cTnT u proceni kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji. Rezultati određivanja hs-TnT u populaciji ARIC studije (opšta populacija bez osoba sa KBS i šlogom) su pokazali povezanost čak i malih povećanja koncentracije hs-TnT sa većim rizikom od infarkta miokarda, smrti, naročito uzrokovane KBS, i od hospitalizacije zbog srčane insuficijencije (192). Veoma niske, ali detektabilne koncentracije hs-cTnT povezane su sa pojavom KVB i mortalitetom kod žena sa dijabetesom u WHS studiji (193). Više studija je pokazalo i da hs-TnI može da se detektuje u značajnom procentu osoba bez znakova KVB i da su te vrednosti povezane sa rizikom od kardiovaskularnog i opšteg mortaliteta nezavisno od tradicionalnih faktora rizika, hsCRP i NT-proBNP (194, 195).

1.4.5. BIOMARKERI BUBREŽNE FUNKCIJE

Pokazano je da stanje renalne funkcije nosi nezavisnu prediktivnu informaciju o kardiovaskularnom mortalitetu i morbiditetu u populacijama sa visokim rizikom, kao što su osobe sa hroničnom bubrežnom bolešću ili KVB, osobe sa prisutnim faktorima kardiovaskularnog rizika, dijabetesom i hipertenzijom. Međutim, rizik od komplikacija KVB

povezan sa manjim, asimptomatskim stepenom oštećenja bubrega u opštoj populaciji nije dovoljno jasan. Malo je studija koje su ispitivale vezu između renalne funkcije i rizika od pojave kardiovaskularnih komplikacija i šloga u opštoj populaciji. Neke su potvrdile povezanost, dok rezultati drugih nisu pokazali nezavisni doprinos proceni rizika posle korigovanja sa faktorima kardiovaskularnog rizika (196).

1.4.5.1. Kreatinin u serumu i jednačine za procenu jačine glomerularne filtracije

Prve studije su pokazale jasnu povezanost između koncentracije kreatinina u serumu i komplikacija KVB. Međutim, i kasnijim istraživanjima nije nađena značajna povezanost između blago povišenih vrednosti serumskog kreatinina i incidence KVB (197, 198).

Koncentracija kreatinina se često koristi kao indeks bubrežne funkcije i mera jačine glomerularne filtracije (*glomerular filtration rate*, GFR). Međutim, sam serumski kreatinin ne može da se koristi za procenu GFR ili da detektuje oštećenje bubrega zato što njegova veza sa GFR nije linearna i na nju utiču i faktori nezavisni od GFR, kao što su starost, pol, dimenzije tela, ishrana, neki lekovi (199). Verovatno su iz tih razloga rezultati studija o vezi koncentracije kreatinina, kao biomarkera bubrežne funkcije, i kardiovaskularnog rizika bili neujednačeni. Tačnija i preciznija procena GFR se dobija jednačinama koje empirijski kombinuju sve prosečne efekte faktora koji utiču na koncentraciju kreatinina u serumu (*estimated glomerular filtration rate*, eGFR). Američka nacionalna fondacija za bubrege (*National Kidney Foundation*) u svojim vodičima preporučuje upotrebu MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) jednačine za procenu GFR, koja pored koncentracije kreatinina sadrži i informacije o starosti, polu i rasi (200). Studije koje su koristile MDRD formulu za procenu GFR pokazale su da osobe sa $eGFR(MDRD) < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, kao pokazateljem oštećene funkcije bubrega, imaju veći rizik od razvoja srčane insuficijencije, šloga, KBS i bolesti perifernih arterija (201–203). Međutim, odstupanja u kalibraciji i nepreciznost određivanja kreatinina imaju veći uticaj na vrednosti eGFR po MDRD formuli kada je koncentracija kreatinina blizu gornje granice referentnog intervala. Pošto su to nivoi karakteristični za ranu hroničnu bubrežnu insuficijenciju, kada je $GFR > 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, preporučuje se da se vrednosti eGRF po MDRD formuli iznad kritične vrednosti od $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ izdaju kao „ $> 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ “, a ne kao

dobijena numerička vrednost (204). Nedavno je definisana nova, CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease-Epidemiology*) jednačina za izračunavanje eGRF, za koju se smatra da daje pouzdaniju procenu GFR kod pacijenata sa normalnom ili subnormalnom funkcijom bubrega (205). Studija koja je ispitivala prediktivnu vrednost cistatina C i jednačina za procenu GFR za pojavu infarkta miokarda i kardiovaskularne smrti kod pacijenata sa AKS pokazala je najveći značaj eGFR po CKD-EPI formuli od svih ispitivanih bubrežnih biomarkera (206).

Na osnovu postojećih dokaza, NACB LMPG preporučuje određivanje kreatinina i izračunavanje eGFR u primarnoj prevenciji kod svih osoba sa hipertenzijom, dijabetesom, porodičnom istorijom hronične bubrežne bolesti i kod osoba sa intermedijernim rizikom (10–20%) za KVB. Takođe, određivanje kreatinina i izračunavanje eGFR treba raditi i kod svih osoba starijih od 65 godina. Preporučuje se izračunavanje eGFR prema poslednjim preporukama NKF, dakle prema MDRD formuli (53).

1.4.5.2. Cistatin C

Ograničenja koja imaju jednačine za izračunavanje eGFR na osnovu koncentracije kreatinina u serumu, posebno kod vrednosti koje označavaju manji stepen oštećenja bubrega, inicirala su potragu za drugim laboratorijskim biomarkerima bubrežne funkcije. Cistatin C (Cys-C) je inhibitor cistein proteaza molekulske mase 13 kDa. Sintetiše se u skoro svim ćelijama sa jedrom i oslobađa u cirkulaciju. U pogledu bubrežne funkcije, njegove najvažnije osobine su mala molekulska masa i visoka izoelektrična tačka ($pI=9,2$), što mu omogućava neometanu filtraciju u glomerulima. Sledi potpuna reapsorpcija i katabolizam u proksimalnim tubulima, tako da se ne pojavljuje ponovo u cirkulaciji. Prema tome, koncentracija Cys-C u serumu je u korelaciji sa intenzitetom njegovog glomerularnog klirensa. Pored toga, faktori koji utiču na nivoe kreatinina u serumu, kao što su pol, starost, fizička aktivnost, ishrana i mišićna masa, ne utiču na koncentraciju Cys-C u serumu. Zato je bolji marker bubrežne funkcije i alternativa eGFR vrednostima zasnovanim na kreatininu (199).

Nedavne studije pokazuju da je Cys-C jače povezan sa rizikom od pojave infarkta miokarda, šloga, bolesti perifernih arterija, kardiovaskularnim i opštim mortalitetom u populacijama inicijalno zdravih osoba (207, 208). Međutim, postoje indicije da je Cys-C povezan sa kardiovaskularnim rizikom ne samo kao indikator GFR i bubrežne funkcije, već u kao direktan učesnik u formiranju aterosklerotskog plaka. Naime, pokazano je da su više vrednosti Cys-C u serumu u korelaciji sa ranom fazom u formiranju koronarnih aterosklerotskih plakova među pacijentima bez ustanovljene hronične disfunkcije bubrega. Prisustvo nekalcifikovanih plakova je bilo dominantnije sa povećanjem koncentracije Cys-C, nezavisno od eGFR i drugih faktora kardiovaskularnog rizika (209).

S obzirom na dovoljan broj adekvatnih dokaza, Cys-C je uvršten u NACB LMPG preporuke o novim faktorima rizika za prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da bi mogao da bude snažniji prediktor komplikacija kardiovaskularnih bolesti od izračunavanja eGFR na osnovu kreatinina. Međutim, neophodna su dalja istraživanja koja bi ustanovila da li bi intervencija zasnovana na stratifikaciji rizika na osnovu određivanja Cys-C kod osoba sa smanjenom eGFR donela veću kliničku korist. Neophodno je i sprovođenje studija odgovarajućeg dizajna o ulozi kreatinina, eGFR i Cys-C da bi se utvrdio uticaj ovih biomarkera u globalnoj proceni kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji (53).

2. CILJ RADA

Procena kardiovaskularnog rizika na osnovu aktuelnih preporuka i globalnih skorova zasnovanih na tradicionalnim faktorima rizika ne identifikuje skoro 50% osoba kod kojih će se javiti KBS. Takođe, oko 40% populacije sa rizikom se svrstava u kategoriju intermedijernog 10-godišnjeg rizika (10–20%). Za ovu grupu zvanične preporuke nisu jasno definisane, za razliku od kategorije najnižeg, odnosno najvišeg rizika. Brojne studije su opisale povezanost različitih biomarkera sa incidencijom kardiovaskularnih komplikacija i njihov pojedinačni doprinos u patogenezi ateroskleroze i inflamatornim procesima u njenoj osnovi. Do sada, jedino je hsCRP dovoljno ispitan po definisanim kriterijumima u smislu diskriminacije, kalibracije i reklasifikacije.

Cilj rada je da se utvrdi, korelacionom i regresionom analizom, da li postoji povezanost između hsCRP-a, kao ustanovljenog biomarkera proaterogenog metaboličkog stanja i drugih biomarkera inflamacije (SAA, fibrinogen, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa), metabolizma lipida (ukupan, HDL, nonHDL i LDL holesterol, trigliceridi, apo A-I, apo B, Lp(a)), bubrežne (kreatinin, eGFR po MDRD i CKD-EPI jednačinama, Cys-C i eGFR na osnovu Cys-C) i srčane funkcije (NT-proBNP, hs-cTnT), koji potencijalno mogu da unaprede procenu kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji.

Prethodno je neophodno ispitati analitičke karakteristike i kliničku efikasnost metode visoke osetljivosti koja će se koristiti za određivanja hsCRP-a, s obzirom da su koncentracije CRP-a u hroničnoj inflamaciji koja je prisutna u aterosklerozi značajno niže od onih u akutnoj.

Svim učesnicima će se proceniti 10-godišnji rizik od pojave smrtnog ishoda kao posledice KBS, infarkta miokarda, stabilne i nestabilne angine pektoris na osnovu FRS; zatim „globalni“ 10-godišnji kardiovaskularni rizik od pojave smrtnog ishoda KVB, pojave svih oblika KBS, šloga, srčane insuficijencije i intermitentnih klaudikacija na osnovu globalnog

FRS; kao i dugoročni globalni 30-godišnji rizik. Upoređiće se raspodela rizika po kategorijama na osnovu sva tri algoritma i na osnovu hsCRP-a.

Priroda uticaja svakog pojedinačnog biomarkera na kardiovaskularni rizik i eventualna povezanost sa vrednostima hsCRP-a ispitaće se faktorskom analizom. Aterosklerozu, kao kompleksno stanje uslovljeno velikim brojem činilaca, karakteriše subklinička, hronična inflamacija. Iz tog razloga je identifikovan veliki broj biomarkera koji su povezani sa patogenezom, bilo uzročno-posledično, bilo samo kao indikatori patofiziološkog procesa. Međutim, promenljive povezane sa subkliničkom inflamacijom često su u višestrukoj korelaciji. Faktorska analiza redukuje veliki broj međusobno povezanih promenljivih na manji broj faktora ili komponenti. Faktori su statistički nezavisni i fiziološki različiti fenotipovi koji ukazuju na zajedničku osnovu fizioloških domena. Svaki od faktora predstavlja linearnu kombinaciju više promenljivih, u ovom slučaju biomarkera, koji u različitom stepenu mogu da se koriste za razlikovanje ispitanika. Faktorskom analizom će se ispitati grupisanje ispitivanih biomarkera povezanih sa aterosklerozom i inflamacijom slabog intenziteta. Zatim će se ispitati povezanost dobijenih faktora sa vrednostima hsCRP, kategorizacijom 10-godišnjeg rizika na osnovu FRS i globalnog FRS, kao i sa klasifikacijom 30-godišnjeg rizika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći komercijalni test reagensi:

1. CRP (Latex), OSR6185, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
2. CRP Calibrator (Latex), ODR3031, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
3. CRP (Latex) Control Sera, ODC0013, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
4. CREATININE, OSR6187, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
5. URIC ACID, OSR6198, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
6. CHOLESTEROL, OSR6216, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
7. TRYGLICERIDE, OSR61118, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
8. SYSTEM CALIBRATOR, 66300, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
9. Control Serum 1, ODC0003, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
10. Control Serum 2, ODC0004, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
11. HDL-CHOLESTEROL, OSR6287, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
12. HDL-CHOLESTEROL CALIBRATOR, ODC0011, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
13. LDL-CHOLESTEROL, OSR6283, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany

14. LDL-CHOLESTEROL CALIBRATOR, ODC0012, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
15. HDL/LDL-CHOLESTEROL CONTROL SERUM, ODC0005, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
16. *CardioPhase*[®] *hsCRP*, OQIY, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
17. MULTIGENT[®] QUANTIA A-1-AGP, 6L34-40, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
18. Quantia PROTEINS Standard, 6K45-02, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
19. Quantia PROTEINS Control, 6K53-21, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
20. HAPTOGLOBIN, 9D91-21, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
21. COMPLEMENT C3, 9D96-21, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
22. COMPLEMENT C4, 9D97-21, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
23. Quantia PROTEINS Control, 6K53-01, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
24. Specific Proteins Multiconstituent Calibrator, 1E78, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
25. APOLIPOPROTEIN A1, 9D92-21, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
26. APOLIPOPROTEIN B, 9D93-21, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
27. Apo A1/Apo B Calibrator, 6E54, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
28. BIO-RAD Liquicheck Lipids Control Level 1, 641, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, United States
29. BIO-RAD Liquicheck Lipids Control Level 2, 642, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, United States
30. MULTIGENT[®] QUANTIA Lp(a), 7K00-40, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
31. Quantia Lp(a) Standard, 7K00-02, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
32. Quantia Lp(a) Control, 7K00-21, BIOKIT, S.A., Barcelona, Spain
33. *CardioPhase*[®] *hsCRP*, OQIY, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
34. N Rheumatology Standard SL, OQKZ, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany

35. N/T Rheumatology Controls SL/1 i SL/2, OQDB i OQDC, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
36. N Supplementary Reagent/Precipitation, OUMU, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
37. N Latex SAA, OQMP, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
38. N Latex Cystatin C, OQNM, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
39. N Diluent, OUMT, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
40. Cleaner SCS, OQUB, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
41. Elecsys[®] proBNP, 03121640, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
42. Elecsys[®] proBNP CalSet, 03121658, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
43. Elecsys[®] PreciControl Cardiac, 03530477, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
44. Elecsys[®] Troponin T hs STAT, 05092728190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
45. Elecsys[®] Troponin T hs STAT CalSet, 05092736190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
46. Elecsys[®] PreciControl Troponin T, 05095107190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
47. HemosIL[®] PT-Fibrinogen, 0009756710, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
48. Calibration Plasma, 0020003700, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
49. Normal Control, 0020003110, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
50. Low Abnormal Control, 0020003210, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
51. High Abnormal Control, 0020003310, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
52. Low Fibrinogen Control, 0020004200, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
53. Sample diluent, 0009756800, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
54. Factor diluent, 0009757600, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy

3.2. PRIBOR I APARATI

U praktičnom radu je korišćen sledeći pribor:

- vakutajner epruvete za serum, BD Vacutainer[®] System, 366430 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- vakutajner epruvete sa Na₃-citratom, BD Vacutainer[®] System, 363048 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- plastične epruvete sa odgovarajućim stalkovima
- plastične čašice za Olympus AU2700 analizator, Sample Cupe, OE66853, (Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany)
- plastične čašice za Architect ci8200 analizator, Sample Cups, 8A7601 (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany)
- plastične čašice za Cobas e601 analizator, Sample Cups, 10394246001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- ependorf i pool epruvete
- automatske pipete firme „Oxford“ sa odgovarajućim nastavcima

U praktičnom radu su korišćeni sledeći aparati:

- Olympus AU2700 analizator, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
- ARCHITECT[®] ci8200 analizator, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
- BN II nefelometar, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
- Cobas[®] e601 analizator, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- ACL 7000 analizator, Instrumentation Laboratory SpA, Milan, Italy
- Digifuga GL centrifuga, Heraeus, Germany
- Mikser „Vortex Genie 2 TM“, Lighting, Switzerland
- Zamrzivač na -70 °C, SANYO Electric Co, Osaka, Japan

3.3. MATERIJAL

U ovom radu zdrave osobe koje su dobrovoljno pristale da učestvuju bile su ispitivana populacija. Ukupno je obuhvaćeno 242 osobe, 100 muškaraca i 142 žene, starosti između 20 i 80 godina. Uzorci su sakupljeni od decembra 2005. do decembra 2008. godine. Biohemijske analize su rađene u laboratoriji Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije u Beogradu, dana 15.11.2012. godine pod brojem 4815/3.

Uključene su osobe kojima nije dijagnostikovano nijedan vid KVB, diabetes mellitus, bubrežna, hepatična niti reumatološka oboljenja i koje nisu primale terapiju bilo koje vrste. Ispitanici su bili anketirani o svojim godinama starosti, visini i težini, o tome da li su pušači ili ne, da li redovno vežbaju ili se aktivno bave sportom, da li preventivno uzimaju aspirin, da li postoji porodična istorija KVB i, u slučaju žena, da li uzimaju oralna kontraceptivna sredstva. Pre vađenja krvi, izmeren im je krvni pritisak živinim sfigmomanometrom i hipertenzija je konstatovana ako je izmerena vrednost bila $\geq 140/90$ mmHg (18). Indeks telesne mase (*body mass index*, BMI) je izračunavan kao količnik težine (kg) i kvadrata visine (m^2). Uzorci krvi su uzimani između 7 i 10 časova ujutru, posle 12 sati gladovanja, u dve epruvete – jednu sa Na_3 -citratom i drugu biohemijsku epruvetu bez aditiva. Nakon venepunkcije plazma je odvajana centrifugiranjem na 3000 obrtaja u minuti 10 minuta, a serum, nakon perioda potrebnog za koagulaciju (oko 45 minuta), centrifugiranjem na 3000 obrtaja u minuti 15 minuta na sobnoj temperaturi. Koncentracije ukupnog, HDL i LDL holesterola, triglicerida i fibrinogena su određivane odmah po odvajanju seruma, odnosno plazme. Ostaci seruma su alikvotirani i čuvani na -70 °C do analize ostalih parametara.

Za procenu nepreciznosti *Olympus* metode visoke osetljivosti za određivanje CRP pripremljeno je osam serumskih *pool*-ova od uzoraka seruma kojima je prethodno određen hsCRP imunonefelometrijskom metodom na BN II nefelometru. Uzorci su pomešani da bi se dobile koncentracije hsCRP od ~ 0.2 mg/L, ~ 0.5 mg/L, ~ 1.0 mg/L, ~ 2.0 mg/L, ~ 3.0

mg/L, ~5.0 mg/L, ~7.5 mg/L i ~10.0 mg/L. Svaki *pool* je alikvotiran i čuvan na -70 °C do upotrebe.

Analitičke karakteristike imunoturbidimetrijskog *Olympus* testa procenjene su poređenjem sa *CardioPhase** imunonefelometrijskim testom, koji je prvi odobren od strane Američke administracije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration, FDA*) za procenu kardiovaskularnog rizika. Za to je odabrano je 194 svežih uzoraka pacijenata iz rutinskog rada laboratorije Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, kojima je određivanje CRP bilo jedna od analiza traženih od strane lekara. Odabrani su uzorci sa koncentracijom hsCRP u intervalu 0,15–10,0 mg/L, alikvotirani i čuvani na -70 °C do analize.

Biohemijski parametri su određivani komercijalnim testovima i to: hsCRP, ukupan, HDL i LDL holesterol, trigliceridi, kreatinin i mokraćna kiselina na automatskom analizatoru Olympus AU2700; apo A-I, apo B, Lp(a), A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa na integrisanom biohemijskom analizatoru Architect *ci8200*; SAA, Cys-C i hsCRP *CardioPhase** testom na BNII nefelometru; NT-proBNP i hs-cTnT na višekanalnom imunochemijskom analizatoru Cobas[®] e601; fibrinogen na višekanalnom koagulometru ACL 7000. Pouzdanost dobijenih vrednosti je redovno proveravana određivanjem odgovarajućih komercijalnih kontrolnih uzoraka i primenom principa unutrašnje kontrole kvaliteta rada.

3.4. METODE

3.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE hsCRP

3.4.1.1. Imunoturbidimetrijska metoda

Koncentracije hsCRP određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru Olympus AU2700 (sada Beckman Coulter). Princip određivanja zasniva se na specifičnoj imunochemijskoj reakciji CRP sa anti-humani CRP antitelima kojima su obložene lateks čestice. Tako nastaju nerastvorljivi agregati čija apsorbancija je proporcionalna koncentraciji CRP u uzorku.

Za određivanje hsCRP korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter:

- CRP (Latex) test (OSR6185) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži MOPSO pufer (pH=7,5) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži lateks čestice obložene kozjim anti-CRP antitelima ($\approx 0,05\%$).
- Kalibrator (nivo 3, 4 i 5 za senzitivnu aplikaciju, Beckman Coulter, ODR3031) – slediv je prema IFCC standardu CRM470, uključuje pet kalibratora različitih koncentracija, gotovih za upotrebu, a nivoi 3, 4 i 5 se koriste za kalibraciju senzitivne aplikacije koju proizvođač preporučuje za procenu kardiovaskularnog rizika.
- Kontrolni serumi (nivo 1 i 2, Beckman Coulter, ODC0013) – spremni za upotrebu, koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,5–20 mg/L za senzitivnu aplikaciju.

3.4.1.2. Imunonefelometrijska metoda

Radi procene analitičkih karakteristika imunoturbidimetrijskog testa, njegovi rezultati su upoređeni sa rezultatima imunonefelometrijskom metodom. Koncentracije hsCRP određivane su PENIA (*particle enhanced nephelometric immunoassay*) na laserskom nefelometru BN II (Siemens). Princip metode podrazumeva da dolazi do agregacije polistirenskih čestica obloženih monoklonskim antitelima specifičnim za humani CRP kada se pomešaju sa uzorcima koji sadrže CRP. Nastali agregati rasipaju snop svetlosti propuštene kroz uzorak. Intenzitet rasute svetlosti je proporcionalan koncentraciji relevantnog proteina u uzorku, koja se dobija poređenjem sa signalom standarda poznate koncentracije.

Za određivanje hsCRP korišćeni su komercijalni reagensi firme Siemens:

- **CardioPhase[®] hsCRP** (OQIY) test – uključuje:
 - reagens, spreman za upotrebu, predstavlja suspenziju polistirenskih čestica obloženih mišjim monoklonskim antitelima na CRP.

- Standard SL (OQKZ) – spreman za upotrebu, sastoji se od smeše humanih seruma sa povišenim koncentracijama RF, ASL i CRP.
- Kontrolni serumi (OQDB i OQDC) – liofolizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.
- Dopunski reagens (OVLE) – spreman za upotrebu, sastoji se od rastvora natrijum hlorida (8,5 g/L) i Thesit[®]-a u fosfatnom puferu (0,05 mol/L), koristi se za uzorke pacijenata sa niskom koncentracijom proteina.
- Diluent (OUMT) – koristi se za razblaživanje uzoraka (pri određivanju i standarda pri kalibraciji).

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan do 8 dana na 2–8 °C ili 8 meseci na ≤ -20 °C, ako se zamrzne u toku 24 h od sakupljanja. Donja granica mernog opsega je 0,175 mg/L, a koeficijent varijacije od 7,6% (<10%) dobijen je kod određivanja koncentracije hsCRP od 0,41 mg/L. Referentne vrednosti u proceni kardiovaskularnog rizika su <3 mg/L.

3.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG HOLESTEROLA

Koncentracije ukupnog holesterola u serumu određivane su enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Holesterol estri u uzorku se hidrolizuju u prisustvu holesterol esteraze (CHE). Nastali slobodni holesterol se oksiduje holesterol esterazom (CHO) do holesten-3-ona uz simultanu produkciju vodonik peroksida (H₂O₂), koji se oksidativno kupluje sa 4-aminoantipirinom i fenolom u prisustvu peroksidaze (POD) da bi se dobio hromofor. Nastala crvena hinoniminska boja meri se spektrofotometrijski na 540/600 nm kao povećanje apsorbancije.

Za određivanje ukupnog holesterola korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR6216) – uključuje:

reagens, gotov za upotrebu, sadrži fosfatni pufer (103 mmol/L), 4-aminoantipirin (0,31 mmol/L), fenol (5,2 mmol/L), CHE ($\geq 0,2$ kU/L / 3,3 μ kat), CHO ($\geq 0,2$ kU/L / 3,3 μ kat), POD ($\geq 10,0$ kU/L / 166,7 μ kat).

- Kalibrator (66300) – slediv je prema NIST SRM 909b nivo 1, liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serum (ODC0003 i ODC0004) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 5–7 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,5–18,0 mmol/L. Granica detekcije iznosi 0,07 mmol/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,72–0,91% u seriji i 1,06–1,45% ukupno.

Referentne vrednosti su usklađene sa evropskim i ATP III preporukama:

<5,2 mmol/L – poželjno

5,2–6,2 mmol/L – granično visoko

$\geq 6,2$ mmol/L – visoko

3.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HDL HOLESTEROLA

Koncentracije HDL holesterola u serumu određivane su enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Anti humana- β -lipoprotein antitela u sastavu reagens R1 vezuju se za sve lipoproteine osim za HDL (LDL, VLDL i hilomikrone). Formirani antigen-antitelo kompleksi blokiraju enzimsku reakciju kada se doda reagens R2. HDL-holesterol se kvantifikuje u prisustvu enzimskog hromogenog sistema: oksiduje se CHO do holest-4-en-3-ona uz simultanu produkciju H₂O₂, koji se oksidativno kupluje sa 4-aminoantipirinom i N-etil – N-(2 hidroksi-3-sulfopropil) – 3,5-dimetoksi – 4-fluoroanilin (F-DAOS) u prisustvu POD da bi se dobio hromofor. Nastala plava boja meri se spektrofotometrijski na 600/700 nm kao povećanje apsorbancije.

Za određivanje HDL holesterola korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR6287) – uključuje:
reagens, gotov za upotrebu, sadrži anti humana- β -lipoprotein antitela (promenljive koncentracije), CHE (0,8 kU/L), CHO (4,4 kU/L), POD (1,7 kU/L), askorbat oksidazu (2,0 kU/L), Goodov pufer (pH 7,0) (30 mmol/L), F-DAOS (0,20 mmol/L), 4-aminoantipirin (0,67 mmol/L).
- Kalibrator (ODC0011) – slediv je prema US CDC referentnoj metodi za HDL holesterol, liofolizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (3 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (ODC0005) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,05–4,65 mmol/L. Granica detekcije iznosi 0,002 mmol/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,61–0,85% u seriji i 1,32–1,92% ukupno.

Referentne vrednosti su usklađene sa NCEP ATP III preporukama:

<1,03 mmol/L – nizak HDL holesterol (jedan od glavnih faktora rizika za KBS)

$\geq 1,55$ mmol/L – visok HDL holesterol („negativan“ faktor rizika za KBS)

3.4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LDL HOLESTEROLA

U uzorcima u kojima je koncentracija triglicerida bila <4,52 mmol/L, LDL holesterol je određivan izračunavanjem na osnovu Friedwaldove formule (210):

$$C_{LDL-C} = C_{TC} - C_{HDL-C} - C_{TG}/2,2$$

gde je:

C_{LDL-C} – koncentracija LDL holesterola, mmol/L

C_{TC} – koncentracija ukupnog holesterola, mmol/L

$C_{\text{HDL-C}}$ – koncentracija HDL holesterola, mmol/L

C_{TG} – koncentracija triglicerida, mmol/L

Pošto za koncentracije triglicerida $\geq 4,52$ mmol/L formula ne daje tačne vrednosti LDL holesterola, u tim slučajevima je LDL holesterol određivan direktnom enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Zaštitni agens u sastavu reagensa R1 štiti LDL od enzimskih reakcija. Svi non-LDL lipoproteini (HDL, VLDL i hilomikroni) se razgrađuju reakcijama sa CHE i CHO. U ovoj reakciji nastao H_2O_2 se razgrađuje katalazom u sastavu R1. Kada se doda reagens R2, zaštitni agens se odvajava od LDL i katalaza se inaktivira natrijum azidom. LDL holesterol se kvantifikuje CHO/PAP sistemom: oksiduje se CHO do holest-4-en-3-ona uz simultanu produkciju H_2O_2 , koji se oksidativno kupluje sa 4-aminoantipirinom i HDAOS u prisustvu POD da bi se dobio hromofor. Nastala plava boja meri se spektrofotometrijski na 600/700 nm kao povećanje apsorbancije.

Za određivanje LDL holesterola korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR6283) – uključuje:
 - reagens, gotov za upotrebu, sadrži CHE (3,7 kU/L), CHO (3,7 kU/L), POD (4,9 kU/L), natrijum azid (0,1%), Good-ov pufer (pH 6,8) (25 mmol/L), 4-aminoantipirin (0,8 mmol/L), katalaza (743 kU/L), HDAOS (0,47 mmol/L).
- Kalibrator (ODC0012) – slediv je prema US CDC referentnoj metodi za LDL holesterol, liofolizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serum (ODC0005) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Referentne vrednosti su usklađene sa NCEP ATP III preporukama:

$< 2,6$ mmol/L – optimalno

$2,6 - 3,3$ mmol/L – blizu optimalnog / iznad optimalnog

3,4 – 4,1 mmol/L – granično visoko

4,1 – 4,9 mmol/L – visoko

≥4,9 mmol/L – jako visoko

3.4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE TRIGLICERIDA

Koncentracije triglicerida u serumu određivane su enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Trigliceridi u uzorku se hidrolizuju kombinacijom mikrobnih lipaza do glicerola i masnih kiselina. Glicerol se fosforilise adenzin trifosfatom (ATP) u prisustvi glicerol kinaze (GK) i nastaje glicerol-3-fosfat. Glicerol-3-fosfat se oksiduje molekulskim kiseonikom u prisustvu glicerol fosfat oskidaze (GPO) pri čemu nastaje H₂O₂ i dihidroksiaceton fosfat. Nastali H₂O₂ reaguje sa 4-aminofenazonom i dinatrijumovom solju N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina (MADB) u prisustvu POD i nastaje hromofor, čija se apsorbanacija čita na 660/800 nm. Povećanje apsorbanacije na 660/800 nm je proporcionalno sadržaju triglicerida u uzorku.

Za određivanje triglicerida korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR61118) – uključuje:
 - reagens, gotov za upotrebu, sadrži PIPES pufer (pH 7,5) (50 mmol/L), Mg²⁺ (4,6 mmol/L), MADB (0,25 mmol/L), 4-aminoantipirin (0,5 mmol/L), ATP (1,4 mmol/L), lipaze (1,5 kU/L / 25 μkat), GK (0,5 kU/L / 8,3 μkat), POD (≥0,98 kU/L / 16,3 μkat), askorbat oksidaza (1,48 kU/L / 24,6 μkat), GPO (1,48 kU/L / 24,6 μkat).
- Kalibrator (66300) – slediv je prema referentnoj metodi masene spektrometrije sa izotopskom dilucijom, liofolizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serum (ODC0003 i ODC0004) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,1–11,3 mmol/L. Granica detekcije iznosi 0,01 mmol/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,72–1,06% u seriji i 1,03–1,76% ukupno.

Referentne vrednosti su usklađene sa NCEP ATP III preporukama:

<1,70 mmol/L – normalno

1,70 – 2,25 mmol/L – granično visoko

2,26 – 5,64 mmol/L – visoko

≥5,65 mmol/L – jako visoko

3.4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE APO A-I

Koncentracije apo A-I u serumu određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Meri se povećanje turbiditeta uzorka uzrokovano formiranjem nerastvorljivih imunih kompleksa kada se antitela na apo A-I dodaju uzorku. Uzorak koji sadrži apo A-I inkubira se sa puferom (R1), a slepa proba uzorka se odredi pre dodavanja antitela na apo A-I (R2). U prisustvu odgovarajućeg antitela u višku, koncentracija Apo A-I meri se kao funkcija turbiditeta.

Za određivanje apo A-I korišćeni su komercijalni reagensi firme Abbott i Bio-Rad:

- Reagens (Abbott, 9D92-21) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (100 mmol/L) i polietilen glikol (35 g/L) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži kozja anti-humani apolipoprotein A1 antitela (50%) i TRIS pufer (100 mmol/L).
- Kalibrator (Abbott, 6E54) – slediv je prema WHO/IFCC/CDC referentnom materijalu za apolipoproteine SP1-01, liofilizovan, rastvara se u 1 mL vode, uključuje jedan kalibrator od koga se prave 4 serijska razblaženja sa koncentracijama 10%, 20%, 40% i 60%, koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (Bio-Rad, 641 i 642) – spremni za upotrebu, koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 3 dana na 2–8 °C ili 2 meseca na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,16–3,10 g/L. Granica detekcije iznosi 0,008 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,2–1,9% u seriji i 1,8–3,2% ukupno.

Referentne vrednosti: 0,95–1,86 g/L (muškarci), 1,01–2,23 g/L (žene).

3.4.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE APO B

Koncentracije apo B u serumu određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Meri se povećanje turbiditeta uzorka uzrokovano formiranjem nerastvorljivih imunih kompleksa kada se antitela na apo B dodaju uzorku. Uzorak koji sadrži apo B inkubira se sa puferom (R1), a slepa proba uzorka se odredi pre dodavanja antitela na apo B (R2). U prisustvu odgovarajućeg antitela u višku, koncentracija Apo B meri se kao funkcija turbiditeta.

Za određivanje apo B korišćeni su komercijalni reagensi firme Abbott i Bio-Rad:

- Reagens (Abbott, 9D93-21) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (100 mmol/L) i polietilen glikol (30 g/L) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži kozja anti-humani apolipoprotein B antitela (50%) i TRIS pufer (100 mmol/L).
- Kalibrator (Abbott, 6E54) – slediv je prema WHO/IFCC/CDC referentnom materijalu za apolipoproteine SP3-07, liofilizovan, rastvara se u 1 mL vode, uključuje jedan kalibrator od koga se prave 4 serijska razblaženja sa koncentracijama 10%, 20%, 40% i 60%, koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (Bio-Rad, 641 i 642) – spremni za upotrebu, koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 3 dana na 2–8 °C ili 2 meseca na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,11–2,40 g/L. Granica detekcije iznosi

0,028 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,3–4,4% u seriji i 1,8–6,3% ukupno.

Referentne vrednosti: 0,49–1,73 g/L (muškarci), 0,53–1,82 g/L (žene).

3.4.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE Lp(a)

Koncentracije Lp(a) u serumu određivane su lateks imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Kada se uzorak koji sadrži Lp(a) pomeša sa lateks reagensom, koji predstavlja suspenziju polistirenskih lateks čestica uniformne veličine koje su obložene zečijim IgG anti-humanim Lp (a), i reakcionim puferom dolazi do reakcije aglutinacije. Step en aglutinacije proporcionalan je koncentraciji Lp(a) u uzorku i određuje se merenjem smanjenja upadne svetlosti usled prisustva agregata.

Za određivanje Lp(a) korišćeni su komercijalni reagensi firme BIOKIT:

- Reagens (7K00-40) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži glicin (1,2 %), goveđi serumski albumin (0,9%) i natrijum azid (<0,1%) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži lateks čestice obložene IgG zečijim anti-humanim Lp(a) antitelima (0,48%) i natrijum azid (<0,1%).
- Kalibrator (7K00-02) – slediv je prema IFCC/SRM28, uključuje šest kalibratora različitih koncentracija, gotovih za upotrebu, koriste se za kalibraciju.
- Kontrolni serum (7K00-21) – spremni za upotrebu, koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C, za duže čuvanje preporučuje se zamrzavanje na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 13–900 mg/L. Granica detekcije iznosi 4 mg/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,4–1,2% u seriji i 1,1–3,1% ukupno.

Referentne vrednosti: <300 mg/L.

3.4.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FIBRINOGENA

Fibrinogen je određivan izvođenjem iz protrombinskog vremena (PT) na ACL 7000 analizatoru za parametre koagulacije (Instrumentation Laboratory). Tromboplastin u prisustvu jona kalcijuma aktivira spoljašnji put koagulacije u uzorku plazme. Fibrinogen iz uzorka se prevodi u fibrin dejstvom nastalog trombina i kvantifikuje se povezivanjem izmerene apsorbancije ili rasute svetlosti u toku koagulacije sa signalom kalibratora 5.

Za određivanje koncentracije fibrinogena korišćeni su komercijalni reagensi firme Instrumentation Laboratory:

- Reagens (0009756710) – uključuje:
 - liofilizovani kalcijum tromboplastin zečjeg mozga, stabilizatore, polibren, pufer i konzervanse, rastvara se u dejonizovanoj vodi (8 mL).
- Kalibraciona plazma (0020003700) – slediva je prema internacionalnom referentnom materijalu CRM 149S, uključuje jedan kalibrator, liofilizovana, rastvara se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolne plazme (0020003110, 0020003210, 0020002210 i 0020004200) – liofilizovane, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema CLSI dokumentu H21-A25, uzorak plazme stabilan je 24 h na sobnoj temperaturi, 2 nedelje na -20 °C, a za duže čuvanje preporučuje se zamrzavanje na -70 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,7–9 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 3,08–6,3% u seriji i 6,38–8,15% ukupno.

Referentne vrednosti: 1,7–5,4 g/L

3.4.10. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SAA

Koncentracije SAA određivane su PENIA metodom na laserskom nefelometru BN II (Siemens). Princip metode podrazumeva da dolazi do agregacije polistirenskih čestica obloženih antitelima specifičnim za humani SAA kada se pomešaju sa uzorcima koji sadrže

SAA. Nastali agregati rasipaju snop svetlosti propuštene kroz uzorak. Intenzitet rasute svetlosti je proporcionalan koncentraciji relevantnog proteina u uzorku, koja se dobija poređenjem sa signalom standarda poznate koncentracije.

Za određivanje SAA korišćeni su komercijalni reagensi firme Siemens:

- N Latex SAA (OQMP) test – uključuje:
 - N SAA Reagens – sastoji se od liofilizovanih polistirenskih čestica obloženih ovčjim antitelima na humani SAA, rastvara se u dejonizovanoj vodi (2 mL);
 - N SAA Standard SY – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), proizvodi se od smeše humanih seruma sa povišenim koncentracijama SAA, koristi se za kalibraciju;
 - N SAA Kontrolni serum SY – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), proizvodi se od smeše humanih seruma sa povišenim koncentracijama SAA, koristi se za kontrolu kvaliteta;
 - N SAA Dopunski reagens – spreman za upotrebu, sastoji se od rastvora natrijum hlorida u glicinskom puferu, koristi se za uzorke pacijenata sa niskom koncentracijom proteina.
- Diluent (OUMT) – koristi se za razblaživanje uzoraka (pri određivanju) i standarda (pri kalibraciji).

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan do 8 dana na 2–8 °C ili 3 meseca na ≤ -25 °C, ako se zamrzne u toku 24 h od sakupljanja. Donju granicu mernog opsega određuje najniža vrednost kalibracione krive, pa prema tome zavisi od koncentracije proteina u standardu. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 4,3–6,2% u seriji i 5,4–6,4% ukupno.

Referentne vrednosti: <6,4 mg/L.

3.4.11. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE A1AGP

Koncentracije A1AGP u serumu određivane su lateks imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Reagens sadrži kozja anti-humani A1AGP antitela koja reguju specifično sa A1AGP iz uzorka gradeći nerastvorljive agregate čiji se turbiditet meri.

Za određivanje A1AGP korišćeni su komercijalni reagensi firme BIOKIT:

- Reagens (6L34-40) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (1,2%), polietilen glikol (2,9%), 35% HCl (0,7%) i natrijum azid (<0,1%) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži anti-humani A1AGP kozji serum (50%), TRIS pufer (1,2%), 35% HCl (0,7%) i natrijum azid (<0,1%).
- Kalibrator (6K45-02) – slediv je prema CRM 470, uključuje pet kalibratora različitih koncentracija, gotovih za upotrebu, koriste se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (Control I i II, 6K53-21) – liofolizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 2 dana na 2–8 °C, za duže čuvanje preporučuje se zamrzavanje na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,15–2,5 g/L. Granica detekcije iznosi 0,009 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,6–1,0% u seriji i 0,9–1,3% ukupno.

Referentne vrednosti: 0,5–1,2 g/L.

3.4.12. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HAPTOGLOBINA

Koncentracije haptoglobina u serumu određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Meri se povećanje turbiditeta uzorka uzrokovano formiranjem nerastvorljivih imunih kompleksa kada se antitela na haptoglobin dodaju uzorku. Uzorak koji sadrži haptoglobin inkubira se sa puferom (R1), a

slepa proba uzorka se odredi pre dodavanja antitela na haptoglobin (R2). U prisustvu odgovarajućeg antitela u višku, koncentracija haptoglobina meri se kao funkcija turbiditeta.

Za određivanje haptoglobina korišćeni su komercijalni reagensi firme Abbott i BLOKIT:

- Reagens (Abbott, 9D91-21) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (100 mmol/L) i polietilen glikol (30 g/L) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži kozja anti-humani haptoglobin antitela (50%) i TRIS pufer (100 mmol/L).
- Kalibrator (Abbott, 1E78) – slediv je prema CAP/BCR/IFCC referentnom materijalu za proteine u humanom serumu RPPHS 91/0619, spreman za upotrebu, uključuje pet kalibratora različitih kalibracija, koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (BLOKIT, Control I i II, 6K53-21) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C ili 2 nedelje na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,08–2,5 g/L. Granica detekcije iznosi 0,026 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,0–1,5% u seriji i 2,1–5,6% ukupno. Referentne vrednosti: 0,14–2,58 g/L (muškarci), 0,53–2,50 g/L (žene).

3.4.13. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE C3 KOMPLEMENTA

Koncentracije C3 komponente komplementa u serumu određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT® ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Meri se povećanje turbiditeta uzorka uzrokovano formiranjem nerastvorljivih imunih kompleksa kada se antitela na C3 dodaju uzorku. Uzorak koji sadrži C3 inkubira se sa puferom (R1), a slepa proba uzorka se odredi pre dodavanja antitela na haptoglobin (R2). U prisustvu odgovarajućeg antitela u višku, koncentracija haptoglobina meri se kao funkcija turbiditeta.

Za određivanje C3 korišćeni su komercijalni reagensi firme Abbott i BLOKIT:

- Reagens (Abbott, 9D91-21) – uključuje:
 - reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (100 mmol/L) i polietilen glikol (40 g/L) i
 - reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži kozja anti-humani C3 antitela (35%) i TRIS pufer (100 mmol/L).
- Kalibrator (Abbott, 1E78) – slediv je prema CAP/BCR/IFCC referentnom materijalu za proteine u u humanom serumu RPPHS 91/0619, spreman za upotrebu, uključuje pet kalibratora različitih kalibracija, koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (BLOKIT, Control I i II, 6K53-21) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 8 dana na 2–8 °C i 8 dana na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,11–3,15 g/L. Granica detekcije iznosi 0,014 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,2–2,2% u seriji i 1,3–3,2% ukupno. Referentne vrednosti: 0,82–1,85 g/L (muškarci), 0,83–1,93 g/L (žene).

3.4.14. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE C4 KOMPLEMENTA

Koncentracije C4 komponente komplementa u serumu određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na ARCHITECT[®] ci8200 analizatoru (Abbott Diagnostics). Meri se povećanje turbiditeta uzorka uzrokovano formiranjem nerastvorljivih imunih kompleksa kada se antitela na C3 dodaju uzorku. Uzorak koji sadrži C3 inkubira se sa puferom (R1), a slepa proba uzorka se odredi pre dodavanja antitela na haptoglobin (R2). U prisustvu odgovarajućeg antitela u višku, koncentracija haptoglobina meri se kao funkcija turbiditeta.

Za određivanje C4 korišćeni su komercijalni reagensi firme Abbott i BLOKIT:

- Reagens (Abbott, 9D91-21) – uključuje:

reagens 1, gotov za upotrebu, sadrži TRIS pufer (100 mmol/L) i polietilen glikol (30 g/L) i

reagens 2, gotov za upotrebu, sadrži kozja anti-humanu C3 antitela (40%) i TRIS pufer (100 mmol/L).

- Kalibrator (Abbott, 1E78) – slediv je prema CAP/BCR/IFCC referentnom materijalu za proteine u u humanom serumu RPPHS 91/0619, spreman za upotrebu, uključuje pet kalibratora različitih kalibracija, koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (BIOKIT, Control I i II, 6K53-21) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 2 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 0,029–0,58 g/L. Granica detekcije iznosi 0,0047 g/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,1–2,5% u seriji i 1,5–3,7% ukupno.

Referentne vrednosti: 0,15–0,53 g/L (muškarci), 0,15–0,57 g/L (žene).

3.4.15. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MOKRAĆNE KISELINE

Koncentracije mokraćne kiseline u serumu određivane su enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Mokraćna kiselina u uzorku prevodi se pod dejstvom urikaze do alantoina i H₂O₂. Za određivanje nastalog H₂O₂ koristi se Trinderova reakcija. Formirani H₂O₂ reaguje sa N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilalanin, dinatrijumova so (MADB) i 4-aminofenazonom u prisustvu peroksidaze i nastaje plavo obojeni hromofor čija se apsorbancija meri na 660/800 nm. Količina formirane boje proporcionalna je koncentraciji mokraćne kiseline u uzorku.

Za određivanje mokraćne kiseline korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR6198) – uključuje:

reagens, gotov za upotrebu, sadrži fosfatni pufer (42 mmol/L), MADB (0,15 mmol/L), 4-aminofenazon (0,30 mmol/L), POD ($\geq 5,9$ kU/L / 98 μ kat), urikaza ($\geq 0,25$ kU/L / 4,15 μ kat), askorbat oksidaza ($\geq 1,56$ kU/L / 26 μ kat/L).

- Kalibrator (66300) – slediv je prema referentnoj metodi masene spektrometrije sa izotopskom dilucijom, liofolizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koristi se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (ODC0003 i ODC0004) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–8 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 89–1765 μ mol/L. Granica detekcije iznosi 2 μ mol/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,73–1,55% u seriji i 1,71–2,44% ukupno.

Referentne vrednosti: 208–428 μ mol/L (muškarci), 155–357 μ mol/L (žene).

3.4.16. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KREATININA

Koncentracije kreatinina u serumu određivane su kompenzovanom kinetičkom Jaffé metodom sa alkalnim pikratom na Olympus AU2700 analizatoru (Beckman Coulter, ranije Olympus Diagnostica). Kreatinin formira žuto-narandžasto obojeno jedinjenje sa pikrinskom kiselinom u alkalnoj sredini. Brzina promene apsorbancije na 520/800 nm proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku.

Za određivanje kreatinina korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica):

- Reagens (OSR6178) – uključuje:
 - reagens, gotov za upotrebu, sadrži natrijum hidroksid 120 mmol/L i pikrinsku kiselinu 2,9 mmol/L.
- Kalibrator (66300) – slediv je prema referentnoj metodi masene spektrometrije sa izotopskom dilucijom i NIST SRM 967 referentnom materijalu, liofolizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koristi se za kalibraciju.

- Kontrolni serumi (ODC0003 i ODC0004) – liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (5 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 7 dana na 2–25 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 5–2200 µmol/L. Granica detekcije iznosi 2,4 µmol/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,86–1,19% u seriji i 1,61–2,00% ukupno.

Referentne vrednosti: 54–104 µmol/L (muškarci), 45–84 µmol/L (žene).

3.4.17. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CISTATINA C

Koncentracije Cys-C određivane su PENIA metodom na laserskom nefelometru BN II (Siemens). Princip metode podrazumeva da dolazi do agregacije polistirenskih čestica obloženih antitelima specifičnim za humani Cys-C kada se pomešaju sa uzorcima koji sadrže Cys-C. Nastali agregati rasipaju snop svetlosti propuštene kroz uzorak. Intenzitet rasute svetlosti je proporcionalan koncentraciji relevantnog proteina u uzorku, koja se dobija poređenjem sa signalom standarda poznate koncentracije.

Za određivanje Cys-C korišćeni su komercijalni reagensi firme Siemens:

- N Latex SAA (OQMP) test – uključuje:
 - N CYSC Reagens – gotov za upotrebu, predstavlja suspenziju polistirenskih čestica obloženih zečjim antitelima na humani Cys-C;
 - N SAA Dopunski reagens A – spreman za upotrebu, sadrži zečji imunoglobulin u puferu, koristi se da smanji interferenciju reumatoidnih faktora; radno reagens – sipati 0,5 mL reagensa B u bočicu sa reagensom A;
 - N SAA Dopunski reagens B – spreman za upotrebu, sastoji se od vodenog rastvora polietilen glikol sorbitan monolaureata i polietilen glikol etra;
 - N CYSC Kontrolni serumi 1 i 2 – liofilizovani, rastvara se u dejonizovanoj vodi (1,0 mL), sadrže poligelin sa urinskim proteinima humanog porekla, koriste se za kontrolu kvaliteta.

- N SAA Standard UY (OQLV) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od poligelina sa urinskim proteinima humanog porekla, koristi se za kalibraciju;
- Diluent (OUMT) – koristi se za razblaživanje uzoraka (pri određivanju) i standarda (pri kalibraciji).

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan do 7 dana na 2–8 °C ili 3 meseca na ≤ -25 °C, ako se zamrzne u toku 24 h od sakupljanja. Donja granica mernog opsega je 0,05 mg/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 1,5–3,1% u seriji i 2,4–4,3% ukupno.

Referentne vrednosti: 0,53–0,95 mg/L.

3.4.18. ODREĐIVANJE eGFR PRIMENOM FORMULA ZASNOVANIH NA KONCENTRACIJI KREATININA I CISTATINA C

Procenjena GFR na osnovu koncentracije kreatinina u serumu izračunata je primenom MDRD (200) i CKD-EPI (205) jednačina, koje glase:

$$\text{eGFR (MDRD), mL/min/1,73 m}^2 = 186 \times [\text{kreatinin } (\mu\text{mol/L}) \times 0,011312]^{-1,154} \times \text{godine}^{-0,203} \text{ (x 0,742 za žene)}$$

$$\text{eGFR (CKD-EPI), mL/min/1,73 m}^2 = \mathbf{a} \times [\text{S}_{\text{Cr}} (\mu\text{mol/L}) / \mathbf{b}]^{\mathbf{c}} \times (0,993)^{\text{godine}}$$

gde je:

S_{Cr} - koncentracija kreatinina u serumu, $\mu\text{mol/L}$

a – bela rasa: žene = 144, muškarci = 141;

crna rasa: žene = 166, muškarci = 163

b – žene = 62, muškarci = 80

c – žene ($S_{\text{Cr}} < 62 \mu\text{mol/L} = -0,329$; $S_{\text{Cr}} > 62 \mu\text{mol/L} = -1, 209$)

muškarci ($S_{\text{Cr}} < 80 \mu\text{mol/L} = -0,411$; $S_{\text{Cr}} > 80 \mu\text{mol/L} = -1,209$)

Procenjena GFR na osnovu koncentracije Cys-C u serumu izračunata je primenom formule koju su objavili Hoek i sar. (211), koja glasi:

$$eGFR_{\text{Cys-C}}, \text{ mL/min/1,73 m}^2 = 80,35 \times [1/\text{Cys-C (mg/L)}] - 4,32$$

3.4.19. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NT-proBNP

Određivanje NT-proBNP Elecsys[®] proBNP testom zasnovano je na principu elektrohemiluminiscencije (ECLIA). Princip određivanja podrazumeva dvostepeno „sendvič“ imunoodređivanje. Korišćen je analizator Cobas[®] e601 (Roche Diagnostics). U toku prve inkubacije NT-proBNP iz uzorka, poliklonsko NT-proBNP-specifično antitelo obeleženo biotinom i poliklonsko NT-proBNP-specifično antitelo obeleženo rutenijum kompleksom formiraju „sendvič“ kompleks. U drugoj inkubaciji, posle dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom, kompleks se vezuje za čvrstu fazu posredstvom interakcije biotina i streptavidina. Reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju, gde se mikročestice dejstvom magnetne sile zadržavaju na površini elektrode. Nevezane supstance se ispiraju. Promenom napona elektrode indukuje se emisija hemiluminiscentne svetlosti koja se meri fotomultiplikatorom. Rezultati se dobijaju pomoću krive dobijene kalibracijom u dve tačke i master krive definisane u bar kodu reagensa.

Za određivanje NT-proBNP korišćeni su komercijalni reagensi firme Roche Diagnostics:

- Reagens: Elecsys[®] NT-proBNP (03121640122) – uključuje: streptavidinom obložene mikročestice (0,72 mg/mL), reagens 1 – poliklonsko anti-NT-proBNP antitelo obeleženo biotinom (1,5 µg/mL) u fosfatnom puferu (40 mmol/L, pH 7,4), reagens 2 – ovčje poliklonsko anti-NT-proBNP antitelo obeleženo rutenijum kompleksom (1,7 µg/mL) u fosfatnom puferu (40 mmol/L, pH 7,4).
- Kalibrator (03121658122) – slediv je prema referentom standardu dobijenom dodavanjem čistog sintetskog NT-proBNP u matriks humanog seruma, uključuje 2 liofilizovana kalibratora koncentracija oko 140 pg/mL i oko 2700 pg/mL, rastvaraju se dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kalibraciju.

- Kontrolni serumi (CARD1 i CARD2, 03530477190) – 2 nivoa, liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (2 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 3 dana na 20–25 °C, 6 dana na 2–8 °C ili 12 meseci na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 50–35000 µmol/L. Granica detekcije iznosi 5 pg/mL. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,8–3,0% u seriji i 3,6–5,8% ukupno.

Referentne vrednosti: <125 pg/mL.

3.4.20. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE hs-cTnT

Određivanje cTnT Elecsys[®] Troponin T hs STAT testom zasnovano je na principu elektrohemiluminiscencije (ECLIA). Princip određivanja podrazumeva „sendvič“ imunoodređivanje. Korišćen je analizator Cobas[®] e601 (Roche Diagnostics). U toku inkubacije od 9 minuta cTn-T iz uzorka, monoklonsko anti-cTnT-specifično antitelo obeleženo biotinom i monoklonsko anti-cTnT-specifično antitelo obeleženo rutenijum kompleksom i mikročestice obložene streptavidinom formiraju „sendvič“ kompleks vezan za čvrstu fazu. Reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju, gde se mikročestice dejstvom magnetne sile zadržavaju na površini elektrode. Nevezane supstance se ispiraju. Promenom napona elektrode indukuje se emisija hemiluminiscentne svetlosti koja se meri fotomultiplikatorom. Rezultati se dobijaju pomoću krive dobijene kalibracijom u dve tačke i master krive definisane u bar kodu reagensa.

Za određivanje hs-cTnT korišćeni su komercijalni reagensi firme Roche Diagnostics:

- Reagens: Elecsys[®] Troponin T hs STAT (05092728190) – uključuje:
 - streptavidinom obložene mikročestice (0,72 mg/mL), reagens 1 – monoklonsko anti-cTnT antitelo obeleženo biotinom (2,5 mg/L) u fosfatnom puferu (100 mmol/L, pH 6),
 - reagens 2 – mišje monoklonsko anti-cTnT antitelo obeleženo rutenijum kompleksom (2,5 mg/L) u fosfatnom puferu (100 mmol/L, pH 6).

- Kalibrator (04856643) – slediv je prema Enzymun-Test Troponin T (CARDIAC T) metodi, uključuje 2 liofilizovana kalibratora koncentracija oko 0,075 µg/L i oko 10 µg/L, rastvaraju se dejonizovanoj vodi (1 mL), koriste se za kalibraciju.
- Kontrolni serumi (TN1 i TN2, 05095107190) – 2 nivoa, liofilizovani, rastvaraju se u dejonizovanoj vodi (2 mL), koriste se za kontrolu kvaliteta.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma je stabilan 24 h na 2–8 °C ili 12 meseci na -20 °C. Test je linearan u opsegu koncentracija 13–10000 ng/L. Granica detekcije iznosi 3 ng/L. Nepreciznost određivanja se kreće u opsegu 0,9–3,7% u seriji i 1,5–4,0% ukupno.

Referentne vrednosti: <14 ng/L.

3.4.21. IZRAČUNAVANJE SKOROVA RIZIKA

Korišćenjem elektronskog kalkulatora „ATP III Risk Estimator ver. 2000“ (212), izračunavan je FRS, unošenjem podataka o polu (muški/ženski), starosti (godine), koncentraciji ukupnog i HDL holesterola, pušenju (da/ne), sistolnom krvnom pritisku (mmHg) i da li je osoba na antihipertenzivnoj terapiji (da/ne).

Globalni FRS izračunavan je pomoću elektronskog kalkulatora „CVD Risk Check“ (213), koji pored navedenih parametara za izračunavanje FRS, koristi i informaciju o prisustvu dijabetesa (da/ne).

Dugoročni, 30-godišnji rizik izračunavan je pomoću interaktivnog kalkulatora „30-year risk of cardiovascular disease“ (214). Rizik je funkcija istih parametara koji se koriste i za izračunavanje globalnog FRS.

3.5. ANALIZA PODATAKA

U radu su izračunavani sledeći statistički parametri:

- srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd), koeficijent varijacije (Kv)
- medijana (Me)
- geometrijska sredina
- interval pouzdanosti (*Confidence Interval*, CI)
- Pearsonov koeficijent korelacije (r)
- sistematska (a) i procentualna (b) greška
- rezidualna standardna devijacija ($S_{y/x}$)
- koeficijent determinacije (R^2)
- regresioni koeficijent (β)
- *odds ratio*
- Spearmanov koeficijent korelacije (rho)
- determinanta korelacione matrice
- Bartlettov test sferičnosti
- Keiser-Meyer-Olkinova mera adekvatnosti uzorka (KMO)
- karakteristični koren (*eigenvalue*)
- koeficijent korelacije faktora i promenljive (*factor loading*)
- površina ispod ROC krive (AUC), standardna greška (SE), *z score*

U radu su primenjene sledeće statističke metode:

- Kolmogorov-Smirnov test
- ponderisana parametarska Deming-ova korelaciona analiza
- Bland-Altman dijagram razlika
- parametarski Student t-test
- parametarska analiza varijanse (ANOVA test)
- Tukey *post hoc* test
- parametarska multipla linearna regresiona analiza
- multinomialna logistička regresiona analiza

- neparametarski Chi-kvadrat test
- neparametarska Spearmanova korelaciona analiza
- faktorska analiza
- binarna logistička regresiona analiza
- analiza ROC (*Receiver Operating Characteristic*) krive.

Za statističku analizu i grafički prikaz korišćeni su kompjuterski statistički programi MedCalc[®] Ver. 12.1.3 (MedCalc software, Mariakerke, Belgium), CB Stat Ver. 4.3 (Kristian Linnet, Risskov, Denmark) i SPSS for Windows 11.5 (Chicago, IL, USA).

4. REZULTATI

4.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODE VISOKE OSETLJIVOSTI ZA ODREĐIVANJE CRP

4.1.1. Nepreciznost u seriji i iz dana u dan

Nepreciznost u seriji i iz dana u dan je dobijena iz rezultata analize osam serumskih *pool*-ova različitih koncentracija u opsegu 0,2–10,0 mg/L, značajnom za procenu kardiovaskularnog rizika. Uzastopnim određivanjem svakog *pool*-a 20 puta dobijeni su podaci za izračunavanje nepreciznosti u seriji, dok su uzorci istih serumskih *pool*-ova korišćeni i za izračunavanje nepreciznosti iz dana u dan na osnovu njihovog određivanja u toku 10 uzastopnih dana. Izračunati statistički parametri (\bar{x} – srednja vrednost, Sd – standardna devijacija i Kv – koeficijent varijacije) prikazani su u *Tabeli VIII*.

Tabela VIII Nepreciznost u seriji i iz dana u dan *Olympus* visoko osetljive metode za određivanje C-reaktivnog proteina

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x} (mg/L)	Sd (mg/L)	Kv (%)	\bar{x} (mg/L)	Sd (mg/L)	Kv (%)
<i>Pool 1</i>	0,20	0,017	8,16	0,22	0,022	9,63
<i>Pool 2</i>	0,52	0,017	3,32	0,52	0,027	5,12
<i>Pool 3</i>	0,99	0,025	2,54	1,01	0,042	4,21
<i>Pool 4</i>	1,96	0,026	1,30	2,00	0,074	3,68
<i>Pool 5</i>	2,90	0,024	0,82	2,92	0,110	3,75
<i>Pool 6</i>	5,08	0,019	0,38	5,02	0,188	3,75
<i>Pool 7</i>	7,66	0,050	0,65	7,56	0,408	5,39
<i>Pool 8</i>	10,30	0,053	0,52	10,02	0,510	5,09

Vrednosti prikazane u *Tabeli VIII* ukazuju da se određivanje CRP *Olympus* visoko osetljivom metodom mogu smatrati pouzdanim za određivanje niskih koncentracija CRP karakterističnih za hroničnu subkliničku inflamaciju.

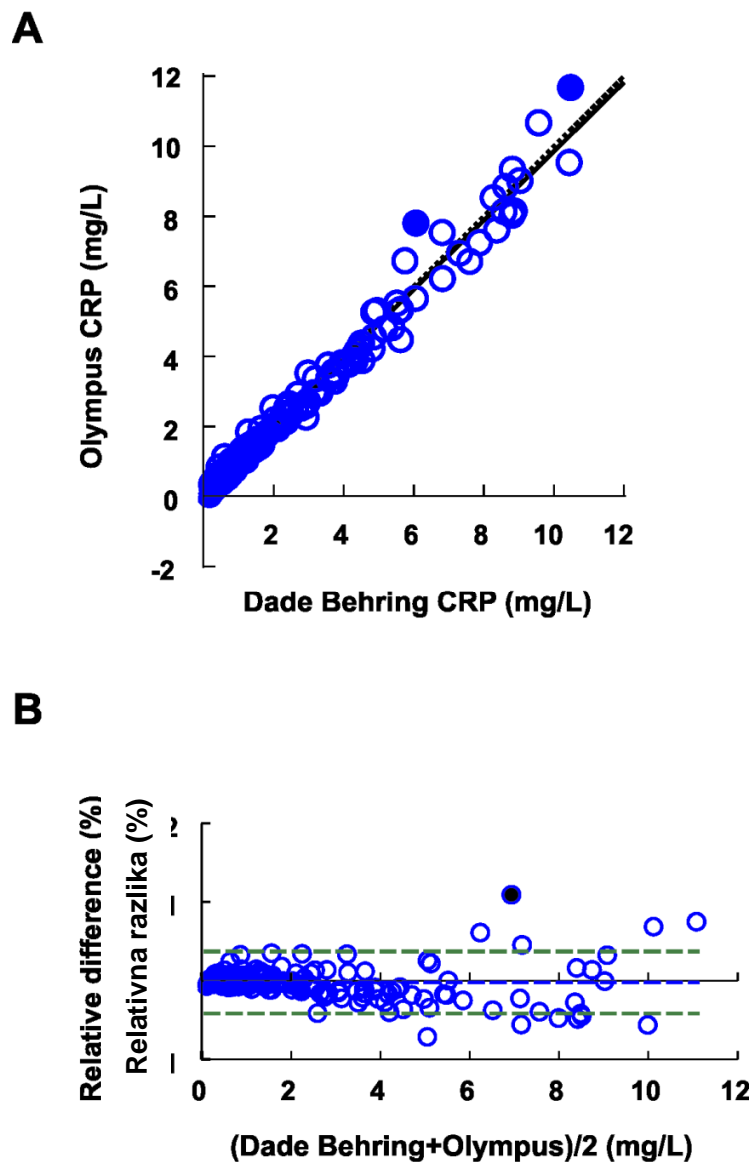
4.1.2. Granica detekcije

Granica detekcije određena je analiziranjem rastvora NaCl koncentracije 154 mmol/L 20 puta i izračunavanjem zbira srednje vrednosti i tri standardne devijacije. Dobijena vrednost granice detekcije iznosi 0,11 mg/L.

4.1.3. Poređenje *Olympus* visoko osetljive metode za određivanje CRP sa imunofelometrijskom metodom

Korelacija rezultata određivanja CRP *Olympus* imunoturbidimetrijskom metodom visoke osetljivosti sa rezultatim dobijenim imunonefelometrijskom metodom ispitana je pomoću ponderisane Demingove regresione analize. U 194 uzoraka seruma, u kojima se koncentracija hsCRP nalazila u intervalu 0,15–10,0 mg/L, određen je hsCRP sa obe metode. Regresiona jednačina dobijena poređenjem rezultata dobijenih *Olympus* i imunonefelometrijskom metodama glasi $y = 0,99x - 0,002$. Koeficijent korelacije iznosi $r=0,992$, a rezidualna standardna devijacija $S_{y/x}=0,020$ mg/L. Sistematska greška, predstavljena kao odsečak regresione krive na y-osi, iznosi -0,002 mg/L (95% CI = -0,060 – 0,057 mg/L). Kako CI odsečka obuhvata 0, smatra se da sistematska greška nije statistički značajna. Procentualna greška, predstavljena kao nagib regresione krive u odnosu na x-osu, iznosi 0,99 (95% CI = 0,95 – 1,03). Pošto CI nagiba obuhvata 1, smatra se da procentualno odstupanje nije statistički značajno. Razlike između vrednosti hsCRP određenih dvema metodama na kritičnim koncentracijama značajnim za kategorizaciju kardiovaskularnog rizika od 1 mg/L i 3 mg/L bile su -0,02 mg/L (SE=0,01) i -0,05 mg/L (SE=0,04), redom. Ponderisana Demingova regresiona analiza *Olympus* imunoturbidimetrijske visoko osetljive i imunonefelometrijske metode grafički je predstavljena na *Slici 3A*.

Slaganje između metoda ispitano je i pomoću Bland-Altman dijagrama. Analizirane su procentualne, a ne apsolutne razlike između metoda, zbog prisustva proporcionalne greške



Slika 3. Poređenje rezultata određivanja hsCRP u 194 uzoraka seruma *Olympus* imunoturbidimetrijskom visoko osetljivom i imunonefelometrijskom metodom. (A) Ponderisana Demingova regresiona analiza: puna linija predstavlja regresionu krivu; isprekidana linija predstavlja krivu $y=x$; nagib $0,99 \pm 0,04$, odsečak $-0,002 \pm 0,059$ mg/L, $S_{y/x} = 0,020$ mg/L, $r = 0,992$. (B) Bland-Altman dijagram relativnih razlika: puna linija predstavlja srednju vrednost relativnih razlika između metoda; isprekidane linije predstavljaju 95% interval pouzdanosti za srednju vrednost; srednja vrednost relativnih razlika i Sd iznose $-0,002\%$ i $0,040\%$, redom. I za Demingovu regresionu analizu i za dijagram relativnih razlika vrednosti ispod $0,16$ mg/L nisu uzimane u obzir.

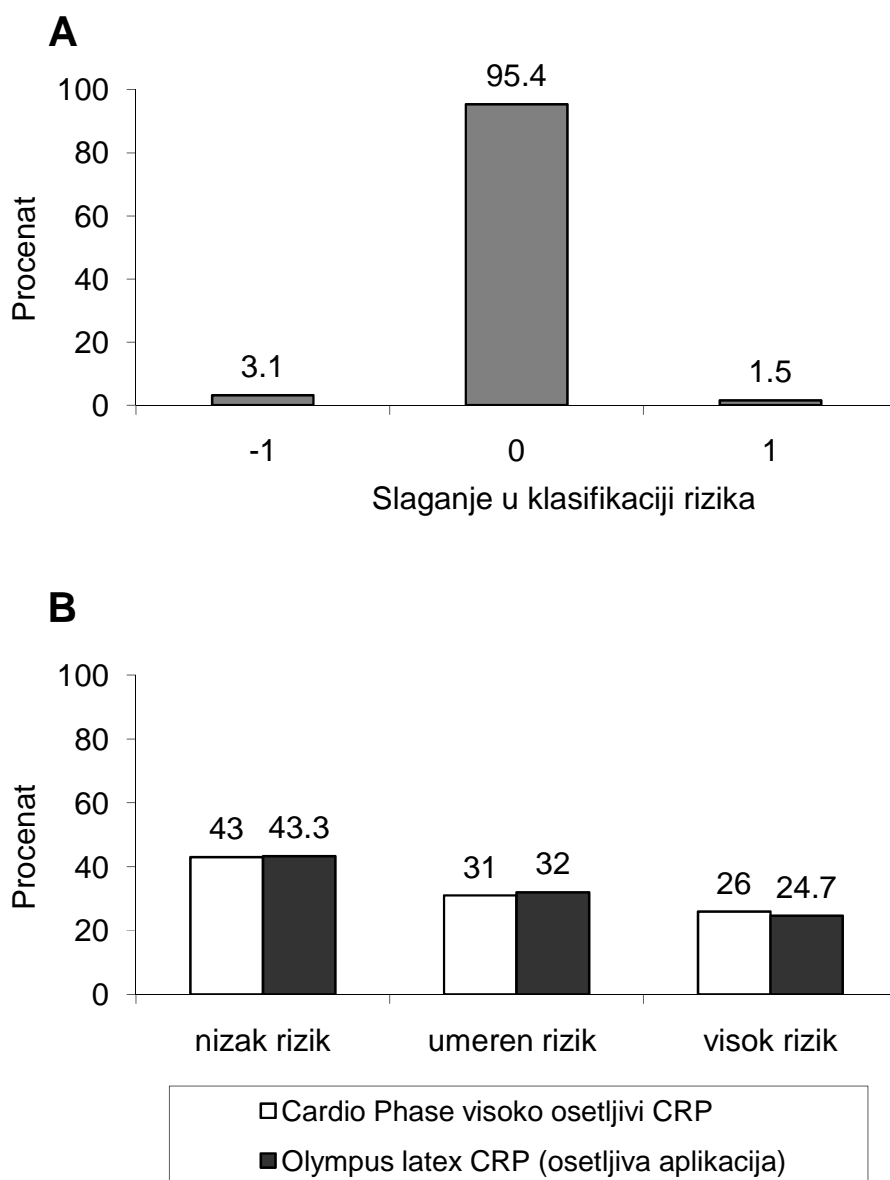
u merenju i zavisnosti Sd od koncentracije. Iz istog razloga je korišćena ponderisana, a ne klasična Demingova regresiona analiza. Srednja vrednost relativnih razlika između dve metode iznosi -0,002% (95% CI = -0,082 – 0,078%). Student t-test razlike parova određivanja pokazao je da razlika nije statistički značajna ($t=-0,421$; $P>0,05$). Bland-Altman dijagram relativnih razlika prikazan je na *Slici 3B*.

Dobijena regresiona jednačina i dijagram relativnih razlika pokazuju dobru korelaciju između *Olympus* visoko osetljive imunoturbidimetrijske i imunonefelometrijske metode.

4.1.4. Slaganje metoda u proceni kardiovaskularnog rizika

Ispitano je i slaganje *Olympus* i imunonefelometrijske metode u sposobnosti klasifikacije rizika (*Slika 4A*). Kategorija kardiovaskularnog rizika za svaki uzorak određena na osnovu koncentracije hsCRP dobijene *Olympus* metodom i upoređena sa kategorijom definisanom na osnovu imunonefelometrijske metode. Ukupno 95,4% rezultata dobijenih *Olympus* metodom je klasifikovano u istu kategoriju rizika, u višu kategoriju je raspoređeno 1,5% vrednosti i 3,1% rezultata je svrstano u nižu kategoriju rizika u odnosu na klasifikaciju definisanu vrednostima dobijenim imunonefelometrijskom metodom. Procenat osoba klasifikovanih u grupu niskog, umerenog i visokog rizika na osnovu rezultata obe metode prikazan je na *Slici 4B*.

Izvedena je i statistička analiza razlike između srednjih vrednosti u klasama kardiovaskularnog rizika na osnovu koncentracija hsCRP dobijenih različitim metodama. Kategorizacija u odgovarajuće klase izvršena je na osnovu rezultata imunonefelometrijske metode. Student t-testom je provereno da li se srednje vrednosti u odgovarajućim kategorijama razlikuju u zavisnosti od metode određivanja. Dobijeni rezultati, prikazani u *Tabeli IX*, pokazuju da se vrednosti hsCRP dobijene *Olympus* metodom statistički značajno ne razlikuju od onih dobijenih imunonefelometrijskom metodom u svim klasama relativnog rizika ($P>0,05$).



Slika 4. Slaganje između *Olympus* i imunonefelometrijske metode u kategorizaciji u klase relativnog rizika. (A) Slaganje metoda u sposobnosti klasifikacije rizika: 95,4% rezultata dobijenih *Olympus* i nefelometrijskom metodom je klasifikovano u istu kategoriju rizika; 1,5% vrednosti se našlo u višoj kategoriji; 3,1% rezultata je svrstano u nižu kategoriju rizika. (B) Procenat osoba klasifikovan u pojedine kategorije rizika na osnovu koncentracija hsCRP određenih dvema metodama.

Tabela IX Statistička analiza razlika u metodama u pojedinim klasama rizika

CRP (mg/L)	\bar{x} (mg/L)		\bar{x} razlike ^a (mg/L)	Sd razlike (mg/L)	<i>P</i> ^b
	<i>Olympus</i>	BN II			
<1	0,499	0,495	0,004	0,149	0,1762
1–3	1,769	1,775	-0,006	0,206	0,3669
>3	5,695	5,858	-0,164	0,571	0,4761

^a Raspodela po klasama rizika izvršena je na osnovu rezultata hsCRP dobijenih imunonefelometrijskom metodom.

^b t-test razlika srednjih vrednosti dobijenih različitim metodama u pojedinim klasama rizika; $P < 0,05$ – statistički značajna razlika.

4.2. POREĐENJE VREDNOSTI LIPIDNIH I INFLAMATORNIH BIOMARKERA SA hsCRP

Radi utvrđivanja poveznosti različitih novih biomarkera kardiovaskularnog rizika predloženih za upotrebu u primarnoj prevenciji sa hsCRP, poredene su vrednosti parametara lipidnog statusa i markera inflamatornog odgovora sa ovim već ustanovljenim biomarkerom. U serumu 242 osobe, 100 muškaraca i 142 žene, 25–80 godina starosti, određivani su hsCRP, ukupan, HDL, nonHDL i LDL holesterol, trigliceridi, apo A-I, apo B, Lp(a), fibrinogen, SAA, haptoglobin, A1AGP, C3 i C4 komponente komplemента. Korišćene su informacije o starosti, pušenju, telesnoj težini i visini (iz kojih je izračunavan BMI), fizičkoj aktivnosti i porodičnoj istoriji pojave kardiovaskularnih bolesti dobijene putem ankete. Pre vađenja krvi meren je krvni pritisak.

Distribucija određivanih parametara u ispitivanoj grupi učesnika prikazana je u *Tabeli X*. Kolmogorov-Smirnovljevim testom je utvrđeno da raspodela nije normalna za hsCRP, trigliceride, Lp(a), i SAA i u kasnijim analizama su logaritamski transformisani. Svi ostali parametri imaju normalnu distribuciju.

U ispitivanoj populaciji, 127 osoba imalo je hsCRP<1 mg/L (39 muškaraca, 88 žena), kod 73 osobe (39 muškaraca, 34 žene) hsCRP je bio u intervalu 1–3 mg/L i u najvišu kategoriju

Tabela X Distribucija vrednosti određivanih parametara u ispitivanoj grupi učesnika

Parametar	\bar{x}	Sd	Min	Max	Me	95%CI za Me	P*
hsCRP (mg/L)	1,73	2,052	0,03	12,64	1,00	0,82–1,13	<0,0001
TC (mmol/L)	5,63	1,090	2,45	9,16	5,58	5,44–5,68	0,1464
HDL-C (mmol/L)	1,39	0,342	0,70	2,71	1,37	1,31–1,42	0,5351
nonHDL-C (mmol/L)	4,24	1,122	1,34	7,78	4,17	3,96–4,29	0,3311
LDL-C (mmol/L)	3,52	0,916	1,04	6,72	3,45	3,35–3,60	0,5276
TG (mmol/L)	1,63	1,220	0,31	8,57	1,34	1,19–1,45	<0,0001
apo A-I (g/L)	1,58	0,219	1,10	2,33	1,57	1,54–1,59	0,4557
apo B (g/L)	1,06	0,270	0,33	1,97	1,04	1,00–1,07	0,2090
Lp(a) (mg/L)	161,8	208,74	1,0	1099,0	81,0	66,6–98,7	<0,0001
Fibrinogen (g/L)	3,59	0,903	1,50	7,30	3,60	3,40–3,70	0,6067
SAA (mg/L)	3,99	3,291	0,60	22,40	3,10	2,73–3,40	<0,0001
A1AGP (g/L)	0,76	0,176	0,36	1,35	0,74	0,72–0,77	0,1181
Haptoglobin (mg/L)	1,08	0,437	0,07	2,34	1,06	0,99–1,12	0,3001
C3 (g/L)	1,32	0,252	0,84	2,11	1,29	1,25–1,34	0,2191
C4 (g/L)	0,25	0,076	0,08	0,52	0,25	0,23–0,26	0,2698

*P>0,05 – normalna distribucija (Kolmogorov-Smirnov test)

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; TC, ukupan holesterol; HDL-C, HDL holesterol; nonHDL-C, nonHDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apo A-I, apolipoprotein A-I; apo B, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a); SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α_1 -kiselni glikoprotein, A1AGP; C3, C3 komponenta komplementa; C4, C4 komponenta komplementa.

Tabela XI Karakteristike ispitivane populacije prema kategorijama rizika na osnovu koncentracije hsCRP

	hsCRP			<i>P</i> ^a
	<1 mg/L N = 127	1–3 mg/L N = 73	>3 mg/L N = 42	
Starost, godine ^d	39,4 ± 12,8	49,3 ± 13,0 ^{1,***}	46,3 ± 13,9 ^{1,**}	<0,001
Pol, m/ž	39/88	39/34	22/20	<0,001
BMI, kg/m ² ^d	22,80 ± 3,14	26,36 ± 3,88 ^{1,***}	28,23 ± 3,97 ^{1,2*}	<0,001
Porodična istorija, %	37,0	37,0	26,2	0,373
Pušači, %	26,0	31,5	38,1	0,306
Fizička aktivnost, %	70,1	63,0	57,1	0,318
Hipertenzija, %	9,5	23,3	33,3	<0,001
TC, mmol/L ^d	5,26 ± 1,00	6,10 ± 1,08 ^{1,***}	6,30 ± 1,84 ^{1,***}	<0,001
HDL-C, mmol/L ^d	1,48 ± 0,35	1,40 ± 0,39	1,30 ± 0,31 ^{1,**}	0,005
nonHDL-C, mmol/L ^d	3,78 ± 0,98	4,70 ± 1,14 ^{1,***}	5,00 ± 1,24 ^{1,***}	<0,001
LDL-C, mmol/L ^d	3,27 ± 0,86	3,80 ± 0,90 ^{1,***}	4,10 ± 1,05 ^{1,***}	<0,001
TG, mmol/L ^{b,c}	1,08 (1,00–1,20)	1,68 (1,47–1,96) ^{1,***}	1,76 (1,51–2,09) ^{1,***}	<0,001
ApoAI, g/L ^d	1,59 ± 0,22	1,59 ± 0,24	1,53 ± 0,22	0,277
ApoB, g/L ^d	0,98 ± 0,24	1,19 ± 0,28 ^{1,***}	1,27 ± 0,30 ^{1,***}	<0,001
Lp(a), mg/L ^{b,c}	75 (60–92)	88 (59–107)	77 (52–122)	0,560
Fibrinogen, g/L ^d	3,12 ± 0,72	3,65 ± 0,66 ^{1,***}	4,17 ± 0,84 ^{1,2***}	<0,001
SAA, mg/L ^{b,c}	1,93 (1,72–2,21)	3,70 (3,39–4,68) ^{1,***}	5,60 (5,22–7,62) ^{1,2***}	<0,001
A1AGP, g/L ^d	0,67 ± 0,14	0,78 ± 0,16 ^{1,***}	0,90 ± 0,16 ^{1,2***}	<0,001
Haptoglobin, g/L ^d	0,96 ± 0,43	1,17 ± 0,43 ^{1,**}	1,46 ± 0,50 ^{1,2***}	<0,001
C3, g/L ^d	1,19 ± 0,20	1,39 ± 0,24 ^{1,***}	1,53 ± 0,29 ^{1,2**}	<0,001
C4, g/L ^d	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,06 ^{1,***}	0,29 ± 0,09 ^{1,2*}	<0,001

^a ANOVA za jedan kriterijum klasifikacije između tri grupe definisane na osnovu nivoa hsCRP za kontinualne promenljive i Chi-kvadrat test za proporcije (procenete).

^b Statistički testovi na logaritamski transformisanim vrednostima.

^c Geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (CI).

^d Aritmetička sredina ± Sd.

¹ Statistički značajna razlika u odnosu na vrednost u prvoj kategoriji (Tukey *post hoc* test).

² Statistički značajna razlika u odnosu na vrednost u drugoj kategoriji (Tukey *post hoc* test).

*** *P*<0,001, ** *P*<0,01, * *P*<0,05 (Tukey *post hoc* test).

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; BMI, indeks telesne mase; TC, ukupan holesterol; HDL-C, HDL holesterol; nonHDL-C, nonHDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apo A-I, apolipoprotein A-I; apo B, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a); SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α_1 -kiselni glikoprotein, A1AGP; C3, C3 komponenta komplemента; C4, C4 komponenta komplemента.

rizika sa hsCRP>3 mg/L, klasifikovano je 42 osobe (22 žene, 20 muškaraca). Karakteristike ispitivane grupe učesnika u okviru tri hsCRP kategorije prikazane su u *Tabeli XI*. Analiza razlike između ispitivanih parametara u različitim kategorijama koncentracije hsCRP urađena je za kontinualne promenljive analizom varijanse (ANOVA) za jedan kriterijum klasifikacije, a za procenite Chi-kvadrat testom. ANOVA analiza je pokazala značajno ($P<0,001$) povećanje koncentracija ukupnog, nonHDL i LDL holesterola, triglicerida, apo B, fibrinogena, SAA, A1AGP, haptoglobina, C3 i C4 komponente komplemента, a smanjenje HDL ($P=0,005$) sa povećanjem koncentracije hsCRP.

Iako postoji smanjenje u koncentraciji HDL holesterola od niže ka višoj kategoriji vrednosti hsCRP, to nije praćeno značajnom promenom u koncentraciji apo A-I. Ovo može da se objasni razlikama u sastavu HDL čestica, koje sadrže i apo A-I i apo A-II apolipoproteine. Među grupama su se značajno ($P<0,001$) razlikovale i srednje vrednosti za starost i BMI. Rezultati Chi-kvadrat testa su pokazali značajne razlike ($P<0,001$) u procentu zastupljenosti hipertenzije i različitih polova u kategorijama rizika definisanim na osnovu koncentracija hsCRP.

Značajne vrednosti nekontrolisanih parcijalnih Pearsonovih koeficijenata korelacije nađeni su između vrednosti hsCRP i svih parametara osim apo A-I i Lp(a). Međutim, posle kontrolisanja uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušačkog statusa, samo umerene, ali statistički značajne vrednosti koeficijenata korelacije su nađeni između koncentracije hsCRP i ukupnog holesterola ($r=0,172$; $P=0,008$), nonHDL holesterola ($r=0,182$; $P=0,005$); LDL holesterola ($r=0,154$; $P=0,018$) i apo B ($r=0,167$; $P=0,010$). Korelacije su ostale prilično snažne između vrednosti hsCRP i svih ispitivanih biomarkera inflamacije – fibrinogena ($r=0,411$; $P<0,001$), SAA ($r=0,493$; $P<0,001$), A1AGP ($r=0,462$; $P<0,001$),

Tabela XII Parcijalni Pearsonovi koeficijenti korelacije između hsCRP, lipidnih i inflamatornih parametara, kontrolisanih za starost, pol, BMI, hipertenziju i pušenje.

	hsCRP ^a	Fib.	SAA ^a	A1AGP	Hapt.	C3	C4	TC	HDL-C	nonHDL	LDL-C	TG ^a	apoAI	apoB
	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)	r (P)
Fib.	0,411 (<0,001)	-												
SAA ^a	0,493 (<0,001)	0,177 (0,006)	-											
A1AGP	0,462 (<0,001)	0,209 (0,001)	0,254 (<0,001)	-										
Hapt.	0,310 (<0,001)	0,295 (<0,001)	0,220 (0,001)	0,433 (<0,001)	-									
C3	0,349 (<0,001)	0,259 (<0,001)	0,229 (<0,001)	0,490 (<0,001)	0,371 (<0,001)	-								
C4	0,371 (<0,001)	0,194 (0,003)	0,238 (<0,001)	0,511 (<0,001)	0,342 (<0,001)	0,566 (<0,001)	-							
TC	0,172 (0,008)	0,060 (0,361)	0,086 (0,189)	0,154 (0,018)	0,081 (0,216)	0,226 (<0,001)	0,191 (0,003)	-						
HDL-C	-0,029 (0,658)	-0,030 (0,647)	0,123 (0,058)	-0,130 (0,046)	-0,051 (0,433)	-0,079 (0,228)	-0,041 (0,528)	0,174 (0,007)	-					
nonHDL	0,182 (0,005)	0,070 (0,285)	0,045 (0,487)	0,197 (0,002)	0,098 (0,134)	0,252 (<0,001)	0,205 (0,001)	0,946 (<0,001)	-0,155 (0,017)	-				
LDL-C	0,154 (0,018)	0,036 (0,582)	0,030 (0,645)	0,189 (0,004)	0,057 (0,383)	0,174 (0,007)	0,177 (0,006)	0,881 (<0,001)	-0,012 (0,858)	0,888 (<0,001)	-			
TG ^a	0,081 (0,216)	0,101 (0,121)	-0,003 (0,958)	0,045 (0,487)	0,033 (0,610)	0,234 (<0,001)	0,095 (0,144)	0,392 (<0,001)	-0,388 (<0,001)	0,521 (<0,001)	0,165 (0,011)	-		
apoAI	0,021 (0,750)	-0,012 (0,860)	0,088 (0,176)	-0,113 (0,084)	-0,024 (0,710)	0,046 (0,479)	0,025 (0,703)	0,191 (0,003)	0,843 (<0,001)	-0,085 (0,191)	-0,005 (0,938)	-0,234 (<0,001)	-	
apoB	0,167 (0,010)	0,074 (0,258)	0,021 (0,753)	0,236 (<0,001)	0,087 (0,182)	0,329 (<0,001)	0,255 (<0,001)	0,855 (<0,001)	-0,161 (0,013)	0,910 (<0,001)	0,860 (<0,001)	0,434 (<0,001)	-0,091 (0,165)	-
Lp(a) ^a	0,007 (0,919)	0,034 (0,598)	0,004 (0,957)	0,135 (0,038)	0,065 (0,322)	0,090 (0,169)	0,099 (0,127)	0,193 (0,003)	0,055 (0,400)	0,175 (0,007)	0,241 (<0,001)	-0,018 (0,788)	0,022 (0,740)	0,210 (0,001)

^a Statistički testovi sa log₁₀-transformisanim vrednostima.

BMI, indeks telesne mase; hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; Fib, fibrinogen; SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α₁-kiseli glikoprotein; Hapt, haptoglobin; C3, C3 komponenta komplemanta; C4, C4 komponenta komplemanta; TC, ukupan holesterol; HDL-C, HDL holesterol; nonHDL, non-HDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apoAI, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a).

haptoglobina ($r=0,310$; $P<0,001$), C3 ($r=0,349$; $P<0,001$) i C4 ($r=0,371$; $P<0,001$). Kao što je bilo i očekivano, snažne korelacije, koje su ostale značajne i posle kontrolisanja uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja, su nađene između koncentracija ukupnog i LDL holesterola ($r=0,881$; $P<0,001$), ukupnog i nonHDL holesterola ($r=0,946$; $P<0,001$), ukupnog holesterola i apo B ($r=0,855$; $P<0,001$), LDL i nonHDL holesterola ($r=0,888$; $P<0,001$), LDL holesterola i apo B ($r=0,860$; $P<0,001$), HDL holesterola i apo A-I ($r=0,843$; $P<0,001$) i nonHDL holesterola i apo B ($r=0,910$; $P<0,001$). Takođe, umerene korelacije, koje su oslabljene ali ostale i dalje značajne posle kontrole uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja, nađene su između koncentracija triglicerida i ukupnog, nonHDL holesterola, apo B i HDL holesterola. Korelaciona matrica prikazana je u *Tabeli XII*.

U cilju identifikacije nezavisnih determinanti koncentracije hsCRP u serumu urađena je postepena multipla linearna regresiona analiza. Rezultati su prikazani u *Tabeli XIII*. Korišćena je postepena metoda da bi se izbegli problemi sa multikolinearnošću, s obzirom na snažnu korelaciju između lipidnih parametara. Koeficijent determinacije, R^2 , koji govori o procentu varijacija zavisne promenljive koji je objašnjen regresionim modelom, iznosio je 0,658. Korigovani R^2 , koji predstavlja koeficijent determinacije usklađen sa brojem nezavisnih promenljivih uključenih u model, iznosio je 0,629. Samo za BMI ($\beta=0,229$; $P<0,001$), fibrinogen ($\beta=0,250$; $P<0,001$), SAA ($\beta=0,293$; $P<0,001$), A1AGP ($\beta=0,272$; $P<0,001$) i nonHDL holesterol ($\beta=0,115$; $P=0,012$) su dobijene statistički značajne vrednosti regresionog koeficijenta (β). To podrazumeva da je β različit od nule i da posmatrane promenljive značajno doprinose, odnosno određuju vrednost zavisne promenljive, što je u ovom slučaju hsCRP. BMI, fibrinogen, SAA, A1AGP i nonHDL holesterol su jedini ostali u nezavisnoj korelaciji sa koncentracijom hsCRP u serumu.

Da bi se utvrdila jačina i prediktivni potencijal parametara koji su ostali u nezavisnoj korelaciji sa koncentracijom hsCRP u serumu (BMI, fibrinogen, SAA, A1AGP i nonHDL holesterol) urađena je multinomialna logistička regresiona analiza. BMI, fibrinogen, SAA i nonHDL holesterol su ostali snažni prediktori koncentracije hsCRP u serumu i posle

korekcije za starost, pol, hipertenziju i pušenje. *Odds ratio*, koji predstavlja odnos šansi za prisustvo viših koncentracija nezavisnih prediktora u kategorijama umerenog i visokog rizika na osnovu koncentracije hsCRP u poređenju sa kategorijom niskog rizika prikazani su u *Tabeli XIV*. Ekstremno visoka vrednost *odds ratio* za A1AGP bila je posledica jako niske varijacije (samo 0,03), zbog čega je isključen iz dalje analize.

Tabela XIII Postepena multipla linearna regresiona analiza nezavisne povezanosti hsCRP sa ispitivanim parametrima

	hsCRP, mg/L R ² = 0,658 korigovan R ² = 0,629	
	β	P*
Starost, godine	0,039	0,388
BMI, kg/m ²	0,229	<0,001
TC, mmol/L	-0,092	0,500
HDL-C, mmol/L	-0,029	0,500
nonHDL-C, mmol/L	0,115	0,012
LDL-C, mmol/L	-0,044	0,628
TG, mmol/L ^a	0,025	0,640
ApoAI, g/L	0,021	0,605
ApoB, g/L	-0,045	0,698
Lp(a), mg/L ^a	-0,050	0,214
Fibrinogen, g/L	0,250	<0,001
SAA, mg/L ^a	0,293	<0,001
A1AGP, g/L	0,272	<0,001
Haptoglobin, g/L	0,020	0,676
C3, g/L	0,020	0,705
C4, g/L	0,074	0,137

* P<0,05 – statistički značajan prediktor

^a Statistički testovi sa log₁₀-transformisanim vrednostima.

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; BMI, indeks telesne mase; TC, ukupan holesterol; HDL-C, HDL holesterol; nonHDL, non-HDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apoAI, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a); Fib, fibrinogen; SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α₁-kiselni glikoprotein; Hapt, haptoglobin; C3, C3 komponenta komplekta; C4, C4 komponenta komplekta.

Tabela XIV Multinomialna logistička regresiona analiza prediktivnog potencijala izdvojenih biomarkera u pogledu koncentracije hsCRP

		hsCRP < 1 mg/L		hsCRP 1–3 mg/L		hsCRP > 3 mg/L	
		OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i> *	OR (95% CI)	<i>P</i> *
Model 1	BMI, kg/m ²	1	-	1,238 (1,103–1,390)	<0,001	1,351 (1,167–1,565)	<0,001
	nonHDL-C, mmol/L	1	-	1,694 (1,157–2,479)	0,007	2,106 (1,319–3,367)	0,002
	Fibrinogen, g/L	1	-	2,223 (1,295–3,813)	0,004	4,796 (2,392–9,617)	<0,001
	SAA, mg/L	1	-	1,350 (1,162–1,569)	<0,001	1,565 (1,314–1,864)	<0,001
Model 2	BMI, kg/m ²	1	-	1,177 (1,033–1,341)	0,014	1,289 (1,091–1,523)	0,003
	nonHDL-C, mmol/L	1	-	1,515 (1,021–2,249)	0,039	2,062 (1,246–3,411)	0,005
	Fibrinogen, g/L	1	-	2,241 (1,268–3,959)	0,005	7,123 (3,259–15,568)	<0,001
	SAA, mg/L	1	-	1,387 (1,179–1,632)	<0,001	1,691 (1,397–2,047)	<0,001

* *P*<0,05 – statistički značajna vrednost OR

Model 1, nekorigovan; Model 2, korigovan za starost (godine), pol (žensko, muško), hipertenziju (ne, da) i pušenje (ne, da).

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; OR (95% CI), *odds ratio*, 95% interval pouzdanosti; BMI, indeks telesne mase; nonHDL-C, non-HDL holesterol; SAA, serumski amiloid A.

Takođe je izračunat i FRS za svakog učesnika. Od 242 osobe, 193 je imalo FRS<10%, kod 34 je identifikovan intermedijerni rizik (FRS 10–20%) i 15 je bilo pod visokim rizikom zbog FRS>20%. U grupi sa intermedijernim rizikom, koji bi imali najviše koristi od uvođenja novih faktora u klasifikaciju rizika, kod 11 (32,3%) učesnika je koncentracija hsCRP bila <1 mg/L, 16 (47,1%) njih je imalo vrednost hsCRP u opsegu 1–3 mg/L i kod 7

(20,6%) je hsCRP bio >3 mg/L. Osobe klasifikovane u intermedijernu rizičnu grupu na osnovu FRS su takođe imale i statistički značajno različite vrednosti fibrinogena ($P=0,020$), SAA ($P=0,001$), nonHDL holesterola ($P=0,041$) i triglicerida ($P=0,040$) između kategorija koncentracije hsCRP (Tabela XV).

Tabela XV Distribucija koncentracija ispitivanih parametara koji nisu uključeni u izračunavanje Framingamskog rizik skora (FRS) između kategorija koncentracija hsCRP u grupi učesnika sa FRS 10-20%

	hsCRP, mg/L			P^a
	<1 mg/L n = 11 (32,3%)	1–3 mg/L n = 16 (47,1%)	>3 mg/L n = 7 (20,6%)	
BMI, kg/m ² ^d	25,44 ± 2,62	28,20 ± 4,30	29,51 ± 1,66	0,063
Fibrinogen, g/L ^d	3,14 ± 1,10	4,01 ± 0,68	4,24 ± 0,92	0,020
SAA, mg/L ^{b,c}	1,38 (0,96–1,99)	3,12 (2,06–4,73)	5,84 (4,45–7,66)	0,001
Haptoglobin, g/L ^d	0,86 ± 0,63	1,29 ± 0,51	1,45 ± 0,39	0,055
A1AGP, g/L ^d	0,69 ± 0,19	0,80 ± 0,13	0,87 ± 0,13	0,069
C3, g/L ^d	1,45 ± 0,20	1,49 ± 0,24	1,51 ± 0,27	0,309
C4, g/L ^d	0,24 ± 0,06	0,28 ± 0,07	0,28 ± 0,08	0,300
nonHDL-C, mmol/L ^d	4,50 ± 1,25	5,32 ± 0,95	5,74 ± 0,79	0,041
apoAI, g/L ^d	1,60 ± 0,18	1,57 ± 0,21	1,59 ± 0,20	0,870
apoB, g/L ^d	1,19 ± 0,33	1,38 ± 0,24	1,44 ± 0,19	0,093
Lp(a), mg/L ^{b,c}	91 (53–218)	90 (53–156)	89 (17,6–451)	0,996
TG, mmol/L ^{b,c}	1,32 (1,11–1,57)	1,88 (1,46–2,38)	2,16 (1,67–2,61)	0,040

^a ANOVA za jedan kriterijum klasifikacije između tri grupe definisane na osnovu nivoa hsCRP za kontinualne promenljive i Chi-kvadrat test za proporcije (procenete).

^b Statistički testovi na logaritamski transformisanim vrednostima.

^c Geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (CI).

^d Aritmetička sredina ± Sd.

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; BMI, indeks telesne mase; SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α_1 -kiselni glikoprotein; C3, C3 komponenta komplemanta; C4, C4 komponenta komplemanta; nonHDL-C, non-HDL holesterol; apoAI, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a); TG, trigliceridi.

4.3. POREĐENJE VREDNOSTI MOKRAĆNE KISELINE, SRČANIH I BUBREŽNIH BIOMARKERA SA hsCRP

Sledeći korak u ispitivanju poveznosti novih biomarkera kardiovaskularnog rizika predloženih za upotrebu u primarnoj prevenciji sa hsCRP, bio je da se njegove vrednosti uporede sa koncentracijama mokraćne kiseline, srčanih i bubrežnih biomarkera. Korišćene su koncentracije hsCRP, mokraćne kiseline, NT-proBNP, hs-cTnT, kreatinina i Cys-C

Tabela XVI Distribucija vrednosti mokraćne kiseline, srčanih i bubrežnih biomarkera u ispitivanoj grupi učesnika

Parametar	\bar{x}	Sd	Min	Max	Me	95%CI za Me	P*
Mokraćna kis. ($\mu\text{mol/L}$)	326	85,7	139	594	319	309–333	0,1729
NT-proBNP (pg/mL)	69,4	92,78	4,0	978,0	47,0	37,8–55,6	<0,0001
hs-cTnT (ng/L)	5,01	2,841	3,00	18,95	3,82	3,29–4,35	<0,0001
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	79	17,7	52	138	74	71–77	0,0005
Cys-C (mg/L)	0,72	0,121	0,46	1,20	0,70	0,69–0,72	0,0187
eGFR_{MDRD} (mL/min/1,73 m ²)	82	16,0	42	119	84	82–85	0,1478
eGFR_{CKD-EPI} (mL/min/1,73 m ²)	93	18,8	45	139	96	94–98	0,0123
eGFR_{CysC} (mL/min/1,73 m ²)	111	18,4	63	170	110	107–112	0,2182

* $P > 0,05$ – normalna distribucija (Kolmogorov-Smirnov test)

NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; Cys-C, cistatin C; eGFR_{MDRD}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; eGFR_{CKD-EPI}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; eGFR_{CysC}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije Cys-C.

određene u serumu 242 osobe, 100 muškaraca i 142 žene, 25–80 godina starosti. Iz koncentracija kreatinina izračunate su vrednosti eGFR prema MDRD (eGFR_{MDRD}) i CKD-

EPI (eGFR_{CKD-EPI}) formulama (201, 206). Takođe, prema odgovarajućoj jednačini izračunate su i vrednosti eGFR iz koncentracija Cys-C (eGFR_{CysC}) (205). Distribucija ispitivanih parametara prikazana je u *Tabeli XVI*.

Tabela XVII Raspodela ispitivanih biomarkera u pojedinim kategorijama rizika na osnovu koncentracije hsCRP

	hsCRP			P ^{*,a}
	<1 mg/L N = 127	1–3 mg/L N = 73	>3 mg/L N = 42	
NT-proBNP, pg/mL ^{b,c}	42,8 (36,7–49,8)	39,8 (31,6–50,1)	51,1 (37,5–69,5)	0,358
hs-cTnT, ng/L ^{b,c}	4,36 (4,06–4,68)	4,89 (4,37–5,46)	4,08 (3,59–4,63)	0,049
Kreatinin, µmol/L ^{b,c}	75 (73–78)	81 (77–85) ^{1,**}	76 (72–81)	0,048
Cys-C, mg/L ^{b,c}	0,68 (0,66–0,70)	0,72 (0,70–0,75) ^{1,**}	0,76 (0,72 – 0,80) ^{1,***}	<0,001
Mokraćna kis., µmol/L ^d	303 ± 71	351 ± 97 ^{1,***}	349 ± 88 ^{1,**}	<0,001
eGFR _{MDRD} , mL/min/1,73 m ^{2,d}	84 ± 15	78 ± 17 ^{1,*}	83 ± 15	0,034
eGFR _{CKD-EPI} , mL/min/1,73 m ^{2,b}	94 (91–97)	85 (81–90) ^{1,**}	91 (86–97)	0,009
eGFR _{CysC} , mL/min/1,73 m ^{2,d}	115 ± 17	108 ± 18 ^{1,*}	104 ± 20 ^{1,***}	<0,001

*P<0,05 – statistički značajna razlika

^a ANOVA za jedan kriterijum klasifikacije između tri grupe definisane na osnovu nivoa hsCRP.

^b Statistički testovi na logaritamski transformisanim vrednostima.

^c Geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (CI).

^d Aritmetička sredina ± Sd.

¹ Statistički značajna razlika u odnosu na vrednost u prvoj kategoriji (Tukey *post hoc* test).

² Statistički značajna razlika u odnosu na vrednost u drugoj kategoriji (Tukey *post hoc* test).

*** P<0,001, ** P<0,01, * P<0,05 (Tukey *post hoc* test).

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; Cys-C, cistatin C; eGFR_{MDRD}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; eGFR_{CKD-EPI}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; eGFR_{CysC}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije Cys-C.

Kolmogorov-Smirnovljevim testom je utvrđeno da raspodela nije normalna za NT-proBNP, hs-cTnT, kreatinin, Cys-S i eGFR_{CKD-EPI} i u kasnijim analizama oni su logaritamski

transformisani, dok ostali parametri imaju normalnu distribuciju. Karakteristike ispitivane grupe učesnika u okviru tri hsCRP kategorije prikazane su u *Tabeli XVII*.

ANOVA analiza je pokazala značajno povećanje koncentracija Cys-C ($P<0,001$), mokraćne kiseline ($P<0,001$), kreatinina ($P=0,048$) i hs-cTnT ($P=0,049$), dok je smanjenje vrednosti eGFR bilo značajno, bez obzira na način izračunavanja, sa porastom koncentracije hsCRP.

Tabela XVIII Parcijalni Pearsonovi koeficijenti korelacije između hsCRP, mokraćne kiseline, srčanih i bubrežnih parametara, kontrolisani za starost, pol, BMI, hipertenziju i pušenje.

	hsCRP ^a r (P^*)	MK r (P^*)	NT-proBNP ^a r (P^*)	hs-cTnT ^a r (P^*)	Kreat. ^a r (P^*)	Cys-C ^a r (P^*)	MDRD r (P^*)	CKD-EPI ^a r (P^*)
MK	0,072 (0,254)	-						
NT-proBNP ^a	-0,017 (0,791)	-0,168 (0,008)						
hs-cTnT ^a	-0,066 (0,294)	0,164 (0,009)	0,047 (0,463)					
Kreat. ^a	-0,010 (0,872)	0,528 ($<0,001$)	-0,103 (0,104)	0,211 (0,001)				
Cys-C ^a	0,151 (0,016)	0,338 ($<0,001$)	0,038 (0,552)	0,161 (0,011)	0,524 ($<0,001$)			
MDRD	0,022 (0,723)	-0,494 ($<0,001$)	0,097 (0,126)	-0,211 (0,001)	-0,974 ($<0,001$)	-0,491 ($<0,001$)		
CKD-EPI ^a	0,019 (0,764)	-0,507 ($<0,001$)	0,092 (0,146)	-0,208 (0,001)	-0,980 ($<0,001$)	-0,495 ($<0,001$)	0,975 ($<0,001$)	
eGFR _{CysC}	-0,126 (0,046)	-0,330 ($<0,001$)	-0,027 (0,669)	-0,154 (0,015)	-0,513 ($<0,001$)	0,990 ($<0,001$)	0,484 ($<0,001$)	0,481 ($<0,001$)

* $P<0,05$ – statistički značajna korelacija

^a Statistički testovi sa \log_{10} -transformisanim vrednostima.

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; MK, mokraćna kiselina; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; Kreat., kreatinin; Cys-C, cistatin C; MDRD, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; CKD-EPI, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; eGFR_{CysC}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije Cys-C.

Značajne vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije nađeni su između vrednosti hsCRP i mokraćne kiseline ($P<0,001$) i eGFR_{CKD-EPI} ($P=0,015$), ali se značajnost izgubila posle

kontrolisanja uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja. Posle korekcije uticaja navedenih parametara hsCRP je ostao u značajnoj korelaciji samo sa Cys-C ($P=0,016$) i $eGFR_{CysC}$ ($P=0,046$). Statistički značajne vrednosti korelacije i posle kontrolisanja uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja nađene su između koncentracije mokraćne kiseline i NT-proBNP ($P=0,008$), hs-cTnT ($P=0,009$), kreatinina ($P<0,001$), Cys-C ($P<0,001$) i $eGFR$ izračunate pomoću sve tri korišćene formule ($P<0,001$); kao i između hs-cTnT i kreatinina ($P=0,001$) i Cys-C ($P=0,015$), pa samim tim i svim $eGFR$ vrednostima ($P=0,001$ za MDRD i CKD-EPI, $P=0,015$ za $eGFR_{Cys-C}$). Vrednosti Cys-C su bile u značajnoj korelaciji i sa koncentracijom kreatinina i njegovim jednačinama za izračunavanje $eGFR$ ($P<0,001$). Dobijeni koeficijenti korelacije između vrednosti kreatinina i Cys-C i jednačina koje uključuju podatak o njihovoj koncentraciji bili su, očekivano, jako visoki. Statistička značajnost korelacije između NT-proBNP i kreatinina se izgubila posle korekcije uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja. Korelaciona matrica prikazana je u *Tabeli XVIII*.

Tabela XIX Postepena multipla linearna regresiona analiza nezavisne povezanosti hsCRP sa ispitivanim srčanim i burežnim biomarkerima i mokraćnom kiselinom

	hsCRP, mg/L $R^2 = 0,185$ korigovan $R^2 = 0,175$	
	β	P^*
NT-proBNP, pg/mL ^a	0,005	0,937
hs-cTnT, ng/L ^a	-0,074	0,212
Kreatinin, $\mu\text{mol/L}$ ^a	-0,276	0,001
Cys-C, mg/L ^a	0,363	<0,001
Mokraćna kis., $\mu\text{mol/L}$	0,293	<0,001
$eGFR_{MDRD}$, mL/min/1,73 m ²	-0,042	0,634
$eGFR_{CKD-EPI}$, mL/min/1,73 m ² ^a	-0,077	0,392

* $P<0,05$ – statistički značajan prediktor

^a Statistički testovi sa \log_{10} -transformisanim vrednostima.

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; Cys-C, cistatin C; $eGFR_{MDRD}$, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; $eGFR_{CKD-EPI}$, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; $eGFR_{CysC}$, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije Cys-C.

Postepenom multiplom linearnom regresionom analizom identifikovani su kreatinin ($\beta=-0,276$; $P=0,001$), Cys-C ($\beta=0,363$; $P=<0,001$) i mokraćna kiselina ($\beta=0,293$; $P<0,001$) kao nezavisne determinante koncentracije hsCRP. Rezultati su prikazani u *Tabeli XIX*. Korišćena je postepena metoda da bi se izbegli problemi sa multikolinearnošću, s obzirom na snažnu korelaciju između kreatinina i izračunatim eGFR, dok je zbog singularnosti Cys-C i $eGFR_{CysC}$ u analizu uključen samo Cys-C. Koeficijent determinacije, R^2 , odnosno procenat varijacije zavisne promenljive objašnjen dobijenim regresionim modelom, iznosio je 0,185. Korigovani R^2 , dakle koeficijent determinacije usklađen sa brojem nezavisnih promenljivih uključenih u model, iznosio je 0,175. Prediktivna vrednost dobijenog modela nije potvrđena logističkom regresijom, odnosno nijedan od izdvojenih parametara nije zadržao statističku značajnost.

4.4. POREĐENJE KATEGORIZACIJE RIZIKA NA OSNOVU SKOROVA I hsCRP

Ispitano je i da li su rezultati klasifikacije rizika na osnovu rizik skorova i koncentracije hsCRP nezavisni jedni od drugih u smislu raspodele u ispitivanoj populaciji. Primenjen je Chi-kvadrat test nezavisnosti između kriterijuma klasifikacije rizika. Dva kriterijuma klasifikacije se smatraju nezavisnim ako je raspodela frekvencija na osnovu jednog kriterijuma ista bez obzira na to kakva je raspodela na osnovu drugog. Statistički, ako je dobijena vrednost χ^2 iz odgovarajuće tablice kontingencije veća od granične za željenu verovatnoću ($P<0,05$) i odgovarajući broj stepena slobode, nulta hipoteza se odbacuje, odnosno kriterijumi klasifikacije nisu nezavisni.

Svim učesnicima izračunat je 10-godišnji rizik od pojave KBS kao krajnjeg ishoda, što podrazumeva pojavu infarkta miokarda, stabilne i nestabilne angina pectoris i smrtnog ishoda. Za izračunavanje je korišćen elektronski kalkulator „ATP Risk Estimator ver. 2000“, koji koristi algoritam FRS, u koji su uključeni podaci o polu, starosti, koncentraciji ukupnog i HDL holesterola, sistolnom krvnom pritisku, antihipertenzivnoj terapiji i

pušenju. Dobijeni apsolutni 10-godišnji rizik je klasifikovan u kategorije sa <10%, 10–20% i >20%. Chi-kvadrat testom je ispitano da li je raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L nezavisna od raspodele kategorija rizika na osnovu FRS u ispitivanoj populaciji. Dobijena raspodela frekvencija je prikazana u *Tabeli XX*. Rezultati Chi-kvadrat testa nezavisnosti pokazuju da je klasifikacija kardiovaskularnog rizika na osnovu vrednosti hsCRP nezavisna od kategorizacije primenom algoritma FRS ($\chi^2=7,079$; $P=0,1318$).

Tabela XX Tablica kontingencije klasifikacije rizika na osnovu kategorija FRS i klasa hsCRP

		hsCRP, mg/L			ukupno
		<1	1–3	>3	
FRS, %	<10	103	53	37	193 (79,8%)
	10–20	11	16	7	34 (14,0%)
	>20	7	5	3	15 (6,2%)
ukupno		121 (50,2%)	74 (30,4%)	47 (19,5%)	242

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; FRS, Framingamski rizik skor.

Primenjen je i globalni FRS koji izračunava 10-godišnji rizik od svih oblika KVB – tzv. „globalni KVB rizik“, što uključuje smrtni ishod KVB, pojavu svih oblika KBS (srčana smrt, infarkt miokarda, koronarna insuficijencija, angina), cerebrovaskularne komplikacije (ishemijski i hemoragični šlog, tranzitorni ishemijski atak), srčanu insuficijenciju i bolest perifernih arterija (intermitentne klaudikacije). Procena 10-godišnjeg globalnog KVB rizika zasniva se na istim parametrima kao i klasični FRS, uz dodatnu informaciju o eventualnom prisustvu dijabetesa. Za izračunavanje je korišćen elektronski kalkulator „CVD Risk Check“. Posle klasifikacije dobijenog 10-godišnjeg globalnog rizika u odgovarajuće kategorije od <10%, 10–20% i >20% ispitana je nezavisnost njegove raspodele i raspodele na osnovu klasa hsCRP (*Tabela XXI*). Rezultati Chi-kvadrat testa su pokazali da ispitivane klasifikacije rizika nisu nezavisne jedna od druge ($\chi^2=13,295$; $P=0,0099$).

Tabela XXI Tablica kontingencije klasifikacije rizika na osnovu kategorija globalnog FRS i klasa hsCRP

		hsCRP, mg/L			ukupno
		<1	1–3	>3	
Globalni FRS, %	<10	97	42	29	168 (69,6%)
	10–20	15	17	10	42 (17,5%)
	>20	9	14	8	32 (12,8%)
ukupno		121 (50,2%)	74 (30,4%)	47 (19,5%)	242

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; FRS, Framingamski rizik skor

Izračunat je i dugoročni, 30-godišnji rizik za KVB na osnovu algoritama predloženih od strane Pencine i sar. (43). Primenjena su oba modela, primarni, za procenu rizika od pojave teških komplikacija KVB („teška KVB“), koje uključuju teške manifestacije KBS (srčana smrt, infarkt miokarda), fatalni i nefatalni šlog; i sekundrani, za izračunavanje rizika od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija („kompletna KVB“). Parametri uključeni u izračunavanje rizika obihvataju pol, starost, sistolni krvni pritisak, terapiju antihipertenzivima, ukupan i HDL holesterol, pušenje i dijabetes. Rizik je izračunat samo za učesnike mlađe od 60 godina (N=221), što je definisana gornja granica za procenu, a za izračunavanje je korišćen elektronski kalkulator „30-year risk of cardiovascular disease“ (43). Dobijene vrednosti rizika su klasifikovane kao „ispod optimalne/normalne vrednosti“ i „iznad optimalne/normalne vrednosti“, koje su definisane na osnovu pola i starosti. Rezultati Chi-kvadrat testa su pokazali da raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L nije nezavisna od raspodele u kategorijama 30-godišnjeg rizika i za „tešku KVB“ ($\chi^2=19,685$; $P=0,0001$) i za „kompletnu KVB“ ($\chi^2=15,559$; $P=0,0004$). Dobijene raspodele frekvencija prikazane su u *Tabelama XXII* i *XXIII*.

Tabela XXII Tablica kontingencije klasifikacije rizika na osnovu 30-godišnjeg rizika za „tešku KVB“ i klasa hsCRP

		hsCRP, mg/L			ukupno
		<1	1–3	>3	
„teška KVB“, %	<opt/norm	43	9	5	57 (26%)
	>opt/norm	70	57	37	164 (74%)
ukupno		113 (51,1%)	66 (29,8%)	42 (19,1%)	221

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; KVB, kardiovaskularna bolest; opt/norm, optimalan/normalan rizik.

Tabela XXIII Tablica kontingencije klasifikacije rizika na osnovu 30-godišnjeg rizika za „kompletnu KVB“ i klasa hsCRP

		hsCRP, mg/L			ukupno
		<1	1–3	>3	
„kompletna KVB“, %	<opt/norm	40	9	5	54 (24%)
	>opt/norm	73	57	37	167 (76%)
ukupno		113 (51,1%)	66 (29,8%)	42 (19,1%)	221

hsCRP, C-reaktivni protein određen visoko osetljivom metodom; KVB, kardiovaskularna bolest; opt/norm, optimalan/normalan rizik.

Autori algoritma globalnog FRS uveli su i novi koncept starosti srca/vaskularne starosti. To podrazumeva prevođenje izračunatog kardiovaskularnog rizika u starost osobe sa istim rizikom ali normalnim nivoima svih ostalih faktora rizika (netretirani sistolni krvni pritisak od 125 mmHg, ukupan holesterol 4,7 mmol/L, HDL holesterol 1,17 mmol/L, nepušač, bez dijabetesa). Starost srca/vaskularna starost određena je na osnovu poena globalnog FRS prema *Tabeli VII*. Da bi se ispitalo da li postoji zavisnost između razlike u aktuelnoj starosti i procenjene starosti srca na osnovu ovog algoritma i koncentracije hsCRP, ispitana je razlika između njih u pojedinim klasama koncentracije hsCRP. Student t-test je pokazao statistički značajne razlike srednjih vrednosti aktuelne starosti i starosti srca/vaskularne starosti u pojedinim kategorijama koncentracije hsCRP ($P < 0,05$). Takođe, ANOVA za

jedan kriterijum klasifikacije je potvrdila statistički značajno povećanje razlike sa porastom koncentracije hsCRP ($P < 0,001$). Rezultati su prikazani u *Tabeli XXIV*.

Tabela XXIV Statistička analiza razlika između aktuelne starosti i procenjene starosti srca/vaskularne starosti na osnovu globalnog FRS algoritma u pojedinim kategorijama koncentracija hsCRP

CRP (mg/L)	\bar{x} (godine)		\bar{x} razlike (godine)	Sd razlike (godine)	P^a	P^b
	starost	starost srca/vaskularna starost				
<1	39,5	43,3	3,8	8,32	0,0400	
1–3	46,9	56,7	9,8	11,40	0,0001	<0,0001
>3	45,8	55,8	10,0	9,76	0,0020	

^a t-test razlika srednjih vrednosti aktuelne starosti i procenjene starosti srca/vaskularne starosti u pojedinim klasama rizika; $P < 0,05$ – statistički značajna razlika.

^b ANOVA analiza za jedan kriterijum klasifikacije \bar{x} razlika aktuelne starosti i procenjene starosti srca/vaskularne starosti između kategorija koncentracije hsCRP.

4.5. FAKTORSKA ANALIZA

U cilju redukcije ispitivane velike grupe biomarkera povezanih sa kardiovaskularnim rizikom i hsCRP, kao indikatorom subkliničke inflamacije u aterosklerozi, u manji broj podgrupa koje su odgovorne za najveći procenat varijabilnosti njihovih originalnih vrednosti sprovedena je faktorska analiza. Za izdvojene podgrupe promenljivih, koje se označavaju kao „komponente“ ili „faktori“, pretpostavlja se da predstavljaju osnovne dimenzije (označavaju se i kao „latentne promenljive“) svih ispitivanih parametara. Korišćen je najjednostavniji oblik faktorske analize, analiza glavnih komponenti (*principal components analysis*), kojom se komponente ili faktori izdvajaju na osnovu ukupne varijacije u jednom setu podataka. Svaka od komponenti dobijena analizom glavnih komponenti predstavlja linearnu kombinaciju promenljivih koja u različitom stepenu može

Tabela XXV Sumarni prikaz karakteristika ispitivane populacije (N=242)

Promenljiva	Broj / aritmetička / geometrijska sredina	Standardna devijacija / 95% CI geometrijske sredine / %
Starost, godine	43	13,3
Ženski pol, %	142	58,7
BMI, kg/m ²	24,8	4,17
Porodična istorija KVB, %	90	37,2
Sistolni krvni pritisak, mmHg	122	120–125
Dijastolni krvni pritisak, mmHg	79	72–81
Hipertenzija, %	43	17,8
Antihipertenzivna terapija, %	38	15,5
Pušači, %	72	29,8
Fizička aktivnost, %	159	65,7
C-reaktivni protein, mg/L	0,97	0,85–1,12
Ukupan holesterol, mmol/L	5,63	1,090
HDL holesterol, mmol/L	1,39	0,342
LDL holesterol, mmol/L	3,52	0,916
Non-HDL holesterol, mmol/L	4,24	1,122
Trigliceridi, mmol/L	1,35	1,25–1,45
Apolipoprotein A-I, g/L	1,58	0,220
Apolipoprotein B, g/L	1,06	0,270
Lipoprotein (a), mg/L	84	72–97
Fibrinogen, g/L	3,59	0,903
Serumski amiloid A, mg/L	2,97	2,70–3,27
α_1 -kiseli glikoprotein, g/L	0,76	0,176
Haptoglobin, g/l	1,09	0,429
C3 komplement, g/L	1,32	0,252
C4 komplement, g/L	0,25	0,076
NT-proBNP, pg/mL	43,3	38,4–48,8
hs-cTnT, ng/L	4,46	4,22 – 4,72
Kreatinin, μ mol/L	77	75–79
eGFR _{MDRD} , mL/min/1,73 m ²	82	16
eGFR _{CKD-EPI} , mL/min/1,73 m ²	91	88–93
Cistatin C, mg/L	0,71	0,69–0,72
eGFR _{CysC} , mL/min/1,73 m ²	111	18
Mokraćna kiselina, μ mol/L	326	86

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija, geometrijska sredina i 95% CI, odnosno kao apsolutni broj i procenat od ukupnog broja. BMI, indeks telesne mase; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretски peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; eGFR_{MDRD}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; eGFR_{CKD-EPI}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; eGFR_{CysC}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije cistatina C.

Tabela XXVI Spearman-ova korelaciona analiza ispitivanih parametara u populaciji učesnika (N=242)

	Starost rho (P)	Pol rho (P)	BMI rho (P)	Ist. KVB rho (P)	SBP rho (P)	DBP rho (P)	Hipert rho (P)	Pušenje rho (P)	Fiz. akt. rho (P)	CRP rho (P)	TC rho (P)	HDL rho (P)	LDL rho (P)	nonHDL rho (P)	TG rho (P)	Apo AI rho (P)	Apo B rho (P)
Pol	-0,048 (0,440)																
BMI	0,423 (<0,001)	-0,360 (<0,001)															
Ist. KVB	-0,031 (0,627)	0,016 (0,801)	-0,039 (0,534)														
SBP	0,356 (<0,001)	-0,233 (<0,001)	0,498 (<0,001)	-0,112 (0,075)													
DBP	0,260 (<0,001)	-0,204 (0,001)	0,426 (<0,001)	-0,101 (0,107)	0,835 (<0,001)												
Hpt..	-0,275 (<0,001)	0,017 (0,782)	-0,383 (<0,001)	0,120 (0,056)	-0,690 (<0,001)	-0,648 (<0,001)											
Puš.	0,005 (0,931)	0,009 (0,885)	0,057 (0,367)	0,129 (0,039)	0,006 (0,924)	0,029 (0,664)	-0,007 (0,914)										
Fiz. akt.	-0,132 (0,048)	-0,058 (0,389)	-0,024 (0,720)	0,171 (0,010)	-0,101 (0,131)	-0,097 (0,146)	0,127 (0,059)	0,050 (0,457)									
CRP	0,333 (<0,001)	-0,151 (0,015)	0,591 (<0,001)	0,010 (0,876)	0,339 (<0,001)	0,295 (<0,001)	-0,243 (<0,001)	0,002 (0,979)	-0,019 (0,772)								
TC	0,440 (<0,001)	-0,130 (0,038)	0,351 (<0,001)	-0,082 (0,190)	0,243 (<0,001)	0,202 (0,001)	-0,146 (0,020)	-0,081 (0,198)	-0,009 (0,898)	0,312 (<0,001)							
HDL	0,010 (0,871)	0,335 (<0,001)	-0,319 (<0,001)	-0,002 (0,974)	-0,226 (<0,001)	-0,240 (<0,001)	0,077 (0,221)	0,057 (0,365)	0,006 (0,928)	-0,218 (<0,001)	0,055 (0,381)						
LDL	0,405 (<0,001)	-0,076 (0,225)	0,324 (<0,001)	-0,054 (0,389)	0,225 (<0,001)	0,155 (0,013)	-0,092 (0,143)	-0,039 (0,536)	0,009 (0,893)	0,280 (<0,001)	0,888 (<0,001)	-0,063 (0,315)		-			
Non HDL	0,411 (<0,001)	-0,225 (<0,001)	0,449 (<0,001)	-0,076 (0,227)	0,325 (<0,001)	0,275 (<0,001)	-0,157 (0,012)	-0,104 (0,098)	-0,014 (0,829)	0,377 (<0,001)	0,934 (<0,001)	-0,271 (<0,001)	0,887 (<0,001)				
TG	0,251 (<0,001)	-0,364 (<0,001)	0,479 (<0,001)	-0,075 (0,233)	0,342 (<0,001)	0,321 (<0,001)	-0,176 (0,005)	-0,112 (0,074)	0,010 (0,880)	0,362 (<0,001)	0,512 (<0,001)	-0,505 (<0,001)	0,343 (<0,001)	-0,664 (<0,001)			
Apo AI	0,165 (0,008)	0,209 (0,001)	-0,150 (0,016)	-0,018 (0,771)	-0,116 (0,064)	-0,137 (0,029)	0,010 (0,875)	0,046 (0,462)	-0,039 (0,563)	-0,104 (0,096)	0,179 (0,004)	0,836 (<0,001)	0,026 (0,682)	-0,107 (0,088)	-0,289 (<0,001)		
Apo B	0,416 (<0,001)	-0,252 (<0,001)	0,472 (<0,001)	-0,071 (0,255)	0,350 (<0,001)	0,276 (<0,001)	-0,159 (0,011)	-0,090 (0,153)	-0,032 (0,637)	0,380 (<0,001)	0,865 (<0,001)	-0,280 (<0,001)	0,843 (<0,001)	0,940 (<0,001)	0,658 (<0,001)	-0,148 (0,017)	
Lp(a)	0,045 (0,473)	0,031 (0,626)	0,001 (0,984)	-0,004 (0,950)	0,026 (0,677)	0,032 (0,606)	-0,079 (0,209)	0,007 (0,911)	0,066 (0,323)	0,011 (0,863)	0,206 (0,001)	0,134 (0,032)	0,021 (<0,001)	0,153 (0,014)	-0,024 (0,701)	0,098 (0,116)	0,155 (0,013)

Tabela XXVI (nastavak)

	Starost	Pol	BMI	Ist. KVB	SBP	DBP	Hipert	Pušenje	Fiz. akt.	CRP	TC	HDL	LDL	nonHDL	TG	Apo AI	Apo B
	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)	rho (P)
Fib.	0,403 (<0,001)	0,016 (0,796)	0,386 (<0,001)	0,032 (0,609)	0,222 (<0,001)	0,173 (0,006)	-0,181 (0,004)	-0,103 (0,101)	-0,128 (0,055)	0,519 (<0,001)	0,265 (<0,001)	-0,156 (0,012)	0,233 (<0,001)	0,287 (<0,001)	0,297 (<0,001)	-0,059 (0,342)	0,257 (<0,001)
SAA	0,169 (0,007)	0,075 (0,231)	0,322 (<0,001)	0,052 (0,405)	0,150 (0,016)	0,098 (0,116)	-0,157 (0,012)	0,084 (0,181)	0,059 (0,377)	0,580 (<0,001)	0,133 (0,033)	-0,044 (0,487)	0,091 (0,145)	0,139 (0,026)	0,157 (0,011)	0,012 (0,854)	0,143 (0,022)
α1AG	0,085 (0,172)	-0,181 (0,004)	0,423 (<0,001)	-0,007 (0,910)	0,284 (<0,001)	0,244 (<0,001)	-0,211 (0,001)	-0,001 (0,989)	0,049 (0,462)	0,588 (<0,001)	0,200 (0,001)	-0,274 (<0,001)	0,221 (<0,001)	0,271 (<0,001)	0,287 (<0,001)	-0,196 (0,002)	0,300 (<0,001)
HPT	0,291 (<0,001)	0,052 (0,408)	0,221 (<0,001)	0,073 (0,244)	0,100 (0,112)	0,131 (0,036)	-0,071 (0,258)	-0,062 (0,321)	0,019 (0,779)	0,406 (<0,001)	0,162 (0,009)	-0,090 (0,148)	0,146 (0,019)	0,166 (0,008)	0,174 (0,005)	-0,016 (0,799)	0,180 (0,004)
C3	0,204 (<0,001)	0,228 (<0,001)	0,536 (<0,001)	-0,008 (0,901)	0,335 (<0,001)	0,329 (<0,001)	-0,261 (<0,001)	0,149 (0,017)	0,019 (0,778)	0,534 (<0,001)	0,319 (<0,001)	-0,236 (<0,001)	0,304 (<0,001)	0,384 (<0,001)	0,405 (<0,001)	-0,099 (0,113)	0,408 (<0,001)
C4	0,217 (<0,001)	-0,149 (0,017)	0,353 (<0,001)	-0,053 (0,401)	0,200 (0,001)	0,176 (0,005)	-0,185 (0,003)	0,050 (0,427)	-0,049 (0,463)	0,461 (<0,001)	0,281 (<0,001)	-0,160 (0,010)	0,291 (<0,001)	0,315 (<0,001)	0,253 (<0,001)	-0,057 (0,361)	0,303 (<0,001)
Pro BNP	0,425 (<0,001)	0,279 (<0,001)	-0,016 (0,796)	-0,001 (0,991)	0,041 (0,515)	0,019 (0,757)	-0,111 (0,077)	0,048 (0,445)	-0,140 (0,036)	0,008 (0,892)	-0,017 (0,785)	0,100 (0,108)	0,011 (0,862)	-0,066 (0,295)	-0,167 (0,007)	0,108 (0,085)	-0,073 (0,244)
cTnT	0,189 (0,002)	-0,101 (0,105)	0,072 (0,251)	-0,010 (0,870)	0,180 (0,004)	0,168 (0,007)	-0,080 (0,200)	0,214 (0,001)	0,005 (0,942)	-0,029 (0,645)	0,038 (0,543)	0,053 (0,395)	0,019 (0,762)	0,030 (0,637)	0,068 (0,279)	0,033 (0,597)	0,096 (0,125)
Kreat	-0,064 (0,304)	-0,545 (<0,001)	0,253 (<0,001)	-0,075 (0,229)	0,145 (0,020)	0,129 (0,039)	-0,031 (0,626)	0,063 (0,314)	0,048 (0,469)	0,105 (0,093)	0,104 (0,097)	-0,265 (<0,001)	0,077 (0,218)	0,184 (0,003)	0,276 (<0,001)	-0,181 (0,004)	0,197 (0,002)
MDR D	-0,189 (0,002)	-0,049 (0,430)	-0,191 (0,002)	0,087 (0,166)	-0,107 (0,088)	-0,086 (0,170)	0,111 (0,077)	-0,058 (0,358)	0,042 (0,535)	-0,121 (0,053)	-0,156 (0,012)	0,080 (0,203)	-0,144 (0,021)	-0,176 (0,005)	-0,169 (0,007)	0,026 (0,673)	-0,167 (0,007)
CKD	0,323 (<0,001)	0,013 (0,842)	-0,246 (<0,001)	0,067 (0,286)	-0,160 (0,011)	-0,120 (0,055)	0,152 (0,015)	-0,056 (0,375)	0,058 (0,385)	-0,175 (0,005)	-0,215 (0,001)	0,100 (0,110)	-0,206 (0,001)	-0,240 (<0,001)	-0,200 (0,001)	0,019 (0,759)	-0,233 (<0,001)
EPI	0,331 (<0,001)	-0,389 (<0,001)	0,398 (<0,001)	-0,025 (0,693)	0,295 (<0,001)	0,217 (<0,001)	-0,131 (0,036)	-0,033 (0,596)	0,033 (0,622)	0,352 (<0,001)	0,219 (<0,001)	-0,276 (<0,001)	0,184 (0,003)	0,303 (<0,001)	0,383 (<0,001)	-0,120 (0,055)	0,305 (<0,001)
CysC	-0,331 (<0,001)	0,389 (<0,001)	0,398 (<0,001)	0,025 (0,692)	-0,295 (<0,001)	-0,217 (<0,001)	0,131 (0,036)	0,033 (0,596)	-0,033 (0,622)	-0,352 (<0,001)	-0,219 (<0,001)	0,276 (<0,001)	-0,184 (0,003)	-0,303 (<0,001)	-0,383 (<0,001)	0,120 (0,055)	-0,305 (<0,001)
eGFR	-0,331 (<0,001)	0,389 (<0,001)	0,398 (<0,001)	0,025 (0,692)	-0,295 (<0,001)	-0,217 (<0,001)	0,131 (0,036)	0,033 (0,596)	-0,033 (0,622)	-0,352 (<0,001)	-0,219 (<0,001)	0,276 (<0,001)	-0,184 (0,003)	-0,303 (<0,001)	-0,383 (<0,001)	0,120 (0,055)	-0,305 (<0,001)
CysC	0,125 (0,045)	-0,484 (<0,001)	0,436 (<0,001)	-0,002 (0,968)	0,286 (<0,001)	0,270 (<0,001)	-0,174 (0,005)	0,026 (0,681)	-0,022 (0,747)	0,292 (<0,001)	0,301 (<0,001)	-0,307 (<0,001)	0,229 (<0,001)	0,393 (<0,001)	0,462 (<0,001)	-0,185 (0,003)	0,426 (<0,001)

Tabela XXVI (nastavak)

	Lp(a) rho (P)	Fib. rho (P)	SAA rho (P)	α_1 AGP rho (P)	HPT rho (P)	C3 rho (P)	C4 rho (P)	NTproBNP rho (P)	cTnT rho (P)	kreatinin rho (P)	MDRD rho (P)	CKD-EPI rho (P)	CysC rho (P)	eGFR _{CysC} rho (P)
Fib.	0,019 (0,765)													
SAA	-0,031 (0,618)	0,370 (<0,001)												
α_1 AG	0,116 (0,064)	0,330 (<0,001)	0,399 (<0,001)											
HPT	0,032 (0,612)	0,416 (<0,001)	0,278 (<0,001)	0,389 (<0,001)										
C3	0,104 (0,095)	0,365 (<0,001)	0,338 (<0,001)	0,598 (<0,001)	0,316 (<0,001)									
C4.	0,083 (0,183)	0,304 (<0,001)	0,358 (<0,001)	0,551 (<0,001)	0,301 (<0,001)	0,570 (<0,001)								
NTproBNP	-0,015 (0,815)	0,139 (0,026)	0,094 (0,132)	-0,150 (0,016)	0,120 (0,054)	-0,185 (0,003)	-0,040 (0,521)							
cTnT	0,071 (0,258)	-0,172 (0,006)	0,041 (0,511)	-0,061 (0,330)	0,040 (0,524)	0,030 (0,634)	-0,017 (0,786)	0,084 (0,178)						
Kreat	0,055 (0,377)	-0,114 (0,068)	0,052 (0,404)	0,211 (0,001)	-0,029 (0,639)	0,305 (<0,001)	0,143 (0,021)	-0,280 (<0,001)	0,222 (<0,001)					
MDRD	-0,095 (0,127)	-0,002 (0,976)	-0,191 (0,002)	-0,139 (0,025)	-0,088 (0,160)	-0,225 (<0,001)	-0,116 (0,063)	-0,025 (0,692)	-0,236 (<0,001)	-0,718 (<0,001)				
CKD EPI	-0,115 (0,065)	-0,077 (0,219)	-0,210 (0,001)	-0,156 (0,012)	-0,118 (0,059)	-0,262 (<0,001)	-0,152 (0,015)	-0,067 (0,285)	-0,266 (<0,001)	-0,705 (<0,001)	0,970 (<0,001)			
CysC	0,017 (0,785)	0,216 (<0,001)	0,161 (0,010)	0,274 (<0,001)	0,092 (0,142)	0,262 (<0,001)	0,172 (0,006)	0,021 (0,733)	0,181 (0,004)	0,542 (<0,001)	-0,456 (<0,001)	-0,497 (<0,001)		
eGFR _{CysC}	-0,017 (0,786)	-0,216 (<0,001)	-0,161 (0,010)	-0,274 (<0,001)	-0,092 (0,142)	-0,262 (<0,001)	-0,172 (0,006)	-0,021 (0,732)	-0,181 (0,004)	0,542 (<0,001)	0,456 (<0,001)	0,497 (<0,001)	-1,000 (<0,001)	
MK	0,075 (0,231)	0,060 (0,335)	0,219 (<0,001)	0,337 (<0,001)	0,106 (0,089)	0,423 (<0,001)	0,277 (<0,001)	-0,208 (0,001)	0,163 (0,009)	0,631 (<0,001)	-0,416 (<0,001)	-0,431 (<0,001)	0,507 (<0,001)	-0,507 (<0,001)

Determinanta korelacione matrice: $5,1 \times 10^{-14}$. BMI, indeks telesne mase; Ist. KVB; porodična istorija kardiovaskularnih bolesti; SBP, sistolni krvni pritisak; DBP, dijastolni krvni pritisak; Hipert., hipertenzija; Fiz. akt, fizička aktivnost; CRP, C-reaktivni protein; TC, ukupan holesterol; HDL-C, HDL holesterol; nonHDL, non-HDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apoAI, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a), Fib, fibrinogen; SAA, serumski amiloid A; α_1 AGP, α_1 -kiseli glikoprotein; Hapt, haptoglobin; C3, C3 komponenta komplemeta; C4, C4 komponenta komplemeta; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; cTnT, srčani troponin T; Kreat., kreatinin; MDRD, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu MDRD formule; CKD-EPI, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu CKD-EPI formule; CysC, cistatin C; eGFR_{CysC}, procenjena jačina glomerularne filtracije na osnovu koncentracije CysC; MK, mokraćna kiselina.

da se koristi za razlikovanje pojedinaca u ispitivanom uzorku. Glavna komponenta koja se prva izdvoji biće linearna kombinacija promenljivih koja maksimalno razlikuje ispitanike, druga po redu predstavljaće linearnu kombinaciju promenljivih čija je moć razdvajanja odmah iza prve i tako redom do poslednje izdvojene komponente (215).

Karakteristike ispitivane populacije prikazane su u *Tabeli XXV* kao broj, odnosno procenat za kategoričke parametre, srednja vrednost i Sd za parametre sa normalnom raspodelom, odnosno kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti gde ne važi normalna raspodela (što je ispitano Kolmogorov-Smirnovljevim testom, prikazanim u *Tabelama X i XVI*). U daljoj analizi korišćene su logaritamski transformisane vrednosti parametara koji nisu imali normalnu raspodelu.

Rezultati Spearmanove korelacione analize za svih 31 parametara povezanih sa kardiovaskularnim rizikom prikazani su u *Tabeli XXVI*. Većina ispitivanih biomarkera bila je u statistički značajnoj ($P < 0,05$) međusobnoj korelaciji, što je i preduslov za izvođenje analize. Determinanta korelacione matrice je bila $5,1 \times 10^{-14}$, što, pošto je manje od neophodne vrednosti od 10^{-5} , ukazuje na prisustvo multikolinearnosti (promenljive koje su u izrazitoj korelaciji) i/ili singularnosti (parametri koji su u potpunoj korelaciji). Da bi se ovaj problem uklonio, u preliminarnoj analizi identifikovani su parametri čija većina koeficijenata korelacije nije statistički značajna ($P > 0,05$) i oni koji su u međusobno snažnoj korelaciji (koeficijent korelacije veći od 0,8). Oni su isključeni iz dalje analize, a time je determinanta korelacione matrice dostigla prihvatljivu vrednost od $4,24 \times 10^{-5}$. Isključeni su: porodična istorija KVB, dijastolni krvni pritisak, fizička aktivnost, hipertenzija, pušenje, ukupan holesterol, apo A-I, apo B, Lp(a), eGFR_{MDRD}, eGFR_{CKD-EPI} i eGFR_{Cys-C}.

Da li je korelaciona matrica sa preostalih 19 parametara pogodna za izvođenje faktorske analize ispitano je Bartlettovim testom sferičnosti. Faktorska analiza je moguća ako je u matrici prisutan dovoljan broj značajnih korelacija, što se ispituje Bartlettovim testom sferičnosti, koji proverava nultu hipotezu da su sve korelacije u matrici nule. Test koristi Chi-kvadrat distribuciju. U ovom slučaju, dobijena vrednost χ^2 Bartlettovim testom iznosi

2494,998 ($P < 0,0001$) što znači da se nulta hipoteza odbacuje i korelaciona matrica može da se koristi za faktorsku analizu.

Adekvatnost veličine uzorka za faktorsku analizu, odnosno da li je uzorak dovoljno veliki da obezbedi pouzdane, tj. stabilne korelacije između promenljivih, ispituje se Kaiser-Meyer-Olkin-ovom statistikom. Kaiser-Meyer-Olkinova mera adekvatnosti uzorka (KMO) može da se kreće između 0 i 1. Vrednosti 0,5–0,7 se smatraju prosečnim, 0,7–0,8 dobrim, 0,8–0,9 odličnim, a 0,9–1 izvrsnim. Za ispitivani uzorak u ovom slučaju KMO iznosi 0,75 što znači da je adekvatne veličine za izvođenje faktorske analize.

„Karakteristični koren“ (*eigenvalue*) predstavlja relativnu snagu svakog od izdvojenih faktora, odnosno deo ukupne varijacije ispitivanih parametara koji se objašnjava zbirnim faktorom koji ih obuhvata. Dakle, što je veća vrednost karakterističnog korena veća je i uloga faktora u objašnjenju varijabilnosti kompletnog seta podataka. Pošto standardizovane promenljive imaju ovu vrednost jednaku 1, izdvajaju se oni faktori sa karakterističnim vrednostima većim od 1 za dalju analizu. Faktor će obuhvatiti one promenljive (ispitivane parametre u našem slučaju) čija varijacija učestvuje sa $\geq 25\%$ u varijaciji zbirnog faktora, što odgovara koeficijentu korelacije između faktora i promenljive (*factor loading*) od $\geq 0,50$.

Postupak kojim se omogućava jasnije razdvajanje faktora označava se kao rotacija. Vrlo često će većina promenljivih imati visoke koeficijente korelacije sa više faktora, čime će rezultati faktorske analize biti teži za interpretaciju. Rotacijom se dobija jednostavna struktura koja omogućava nedvosmislenu interpretaciju svakog faktora. U ovom slučaju primenjena je ortogonalna *varimax* rotacija, kojom se zadržava nezavisnost između formiranih glavnih komponenti i tako dobija najjednostavnija faktorska struktura.

Faktorskom analizom i na osnovu navedenih kriterijuma od 19 polaznih parametara identifikovano je 5 klastera, odnosno glavnih komponenti (faktora). Izdvojenim komponentama objašnjeno je 65,3% ukupne varijacije i to 29,0% faktorom 1; 13,2%

faktorom 2; 9,0% faktorom 3; 8,5% faktorom 4 i 5,6% faktorom 5. Faktori su označeni kao 1) „sistemska inflamacija“, koji obuhvata fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponentu komplekta, sve sa pozitivnim koeficijentom korelacije; 2) „kardiorenalni faktor“, gde se nalaze kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C i hs-cTnT, koji su u pozitivnoj korelaciji sa faktorom, i pol u negativnoj korelaciji; 3) „aterogeni holesterol“, koji grupiše

Tabela XXVII Procenat ukupne varijacije objašnjen izdvojenim faktorima

faktor	Pre ekstrakcije faktora			Posle ekstrakcije faktora			Posle rotacije†		
	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %
1	5,508	28,987	28,987	5,508	28,987	28,987	3,205	16,871	16,871
2	2,507	13,197	42,184	2,507	13,197	42,184	2,828	14,882	31,753
3	1,703	8,965	51,148	1,703	8,965	51,148	2,358	12,409	44,162
4	1,615	8,502	59,650	1,615	8,502	59,650	2,133	11,228	55,390
5	1,072	5,642	65,292	1,072	5,642	65,292	1,881	9,902	65,292
6	0,838	4,410	69,702						
7	0,784	4,125	73,827						
8	0,736	3,874	77,701						
9	0,696	3,662	81,363						
10	0,608	3,199	84,562						
11	0,505	2,658	87,220						
12	0,449	2,366	89,568						
13	0,421	2,215	91,801						
14	0,388	2,044	93,845						
15	0,335	1,764	95,609						
16	0,310	1,630	97,239						
17	0,296	1,557	98,796						
18	0,207	1,090	99,886						
19	0,022	0,114	100,000						

Eigenvalue - karakteristični koren; predstavlja relativnu snagu svakog od izdvojenih faktora na osnovu procenta ukupne varijacije objašnjene njime; izdvajaju se faktori sa vrednošću >1.

† Rotacija optimizira strukturu faktora zbog čega se relativni značaj (% varijacije) izdvojenih faktora izjednačava.

LDL i non-HDL holesterol sa pozitivnim koeficijentom korelacije; 4) „hemodinamski faktor“, gde spadaju starost i NT-proBNP u pozitivnoj korelaciji sa faktorom; i 5) „metabolički faktor“, sa trigliceridima u pozitivnoj korelaciji i HDL holesterolom u negativnoj. Predznak koeficijenta korelacije faktora i promenljive označava prirodu veze između skora promenljive i faktorskog skora kod jedne osobe. Faktorski skor zasniva se na relativnom doprinosu svih promenljivih koje ga predstavljaju. Njegovo izračunavanje

omogućava da se odredi relativni status svake osobe u odnosu na svaki faktor dobijen analizom. Prema tome, ako je koeficijent korelacije negativan, to znači da će kod osobe sa visokim skorom promenljive faktorski skor biti nizak i obrnuto. Rezultati faktorske analize prikazani su u *Tabelama XXVII i XXVIII*.

Veza između faktora, izdvojenih iz velike grupe lipidnih, inflamatornih, srčanih i bubrežnih biomarkera, i koncentracije hsCRP, kao indikatora kardiovaskularnog rizika, ispitana je logističkom regresijom. Prediktivni potencijal faktorskih skorova (koji se izračunavaju u okviru faktorske analize za svakog od učesnika i za svaki od faktora) za koncentracije hsCRP >1 mg/L, >2 mg/L i >3 mg/L ispitani su u univarijabilnoj analizi svakog od pet faktora pojedinačno i u sklopu multivarijabilnog modela sa svim faktorima zajedno. U *Tabeli XXIX* prikazani su rezultati binarne logističke regresione analize. Prediktivni potencijal svih faktora bio je veći u multivarijabilnom modelu, nego u pojedinačnim. Takođe, najbolju prediktivnu vrednost model sa svih pet faktora imao je za koncentracije hsCRP>1 mg/L, dok se značajnost potpuno izgubila ($P>0,05$) za „kardiorenalni faktor“ i „aterogeni holesterol“ u predikciji koncentracija >2 mg/L i >3 mg/L.

Upoređena je i sposobnost logističkog regresionog modela zasnovanog na izdvojenih pet faktora sa dva multivarijabilna logistička modela, prvi koji uključuje 19 parametara podvrgnutih faktorskoj analizi i drugi sa 31 polaznih biomarkera kardiovaskularnog rizika, u predikciji prisustva koncentracija hsCRP koje ukazuju na umereno povišen i visok rizik. ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analiza sposobnosti logističkih modela da predvide koncentracije hsCRP >1 mg/L, >2 mg/L i >3 mg/L prikazana je na *Slikama 5–7*. Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) tri logistička modela za ispitivane tri koncentracije hsCRP prikazano je u *Tabelama XXX–XXXII*. Logistički model 5 faktora sa AUC=0,889 nije se statistički značajno razlikovao u predviđanju koncentracije hsCRP>1 mg/L od modela sa 31 polaznih parametara (AUC=0,922) i od modela sa 19 parametara uključenih u faktorsku analizu (AUC=0,915) ($P=0,2113$ i $P=0,3359$, redom). Međutim, razlika između tri ispitivana logistička modela je bila statistički značajna u predviđanju vrednosti hsCRP>2 mg/L i hsCRP>3 mg/L. Naime,

za koncentracije hsCRP>2 mg/L AUC modela sa 5 faktora iznosila je 0,863, što je bilo statistički značajno različito od modela sa 31 parametrom (AUC=0,928; $P=0,0203$), dok razlika nije bila značajna u poređenju sa modelom sa 19 parametara (AUC=0,914;

Tabela XXVIII Klasteri identifikovani faktorskom analizom na osnovu koeficijenata korelacije između faktora i promenljivih (*factor loading*) $\geq 0,50$

Parametar	Faktor				
	Sistemska inflamacija	Kardiorenalni	Aterogeni holesterol	Hemodinamski	Metabolički
Starost	0,133	0,118	0,334	0,782	0,007
Pol	0,006	-0,618	-0,058	0,163	-0,397
BMI	0,474	0,315	0,255	0,360	0,367
Sistolni krvni pritisak	0,210	0,263	0,263	0,057	0,277
HDL holesterol	-0,076	-0,158	0,009	0,086	-0,818
LDL holesterol	0,138	0,007	0,936	0,073	-0,037
nonHDL holesterol	0,170	0,121	0,920	0,073	0,236
Log trigliceridi	0,153	0,292	0,422	0,024	0,636
Fibrinogen	0,520	-0,199	0,106	0,474	0,329
Log SAA	0,675	0,091	-0,070	0,228	-0,097
A1AGP	0,774	0,144	0,051	-0,099	0,169
Haptoglobin	0,579	-0,110	0,048	0,283	0,042
C3	0,732	0,265	0,254	-0,059	0,156
C4	0,737	0,064	0,221	-0,086	0,156
Log NT-proBNP	-0,012	-0,200	-0,128	0,761	-0,141
Log hs-cTnT	-0,062	0,544	-0,015	0,361	-0,285
Log Kreatinin	0,082	0,840	0,007	-0,196	0,109
Log Cys-C	0,150	0,638	0,024	0,405	0,245
Mokraćna kiselina	0,264	0,730	0,236	-0,089	0,187

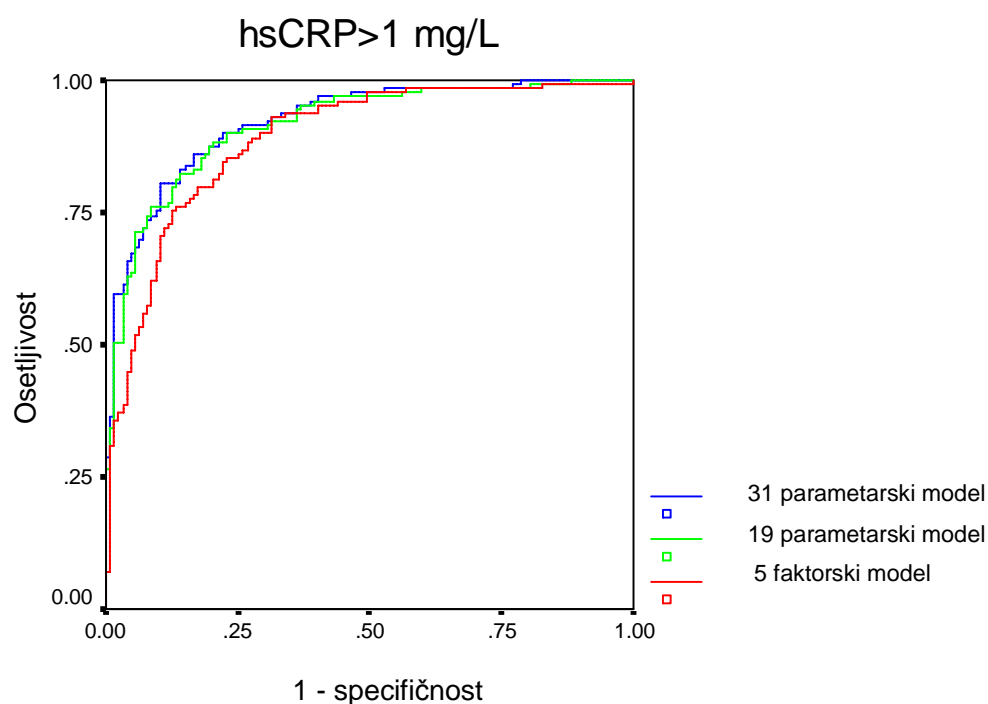
Istaknuti su koeficijenti korelacije faktora i promenljivih $>0,50$; odnosno $<-0,50$.

BMI, indeks telesne mase; SAA, serumski amiloid A; A1AGP, α_1 -kiselni glikoprotein; C3, C3 komponenta komplementa; C4, C4 komponenta komplementa; NT-proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; hs-cTnT, srčani troponin T određen visoko osetljivom metodom; Cys-C, cistatin C.

$P=0,0808$). U predikciji koncentracija hsCRP>3 mg/L, faktorski model sa AUC=0,883, statistički se značajno razlikovao od oba modela sa pojedinačnim parametrima (za model sa 31 parametrom: AUC=0,954; $P=0,0072$; za model sa 19 parametara: AUC=0,949; $P=0,0142$).

Tabela XXIX Binarna logistička regresiona analiza povezanosti faktorskih skorova sa umereno povišenim i visokim koncentracijama hsCRP (>1 mg/L, >2 mg/L, >3 mg/L)

	<i>Odds ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
hsCRP > 1 mg/L			
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	4,821	3,22–7,219	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,234	0,962–1,583	0,098
Aterogeni holesterol	1,454	1,119–1,888	0,005
Hemodinamski faktor	1,443	1,112–1,873	0,006
Metabolički faktor	1,476	1,139–1,912	0,003
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	6,529	4,058–10,503	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,442	1,041–1,997	0,028
Aterogeni holesterol	1,756	1,233–2,500	0,002
Hemodinamski faktor	1,906	1,329–2,732	<0,001
Metabolički faktor	1,090	1,359–2,701	<0,001
hsCRP > 2 mg/L			
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	4,707	3,106–7,132	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,076	0,821–1,410	0,596
Aterogeni holesterol	1,053	0,803–1,380	0,708
Hemodinamski faktor	1,340	1,023–1,754	0,033
Metabolički faktor	1,379	1,042–1,826	0,025
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	5,357	3,406–8,425	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,148	0,825–1,599	0,413
Aterogeni holesterol	1,080	0,777–1,502	0,646
Hemodinamski faktor	1,583	1,122–2,234	0,009
Metabolički faktor	1,606	1,126–2,291	<0,001
hsCRP > 3 mg/L			
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	5,051	3,169–8,052	<0,001
Kardiorenalni faktor	0,896	0,654–1,227	0,493
Aterogeni holesterol	1,132	0,834–1,534	0,426
Hemodinamski faktor	1,336	0,992–1,801	0,057
Metabolički faktor	1,594	1,151–2,208	0,005
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	6,103	3,578–10,409	<0,001
Kardiorenalni faktor	0,875	0,591–1,295	0,504
Aterogeni holesterol	1,266	0,873–1,837	0,213
Hemodinamski faktor	1,615	1,088–2,397	0,017
Metabolički faktor	1,995	1,302–3,056	0,002



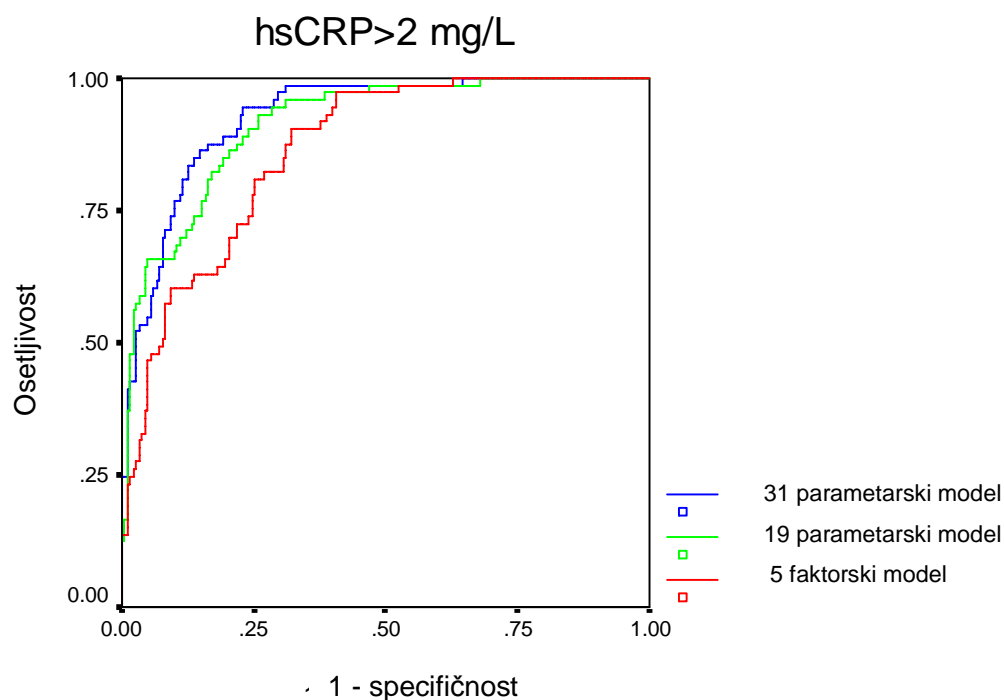
Slika 5. ROC analiza tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 1 mg/L.

Tabela XXX Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve, AUC*) tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 1 mg/L

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P</i> **
5 faktora	0,889	0,849–0,929	0,021	-	-	-
19 parametara	0,915	0,880–0,949	0,017	-0,026	-0,962	0,3359
31 parametar	0,922	0,890–0,954	0,016	-0,033	-1,250	0,2113

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnih modela sa 31, odnosno 19 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.



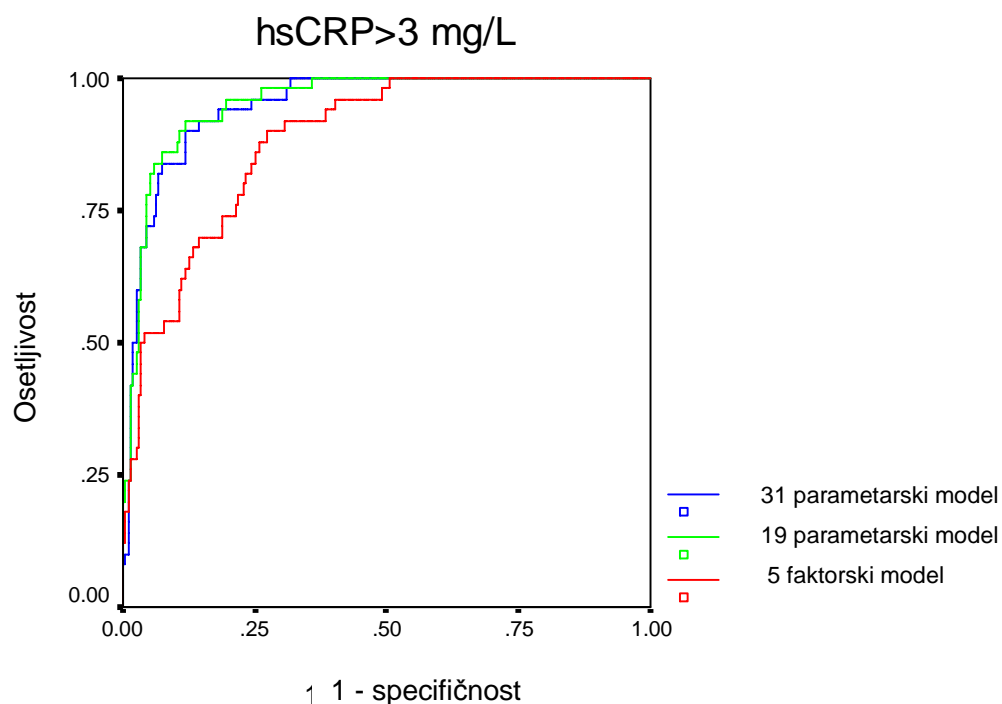
Slika 6. ROC analiza tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 2 mg/L.

Tabela XXXI Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve, AUC*) tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 2 mg/L

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	z score	P**
5 faktora	0,863	0,818–0,908	0,023	-	-	-
19 parametara	0,914	0,878–0,950	0,018	-0,051	-1,746	0,0808
31 parametar	0,928	0,896–0,959	0,016	-0,065	-2,320	0,0203

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnih modela sa 31, odnosno 19 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.



Slika 7. ROC analiza tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 3 mg/L.

Tabela XXXII Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve, AUC*) tri logistička modela za predikciju nivoa hsCRP > 3 mg/L

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P</i> **
5 faktora	0,883	0,838–0,928	0,023	-	-	-
19 parametara	0,949	0,922–0,976	0,014	-0,066	-2,451	0,0142
31 parametar	0,954	0,928–0,979	0,013	-0,071	-2,687	0,0072

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnih modela sa 31, odnosno 19 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.

U cilju utvrđivanja povezanosti hsCRP i ispitivanih biomarkera sa algoritmima procene kratkoročnog i dugoročnog rizika, izvedena je faktorska analiza sa parametarima koji ne ulaze u njihovo izračunavanje, uključujući i hsCRP. U poređenju sa prethodnom analizom, isključeni su pol, starost, BMI, ukupan i HDL holesterol i sistolni krvni pritisak. U analizu su ovom prilikom uključeni apo A-I, apo B i Lp(a). Rezultati Spearmanove korelacione analize prikazani su u *Tabeli XXXIII*. Determinanta korelacione matrice bila je $1,74 \times 10^{-5}$, što je $>10^{-5}$ i znači da nije bila prisutna multikolinearnost ili singularnost između 18 ispitivanih parametara. Dobijena vrednost χ^2 Bartlettovim testom sferičnosti iznosila je 2730,936 ($P < 0,0001$), što ukazuje da je u matrici prisutan dovoljan broj značajnih korelacija za izvođenje faktorske analize. Vrednost KMO od 0,76 je potvrdio da je veličina uzorka adekvatna da obezbedi stabilne korelacije između promenljivih. Rezultati faktorske analize prikazani su u *Tabelama XXXIV i XXXV*.

Faktorskom analizom je od 18 polaznih parametara identifikovano 5 klastera, odnosno glavnih komponenti (faktora). Izdvojenim komponentama objašnjeno je 67,4% ukupne varijacije i to 29,7% faktorom 1; 12,5% faktorom 2; 11,0% faktorom 3; 7,6% faktorom 4 i 6,7% faktorom 5. Faktori su označeni kao 1) „sistemska inflamacija“, koji obuhvata hsCRP, fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponentu komplementa; 2) „aterogena dislipidemija“, koji grupiše LDL i non-HDL holesterol, apo B i trigliceride; 3) „kardiorenalni faktor“, gde se nalaze kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C i hs-cTnT; 4) „hemodinamski faktor“, gde je izdvojen NT-proBNP; i 5) „lipoproteinski faktor“, sa apo A-I i Lp(a). Svi parametri su bili u pozitivnoj korelaciji sa odgovarajućim faktorom.

Logističkom regresijom je ispitana veza između faktora, izdvojenih iz grupe od 18 lipidnih, inflamatornih, srčanih i bubrežnih biomarkera koji nisu uključeni u algoritme procene rizika. Prediktivni potencijal faktorskih skorova za $FRS > 10\%$, globalni $FRS > 10\%$ i povećan 30-godišnji rizik za „kompletnu KVB“ i „tešku KVB“ ispitani su u univarijabilnoj analizi svakog od pet faktora pojedinačno i u sklopu multivarijabilnog modela sa svim faktorima zajedno. Rezultati binarne logističke regresione analize prikazani su u *Tabelama XXXVI–XXXVIII*. Prediktivni potencijal svih faktora bio je veći u multivarijabilnim

Tabela XXXIII Spearmanova korelaciona analiza 18 parametara koji nisu uključeni u algoritme skorova rizika u populaciji učesnika (N=242)

	CRP rho (P)	LDL rho (P)	nonHDL rho (P)	TG rho (P)	apoA-I rho (P)	apoB rho (P)	Lp(a) rho (P)	Fib rho (P)	SAA rho (P)	A1AG rho (P)	HPT rho (P)	C3 rho (P)	C4 rho (P)	proBNP rho (P)	cTnT rho (P)	Kreat. rho (P)	CysC rho (P)
LDL	0,280 (<0,001)																
non HDL	0,377 (<0,001)	0,887 (<0,001)															
TG	0,362 (<0,001)	0,343 (<0,001)	0,664 (<0,001)														
apoAI	-0,104 (0,096)	0,026 (0,682)	-0,107 (0,088)	-0,289 (<0,001)													
apoB	0,380 (<0,001)	0,843 (<0,001)	0,940 (<0,001)	0,658 (<0,001)	-0,148 (0,017)												
Lp(a)	0,011 (0,863)	0,221 (<0,001)	0,153 (0,014)	-0,024 (0,701)	0,098 (0,116)	0,155 (0,013)											
Fib.	0,519 (<0,001)	0,233 (<0,001)	0,287 (<0,001)	0,297 (<0,001)	-0,059 (0,342)	0,019 (<0,001)	0,019 (0,765)										
SAA	0,580 (<0,001)	0,091 (0,145)	0,139 (0,026)	0,157 (0,011)	0,012 (0,854)	0,143 (0,022)	-0,031 (0,618)	0,370 (<0,001)									
A1AG	0,588 (<0,001)	0,221 (<0,001)	0,271 (<0,001)	0,287 (<0,001)	-0,196 (0,002)	0,300 (<0,001)	0,116 (0,064)	0,330 (<0,001)	0,399 (<0,001)								
HPT	0,406 (<0,001)	0,146 (0,019)	0,166 (0,008)	0,174 (0,005)	-0,016 (0,799)	0,180 (0,004)	0,032 (0,612)	0,416 (<0,001)	0,278 (<0,001)	0,389 (<0,001)							
C3	0,534 (<0,001)	0,304 (<0,001)	0,384 (<0,001)	0,405 (<0,001)	-0,099 (0,013)	0,408 (<0,001)	0,104 (0,095)	0,365 (<0,001)	0,383 (<0,001)	0,598 (<0,001)	0,316 (<0,001)						
C4	0,461 (<0,001)	0,291 (<0,001)	0,315 (<0,001)	0,253 (<0,001)	-0,057 (0,361)	0,303 (<0,001)	0,083 (0,183)	0,304 (<0,001)	0,358 (<0,001)	0,551 (<0,001)	0,301 (<0,001)	0,570 (<0,001)					
pro BNP	0,008 (0,892)	0,011 (0,862)	-0,066 (0,295)	-0,167 (0,007)	0,108 (0,085)	-0,073 (0,244)	-0,015 (0,815)	0,139 (0,026)	0,094 (0,132)	-0,150 (0,016)	0,120 (0,054)	-0,185 (0,003)	-0,040 (0,521)				
cTnT	-0,029 (0,645)	0,019 (0,762)	0,030 (0,637)	0,068 (0,279)	0,033 (0,597)	0,096 (0,125)	0,071 (0,258)	-0,172 (0,006)	0,041 (0,511)	-0,061 (0,330)	0,040 (0,524)	0,030 (0,634)	-0,017 (0,786)	0,084 (0,178)			
Kreat	0,105 (0,093)	0,077 (0,218)	0,184 (0,003)	0,276 (<0,001)	-0,181 (0,004)	0,197 (0,002)	0,055 (0,377)	-0,114 (0,068)	0,052 (0,404)	0,211 (0,001)	-0,029 (0,639)	0,305 (<0,001)	0,143 (0,021)	-0,280 (<0,001)	0,222 (<0,001)		
CysC	0,352 (<0,001)	0,184 (0,003)	0,303 (<0,001)	0,383 (<0,001)	-0,120 (0,055)	0,305 (<0,001)	0,017 (0,785)	0,216 (<0,001)	0,161 (0,010)	0,274 (<0,001)	0,092 (0,142)	0,262 (<0,001)	0,172 (0,006)	0,021 (0,733)	0,181 (0,004)	0,542 (<0,001)	
MK	0,292 (<0,001)	0,229 (<0,001)	0,393 (<0,001)	0,462 (<0,001)	-0,185 (0,003)	0,426 (<0,001)	0,075 (0,231)	0,060 (0,335)	0,219 (<0,001)	0,337 (<0,001)	0,106 (0,089)	0,423 (<0,001)	0,277 (<0,001)	-0,208 (0,001)	0,163 (0,009)	0,631 (<0,001)	0,507 (<0,001)

Determinanta korelacione matrice: $1,74 \times 10^{-5}$. CRP, C-reaktivni protein; nonHDL, non-HDL holesterol; LDL-C, LDL holesterol; TG, trigliceridi; apoAI, apolipoprotein A-I; apoB, apolipoprotein B; Lp(a), lipoprotein (a), Fib, fibrinogen; SAA, serumski amiloid A; A₁AGP, α₁-kiselni glikoprotein; HPT, haptoglobin; C3, C3 komponenta komplekta; C4, C4 komponenta komplekta; proBNP, amino terminalni pro-natriuretski peptid tip B; cTnT, srčani troponin T; Kreat., kreatinin; CysC, cistatin C; MK, mokraćna kiselina.

modelima, nego u pojedinačnim. U predikciji vrednosti povećanog rizika na osnovu FRS (>10%), faktor „sistemske inflamacije“ nije imao statistički značaj, dok je kod globalnog FRS to bio slučaj sa „lipoproteinskim faktorom“. Kod procene 30-godišnjeg rizika i od „kompletne“ i od „teške“ KVB, za vrednosti iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost „hemodinamski faktor“ nije imao statistički značajan prediktivni potencijal.

Tabela XXXIV Procenat ukupne varijacije objašnjen izdvojenim faktorima

faktor	Pre ekstrakcije faktora			Posle ekstrakcije faktora			Posle rotacije†		
	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %	<i>eigenvalue</i> *	% varijacije	kumulativni %
1	5,337	29,652	29,652	5,337	29,652	29,652	3,656	20,314	20,314
2	2,244	12,467	42,119	2,244	12,467	42,119	3,295	18,305	38,618
3	1,985	11,028	53,146	1,985	11,028	53,146	2,290	12,725	51,343
4	1,360	7,553	60,700	1,360	7,553	60,700	1,583	8,795	60,138
5	1,203	6,681	67,381	1,203	6,681	67,381	1,304	7,243	67,381
6	0,885	4,917	72,299						
7	0,823	4,574	76,873						
8	0,709	3,939	80,811						
9	0,654	3,631	84,443						
10	0,555	3,082	87,524						
11	0,505	2,804	90,328						
12	0,431	2,392	92,721						
13	0,375	2,086	94,807						
14	0,310	1,724	96,530						
15	0,303	1,684	98,215						
16	0,239	1,326	99,541						
17	0,061	0,341	99,882						
18	0,021	0,118	100,000						

* *Eigenvalue* - karakteristični koren; predstavlja relativnu snagu svakog od izdvojenih faktora na osnovu procenta ukupne varijacije objašnjene njime; izdvajaju se faktori sa vrednošću >1.

† Rotacija optimizira strukturu faktora zbog čega se relativni značaj (% varijacije) izdvojenih faktora izjednačava.

Tabela XXXV Klasteri identifikovani faktorskom analizom na osnovu koeficijena korelacije između faktora i promenljivih (*factor loading*) $\geq 0,50$

Parametar	Faktor				
	Sistemska inflamacija	Aterogena dislipidemija	Kardiorenalni	Hemodinamski	Lipoproteinski
LDL holesterol	0,129	0,904	-0,019	0,033	0,220
Non-HDL holesterol	0,183	0,962	0,107	-0,034	-0,014
Log trigliceridi	0,202	0,577	0,313	-0,153	-0,439
Apo A-I	-0,058	-0,068	-0,130	0,173	0,672
Apo B	0,187	0,943	0,139	-0,039	-0,004
Lp(a)	0,066	0,183	0,105	-0,112	0,700
Log CRP	0,788	0,180	0,135	0,112	-0,115
Fibrinogen	0,614	0,220	-0,073	0,406	-0,209
Log SAA	0,675	-0,052	0,159	0,228	-0,022
AIAGP	0,770	0,078	0,115	0,115	0,006
Haptoglobin	0,588	0,109	-0,027	0,269	0,030
C3	0,705	0,246	0,207	-0,268	0,015
C4	0,713	0,175	-0,004	-0,220	0,101
Log NT-proBNP	0,058	-0,072	-0,010	0,805	0,083
Log hs-cTnT	-0,085	-0,008	0,616	0,326	0,140
Log Kreatinin	0,054	0,033	0,789	-0,388	-0,038
Log Cys-C	0,235	0,121	0,742	0,160	-0,112
Mokraćna kiselina	0,240	0,279	0,690	-0,310	-0,104

Istaknuti su koeficijenti korelacije faktora i promenljivih $>0,50$; odnosno $<-0,50$.

Tabela XXXVI Binarna logistička regresiona analiza povezanosti faktorskih skorova sa vrednostima 10-godišnjeg kardiovaskularnog rizika $>10\%$ na osnovu FRS

	FRS $>10\%$		
	Odds ratio	95% CI	P
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	1,213	0,874–1,683	0,248
Aterogena dislipidemija	2,755	1,902–3,990	$<0,001$
Kardiorenalni faktor	1,782	1,277–2,485	0,001
Hemodinamski faktor	1,702	1,215–2,385	0,002
Lipoproteinski faktor	0,766	0,548–1,071	0,119
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	1,224	0,804–1,862	0,346
Aterogena dislipidemija	3,726	2,371–5,857	$<0,001$
Kardiorenalni faktor	2,170	1,441–3,268	$<0,001$
Hemodinamski faktor	1,909	1,300–2,805	0,001
Lipoproteinski faktor	0,686	0,434–1,017	0,060

Tabela XXXVII Binarna logistička regresiona analiza povezanosti faktorskih skorova sa vrednostima globalnog 10-godišnjeg kardiovaskularnog rizika >10% na osnovu globalnog FRS

	Globalni FRS>10%		
	<i>Odds ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	1,435	1,094–1,881	0,009
Aterogena dislipidemija	2,640	1,897–3,673	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,708	1,292–2,259	<0,001
Hemodinamski faktor	1,896	1,406–2,557	<0,001
Lipoproteinski faktor	0,932	0,714–1,217	0,606
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	1,693	1,196–2,397	0,003
Aterogena dislipidemija	3,265	2,242–4,754	<0,001
Kardiorenalni faktor	2,046	1,458–2,871	<0,001
Hemodinamski faktor	2,294	1,604–3,282	<0,001
Lipoproteinski faktor	0,888	0,641–1,231	0,476

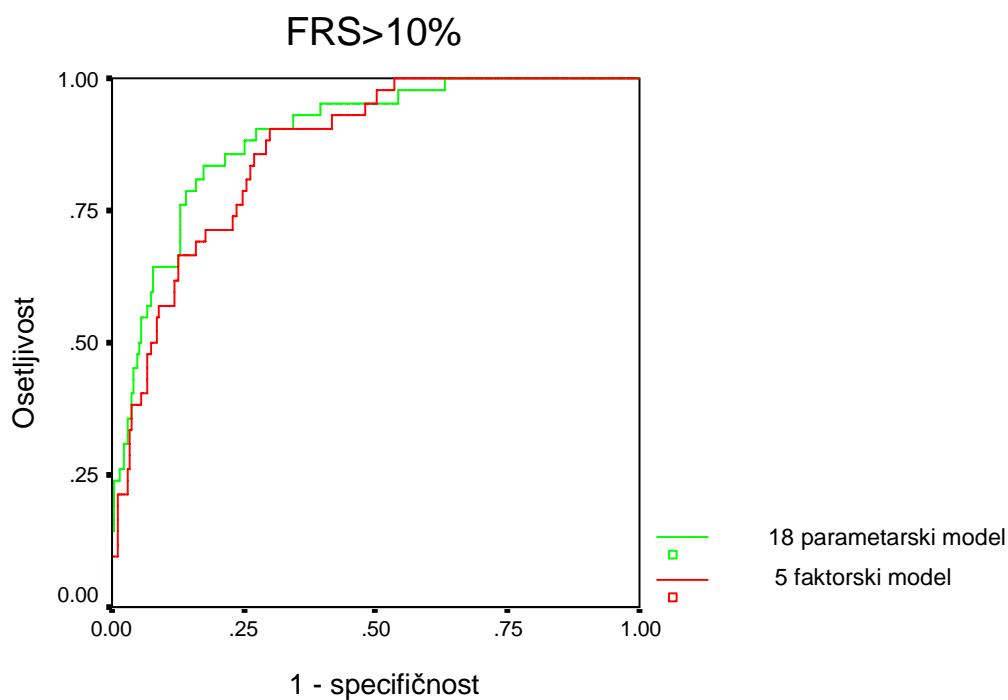
Upoređena je i sposobnost logističkog regresionog modela zasnovanog na izdvojenih pet faktora sa multivarijabilnim logističkim modelom sa 18 polaznih parametara koji nisu uključeni u algoritme procene rizika, u predikciji vrednosti FRS>10%, globalnog FRS>10% i povećanog 30-godišnjeg rizika za „kompletnu KVB“ i „tešku KVB“. ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analiza sposobnosti logističkih modela da predvide rezultate procene rizika na osnovu algoritama prikazana je na *Slikama 8–11*. Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) četiri logistička modela za ispitivane povišene vrednosti rizik skorova prikazano je u *Tabelama XXXIX–XLII*.

Logistički model sa 5 faktora nije se statistički razlikovao u predviđanju vrednosti ispitivanih algoritama procene rizika koji ukazuju na povećan kardiovaskularni rizik, pošto AUC ni u jednom slučaju nisu bili statistički značajno različiti od onih dobijenih modelom sa 18 pojedinačnih, polaznih parametara.

Tabela XXXVIII Binarna logistička regresiona analiza povezanosti faktorskih skorova sa vrednostima 30-godišnjeg kardiovaskularnog rizika za „kompletnu“ i „tešku“ KVB iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost

	<i>Odds ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
30-godišnji rizik za „kompletnu KVB“> opt/norm			
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	1,540	1,111–2,137	0,010
Aterogena dislipidemija	4,176	2,575–6,774	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,836	1,282–2,629	0,001
Hemodinamski faktor	0,852	0,619–1,172	0,326
Lipoproteinski faktor	0,574	0,411–0,803	0,001
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	1,892	1,279–2,797	0,001
Aterogena dislipidemija	5,590	3,131–9,978	<0,001
Kardiorenalni faktor	2,240	1,403–3,577	0,001
Hemodinamski faktor	0,776	0,493–1,223	0,275
Lipoproteinski faktor	0,453	0,292–0,704	<0,001
30-godišnji rizik za „tešku KVB“> opt/norm			
<u>Modeli sa pojedinačnim faktorima</u>			
Sistemska inflamacija	1,711	1,232–2,377	0,001
Aterogena dislipidemija	4,255	2,637–6,868	<0,001
Kardiorenalni faktor	1,776	1,256–2,512	0,001
Hemodinamski faktor	0,836	0,612–1,143	0,261
Lipoproteinski faktor	0,591	0,427–0,819	0,002
<u>Model sa pet faktora</u>			
Sistemska inflamacija	2,199	1,473–3,285	<0,001
Aterogena dislipidemija	5,931	3,309–10,633	<0,001
Kardiorenalni faktor	2,183	1,380–3,454	0,001
Hemodinamski faktor	0,749	0,477–1,178	0,211
Lipoproteinski faktor	0,471	0,306–0,724	0,001

KVB, kardiovaskularna bolest; opt/norm, optimalan/normalan rizik.



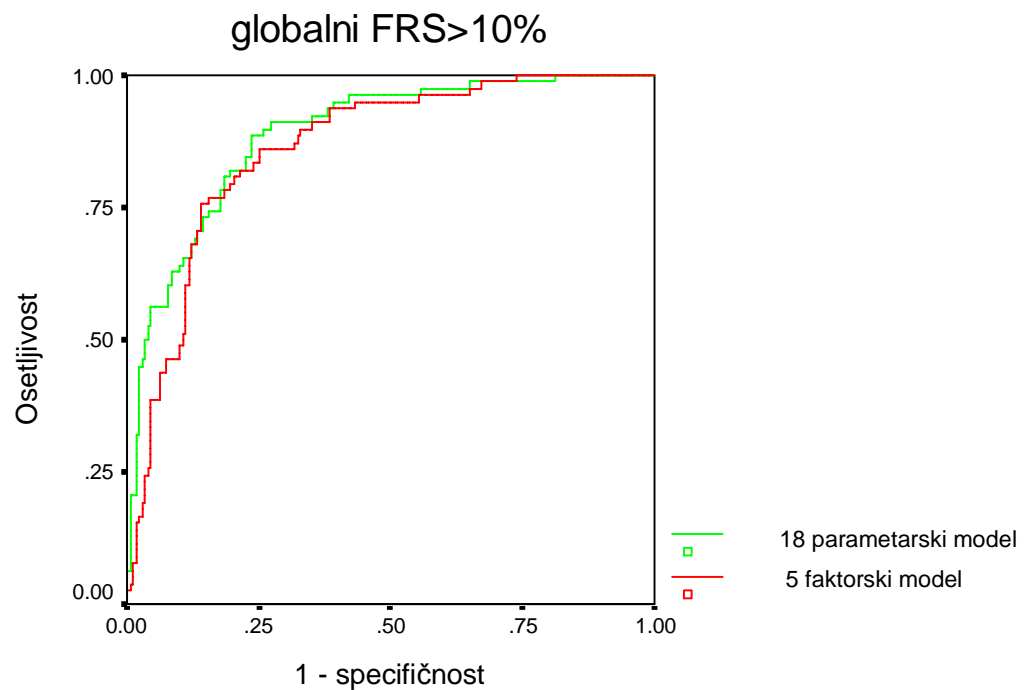
Slika 8. ROC analiza dva logistička modela za predikciju vrednosti FRS>10%.

Tabela XXXIX Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) dva logistička modela za predikciju vrednosti FRS>10%

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P**</i>
5 faktora	0,864	0,812–0,916	0,026	-	-	-
18 parametara	0,891	0,842–0,940	0,025	-0,027	-0,749	0,4541

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnog modela sa 18 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.



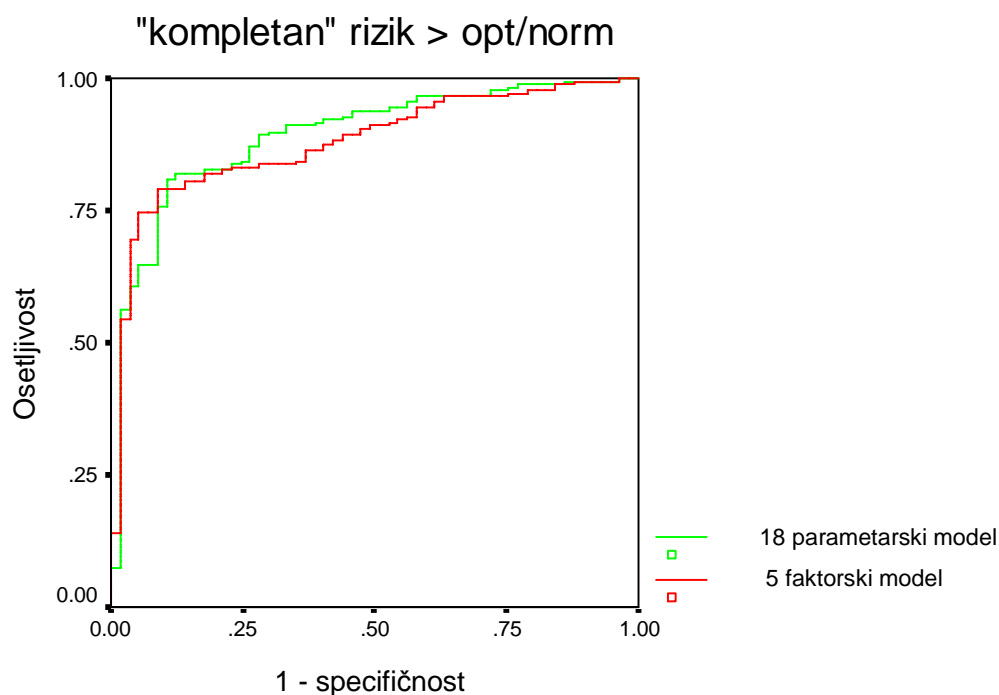
Slika 9. ROC analiza dva logistička modela za predikciju vrednosti globalnog FRS>10%.

Tabela XL Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) dva logistička modela za predikciju vrednosti globalnog FRS>10%

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P**</i>
5 faktora	0,862	0,815–0,908	0,024	-	-	-
18 parametara	0,889	0,847–0,931	0,022	-0,027	-0,829	0,4069

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnog modela sa 18 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.



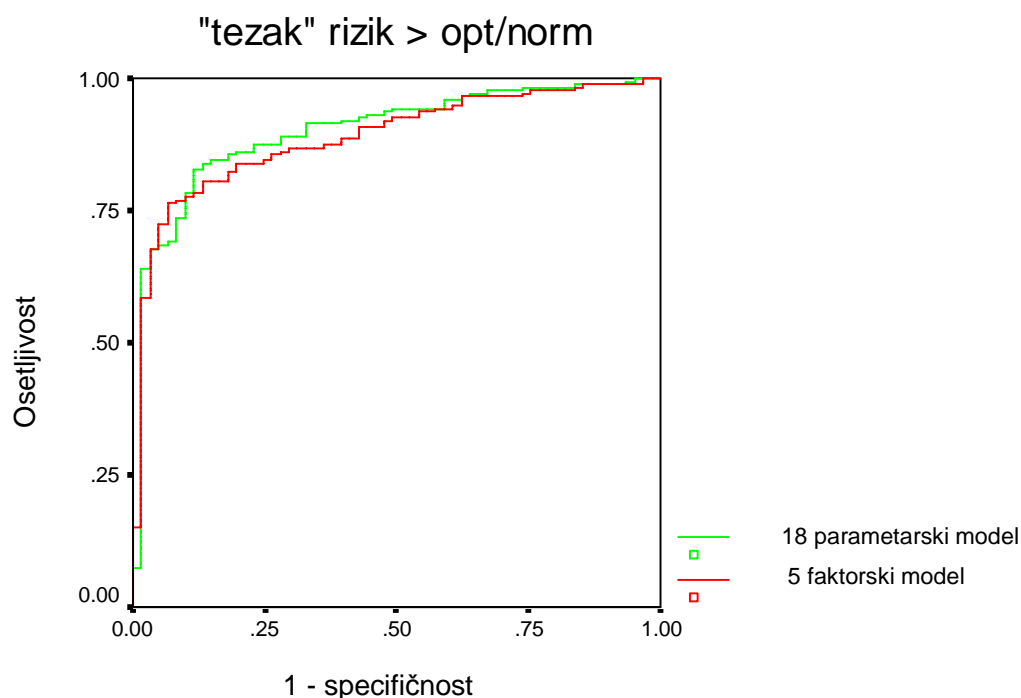
Slika 10. ROC analiza dva logistička modela za predikciju vrednosti 30-godišnjeg kardiovaskularnog rizika za pojavu „kompletne“ KVB iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost.

Tabela XLI Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve*, AUC) dva logistička modela za predikciju vrednosti 30-godišnjeg kardiovaskularnog rizika za pojavu „kompletne“ KVB iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P</i> **
5 faktora	0,881	0,834–0,928	0,024	-	-	-
18 parametara	0,892	0,845–0,940	0,024	-0,011	-0,324	0,7459

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnog modela sa 18 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.



Slika 11. ROC analiza dva logistička modela za predikciju vrednosti 30-godišnjeg kardiovaskularnog rizika za pojavu „teške“ KVB iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost.

Tabela XLII Poređenje površina ispod ROC krivih (*Area Under the ROC Curve, AUC*) dva logistička modela za predikciju vrednosti 30-godišnjeg kardiovaskularnog rizika za pojavu „teške“ KVB iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost

Logistički model	AUC	95% CI	SE	Δ AUC*	<i>z score</i>	<i>P</i> **
5 faktora	0,888	0,844–0,933	0,023	-	-	-
18 parametara	0,901	0,857–0,945	0,022	-0,013	-0,408	0,6829

*Razlika između AUC faktorskog logističkog modela i zbirnog modela sa 18 polaznih parametara.

** $P < 0,05$ – statistički značajna razlika između AUC.

5. DISKUSIJA

Vodeći uzrok mortaliteta u razvijenim zemljama sveta danas predstavljaju KVB. Iz tog razloga, kao prioriteta zdravstvene zaštite nameću se mere prevencije rizika, detekcije i tretmana faktora rizika, rane identifikacije i terapije srčanog i moždanog udara i prevencija rekurentnih kardiovaskularnih događaja. Prema tome, od kritične važnosti je identifikacija biomarkera koji će omogućiti bolje prepoznavanje pacijenata sa koronarnom bolešću, odnosno onih koji mogu imati koristi od intenzivnog tretmana u primarnoj prevenciji.

Postoje brojne preporuke u okviru nacionalnih vodiča za prevenciju i lečenje KVB, kao što je američki NCEP ATP III (18) i smernice Komiteta Evropskog udruženja kardiologa za kliničke vodiče (27). Njihov cilj je da identifikuju više asimptomatskih osoba, naizgled bez kliničkih simptoma KBS, ali sa dovoljno visokim rizikom za pojavu koronarnih komplikacija u budućnosti, kod kojih će biti opravdana primena intenzivnih mera redukcije rizika. U okviru ovih preporuka definisani su specifični faktori rizika, uključujući ukupan, LDL i HDL holesterol, koji su inkorporirani u algoritme procene rizika za pojavu KVB, kao što je FRS (8). Međutim, pokazalo se da ovi prediktivni modeli zasnovani na konvencionalnim faktorima rizika imaju tačnost manju od očekivane, jer i pored njihove primene značajan procenat kardiovaskularnih komplikacija ostaje nedetektovan u primarnoj prevenciji. Iz tog razloga neprekidno se traže novi kriterijumi kojima će se poboljšati procena kardiovaskularnog rizika (216). To su obično novi biomarkeri, koji se označavaju i kao *emerging*, odnosno „u nastajanju“, zato što su povezani sa povećanim rizikom za KVB, ali njihov uzročni, nezavisni i kvantitativni doprinos KVB nije toliko dobro dokumentovan kao u slučaju već dugo ustanovljenih faktora rizika – dislipidemije, povišenog krvnog pritiska i pušenja. Biomarkeri „u nastajanju“ ne moraju biti novi u smislu nedavnog otkrića, već to može biti i od ranije poznati marker za koji su tek nedavno postali dostupni dokazi da je efikasan i nezavisan u identifikaciji rizika ili praćenju terapije (217).

Upotreba tradicionalnih faktora rizika na osnovu zvaničnih preporuka zasnovana je na snažnim dokazima o njihovoj ulozi u patogenezi KVB. Međutim, uloga novih faktora rizika

u primarnoj prevenciji nije toliko jasna i pre njihovog uvođenja u kliničku praksu neophodna je njihova kritička procena na osnovu određenih kriterijuma – da li postoje odgovarajuće analitičke metode za njihovo određivanje, da li nose dodatnu informaciju u odnosu na postojeće testove i da li će doprineti boljem tretmanu pacijenta (50).

Uloga inflamacije u patofiziologiji ateroskleroze je postala opšte prihvaćena u poslednjoj deceniji (56). Iz tog razloga ispitivan je veliki broj biomarkera inflamacije u proceni kardiovaskularnog rizika, ali se od svih izdvojio hsCRP kao najviše proučavan. Brojni eksperimenti su potvrdili ulogu hsCRP u regulaciji funkcije endotelnih ćelija, glatkih mišićnih ćelija i monocita/makrofaga, u biologiji matriksa i koagulaciji, što može doprineti aterogenezi (57). Takođe, rezultati brojnih prospektivnih studija obezbedili su dokaze o povezanosti viših koncentracija hsCRP sa kardiovaskularnim komplikacijama u budućnosti (pre svega KBS i šlog) nezavisno od tradicionalnih faktora rizika. Na osnovu toga, CDC/AHA i NACB u svojim preporukama za upotrebu novih biomarkera u primarnoj prevenciji, navode određivanje hsCRP kod osoba sa intermedijernim rizikom procenjenim na osnovu standardnih algoritama (10–20%), kod kojih izbor preventivnog tretmana nije jasno definisan (106, 187). Vrednosti $<1,0$ mg/L identifikuju osobe sa niskim rizikom, između 1,0 i 3,0 mg/L one sa umerenim rizikom i vrednosti >3 mg/L identifikuju osobe sa visokim rizikom, što odgovara tercilnim vrednostima distribucije u zdravoj populaciji.

Pošto je u svrhu procene rizika neophodno klasifikovati osobe u kategorije korišćenjem specifičnih *cut off* vrednosti, analitičke metode koje se koriste moraju da budu pouzdane u određivanju niskih koncentracija hsCRP. To podrazumeva određene kriterijume u smislu granice detekcije i reproducibilnosti, odnosno nepreciznosti određivanja, koja bi trebalo da bude $<10\%$ u celom opsegu linearnosti testa (111). Iz tog razloga, u ovom radu su prvo ispitane analitičke karakteristike imunoturbidimetrijske metode koja se koristila za određivanje hsCRP. Takođe, analizirano je i njeno slaganje u klasifikaciji rizika sa imunonefelometrijskom metodom koja je prva odobrena od strane američke Administracije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA) za upotrebu u proceni kardiovaskularnog rizika.

Ateroskleroza je bolest uslovljena brojnim faktorima. Pored hronične inflamacije niskog intenziteta i dislipidemije, kao već ustanovljenih činilaca, sve je više podataka o drugim faktorima koji odražavaju intenzitet aterosklerotskih procesa i koji bi mogli da identifikuju doprinos kardiovaskularnom riziku koji ne potiče od tradicionalnih faktora rizika. U ovom radu izdvojeni su mokraćna kiselina, markeri bubrežne funkcije, pre svega kreatinin, Cys-C i jačina glomerularne filtracije procenjena jednačinama u koje su oni inkorporirani, i parametri funkcije srca – NT-proBNP, kao pokazatelj izloženosti miokarda hemodinamskom stresu, i hs-cTnT, kao marker nekroze miokarda. Ovi parametri, zajedno sa apolipoproteinima i drugim proteinima osetljivim na inflamaciju, analizirani su u smislu povezanosti sa hsCRP, kao već ustanovljenog biomarkera proaterogenog metaboličkog stanja. Ispitana je i raspodela rizika u ispitivanoj populaciji procenjenog na osnovu tri algoritma zasnovana na tradicionalnim faktorima rizika i vrednosti hsCRP. S obzirom da je veliki broj ispitivanih parametara u međusobnoj korelaciji, primenjena je faktorska analiza, metoda analize glavnih komponenti, kojom su izdvojeni nezavisni faktori. Tako dobijeni faktori predstavljaju linearnu kombinaciju polaznih parametara koja odgovara jednoj dimenziji u patofiziološkom procesu ateroskleroze. Takođe, faktorskom analizom je ispitana i povezanost biomarkera, uključujući i hsCRP, sa povećanim 10-godišnjim i 30-godišnjim rizikom procenjenim na osnovu algoritama.

5.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODE VISOKE OSETLJIVOSTI ZA ODREĐIVANJE CRP

Zahtevi u pogledu analitičkih karakteristika metoda za određivanje CRP su se značajno promenili otkako je priznata njegova uloga kao prognostičkog markera KVB. To su zahtevi koji se odnose pre svega na nepreciznost određivanja, pošto je potrebna veća osetljivost testova za merenje koncentracija CRP koje se smatraju normalnim u smislu praćenja akutne inflamacije, odnosno koje su u okviru referentnog intervala tradicionalnih testova (<10 mg/L). Iz tog razloga dizajniran je veliki broj testova visoke osetljivosti za određivanje CRP radi procene kardiovaskularnog rizika (111, 218–220). Zbog niskih vrednosti

neophodnih za procenu rizika na osnovu *cut off* koncentracija od 1 mg/L i 3 mg/L prema CDC/AHA i NACB preporukama, neophodno je da metode za određivanje hsCRP bude standardizovane za vrednosti u intervalu 0,2–10 mg/L.

Predloženo je da neophodna nepreciznost hsCRP testa za stratifikaciju rizika od KVB pri koncentraciji od 0,2 mg/L bude $\leq 10\%$ i da granica detekcije bude $\sim 0,1$ mg/L (111). Analizom osam serumskih *pool*-ova u opsegu koncentracija hsCRP 0,2–10,0 mg/L *Olympus* imunoturbidimetrijskim testom dobijeni su koeficijenti varijacije $< 10\%$ i u seriji i iz dana u dan. Dobijeni koeficijenti varijacije kretali su se u intervalu 0,38–8,16% u seriji i 3,68–9,63% iz dana u dan (*Tabela VIII*). Pošto je dobijena nepreciznost $< 10\%$ u celom ispitivanom opsegu, *Olympus* imunoturbidimetrijski test zadovoljava definisane kriterijume u pogledu reproducibilnosti za procenu kardiovaskularnog rizika. Takođe, test zadovoljava i u pogledu osetljivosti, odnosno dobijena je granica detekcije od 0,11 mg/L.

Olympus imunoturbidimetrijska metoda je bila u dobroj korelaciji sa imunonefelometrijskom *Dade Behring CardioPhase** hsCRP metodom, preporučenom od strane FDA, u opsegu koncentracija 0,15–10,0 mg/L. To su potvrdile i ponderisana Demingova regresiona analiza i Bland-Altman dijagram razlika (*Slika 3*). Koeficijent korelacije dobijen ponderisanom Demingovom regresijom iznosio je $r=0,992$. Ni sistematska ni procentualna greška nisu bile statistički značajne. Srednja vrednost relativne razlike na Bland-Altman dijagramu iznosila je $-0,002\%$ ((95% CI = $-0,082 - 0,078\%$). Student t-test razlike parova određivanja pokazao je da dobijena razlika nije statistički značajna. Međutim, dijagram relativnih razlika je pokazao rasipanje veće od 2Sd kod koncentracija > 5 mg/L. Ovo može biti posledica razlika u kalibraciji (111, 218–222), faktora karakterističnih za individualne uzorke ili metodoloških razlika između nefelometrijskih i turbidimetrijskih sistema (223). Iako je kalibracija oba testa slediva do istog primarnog referentnog materijala, razlike su ipak postojale. Ovaj problem je dobro poznat i posledica je različitih razblaženja primarnog referentnog materijala koje proizvođači koriste za kalibraciju svojih testova (116). Tek nedavno je komitet za

standardizaciju CDC definisao jedinstveni protokol transfera vrednosti, što bi trebalo da doprinese harmonizaciji rezultata dobijenih različitim imunometrijskim metodama (117).

Rezultati slaganja *Olympus* imunoturbidimetrijske metode sa imunonefelometrijskom u sposobnosti klasifikacije rizika pokazuju da se 95,5% vrednosti određenih dvema metodama svrstava u istu kategoriju rizika (*Slika 4*). U višu kategoriju je raspoređeno 1,5% vrednosti i 3,1% rezultata je svrstano u nižu kategoriju rizika u odnosu na klasifikaciju definisanu vrednostima dobijenim imunonefelometrijskom metodom. Da ova razlika nije statistički značajna potvrđeno je Student t-testom razlika između srednjih vrednosti rezultata dobijenih dvema metodama u svim klasama kardiovaskularnog rizika, gde je kategorizacija u odgovarajuće klase izvršena je na osnovu rezultata imunonefelometrijske metode. Dobijeni rezultati se ne slažu sa objavljenim poređenjem *Olympus* imunoturbidimetrijske i *Dade Behring* imunonefelometrijske metode, gde je slaganje bilo samo 74,0% (218). Međutim, u tom radu ispitivano je slaganje u klasifikaciji rizika na osnovu *cut off* vrednosti koje su odgovarale kvartilnim vrednostima ispitivane populacije, dok su ovde primenjene granične vrednosti preporučene od strane CDC/AHA vodiča koje odgovaraju tercilima raspodele u zdravoj populaciji.

5.2. POREĐENJE VREDNOSTI LIPIDNIH I INFLAMATORNIH BIOMARKERA SA hsCRP

Inflamatorna etiologija ateroskleroze je usmerila istraživanja o proceni rizika za KVB prema biomarkerima inflamacije. Prvi biomarker inflamacije preporučen od strane CDC/AHA ekspertske grupe kao opcija u proceni rizika bio je hsCRP. Kasnije je uvršten i u NACB LMPG preporuke za upotrebu novih laboratorijskih biomarkera kardiovaskularnog rizika u primarnoj prevenciji kao jedini biomarker koji je zadovoljio sve neophodne kriterijume za procenu rizika (53). Međutim, paralelno sa istraživanjima biomarkera inflamacije ispitivana je i uloga dislipidemije u patogenezi ateroskleroze i proceni rizika za KVB. Rezultati brojnih studija su povezali više koncentracije apo B i niže

koncentracije apo A-I sa patogenezom KVB (146, 148, 224). U isto vreme, još uvek aktuelne ATP III preporuke ističu značaj non-HDL holesterola kao prediktora kardiovaskularnog rizika (18), a nađena je i korelacija Lp(a) sa stepenom razvoja ateroskleroze i KBS (143). NACB LMPG preporuke ne preporučuju skrining koncentracija Lp(a) u primarnoj prevenciji i proceni kardiovaskularnog rizika. Međutim, smatra se da određivanje Lp(a) može biti korisno kod osoba sa izraženom porodičnom istorijom prevremene pojave KVB, posle procene rizika na osnovu FRS, da bi se identifikovali oni pacijenti sa genetskom predispozicijom za razvoj KVB (53). Očigledno različiti markeri inflamacije i lipidnog statusa mogu da intenziviraju ili pokrenu različite i ne uvek preklapajuće mehanizme koji dovode do aterosklerotskih i kardiovaskularnih komplikacija. Prema tome, „multimarker pristup“ može biti efikasna strategija za poboljšanje procene kardiovaskularnog rizika (225).

U prvom delu ovog rada fokusirali smo se na izdvajanje inflamatornih i lipidnih markera ateroskleroze sa potencijalom za poboljšanje efikasnosti identifikacije osoba sa rizikom na osnovu hsCRP. Među ispitivanim markerima inflamacije i lipidnog statusa povezanih sa aterosklerozom (SAA, fibrinogen, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa, ukupan, HDL, non-HDL i LDL holesterol, trigliceridi, apo A-I, apo B, Lp(a)), zajedno sa karakteristikama kao što su pol, starost, pušenje, hipertenzija, BMI, porodična istorija prevremene pojave KVB i fizička aktivnost, posle serije regresionih analiza, samo su BMI, non-HDL holesterol, fibrinogen i SAA ostali u nezavisnoj asocijaciji sa hsCRP (*Tabela XIV*). Dodatna informacija koju oni nose mogla bi da bude komplementarna prediktivnoj vrednosti hsCRP.

Povezanost BMI sa koncentracijom hsCRP je očekivana i postoje podaci o snažnoj i nezavisnoj asocijaciji sa patološkim nivoima markera inflamacije i lipidnog statusa u velikoj populaciji zdravih žena (226). BMI je indikator gojaznosti, za koju je pokazano da je povezana sa koncentracijom hsCRP preko direktnih mera procenta telesnih masti (227). Dobro poznato objašnjenje je da u gojaznosti adipozno tkivo produkuje prekomernu

količinu inflamatornih citokina, kao što je IL-6, koji zatim stimuliše produkciju CRP u jetri (228).

Non-HDL holesterol se pojavio kao prediktor kardiovaskularnog rizika zahvaljujući činjenici da je dobar surogat marker ukupnog apo B u rutinskoj kliničkoj praksi. Kao zbir VLDL, IDL i LDL holesterola predstavlja sve lipoproteine koji sadrže apo B, koji je glavni apolipoprotein svih aterogenih lipoproteinskih čestica. U ovom radu dobijena je snažna korelacija apo B i non-HDL ($r=0,910$, $P<0,001$) (*Tabela XII*), što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (148, 229). Međutim, dok non-HDL predstavlja ukupan sadržaj holesterola u LDL, VLDL i IDL česticama, apo B ukazuje na ukupan broj ovih lipoproteinskih čestica (230). Upravo akumulacija holesteril-estara u citoplazmi konvertuje makrofage u penaste ćelije, karakteristične za ranu fazu ateroskleroze. Makrofage zatim proliferišu i pojačavaju inflamatorni odgovor kroz sekreciju brojnih faktora rasta i citokina (55, 56). Ovo može biti objašnjenje zašto je nađena značajna asocijacija non-HDL holesterola sa hsCRP, kao markerom inflamacije, a ne i apo B sa hsCRP, uprkos snažnoj korelaciji između apo B i non-HDL holesterola. Ovo je u skladu sa NACB LMPG smernicama, koje preporučuju da prvi korak u praćenju efikasnosti terapijskih postupaka za snižavanje lipida bude određivanje LDL holesterola, a pored toga i non-HDL holesterola kod pacijenata sa visokom koncentracijom triglicerida. Iako apo B predstavlja meru aterogenih lipoproteina i dobar je prediktor kardiovaskularnog rizika, samo je marginalno bolji prediktor u poređenju sa lipidnim profilom koji se danas koristi i ne treba ga određivati u sklopu procene rizika (53).

Jousilahti i sar. (156) pokazali su pozitivnu i značajnu asocijaciju hsCRP, SAA i fibrinogena sa prevalencijom KBS. Tome idu u prilog i rezultati dobijeni u ovom radu, koji su pokazali povezanost koncentracija fibrinogena i SAA sa koncentracijom hsCRP, koja predstavlja indikator kardiovaskularnog rizika kod naizgled zdravih ljudi. S obzirom da se radi o reaktantima akutne faze ovo nije neočekivan nalaz. Takođe, pokazano je da protrombotički i proinflamatorni efekti SAA mogu doprineti patogenezi i komplikacijama AKS (165). S druge strane, u kohortnoj grupi inicijalno zdravih žena, polazne koncentracije

fibrinogena nosile su dodatnu prediktivnu informaciju u odnosu da vrednosti hsCRP i tradicionalnih faktora rizika za pojavu kardiovaskularnih komplikacija (154). Takođe, meta-analiza *Fibrinogen Studies Colaboration* našla je umerenu do snažnu vezu fibrinogena sa kardiovaskularnim ishodom u sveobuhvatnoj analizi 154 211 asimptomatskih osoba, učesnika prospektivnih studija (153). Pored toga, postoji dovoljno dokaza da je fibrinogen nezavisan marker kardiovaskularnog rizika, ali NACB LMPG smernice ne preporučuju takvu primenu zbog analitičkih problema (53).

Dodatnim određivanjem novog biomarkera, pored postojećih algoritama procene kardiovaskularnog rizika, mora da se obezbedi ispravna reklasifikacija procenjenog rizika, ako biomarker nosi dodatnu informaciju u odnosu na skorove rizika (49, 54). Rezultati velike studije u južnoj Nemačkoj su pokazali da hsCRP unapređuje rizik procenjen na osnovu FRS, naročito u grupama sa intermedijernim rizikom (87). Takođe, pokazano je da je Reynoldsov rizik skor, koji pored elemenata FRS uključuje još i vrednosti hsCRP, reklasifikovao do 50% žena sa intermedijernim rizikom u višu ili nižu kategoriju rizika (96). U ovom radu dobijeni su slični rezultati, iako na malom broju učesnika. Dakle, u grupi osoba sa procenjenim rizikom u kategoriji 10–20% na osnovu FRS, kod ~50% je nađena koncentracija hsCRP koja je ukazivala na nizak ili visok kardiovaskularni rizik (*Tabela XV*). U istoj grupi učesnika, koncentracije fibrinogena, SAA, non-HDL holesterola i triglicerida su bile statistički značajno različite među kategorijama rizika određenim na osnovu koncentracije hsCRP.

5.3. POREĐENJE VREDNOSTI MOKRAĆNE KISELINE, SRČANIH I BUBREŽNIH BIOMARKERA SA hsCRP

Pored parametara lipidnog statusa i inflamacije, koji učestvuju u samoj patogenezi ateroskleroze, postoje i potencijalni markeri kardiovaskularnog rizika čija uloga u aterogenezi nije potpuno razjašnjena, ali postoji veliki broj dokaza o njihovoj prediktivnoj ulozi u pojavi komplikacija ateroskleroze, odnosno različitih oblika KVB. U ovom radu je

ispitana i povezanost takvih biomarkera, pre svega mokraćne kiseline, parametara bubrežne funkcije (kreatinin, Cys-C, eGFR_{MDRD}, eGFR_{CKD-EPI}, eGFR_{Cys-C}) i srčane funkcije (NT-proBNP, hs-cTnT) sa hsCRP, kao markerom inflamacije, ali i kao ustanovljenim biomarkerom kardiovaskularnog rizika.

Još uvek nije razjašnjeno da li je mokraćna kiselina nezavisan faktor kardiovaskularnog rizika, pošto su njene povišene koncentracije često povezane sa ustanovljenim faktorima rizika. Tako postoje brojni podaci o asocijaciji povišenih koncentracija mokraćne kiseline sa hipertenzijom i prehipertenzijom, bolestima bubrega, metaboličkim sindromom, vaskularnim bolestima (perifernih, karotidnih i koronarnih arterija), šlogom, markerima inflamacije, disfunkcijom endotela, oksidativnim stresom (179). Postoji mali broj studija koje povezuju funkciju bubrega i rizik za pojavu kardiovaskularnih komplikacija u opštoj populaciji. Iako su rezultati kontradiktorni, NACB LMPG smernice preporučuju ispitivanje prisustva hronične bolesti bubrega preko određivanja kreatinina u serumu i izračunavanjem eGFR kod svih osoba sa hipertenzijom, dijabetesom, porodičnom istorijom hronične bolesti bubrega i intremedijernim rizikom za KVB na osnovu algoritma FRS (10–20%) (196). Pored toga što se Cys-C smatra boljim markerom bubrežne funkcije i alternativa eGFR vrednostima zasnovanim na kreatininu (199), u novije vreme je pokazano da je povezan sa kardiovaskularnim rizikom i kao direktan učesnik u formiranju aterosklerotskog plaka (209). Iako je poznat kao indikator srčane insuficijencije, rezultati istraživanja pokazuju da NT-proBNP nosi i dodatnu prognostičku informaciju o mortalitetu i pojavi prve manifestacije kardiovaskularne bolesti u odnosu na tradicionalne faktore rizika (183, 184). Uvođenjem testova visoke osetljivosti za određivanje srčanog troponina rezultati pokazano je da može da se detektuje u značajnom procentu osoba bez znakova KVB i da su te vrednosti povezane sa rizikom od kardiovaskularnog i opšteg mortaliteta nezavisno od tradicionalnih faktora rizika (194, 195).

Iako je ANOVA analiza pokazala značajnu promenu koncentracija svih ispitivanih parametara, osim NT-proBNP, sa porastom koncentracije hsCRP, odnosno između odgovarajućih kategorija kardiovaskularnog rizika (*Tabela XVII*), zavisnost se izgubila u

kasnijoj statističkoj analizi. Naime, značajne vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije nađene su samo između vrednosti hsCRP i mokraćne kiseline, Cys-C, eGFR_{CKD-EPI} i eGFR_{CysC}. Međutim, posle korekcije uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja, hsCRP je ostao u značajnoj korelaciji samo sa Cys-C i eGFR_{CysC} (Tabela XVIII). Postepenom multiplom linearnom regresionom analizom identifikovan je prediktivni model sa kreatininom, Cys-C i mokraćnom kiselinom kao nezavisnim determinantama koncentracije hsCRP (Tabeli XIX). Međutim, logističkom regresionom analizom nije potvrđen nezavisni prediktivni potencijal ovog modela.

Gubitak značajne korelacije između hsCRP i mokraćne kiseline posle korekcije uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja mogao bi da bude posledica povezanosti mokraćne kiseline sa hipertenzijom (178, 179). Međutim, pokazano je i direktno učešće mokraćne kiseline u inflamatornim procesima, tako da korelacija hsCRP i mokraćne kiseline, kao i pojava mokraćne kiseline kao nezavisne determinante koncentracije hsCRP u linearnom regresionom modelu nije neočekivana. Naime, rezultati *in vitro* i istraživanja na eksperimentalnim životinjama su pokazala da mokraćna kiselina učestvuje u inflamatornim procesima u vaskularnim ćelijama kroz aktivaciju mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK), faktora rasta (PDGF), hemokina (MCP-1) i inflamatornih enzima (COX-2). Ovi procesi dovode do disfunkcije endotelnih ćelija i proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (231, 232). Takođe, pokazano je na eksperimentalnim modelima i da mokraćna kiselina, u fiziološkim koncentracijama, indukuje ekspresiju CRP u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama i da su time posredovani njeni efekti na proliferaciju i migraciju ovih ćelija, kao i na redukovano oslobađanje NO iz endotelnih ćelija (233).

Može se reći da hronična bolest bubrega (HBB) predstavlja faktor rizika za razvoj KVB zbog velike prevalencije ateroskleroze i tradicionalnih faktora kardiovaskularnog rizika, kao što su starost, dijabetes, hipertenzija i nizak HDL holesterol, kod ovih pacijenata. HBB se definiše na osnovu GFR i u prvim stadijumima ona je blago smanjena, normalna ili čak povišena (234). Kao indeks renalne funkcije i mera GFR u kliničkoj praksi se najčešće koristi koncentracija kreatinina u serumu. Studije koje su ispitivale povezanost incidencije

kardiovaskularnih komplikacija i koncentracije kreatinina u serumu davale su različite rezultate. Dok je u prospektivnoj studiji na populaciji muškaraca srednjih godina koncentracija kreatinina u najviša tri percentila njegove distribucije povezana sa značajno većim rizikom za pojavu šloga nezavisno od visine krvnog pritiska (235), u *Framingham Heart Study* nije primećena značajna asocijacija blago povišenih vrednosti kreatinina i kardiovaskularnih komplikacija (198). To je verovatno posledica toga što kreatinin nije u linearnoj vezi sa GFR, već na to utiču i nezavisni faktori, kao što su starost, pol, dimenzije tela, ishrana, neki lekovi (199). Jednačinama za izračunavanje eGFR dobija se tačnija i preciznija procena funkcije bubrega.

Klasični algoritmi procene kardiovaskularnog rizika nisu efikasni kod pacijenata sa HBB, što se tumači na dva načina – značajnijom ulogom netradicionalnih faktora rizika u patogenezi ishemijske bolesti srca kod ovih pacijenata i kvantitativno i kvalitativno drugačijom vezom tradicionalnih faktora rizika sa KVB u odnosu na opštu populaciju. Pretpostavlja se da sistemska inflamacija može biti jedan od medijatora većeg kardiovaskularnog rizika u ovom slučaju (236). Rezultati ispitivanja *Framingham Offspring* kohortne grupe pokazali su značajnu povezanost umerene do blage HBB sa inflamatornim procesima, što je posredovano velikim brojem različitih aktivacionih puteva (237). U toj studiji CRP nije bio povezan sa eGFR_{MDRD} kao indikatorom HBB posle korekcije uticaja tradicionalnih faktora rizika, kao ni u MDRD studiji (238), dok rezultati drugih studija pokazuju obrnuto (239, 240). Dobijeni rezultati u ovom radu takođe pokazuju da se posle korekcije uticaja tradicionalnih faktora rizika gubi korelacija CRP sa eGFR izračunatog na osnovu koncentracije kreatinina u serumu. Ovakvo neslaganje studija može biti posledica razlika u ispitivanim populacijama, različitim načinima procene funkcije bubrega i potencijalne greške tipa II zbog niske incidencije kardiovaskularnih komplikacija (234).

Prediktivna vrednost Cys-C u proceni kardiovaskularnog rizika obično se povezuje sa njegovim osobinama pouzdanijeg markera bubrežne funkcije od koncentracije kreatinina u serumu, naročito u detekciji malih promena GFR (241). Međutim, postoje indicije da se prediktivni potencijal koncentracije Cys-C može objasniti i nezavisno od funkcije bubrega.

Pokazano je da su visoke koncentracije Cys-C u korelaciji sa visokim vrednostima hsCRP, što ukazuje da inflamacija, povezana sa aterogenim promenama, može biti jedan od mehanizama koji povezuje Cys-C sa kardiovaskularnim rizikom. Inflamatorni citokini koji se oslobađaju u toku aterosklerotskih procesa stimulišu produkciju lizosomalnih katepsina u endotelnim, glatkim mišićnim ćelijama i makrofagama, a imaju ulogu u progresiji i rupturi aterosklerotskog plaka. Povećana koncentracija Cys-C u plazmi, koji ima ulogu inhibitora katepsina, može da bude odraz, bar delimično, pokušaja uspostavljanja ravnoteže ovog potencijalno štetnog povećanja elastolitičke aktivnosti (207, 208, 242). Rezultati dobijeni u ovom radu su u skladu sa navedenom hipotezom, kojom može da se objasni nezavisna korelacija Cys-C i hsCRP, koja ostaje prisutna i kada se korekcijom za uticaj tradicionalnih faktora rizika izgubi značaj $eGFR_{CKD-EPI}$ kao indikatora bubrežne funkcije.

5.4. POREĐENJE KATEGORIZACIJE RIZIKA NA OSNOVU SKOROVA I hsCRP

Aktuelne preporuke koriste tzv. skorove rizika za procenu 10-godišnjeg kardiovaskularnog rizika na osnovu koga se određuje adekvatan tretman osobe za redukciju tog rizika. Izračunavanje rizika zasniva se na multivarijabilnim regresionim jednačinama izvedenim praćenjem kohortnih grupa. Tako se u FRS, regresionom modelu dobijenom praćenjem Framingamske kohorte i inkorporiranom u NCEP ATP III preporuke, određenim nivoima ili prisustvu tradicionalnih faktora rizika (starost, ukupan i HDL holesterol, sistolni krvni pritisak, pušenje) dodeljuju odgovarajući poeni zavisno od pola kojima se predviđaju manifestacije KBS (8). Izračunati zbir poena dodeljen svakom faktoru rizika se zatim konvertuje u apsolutnu verovatnoću pojave KBS u datom vremenskom intervalu.

Pored izračunavanja 10-godišnjeg apsolutnog rizika treba proceniti i uticaj drugih faktora, kao što je gojaznost, porodična istorija prevremene pojave KVB ili određivanje jednog od dodatnih biomarkera koji bi mogli da modifikuju dobijenu verovatnoću pojave KBS posle perioda od 10 godina. Dodatni biomarkeri mogu pomoći u osnovnoj proceni rizika, naročito

kod osoba u kategoriji sa intermedijernim rizikom. Treba napomenuti da nizak rizik (<10%) ne znači da rizika nema, naročito u kontekstu vremenskih perioda dužih od 10 godina. Ako je očekivani preostali životni vek duži od toga, procenjen rizik će se vremenom povećavati i prisustvo faktora rizika u bilo kom obimu u mlađem dobu može da dovede do značajno većeg kardiovaskularnog rizika u toku života (38).

Takođe, apsolutni rizik će se razlikovati u zavisnosti od krajnjeg ishoda čija se pojava prati. Tako, pored FRS, kojim se procenjuje 10-godišnji rizik od pojave KBS kao krajnjeg ishoda, može da se odredi i 10-godišnji rizik od svih oblika KVB – tzv. „globalni KVB rizik“ (35). Postoje dva modela za procenu dugoročnog, 30-godišnjeg rizika za KVB – od pojave teških komplikacija KVB („teška KVB“) i za izračunavanje rizika od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija („kompletna KVB“) (42).

U ispitivanoj populaciji, nizak 10-godišnji rizik na osnovu FRS imalo je 79,8% učesnika (*Tabela XX*). Verovatnoća pojave svih oblika KVB na osnovu globalnog FRS je bila drugačija, sa dvostruko većim procentom osoba u kategoriji visokog rizika – 12,8% i značajno manjim procentom učesnika sa niskim rizikom – 69,6% (*Tabela XXI*). Procenom 30-godišnjeg rizika, broj osoba sa visokim rizikom od pojave teških komplikacija, odnosno svih oblika KVB, za odgovarajući pol i starost, se značajno povećao i iznosio je 74%, tj. 76%, redom (*Tabela XXII i XXIII*). Ovakvi rezultati nisu neočekivani i odgovaraju rezultatima *Coronary Artery Risk Development in Young Adults* studije, gde je >90% učesnika 32–47 godina starosti imalo procenjen 10-godišnji rizik <10%, ali skoro polovina je imala visok procenjen dugoročni rizik ($\geq 39\%$). Čak i u ovom mlađem životnom dobu, učesnici sa niskim 10-godišnjim rizikom, ali procenom visokog dugoročnog rizika, imali su značajno veću debljinu intime i medie zida karotidne arterije, značajniju kalcifikaciju koronarnih arterija i bržu progresiju subkliničke ateroskleroze u poređenju sa učesnicima sa niskim i 10-godišnjim i dugoročnim rizikom (243).

Raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L bila je nezavisna od raspodele kategorija rizika na osnovu FRS u ispitivanoj populaciji.

Klasifikacija na osnovu koncentracije hsCRP nije bila nezavisna u poređenju sa kategorizacijom rizika na osnovu globalnog FRS, niti sa 30-godišnjim rizikom, što znači da je postojala zavisnost između viših koncentracija hsCRP i većeg kratkoročnog i dugoročnog rizika od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija, kao i većeg dugoročnog rizika od pojave teških komplikacija KVB (*Tabele XXI–XXIII*). Razlike između aktuelne starosti i procenjene starosti srca na osnovu globalnog FRS u pojedinim klasama koncentracije hsCRP bile su statistički značajne, a takođe razlika se statistički značajno povećavala sa porastom koncentracije hsCRP (*Tabela XXIV*). Dobijeni rezultati ukazuju na mnogo veće opterećenje ukupnim kardiovaskularnim rizikom u odnosu na rizik od komplikacija KBS, kao i na značajan dugoročni, 30-godišnji rizik. Povezanost rizika sa koncentracijama hsCRP samo potvrđuje razvijeni aterosklerotske procese, čiji je indikator, u odnosu na prvobitnu procenu niskog rizika na osnovu standardnog algoritma FRS.

5.5. FAKTORSKA ANALIZA

Faktorska analiza je koristan komplementarni pristup boljem razumevanju osnovne strukture podataka koju karakteriše fiziološka kompleksnost i veliki stepen statističke korelacije. To je postupak koji redukuje veliki broj povezanih ili čak na prvi pogled nepovezanih parametara u relativno mali broj faktora. Jedna od prednosti faktorske analize je sposobnost definisanja veza između promenljivih povezanih sa osnovnim patofiziološkim mehanizmima. Grupisanje nezavisnih markera u složene promenljive predstavljene faktorima može biti korisno u proceni rizika upotrebom svih informacija koje nose ispitivani parametri uz istovremeno minimiziranje problema kolinearnosti među njima.

U ovom radu urađene su dve faktorske analize ispitivane grupe biomarkera inflamacije, lipidnog statusa, funkcije srca i bubrega. Prvom je ispitivana njihova povezanost sa koncentracijom hsCRP, kao ustanovljenim markerom subkliničke inflamacije i

kardiovaskularnog rizika. Izdvojeno je pet faktora, koji su interpretirani kao „faktor sistemske inflamacije“, „kardiorenalni faktor“, „faktor aterogenog holesterola“, „hemodinamski faktor“ i „metabolički faktor“. Time je potvrđeno da subkliničkoj inflamaciji doprinosi više različitih fizioloških procesa. Druga faktorska analiza je obuhvatila parametre koji nisu uključeni u izračunavanje skorova rizika i sam hsCRP, čime se opet izdvojilo pet klastera, ali ne identičnih onima dobijenim u prethodnoj analizi. Oni su identifikovani kao „faktor sistemske inflamacije“, „faktor aterogene dislipidemije“, „kardiorenalni faktor“, „hemodinamski faktor“ i „lipoproteinski faktor“. Ispitana je povezanost izdvojenih faktora sa povećanim kardiovaskularnim rizikom identifikovanim multivarijabilnim jednačinama rizik skorova, čime je ispitana njihova prognostička sposobnost.

5.5.1. FAKTORSKI MODEL I KONCENTRACIJA hsCRP

5.5.1.1. Faktor sistemske inflamacije

Nađeno je da je dominantni faktor „sistemske inflamacije“ odgovoran za 29% ukupne varijacije u sistemu ispitivanih biomarkera. U njegovom sastavu su se našli svi proteini osetljivi na inflamaciju – fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa. Njihovo grupisanje je očekivano s obzirom da se radi o proteinima akutne faze, čija se sinteza povećava u prisustvu inflamacije i predstavlja deo urođenog imunskog odgovora. Ovaj faktor je pokazao i najveći prediktivni potencijal za prisustvo koncentracija hsCRP koje ukazuju na prisustvo značajne subkliničke inflamacije i aktivan aterosklerotski proces. Na osnovu toga možemo da pretpostavimo da što je proces ateroskleroze aktivniji, u plazmi će biti prisutne veće koncentracije proteina akutne faze.

Za svaki od ispitivanih proteina akutne faze postoje indicije o njihovoj vezi sa patofiziologijom ateroskleroze. Kako se aterosklerotski plakovi razvijaju, u njih se inkorporira fibrinogen, fragmenti fibrinogena i fibrin. Fibrin zatim obezbeđuje potporu za migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i predstavlja izvor degradacionih produkata fibrina, koji su mitogeni za makrofage, a glatke mišićne ćelije i makrofage su glavne

ćelijske komponente ateroma (151). Takođe, pokazano je da kako se koncentracija fibrinogena povećava iznad fizioloških nivoa, ugrušci postaju rezistentniji na fibrinolizu. Produženo prisustvo fibrina na oštećenom endotelu može ubrzati formiranje plaka (244).

Pokazano je da SAA može da pokrene sintezu različitih medijatora inflamacije kao što su IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α i PAI-1 u kulturama vaskularnih endotelnih ćelija, neutrofila i monocita (165). Dokazano je i da su endotelne, glatke mišićne ćelije, monociti i makrofage u aterosklerotskim lezijama uključene u ekstrahepatičnu produkciju SAA, dok povećane koncentracije menjaju antiaterogene osobine HDL čestica (158, 160–162). Takođe, pokazano je i da SAA direktno učestvuje u svakom od stadijuma aterogeneze (160).

Kao imunomodulator, A1AGP inhibira mitogenom-indukovanu proliferaciju limfocita i agregaciju trombocita, kao i hemotaksu, formiranje superoksida i agregaciju neutrofila nepoznatim mehanizmima. Pokazano je da je njegova sinteza indukovana kao odgovor na metaboličke i inflamatorne signale u adipoznom tkivu gojaznih miševa čime ih štiti od teške inflamacije, osim ako nije prisutna poremećena homeostaza glukoze i lipida, koja može na kraju dovesti do sistemskih metaboličkih komplikacija. Pretpostavlja se da je A1AGP koordinator metaboličke homeostaze u regulaciji energetskeg metabolizma i inflamacije (245). Takođe, pokazano je i da A1AGP interaguje sa PAI-1 u pokretanju protrombotičke aktivnosti u aterosklerotskim lezijama (246).

Pored toga što je pokazano da inhibira sintezu prostaglandina, NO i time modulira endotel-zavisnu vazodilataciju, kao i da kontroliše funkciju limfocita i neutrofila, postoje podaci i da se haptoglobin vezuje za apo A-I na istom mestu kao i lecitin-holesterol acil transferaza (LCAT) i time smanjuje njegovu aktivnost i ograničava sazrevanje HDL čestice. Tako se inhibira reverzni transport holesterola i HDL postaje proaterogen (247).

U fibroznom plaku je koncentracija iRNK komponenti komplemента veća nego u normalnim arterijama, što ukazuje da dolazi do njihove lokalne sinteze, pored toga što se preuzimaju iz plazme i zadržavaju u zadebljanjima intime i fibroznom plaku arterijskog

aterosklerotskog zida. U fibroznom plaku se primarno aktivira klasični put komplementa posredstvom CRP. Vezivanje CRP za modifikovani, neoksidovani LDL, oksidovani LDL i apoptotske ćelije ubrzava proces aktivacije komplementa. Klasični put se takođe aktivira autoantitelima usmerenim protiv oksidovanih lipoproteina i *heat shock* proteina u zidu arterija, što dovodi do aktivacije terminalnog kompleksa (175).

5.5.1.2. Kardiorenalni faktor

U sklopu „kardiorenalnog faktora“ našli su se kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C, hs-cTnT sa pozitivnim, i pol sa negativnim doprinosom. Negativni doprinos pola odnosi se na niže vrednosti faktorskog skora kod žena, što je u skladu sa većim kardiovaskularnim rizikom koji nosi muški pol, zbog čega je uvršten u tradicionalne faktore rizika i shodno tome bodovan u algoritmima rizik skorova. Prisustvo kreatinina i Cys-C u ovom klasteru opravdava njihova ustanovljena primena kao indikatora jačine glomerularne filtracije.

Pored toga što je postoje podaci o njenom direktnom učešću u inflamatornim procesima u aterosklerozi, mokraćna kiselina se najčešće povezuje sa kardiovaskularnim rizikom preko njene uzročne veze sa hipertenzijom. S obzirom da se ta povezanost ostvaruje na nivou bubrega, upravo time možemo objasniti prisustvo mokraćne kiseline u ovom klasteru. Naime, smatra se da povećanje unosa fruktoze (kao jedinstvenog šećera koji izaziva brzo trošenje ATP i povećava i stvaranje i oslobađanje mokraćne kiseline), vrsta mesa bogatih purinima ili piva, dovodi do hronične hiperurikemije. Ako se u cirkulaciji majke nalaze visoke koncentracije mokraćne kiseline, usled prekomernog unosa navedenih namirnica ili zbog prisustva hipertenzije pre trudnoće, gojaznosti ili preeklampsije, može doći do transfera mokraćne kiseline u fetalnu cirkulaciju preko placente. To može doprineti intrauterinoj retardaciji u rastu i smanjenju broja nefrona. Kod beba rođenih sa malim brojem nefrona u detinjstvu može doći do razvoja hiperurikemije u prisustvu genetskim i faktora sredine. Hronična hiperurikemija će stimulisati renin-angiotenzin sistem i inhibirati oslobađanje endotelnog NO, doprinoseći renalnoj vazokonstrikciji i verovatno povećanju krvnog pritiska. Perzistentna renalna vazokonstrikcija može doprineti arteriolosklerozi i razvoju hipertenzije osetljive na so, čak i ako se hiperurikemija koriguje (179).

Smatra se da je rizik koji nose niske detektabilne koncentracije cTnT kod asimptomatskih osoba posredovan dodatnim mehanizmima koji ne učestvuju u procesu aterotromboze ili deluju paralelno sa njom. Ovi mehanizmi, koji nisu potpuno razjašnjeni, mogu biti posledica oslobađanja troponina iz miocita usled asimptomatske ishemije, koronarne mikrovaskularne disfunkcije, apoptoze ili subkliničkih strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti srca (192). Verovatno iz tih razloga nije nađena korelacija hsCRP i hs-cTnT u ovom radu. Međutim, granična statistički značajna razlika između koncentracija hs-cTnT u različitim klasama kardiovaskularnog rizika na osnovu koncentracije hsCRP (*Tabela XVII*) može da sugeriše da ovi procesi prate aterotrombozu i inflamaciju u njenoj osnovi. Pojavljivanje hs-cTnT zajedno sa markerima bubrežne funkcije, kao srčana komponenta „kardiorenalnog faktora“, u faktorskoj analizi može da se objasni time da se kod pacijenata sa HBB često nalaze koncentracije hs-cTnT nekoliko puta više od 99. percentila. Etiologija ovih povećanja je najverovatnije multifaktorska, povezana i sa srčanom i sa bubrežnom patologijom. Potencijalni mehanizmi uključuju povredu miokarda i smanjen renalni klirens cTnT u HBB (248). U prilog povrede miokarda idu nalazi da faktor rasta fibroblasta 23, koštani hormon koji reguliše renalnu ekskreciju fosfata i čija je ekspresija stimulisana u HBB, uzrokuje povećanje mase leve komore (249). S druge strane, indirektan dokaz smanjenog renalnog klirensa cTnT je slično povećanje trans-srčanog gradijenta koncentracije cTnT od aorte ka koronarnom sinusom kod pacijenata sa i bez HBB, ali su veće koncentracije u aorti nađene kod pacijenata sa HBB (250). U ovom radu je hs-cTnT ostao u nezavisnoj korelaciji sa eGFR izračunatim pomoću jednačina zasnovanih i na koncentracijama kreatinina i Cys-C, što je u skladu sa objavljenim podacima (247) i što ide u prilog tome da je stepen povrede miokarda definisan određivanjem hs-cTnT povezan sa stepenom oštećenja bubrega.

5.5.1.3. Faktor aterogenog holesterola

Non-HDL holesterol se često oznava kao aterogeni holesterol. Predstavlja zbir svih lipoproteinskih čestica koje sadrže apo B – LDL, VLDL i IDL. Aterogenost je posledica njihove transformacije u endogenom putu metabolizma lipoproteina do LDL. Uklanjanje

LDL čestica iz cirkulacije počinje prepoznavanjem i vezivanjem apo B u njihovom sastavu za specifične receptore. Receptorski put uklanjanja LDL holesterola iz cirkulacije je strogo regulisan i ćelije imaju sposobnost da regulišu sadržaj holesterola u njima. Kod opterećenja slobodnim holesterolom dolazi do smanjenja brzine sinteze endogenog holesterola inhibicijom enzima hidrokismetil-glutaril-koenzim A reduktaze, povećanja formiranja holesteril estara i inhibicijom sinteze novih LDL receptora supresijom transkripcije gena. U ekstrahepatičnom tkivu LDL se uklanja posredstvom *scavenger* receptora. Ovaj proces nije regulisan i *scavenger* receptori prepoznaju LDL koji je na neki način modifikovan. Nalaze se na makrofagama i drugim ćelijama. Makrofage u kojima su nagomilani holesterol estri nazivaju se penaste ćelije i najranija su komponenta aterosklerotske lezije (12).

Kada su u dugom vremenskom periodu prisutne visoke koncentracije LDL holesterola u krvotoku dolazi do njihove infiltracije u intimu arterija. Prema oksidacionoj hipotezi, LDL zadržan u intimi, delom vezivanjem za proteoglikane, podleže oksidativnim modifikacijama. Sastavni delovi modifikovanih lipoproteinskih čestica, među njima oksidovani fosfolipidi i aldehidi kratkog lanca nastali oksidacijom lipoproteina indukuju aktivaciju transkripcije VCAM-1 gena što je delimično posredovano NF- κ B. To dovodi do pojačane adhezije leukocita na površini arterijskih endotelnih ćelija u ranoj fazi aterogeneze (56).

U endogenom putu metabolizma lipoproteina od VLDL čestica intermedijerno nastaju ostaci/remnanti VLDL-a. Neke od njih preuzima jetra, a ostali se konvertuju u manje, gušće IDL čestice (12). I sami remnanti VLDL-a, kada se nalaze u povišenoj koncentraciji u cirkulaciji i kada je zasićen receptorski put uklanjanja LDL čestica, kao relativno bogatiji holesterolom od samog VLDL-a, mogu dovesti do formiranja penastih ćelija slično kao modifikovani LDL i povećati ekspresiju inflamatornih proteina, adhezivnih molekula i faktora koagulacije, što uslovljava njihov aterogeni potencijal (120).

Prema tome nije neočekivano grupisanje LDL i non-HDL holesterola u zajednički klaster faktorskom analizom. Očekivan je i značajan prediktivni potencijal „faktora aterogenog

holesterola“ za koncentracije hsCRP koje ukazuju na aktivan inflamatorni proces u aterosklerotskim lezijama. Promocijom inflamacije u ranoj fazi aterogeneze se objašnjava i što su koncentracije LDL i non-HDL holesterola bile u korelaciji sa koncentracijom hsCRP u ispitivanoj populaciji (*Tabela XII*), dok je non-HDL holesterol ostao snažan prediktor koncentracije hsCRP u serumu i posle korekcije za starost, pol, hipertenziju i pušenje (*Tabela XIV*).

5.5.1.4. Hemodinamski faktor

U sastavu „hemodinamskog faktora“ izdvojili su se starost i NT-proBNP. Povišene vrednosti natriuretskih peptida posledica su povećanog stresa zida miokarda i pritiska punjenja, a hronična izloženost ovim hemodinamskim stresorima može dovesti do značajne dilatacije komora, hipertrofije i/ili fibroze, promene elektrofiziološkog supstrata i veće ugroženosti miokarda od malignih aritmija. Takođe, povećan pritisak punjenja komora koji je posledica već postojećeg ali ne i prepoznatog strukturnog poremećaja može biti odgovoran za povećan rizik od iznenadne srčane smrti koji se povezuje sa visokim koncentracijama NT-proBNP (185). S druge strane, pacijenti sa dijagnozom dekompenzovane srčane insuficijencije i/ili sistolne disfunkcije leve komore su jasno pod visokim kratkoročnim i dugoročnim rizikom od komplikacija. Takođe, verovatno će ti pacijenti imati i ishemijsku bolest srca, pošto je to najčešći uzrok srčane insuficijencije (187).

Pokazano je da je NT-proBNP bio efikasniji u proceni rizika kod starijih osoba od KVB i smrti od tradicionalnih faktora rizika i hsCRP. Značajan rizik je bio prisutan pri koncentracijama NT-proBNP daleko ispod onih koje se koriste za dijagnozu dekompenzovane srčane insuficijencije (183). Referentne vrednosti NT-proBNP izrazito se razlikuju u zavisnosti od starosti, što objašnjava grupisanje starosti i NT-proBNP u „hemodinamskom faktoru“. Dobijena značajna prediktivna sposobnost ovog faktora za koncentracije hsCRP, iako nije postojala korelacija između NT-proBNP i hsCRP ni u ispitivanoj populaciji u ovom radu, može da se objasni time što NT-proBNP oslikava remodelovanje miokarda koje se javlja sekundarno sa različitim entitetima KVB (186).

5.5.1.5. Metabolički faktor

Osnovne komponente metaboličkog sindroma, HDL holesterol i trigliceridi, nalaze se grupisane u klasteru „metaboličkog faktora“. Doprinos HDL holesterola faktorskom skoru je negativan, što je u skladu sa većim kardiovaskularnim rizikom koji nosi niska koncentracija. Metabolički sindrom predstavlja složeni faktor rizika za KVB. ATP III je identifikovao šest komponenti metaboličkog sindroma koje su u vezi sa KVB: abdominalna gojaznost, aterogena dislipidemija, hipertenzija, rezistencija na insulin sa ili bez intolerancije na glukozu, proinflamatorno i protrombotičko stanje. Najmanje tri organizacije su definisale kliničke kriterijume za dijagnozu metaboličkog sindroma – ATP III, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) i Američka asocijacija kliničkih endokrinologa (AACE). Svima njima je zajednička komponenta aterogena dislipidemija, koja se rutinskom analizom manifestuje kao povišena koncentracija triglicerida $>1,7$ mmol/L i niska koncentracija HDL holesterola ($<0,9$ mmol/L za muškarce i $<1,0$ mmol/L prema SZO, odnosno $<1,04$ mmol/L za muškarce i $<1,29$ mmol/L za žene prema ATP III i AACE). Primarni klinički ishod metaboličkog sindroma je KVB, dok je prisutan i veći rizik za pojavu diabetes mellitus tipa 2, a dijabetes spada u glavne faktore rizika za KVB (251).

Iako je regresionom analizom dobijena značajna prediktivna sposobnost „metaboličkog faktora“ za koncentracije hsCRP povezane sa kardiovaskularnim rizikom, nije postojala značajna direktna korelacija između hsCRP i triglicerida, odnosno HDL holesterola. Ovakav nalaz nije neočekivan, iako je jedna od osnovnih karakteristika metaboličkog sindroma proinflamatorno stanje sa povišenom markerima inflamacije. Ovom povećanju doprinosi više istovremeno prisutnih mehanizama, kao što su gojaznost, rezistencija na insulin, dijabetes, hipertenzija. Međutim, pokazano je da je kod osoba sa metaboličkim sindromom među ostalim markerima inflamacije jedino CRP nezavisno povezan sa rizikom za KVB, odnosno metabolički sindrom i povišena koncentracija hsCRP nezavisno doprinose kardiovaskularnom riziku (252, 253).

5.5.1.6. Regresiona analiza

Logistička regresiona analiza je pokazala da je prediktivni potencijal faktorskih skorova izdvojenih faktora bio je veći u multivarijabilnom, nego u pojedinačnim modelima. Najbolju prediktivnu vrednost model sa svih pet faktora imao je za koncentracije hsCRP>1 mg/L, dok se značajnost potpuno izgubila za „kardiorenalni faktor“ i „faktor aterogenog holesterola“ u predikciji koncentracija >2 mg/L i >3 mg/L (*Tabela XIX*). Ovo se može objasniti malim brojem učesnika u ispitivanju, od kojih je skoro 50% imalo koncentracije hsCRP<1 mg/L. Takođe, Tukey *post hoc* test je pokazao da je raspodela ispitivanih parametara u ispitivanoj populaciji bila takva da su aritmeričke, odnosno geometrijske sredine njihovih vrednosti u drugoj i trećoj kategoriji koncentracija hsCRP u najvećem broju slučajeva bile statistički značajno različite samo u odnosu na vrednost u prvoj kategoriji, a ne i među sobom (*Tabele IX i XVII*). U takvim uslovima moguća je greška tipa II zbog niske incidencije koncentracija hsCRP koje odgovaraju visokom riziku.

ROC analizom je upoređena sposobnost logističkog regresionog modela zasnovanog na izdvojenih pet faktora sa dva multivarijabilna logistička modela, prvi koji uključuje 19 parametara podvrgnutih faktorskoj analizi i drugi sa 31 polaznih biomarkera kardiovaskularnog rizika, u predikciji prisustva koncentracija hsCRP koje ukazuju na umereno povišen i visok rizik. Pošto se iz napred navedenih razloga izgubila značajnost prediktivne sposobnosti dva od pet faktora, razlika između tri ispitivana logistička modela je bila statistički značajna u predviđanju vrednosti hsCRP>2 mg/L i hsCRP>3 mg/L, dok nije postojala za predikciju vrednosti hsCRP>1 mg/L.

Rezultati svakako pokazuju da sistemska inflamacija, kardiorenalna funkcija, aterogeni lipidni profil, hemodinamski i metabolički status nezavisno doprinose patofiziologiji hronične, subkliničke inflamacije u aterosklerozi, koju oslikava koncentracija hsCRP, što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama (254).

5.5.2. FAKTORSKI MODEL I SKOROVI RIZIKA

Od 18 ispitivanih parametara koji ne ulaze u izračunavanje FRS, globalnog FRS i skora 30-godišnjeg rizika, uključujući ovog puta i hsCRP, faktorskom analizom se izdvojilo pet klastera, identifikovanih kao „faktor sistemske inflamacije“, „faktor aterogene dislipidemije“, „kardiorenalni faktor“, „hemodinamski faktor“ i „lipoproteinski faktor“. „Faktor sistemske inflamacije“ je i ovog puta bio dominantan i odgovoran za 29,7% ukupne varijacije u sistemu ispitivanih biomarkera. Pored proteina osjetljivih na inflamaciju, grupisanih i u prethodnoj analizi, uključio je i hsCRP. U sastavu „kardiorenalnog faktora“ bili su isti parametri sa izuzetkom pola, dok je „hemodinamski faktor“ uključio samo NT-proBNP, pošto ni starost nije bila uključena u faktorsku analizu jer kao i pol ulazi u sastav multivarijabilnih jednačina skorova rizika.

U klasteru „aterogene dislipidemije“ našli su se LDL i non-HDL holesterol, apo B i trigliceridi, dakle lipoproteini koji nose tzv. aterogeni holesterol i determinante metaboličkog sindroma. Iako je LDL holesterol identifikovan kao glavni aterogeni lipoprotein, u patofiziološkim stanjima kada je povećana koncentracija triglicerida, kao što je metabolički sindrom, njegova koncentracija ne odgovara aktuelnom kardiovaskularnom riziku (120). Za metabolički sindrom je karakteristična aterogena dislipidemija u kojoj je prisutna povišena koncentracija triglicerida zbog povećanog prisustva aterogenih remnanta lipoproteina, niska koncentracija HDL holesterola i prisustvo malih, gustih LDL čestica (252). Male, guste LDL čestice imaju veći aterogeni potencijal u odnosu na veće, ali sadrže manje LDL holesterola. Iz tog razloga, određivanje LDL holesterola nije uvek ekvivalentno broju LDL čestica. Pošto VLDL i LDL čestice sadrže po jedan molekul apo B, određivanjem koncentracije apo B dobija se ukupan broj aterogenih čestica, od čega >90% čine LDL čestice (255, 256). Iako su apo B i non-HDL u korelaciji, oni se ne slažu potpuno (korelacija je mera tendencije da se promena jedne promenljive oslika promenom druge, dok slaganje kvantifikuje stepen u kom se promene jedne promenljive reflektuju istom promenom druge) (150). Razlog tome je što non-HDL predstavlja ukupan sadržaj

holesterola u LDL, VLDL i IDL česticama, dok apo B ukazuje na ukupan broj ovih lipoproteinskih čestica (230).

„Lipoproteinski faktor“ sadrži Lp(a) i apo A-I. Grupisanje ova dva lipoproteina je neočekivano, pogotovo što je doprinos apo A-I faktorskom skorom pozitivan, iako se njegova veća koncentracija smatra protektivnom, analogno HDL holesterolu, gde čini glavni apolipoprotein. Corsetti i sar. (257) su objavili da su povišene koncentracije HDL holesterola povezane sa rekurentnim koronarnim komplikacijama među pacijentima sa povišenim vrednostima i hsCRP i holesterola. Kod osoba sa višim rizikom nađene su HDL čestice većih dimenzija i više koncentracije apo A-I u poređenju sa osobama sa nižim rizikom. Pretpostavlja se da je to posledica promena HDL čestica izazvanih inflamacijom u kojima dolazi do uklanjanja i/ili modifikacije više proteinskih komponenti, uključujući i apo A-I. Ove promene utiču na anti-aterogene funkcije HDL u smislu reverznog transporta i posredovanja u inhibiciji oksidativne degradacije LDL čestica. Pokazano je i da oksidativna modifikacija apo A-I ima značajnu ulogu u transformaciji funkcije HDL od anti-inflamatorne do pro-inflamatorne. Oksidacija apo A-I je posredovana nitracijom i hlorinacijom ostataka tirozina na molekulu apo A-I pod dejstvom enzima mijeloperoksidaze (MPO), prisutnom u makrofagama ateroma, čiji je selektivni supstrat upravo apo A-I (258). Ove oksidativne promene apo A-I u sastavu HDL čestica dovode do selektivne inhibicije efluksa holesterola iz makrofaga posredovanog ATP-vezujućim kasetnim transporterom A1 (ABCA1) (259). Dalje, značajno veća zastupljenost nitrotirozina i hlorotirozina u sastavu apo A-I u serumu nađena je kod pacijenata sa KVB u poređenju sa onima bez bolesti (260). Pošto se ovi procesi dešavaju nezavisno od puteva u koje je uključen hsCRP, njima možemo objasniti i nalaz da, iako je postojala korelacija između HDL holesterola i apo A-I u ispitivanoj populaciji, za razliku od HDL holesterola, koncentracija apo A-I se nije razlikovala između kategorija nivoa hsCRP (*Tabela IX*).

Lp(a) se povezuje sa budućim kardiovaskularnim komplikacijama samo kada se nalazi u jako visokim koncentracijama i naročito kada su istovremeno prisutne visoke koncentracije LDL holesterola (143). Moguće je da promene HDL čestica u kojima dolazi do uklanjanja

i/ili modifikacije apo A-I i koje utiču na anti-aterogene funkcije HDL u smislu reverznog transporta i posredovanja u inhibiciji oksidativne degradacije LDL čestica, omogućavaju aterogeno delovanje i Lp(a), pošto omogućavaju prisustvo visokih koncentracija LDL holesterola.

Logistička regresiona analiza je pokazala da „faktor sistemske inflamacije“ nije imao statistički značaj u predikciji vrednosti povećanog rizika na osnovu FRS (>10%). Najveći doprinos tom faktoru daje vrednost hsCRP. Time je, zajedno sa nalazom da je raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L bila je nezavisna od raspodele kategorija rizika na osnovu FRS, potvrđeno da procena kardiovaskularnog rizika na osnovu hsCRP nezavisna od tradicionalnih faktora rizika inkorporiranih u FRS. To je u skladu sa preporukama da se njegova koncentracija koristi za reklasifikaciju rizika kod osoba sa intermedijernim vrednostima FRS (10–20%).

S druge strane, „lipoproteinski faktor“ nije bio značajan prediktor vrednosti ni standardnog ni globalnog FRS, koji procenjuje 10-godišnji rizik od svih oblika KVB, uključujući smrtni ishod KVB, pojavu svih oblika KBS, šlog, srčanu insuficijenciju i intermitentne kludikacije. Ovakav nalaz se može objasniti hipotezom da za kratkoročni, 10-godišnji rizik od svih ovih poremećaja, odnosno krajnjih ishoda, poremećaj lipida vezan za povećano prisustvo Lp(a) i patološku funkciju apo A-I nema značaja, već se ispoljava tek u dugoročnom riziku.

Kod procene 30-godišnjeg rizika i od „kompletne“ i od „teške“ KVB, za vrednosti iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost „hemodinamski faktor“ nije imao statistički značajan prediktivni potencijal. Verovatno je to posledica toga što krajnji ishodi u algoritmima procene dugoročnog rizika obuhvataju i srčanu insuficijenciju i kongestivnu srčanu insuficijenciju. S obzirom na značajnu korelaciju NT-proBNP i starosti, moguće objašnjenje je da multivarijabilne jednačine za izračunavanje dugoročnog rizika već obuhvataju aspekte rizika povezane sa povećanjem koncentracije NT-proBNP sa godinama.

Iako u prediktivnom modelu pet izdvojenih faktora sastavljenih od biomarkera koji ne ulaze u algoritme izračunavanja korišćenih skorova rizika bar jedan faktor nije bio značajan prediktor povećanog rizika, ROC analiza je pokazala da se logistički model sa izdvojenih pet faktora nije statistički značajno razlikovao u predviđanju povećanog kardiovaskularnog rizika od modela sa svih 18 polaznih biomarkera.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti sledeće:

1. Analizom osam serumskih *pool*-ova u opsegu koncentracija hsCRP 0,2–10,0 mg/L *Olympus* imunoturbidimetrijskim testom dobijeni su koeficijenti varijacije <10% i u seriji i iz dana u dan. Dobijeni koeficijenti varijacije kretali su se u intervalu 0,38–8,16% u seriji i 3,68–9,63% iz dana u dan. Pošto je dobijena nepreciznost <10% u celom ispitivanom opsegu, *Olympus* imunoturbidimetrijski test zadovoljava definisane kriterijume u pogledu reproducibilnosti za procenu kardiovaskularnog rizika. Takođe, test zadovoljava preporuke i u pogledu osetljivosti pošto je dobijena granica detekcije od 0,11 mg/L.
2. *Olympus* imunoturbidimetrijska metoda je bila u dobroj korelaciji sa imunonefelometrijskom *Dade Behring CardioPhase** hsCRP metodom, preporučenom od strane FDA, u opsegu koncentracija 0,15–10,0 mg/L. Ponderisanom Demingovom regresionom analizom dobijeni koeficijent korelacije iznosio je $r=0,992$. Ni sistematska ni procentualna greška nisu bile statistički značajne. Srednja vrednost relativne razlike na Bland-Altman dijagramu iznosila je $-0,002\%$ ((95% CI = $-0,082 - 0,078\%$), što nije statistički značajno na osnovu Student t-testa razlike parova određivanja. Rasipanje veće od 2Sd kod koncentracija >5 mg/L prisutno na dijagramu relativnih razlika može biti posledica razlika u kalibraciji, faktora karakterističnih za individualne uzorke ili metodoloških razlika između nefelometrijskih i turbidimetrijskih sistema.
3. Rezultati slaganja *Olympus* imunoturbidimetrijske metode sa imunonefelometrijskom u sposobnosti klasifikacije rizika pokazuju da se 95,5% vrednosti određenih dvema metodama svrstava u istu kategoriju rizika, sa 1,5% vrednosti raspoređenih u višu kategoriju rizika i 3,1% rezultata određenih imunoturbidimetrijskom metodom u nižoj kategoriji rizika u odnosu na klasifikaciju definisanu vrednostima dobijenim imunonefelometrijskom metodom. Student t-testom je potvrđeno da ova razlika nije statistički značajna.

4. Među ispitivanim markerima inflamacije i lipidnog statusa povezanih sa aterosklerozom (SAA, fibrinogen, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa, ukupan, HDL, non-HDL i LDL holesterol, trigliceridi, apo A-I, apo B, Lp(a)), zajedno sa karakteristikama kao što su pol, starost, pušenje, hipertenzija, BMI, porodična istorija prevremene pojave KVB i fizička aktivnost, posle serije regresionih analiza, samo su BMI, non-HDL holesterol, fibrinogen i SAA ostali u nezavisnoj asocijaciji sa hsCRP. Dodatna informacija koju oni nose mogla bi da bude komplementarna prediktivnoj vrednosti hsCRP.
5. U grupi učesnika sa procenjenim rizikom u kategoriji 10–20% na osnovu FRS, kod ~50% je nađena koncentracija hsCRP koja je ukazivala na nizak ili visok kardiovaskularni rizik, što se slaže sa literaturnim podacima o sposobnosti hsCRP za reklasifikaciju osoba sa intermedijernim rizikom. U istoj grupi učesnika, koncentracije fibrinogena, SAA, non-HDL holesterola i triglicerida su bile statistički značajno različite među kategorijama rizika određenim na osnovu koncentracije hsCRP. Ovi parametri bi mogli da doprinesu ispravnoj reklasifikaciji osoba sa intermedijernim rizikom uz hsCRP.
6. U grupi biomarkera koja je obuhvatila mokraćnu kiselinu, parametare bubrežne (kreatinin, Cys-C, eGFR_{MDRD}, eGFR_{CKD-EPI}, eGFR_{Cys-C}) i srčane funkcije (NT-proBNP, hs-cTnT), značajne vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije sa koncentracijama hsCRP, posle korekcije uticaja starosti, pola, BMI, hipertenzije i pušenja, ostale su samo za Cys-C i eGFR_{CysC}. Postepenom multiplom linearnom regresionom analizom identifikovan je prediktivni model sa kreatininom, Cys-C i mokraćnom kiselinom kao nezavisnim determinantama koncentracije hsCRP, ali logističkom regresionom analizom nije potvrđen njegov nezavisni prediktivni potencijal.
7. U ispitivanoj populaciji, nizak 10-godišnji rizik na osnovu FRS imalo je 79,8% učesnika; procenat učesnika sa niskim rizikom na osnovu globalnog FRS bio je 69,6%; broj osoba sa visokim 30-godišnjim rizikom od pojave teških komplikacija, odnosno svih oblika KVB, za odgovarajući pol i starost iznosio je 74%, tj. 76%, redom.
8. Raspodela rizika u klasama sa koncentracijom hsCRP <1 mg/L, 1–3 mg/L i >3 mg/L bila je nezavisna od raspodele kategorija rizika na osnovu FRS u ispitivanoj populaciji,

dok klasifikacija na osnovu koncentracije hsCRP nije bila nezavisna u poređenju sa kategorizacijom rizika na osnovu globalnog FRS, niti sa 30-godišnjim rizikom. To ukazuje na zavisnost između viših koncentracija hsCRP i većeg kratkoročnog i dugoročnog rizika od svih oblika kardiovaskularnih komplikacija, kao i većeg dugoročnog rizika od pojave teških komplikacija KVB.

9. Razlike između aktuelne starosti i procenjene starosti srca na osnovu globalnog FRS u pojedinim klasama koncentracije hsCRP bile su statistički značajne, a takođe razlika se statistički značajno povećavala sa porastom koncentracije hsCRP.
10. U ispitivanoj populaciji je prisutno veće opterećenje ukupnim kardiovaskularnim rizikom u odnosu na rizik samo od komplikacija KBS, kao i značajan dugoročni, 30-godišnji rizik. Povezanost rizika sa koncentracijama hsCRP potvrđuje razvijenije aterosklerotske procese, u odnosu na prvobitnu procenu niskog rizika na osnovu standardnog algoritma FRS.
11. Faktorskom analizom ispitivane grupe biomarkera inflamacije, lipidnog statusa, funkcije srca i bubrega identifikovano je pet faktora kojima je objašnjeno 65,3% ukupne varijacije. Izdvojeni faktori su „faktor sistemske inflamacije“ (fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplementa), „kardiorenalni faktor“ (kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C, hs-cTnT i pol), „faktor aterogenog holesterola“ (LDL i non-HDL holesterol), „hemodinamski faktor“ (starost i NT-proBNP) i „metabolički faktor“ (trigliceridi i HDL holesterol). Logistička regresiona analiza je pokazala da je najbolju prediktivnu vrednost model sa svih pet faktora imao za koncentracije hsCRP >1 mg/L. Značajnost se potpuno izgubila za „kardiorenalni faktor“ i „faktor aterogenog holesterola“ u predikciji koncentracija >2 mg/L i >3 mg/L, što se može objasniti malim brojem učesnika u ispitivanju, od kojih je skoro 50% imalo koncentracije hsCRP <1 mg/L.
12. Rezultati ROC analize su pokazali da se prediktivni potencijal logističkog regresionog modela sa pet faktora nije statistički značajno razlikovao od multivarijabilnih logističkih modela sa 19 parametara podvrgnutih faktorskoj analizi i sa 31 polaznih biomarkera kardiovaskularnog rizika, u predikciji prisustva koncentracija hsCRP koje ukazuju na umereno povišen i visok rizik.

13. Sistemska inflamacija, kardioresnalna funkcija, aterogeni lipidni profil, hemodinamski i metabolički status nezavisno doprinose patofiziologiji hronične, subkliničke inflamacije u aterosklerozi, koju oslikava koncentracija hsCRP.
14. Faktorskom analizom 18 ispitivanih parametara (uključujući i hsCRP) koji ne ulaze u izračunavanje FRS, globalnog FRS i skora 30-godišnjeg rizika, izdvojeno je pet klastera, identifikovanih kao „faktor sistemske inflamacije“ (hsCRP, fibrinogen, SAA, A1AGP, haptoglobin, C3 i C4 komponente komplemanta), „faktor aterogene dislipidemije“ (LDL i non-HDL holesterol, apo B i trigliceridi), „kardioresnalni faktor“ (kreatinin, mokraćna kiselina, Cys-C, hs-cTnT), „hemodinamski faktor“ (NT-proBNP) i „lipoproteinski faktor“ (apo A-I i Lp(a)), kojima je objašnjeno 67,4% varijacije u sistemu.
15. Logistička regresiona analiza je pokazala da „faktor sistemske inflamacije“ nije imao statistički značaj u predikciji vrednosti povećanog rizika na osnovu FRS (>10%). „Lipoproteinski faktor“ nije bio značajan prediktor vrednosti ni standardnog ni globalnog FRS. Kod procene 30-godišnjeg rizika i od „kompletne“ i od „teške“ KVB, za vrednosti iznad optimalnih/normalnih za odgovarajući pol i starost „hemodinamski faktor“ nije imao statistički značajan prediktivni potencijal. Iako u prediktivnom modelu pet izdvojenih faktora sastavljenih od biomarkera koji ne ulaze u algoritme izračunavanja korišćenih skorova rizika bar jedan faktor nije bio značajan prediktor povećanog rizika, ROC analiza je pokazala da se logistički model sa izdvojenih pet faktora nije statistički značajno razlikovao u predviđanju povećanog kardiovaskularnog rizika od modela sa svih 18 polaznih biomarkera.
16. Aterogena dislipidemija, kardioresnalna funkcija i hemodinamski status nezavisno doprinose povećanom 10-godišnjem riziku od smrtnog ishoda kao posledice KBS, infarkta miokarda, stabilne i nestabilne angine pektoris procenjenim na osnovu standardnog FRS.
17. Povećan rizik od svih oblika KVB, uključujući smrtni ishod KVB, pojavu svih oblika KBS, šlog, srčanu insuficijenciju i intermitentne klaudikacije na osnovu globalnog FRS povezan je sa sistemskom inflamacijom, aterogenom dislipidemijom, kardioresnalnom funkcijom i hemodinamskim statusom.

18. Dugoročnom, 30-godišnjem riziku iznad normalnog/optimalnog za pojavu teških komplikacija KVB (teške manifestacije KBS – srčana smrt, infarkt miokarda, fatalni i nefatalni šlog) i za pojavu svih oblika kardiovaskularnih komplikacija (teška KBS, srčana insuficijencija, angina pectoris, šlog, tranzitorni ishemijski atak, intremitentne klaudikacije i kongestivna srčana insuficijencija) nezavisno doprinose sistemska inflamacija, aterogena dislipidemija, kardioresrenalna funkcija i status lipoproteina.
19. Ovo ispitivanje je ograničeno malim brojem učesnika od kojih je većina imala nizak kardiovaskularni rizik, bilo na osnovu konvencionalne procene ili na osnovu koncentracije hsCRP. Međutim, zaključci mogu biti značajni s obzirom da osobe sa niskim rizikom čine oko dve trećine ukupne populacije sa rizikom i oko 20% svih kardiovaskularnih komplikacija se dešava u odsustvu tradicionalnih faktora rizika.

7. LITERATURA

1. Savezni zavod za zaštitu zdravlja. Međunarodna klasifikacija bolesti, X revizija. Beograd: Savremena administracija; 1996.
2. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980–2000. *N Engl J Med* 2007;356:2388–98.
3. Young F, Capewell S, Ford ES, Critchley JA. Coronary mortality declines in the US from 1980 to 2002: concealed leveling or mortality rates. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2128–32.
4. Uredba o nacionalnom programu prevencije, lečenja i kontrole kardiovaskularnih bolesti do 2020. godine. Sl. Glasnik RS br 11/2010.
5. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre nacionalne prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; oktobar 2011.
6. Apple FS, Jaffe AS. Cardiac function. U: Burtis CA, Ashwood ER, Brunz DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006:1619–70.
7. McMahan CA, Gidding SS, Viikari JS, et al. Association of pathobiologic determinants of atherosclerosis in youth risk score with carotid artery intima-media thickness in young adults (from the Cardiovascular Risk in Young Finns Study). *Am J Cardiol* 2007;100:1124–9.
8. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837–47.
9. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD, for the MRFIT Research Group. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986;256:2823–8.

10. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I: Reduction in the incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984;251:351–64.
11. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II: The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984;251:365–74.
12. Rifai N, Warnick GR. Lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. U: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006:903–81.
13. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355–74.
14. Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999;353:Suppl II:5–9.
15. Brown BG, Stewart BF, Zhao X-Q, Hillger LA, Poulin D, Albers JJ. What benefit can be derived from treating normocholesterolemic patients with coronary artery disease? *Am J Cardiol* 1995;76:93C–7C.
16. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004;110:227–39.
17. Grundy SM. Promise of low-density lipoprotein-lowering therapy for primary and secondary prevention. *Circulation* 2008;117:569–73.
18. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002;106:3143–421.
19. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360(9326):7–22.

20. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, et al., for PROSPER study group. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk*. *Lancet* 2002;360:1623–30.
21. ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial. Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT). *JAMA* 2002;288:2998–3007.
22. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, et al., ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial–Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:1149–58.
23. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004;350:1495–504.
24. Genest J, McPherson R, Frohlich J, Anderson T, Campbell N, Carpentier A, et al. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult: 2009 recommendations. *Can J Cardiol* 2009;25:567–79.
25. Jackson R. Updated New Zealand cardiovascular disease risk-benefit prediction guide. *BMJ* 2000;320:709–10.
26. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyörälä K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other societies on coronary prevention. *Atherosclerosis* 1998;140:199–270.

27. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2003;10:Suppl 1:1–78.
28. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987–1003.
29. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre nacionalne prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; oktobar 2011.
30. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study. *Circulation* 2002;105:310–5.
31. Woodward M, Brindle P, Tunstall-Pedoe H. Adding social deprivation and family history to cardiovascular risk assessment: the ASSIGN score from the Scottish Heart Health Extended Cohort (SHHEC). *Heart* 2007;93:172–6.
32. Hippesley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, May M, Brindle P. Derivation and validation of QRISK, a new cardiovascular disease risk score for the United Kingdom: prospective open cohort study. *BMJ* 2007;335:136.
33. Jackson R, Lawes CM, Bennett DA, Milne RJ, Rogers A. Treatment with drugs to lower blood pressure and blood cholesterol based on an individual's absolute cardiovascular risk. *Lancet* 2005;365:434–41.
34. Cooney MT, Dudina A, D'Agostino R, Graham IM. Cardiovascular risk-estimation systems in primary prevention: Do they differ? Do they make a difference? Can we see the future? *Circulation* 2010;122:300–10.
35. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:743–53.

36. Kannel WB, Feinleib M, McNamara PM, Garrison RJ, Castelli WP. An investigation of coronary heart disease in families: the Framingham offspring study. *Am J Epidemiol* 1979;110:281–90.
37. Marma AK, Lloyd-Jones DM. Systematic examination of the updated Framingham Heart Study general cardiovascular risk profile. *Circulation* 2009;120:384–90.
38. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PWF, et al. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation* 2006;113:791–8.
39. Cavanaugh-Hussey MW, Berry JD, Lloyd-Jones DM. Who exceeds ATP III risk thresholds? Systematic examination of the effect of varying age and risk factor levels in the ATP III risk assessment tool. *Prev Med* 2008;47:619–23.
40. Lloyd-Jones DM. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* 2010;121:1768–77.
41. Marma AK, Berry JD, Ning H, Persell SD, Lloyd-Jones DM. Distribution of 10-year and lifetime predicted risks for cardiovascular disease in US adults. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003 to 2006. *Circulation* 2010;3:8–14.
42. Pencina MJ, D'Agostino RB, Larson MG, Massaro JM, Vasan RS. Predicting the 30-year risk of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2009;119:3078–84.
43. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohmann EM, Brener SJ, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003;290:898–904.
44. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004;109:6–19.
45. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA* 2003;290:891–7.
46. Koenig W. Cardiovascular biomarkers: added value with an integrated approach? *Circulation* 2007;116:3–5.

47. Greenland P, Smith SC, Grundy SM. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001;104:1863–7.
48. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate end-points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
49. Wang JT. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2011;123:551–65.
50. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation* 2007;115:949–52.
51. Manolio T. Novel risk markers and clinical practice. *N Engl J Med* 2003;349:1587–9.
52. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MSV, et al; on behalf of the American Heart Association Expert Panel on Subclinical Atherosclerotic Disease and Emerging Risk Factors and the Stroke Council. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009;119:2408–16.
53. Myers GL, Christenson RHM, Cushman M, Ballantyne CM, Cooper GR, Pfeiffer CM, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Chem* 2009;55:378–84.
54. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2010;122:e584–e636.
55. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
56. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
57. Verma S, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 2006;113:2135 – 50.
58. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 1999;7:167–77.

59. Kilpatrick JM, Volanakis JE. Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. *Immunol Res* 1991;10:43–53.
60. Zee RYL, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002;162:217–9.
61. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RYL. Relation of polymorphism within the C-reactive gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis* 2005;178:139–45.
62. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001;154:681–9.
63. Verma S, Szmitko PE. Is C-reactive protein a culprit in atherogenesis? U: C-reactive protein and cardiovascular disease. *MediEdition* 2006;53–62.
64. Johnson AM. Amino acids, peptides and proteins. U: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006:533–96.
65. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc gamma receptor II. *J Exp Med* 1999;190:585–90.
66. Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fc gamma receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:995–1001.
67. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003;108:1930–2.
68. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001;158:1039–51.
69. Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Matsui K, Mori T, et al. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1398–404.

70. Venugopal SK, Deveraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol* 2005;166:1265–71.
71. Devaraj S, Torok N, Dasu MR, Samols D, Jialal I. Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells: evidence for an adipose tissue-vascular loop. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1368–74.
72. Singh P, Hoffman M, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Somers VK: Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:e302–7.
73. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem* 2009;55:229–38.
74. Ridker PM. C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem* 2009;55:209–15.
75. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973–9.
76. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:2007–11.
77. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001;285:2481–5.
78. Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002;105:1595–9.
79. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836–43.

80. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998;98:839–44.
81. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230–5.
82. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels. The pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64–70.
83. Balk EM, Lau J, Goudas LC, Jordan HS, Kupelnick B, Kim LU, et al. Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2003;139:670–82.
84. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001;344:1959–65.
85. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557–65.
86. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men. Results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237–42.
87. Koenig W, Löwel H, Baumert J, Meisinger C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: Implications for future risk assessment: results from a large cohort study in Southern Germany. *Circulation* 2004;109:1349–53.
88. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk

- for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 2004;109:837–42.
89. Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, et al. C-reactive protein levels and coronary heart disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993–2003. *Atherosclerosis* 2006;187:415–22.
 90. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 2004;351:2599–610.
 91. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387–97.
 92. Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, et al. C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2005;112:25–31.
 93. Best LG, Zhang Y, Lee ET, Yeh JL, Cowan L, Palmieri V, et al. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in a population with a high prevalence of diabetes. The Strong Heart Study. *Circulation* 2005;112:1289–95.
 94. Laaksonen DE, Niskanen L, Nyyssönen K, Punnonen K, Tuomainen TP, Salonen JT. C-reactive protein in the prediction of cardiovascular and overall mortality in middle-aged men: a population-based cohort study. *Eur Heart J* 2005;26:1783–9.
 95. Wilson PWF, Pencina M, Jacques P, Selhub J, D’Agostino R, O’Donnell CJ. C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2008;1:92–7.
 96. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women. The Reynolds Risk Score. *JAMA* 2007;297:611–9.
 97. Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano M, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: The Reynolds Risk Score for men. *Circulation* 2008;118:2243–51.

98. Cook NR, Buring JE, Ridker PM. The effect of including C-reactive protein in cardiovascular risk prediction models for women. *Ann Intern Med* 2006;145:21–9.
99. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20–8.
100. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Wiviott SD, Blazing MA, Shui A, et al. Clinical relevance of C-reactive protein during follow-up of patients with acute coronary syndromes in the Aggrastat-to-Zocor trial. *Circulation* 2006;114:281–8.
101. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:29–38.
102. Mega JL, Morrow DA, Cannon CP, Murphy S, Cairns R, Ridker PM, et al. Cholesterol, C-reactive protein, and cerebrovascular events following intensive and moderate statin therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2006;22:71–6.
103. Ridker PM. Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein . Rationale and design of the JUPITER trial. *Circulation* 2003;108:2292–7.
104. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195–207.
105. Kones R. Rosuvastatin, inflammation, C-reactive protein, JUPITER, and primary prevention of cardiovascular disease – a perspective. *Drug Des Devel Ther* 2010;4:383–413.
106. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499–511.
107. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med* 1999;6:1019–25.

108. Rifai N, Ridker PM. Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high-sensitivity C-reactive protein and lipid screening. *Clin Chem* 2001;47:28–30.
109. Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Roberts WL, Alexander WR, Biasucci LM, et al. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. Report from the laboratory science discussion group. *Circulation* 2004;110:e545–9.
110. Roberts WL. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. Laboratory tests available to assess inflammation – performance and standardization. A background paper. *Circulation* 2004;110:e572–6.
111. Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological application. *Clin Chem* 2000;46:461–8.
112. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem* 2003;49:1258–71.
113. Ridker PM, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham risk scores. *Circulation* 2004;109:1955–9.
114. Ockene IS, Matthews CE, Rifai N, Ridker PM, Reed G, Stanek E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. *Clin Chem* 2001;47:444–50.
115. Glynn RJ, MacFadyen JG, Ridker PM. Tracking of high-sensitivity C-reactive protein after an initially elevated concentration: the JUPITER study. *Clin Chem* 2009;55:305–12.
116. Kimberly MM, Vesper HW, Caudill SP, Cooper GR, Rifai N, Dati F, et al. Standardization of immunoassays for measurement of high-sensitivity C-reactive protein. Phase I: evaluation of secondary reference materials. *Clin Chem* 2003;49:611–6.

117. Kimberly MM, Caudill SP, Vesper HW, Monsell EA, Miller WG, Rej R, et al. Standardization of high-sensitivity immunoassays for measurement of C-reactive protein, II: two approaches for assessing commutability of a reference material. *Clin Chem* 2009;55:342–50.
118. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383–9.
119. Kresiberg RA, Oberman A. Lipid and atherosclerosis: lessons learned from randomized controlled trials of lipid lowering and other relevant studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:423–37.
120. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:2292–333.
121. DiAngelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009;302:1993 – 2000.
122. Tirosh A, Rudich A, Schochat T, Tekes-Manova D, Israeli E, Henkin Y, et al. Changes in triglyceride levels and risk for coronary heart disease in young men. *Ann Intern Med* 2007;147:377–85.
123. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7B–12B.
124. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998; 81: 13B–7B.
125. Koren E, Corder C, Mueller G, Centurion H, Hallum G, Fesmire J, et al. Triglyceride enriched lipoprotein particles correlate with the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1996;122:105–15.
126. Karpe F, Boquist S, Tang R, Bond GM, de Faire U, Hamsten A. Remnant lipoproteins are related to intima-media thickness of the carotid artery independently of LDL cholesterol and plasma triglycerides. *J Lipid Res* 2001;42:17–21.

127. Sacks FM, Alaupovic P, Moya LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 2000;102:1886–92.
128. Rainwater DL, McMahan CA, Malcom GT, Scheer WD, Roheim PS, McGill HC Jr, et al. Lipid and apolipoprotein predictors of atherosclerosis in youth: apolipoprotein concentrations do not materially improve prediction of arterial lesions in PDAY subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:753–61.
129. Orakzai SH, Nasir K, Blaha M, Blumenthal RS, Raggi P. Non-HDL cholesterol is strongly associated with coronary artery calcification in asymptomatic individuals. *Atherosclerosis* 2009;202:289–95.
130. Blankenhorn DH, Alaupovic P, Wickham E, Chin HP, Azen SP. Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts: lipid and nonlipid factors. *Circulation* 1990;81:470–6.
131. Robinson JG, Wang S, Smith BJ, Jacobson TA. Meta-analysis of the relationship between non-high density lipoprotein cholesterol reduction and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:316–22.
132. Majkić-Singh N. Metabolizam lipida i lipoproteina. U: Majkić-Singh N. *Medicinska biohemija*, II izdanje. Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Srbije. 2006:167–204.
133. Prospective Studies Collaboration. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55000 vascular deaths. *Lancet* 2007;370:1829–39.
134. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8–15.
135. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assman G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13–27.
136. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and atherosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002;161:1–16.

137. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 2000;41:1481–508.
138. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Cohn SD, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994;35:871–82.
139. Rainwater DL. Lipoprotein correlates of LDL particle size. *Atherosclerosis* 2000;148:151–8.
140. Nichols SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen P, Hu T, et al. Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *JAMA* 2007;297:499–508.
141. Kastelein JJP, Isaacsohn JL, Ose L, Hunninghake DB, Frohlich J, Davidson MH, et al. for the Simvastatin Atorvastatin HDL Study Group. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels. *Am J Cardiol* 2000;86:221–3.
142. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of evidence. *JAMA* 2003;290:932–40.
143. Danik JS, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein (a), measured with an assay independent of apolipoprotein (a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA* 2006;296:1363–70.
144. Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB. Non-high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. *JAMA* 2005;112:3376–83.
145. Benn M, Nordestgaard B, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Improving prediction of ischemic cardiovascular disease in the general population using apolipoprotein B: the Copenhagen City Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:661–70.
146. Walldius G, Jurgner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal

- myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001;358:2026–33.
147. Van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stein EA, El-Harchaoui K, Stroes ES, Sandhu MS et al. Role of the apolipoprotein B-apolipoprotein A-I ratio in cardiovascular risk assessment: a case-control analysis in EPIC-Norfolk. *Ann Intern Med* 2007;146:640–8.
 148. Ridker PM, Rifai N, Cook NR, Bradwin G, Buring JE. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B₁₀₀, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA* 2005;294:326–33.
 149. Ingelsson E, Schaefer EJ, Contois JH, McNamara JR, Sullivan L, Keyes MJ, et al. Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women. *JAMA* 2007;298:776–85.
 150. Sniderman AD. Apolipoprotein B versus non-high density lipoprotein cholesterol: and the winner is... *Circulation* 2005;112:3366–7.
 151. Green N, Foiles N, Chan C, Schreiner PJ, Liu K. Elevated fibrinogen levels and subsequent subclinical atherosclerosis: the CARDIA study. *Atherosclerosis* 2009;202:623–31.
 152. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477–82.
 153. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1799–809.
 154. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Additive value of immunoassay-measured fibrinogen and high-sensitivity C-reactive protein levels for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 2006;114:381–7.
 155. Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 2012;367:1310–20.

156. Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. The association of C-reactive protein, serum amyloid A and fibrinogen with prevalent coronary heart disease – baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis* 2001;156:451–6.
157. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, et al. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: The National Heart, Lung and Blood Institute-sponsored Women’s Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* 2004;109:726–32.
158. Kotani K, Yamada T, Miyamoto M, Kario K, Ishibashi S, Taniguchi N. The correlation between the cardio-ankle vascular index (CAVI) and serum amyloid A in asymptomatic Japanese subjects. *Heart Vessels* 2012;27:499–504.
159. Delanghe JR, Langlois MR, De Bacquer D, Mak R, Capel P, Van Renterghem LV, et al. Discriminative value of serum amyloid A and other acute-phase proteins for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002;160:471–6.
160. King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:302–7.
161. Alwaili K, Bailey D, Awan Z, Bailey SD, Ruel I, Hafiane A, et al. The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:402–15.
162. Tölle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res* 2012;94:154–62.
163. Ogasawara K, Mashiba S, Wada Y, Sahara M, Uchida K, Aizawa T, et al. A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;174:349–56.
164. Lewis KE, Kirk EA, McDonald TO, Wang S, Wight TN, O’Brien KO, et al. Increase in serum amyloid A evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation* 2004;110:540–5.
165. Song C, Shen Y, Yamen E, Hsu K, Yan W, Witting PK, et al. Serum amyloid A may potentiate prothrombotic and proinflammatory events in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2009;202:596–604.

166. Engström G, Lind P, Hedblad B, Stavenow L, Janzon L, Lindgärde F. Effects of cholesterol and inflammation-sensitive plasma proteins on incidence of myocardial infarction and stroke in men. *Circulation* 2002;105:2632–7.
167. Eryd SA, Smith JG, Melander O, Hedblad B, Engström G. Inflammation-sensitive proteins and risk of atrial fibrillation: a population-based cohort study. *Eur J Epidemiol* 2011;26:449–55.
168. Grønholdt MLM, Sillesen H, Wiebe BM, Laursen H, Nordestgaard BG. Increased acute phase reactants are associated with levels of lipoproteins and increased carotid plaque volume. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:227–34.
169. Holme I, Aastveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. Inflammatory markers, lipoprotein components and risk of major cardiovascular events in 65 005 men and women in the Apolipoprotein Mortality RISK study (AMORIS). *Atherosclerosis* 2010;213:299–305.
170. Delanghe J, Langlois M, Duprez D, De Buyzere M, Clement D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999;145:287–92.
171. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the Strong Heart study. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1984–90.
172. Vardi M, Blum S, Levy AP. Haptoglobin genotype and cardiovascular outcomes in diabetes mellitus – natural history of the disease and the effect of vitamin E treatment. Meta-analysis of the medical literature. *Eur J Intern Med* 2012;23:628–32.
173. Adams JN, Cox AJ, Freedman BI, Langefeld CD, Carr JJ. Genetic analysis of haptoglobin polymorphisms with cardiovascular disease and type 2 diabetes in the diabetes heart study. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:31.
174. Niculescu F, Rus H. The role of complement activation in atherosclerosis. *Immunol Res* 2004;30:73–80.
175. Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, Sangiorgi Z, Dormi A, Rovinetti C, et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med* 1995;98:357–64.

176. Széplaki G, Prohásk Z, Duba J, Rugonfalvi-Kiss S, Karádi I, Kókai M, et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis* 2004;177:383–9.
177. Dernellis J, Panaretou M. Effects of C-reactive protein and the third and fourth components of complement (C3 and C4) on incidence of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2006;97:245–8.
178. Borges RL, Ribeiro AB, Zanella MT, Batista MC. Uric acid as a factor in the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:113–9.
179. Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008;359:1811–21.
180. Kim SY, Guevara JP, Kim KM, Choi HK, Heitjan DF, Albert DA. Hyperuricemia and coronary heart disease: a systemic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res* 2010;62:170–80.
181. Vekić J, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, Memon L, Zeljković A, Bogavac-Stanojević N, et al. High serum uric acid and low-grade inflammation are associated with smaller LDL and HDL particles. *Atherosclerosis* 2009;207:496–501.
182. Apple FS, Jaffe AS. Cardiac function U: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006:1619–70.
183. Kistrop C, Raymond I, Pedersen F, Gustafsson F, Faber J, Hilderbrandt P. N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein, and urinary albumin levels as predictors of mortality and cardiovascular events in older adults. *JAMA* 2005;293:1609–16.
184. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004;350:655–663.
185. Korngold EC, Januzzi JL, Gantzer ML, Moorthy MV, Cook NR, Albert CM. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and high-sensitivity C-reactive protein as predictors of sudden cardiac death among women. *Circulation* 2009;119:2868–76.

186. McKie PM, Rodeheffer RJ, Cataliotti A, Martin FL, Urban LH, Mahoney DW, et al. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: biomarkers for mortality in a large community-based cohort free of heart failure. *Hypertension* 2006;47:874–80.
187. Christenson RH, Myers GL, Cooper G. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP) and cardiovascular disease risk. U: Myers GL. *Laboratory Medicine Practice Guidelines: Emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease.* NACB AACC 2009;59–63.
188. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525–38.
189. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197–204.
190. Wallace TW, Abdullah SM, Drazner MH, Das SR, Khera A, McGuire DK, et al. Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population. *Circulation* 2006;113:1958–65.
191. Apple FS. High-sensitivity cardiac troponin for screening large populations of healthy people: is there risk? *Clin Chem* 2011;57:537–9.
192. Saunders JT, Nambi V, de Lemos JA, Chambless LE, Virani SS, Boerwinkle E, et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation* 2011;123:1367–76.
193. Everett BM, Cook NR, Magnone MC, Bobadilla M, Kim E, Rifai M, et al. Sensitive cardiac troponin T assay and the risk of incident cardiovascular disease in women with and without diabetes mellitus: the Women’s Health Study. *Circulation* 2011;123:2811–8.
194. Leistner DM, Klotsche J, Pieper L, Stalla GK, Lehnert H, Silber S, et al. Circulating troponin as measured by sensitive assay for cardiovascular risk assessment in primary prevention. *Clin Chem* 2012;58:200–8.

195. Apple FS, Steffen LM, Pearce LA, Murakami MM, Luepker RV. Increased cardiac troponin I as measured by a high-sensitivity assay is associated with high odds of cardiovascular death: the Minnesota Heart Survey. *Clin Chem* 2012;58:930–5.
196. Myers GL. Markers of renal function and cardiovascular disease risk. U: Myers GL. *Laboratory Medicine Practice Guidelines: Emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease*. NACB AACC 2009;43–50.
197. Shulman NB, Ford CE, Hall WD, et al. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* 1989;13:180–93.
198. Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999;56:2214–9.
199. Lamb E, Newman DJ, Price CP. Kidney function tests. U: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006:797–835.
200. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Kidney Disease Outcome Quality Initiative*. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1–S246.
201. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296–305.
202. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, MacLeod B, Salem DN, Griffith JL, et al. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerosis cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:47–55.
203. Brugts JJ, Knetsch AM, Mattace-Ruso FUS, Hofman A, Witteman JC. Renal function and risk of myocardial infarction in an elderly population. The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 2005;165:2659–65.
204. Dajak M, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Funkcija bubrega – procena brzine glomerularne filtracije. *J Med Biochem* 2007;26:51–7.

205. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
206. Åkerblom A, Wallentin L, Siegbahn A, Becker RC, Budaj A, Buck K, et al. Cystatin C and estimated glomerular filtration rate as predictors for adverse outcomes in patients with ST-elevation and non-ST-elevation acute coronary syndromes: results from Platelet Inhibition and Patient Outcome Study. *Clin Chem* 2012;58:190–9.
207. Luc G, Bard JM, Lesueur C, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, et al. Plasma cystatin-C and development of coronary heart disease: the PRIME study. *Atherosclerosis* 2006;185:375–80.
208. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC. Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem* 2009;55:1932–43.
209. Imai A, Komatsu S, Ohara T, Kamata T, Yoshida J, Miyaji K, et al. Serum cystatin C is associated with early stage coronary atherosclerotic plaque morphology on multidetector computed tomography. *Atherosclerosis* 2011;218:350–5.
210. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
211. Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2004–31.
212. National Cholesterol Education Program. Risk assessment tool for estimating 10-year risk of developing hard CHD (myocardial infarction and coronary death). <http://hin.nhlb.nih.gov/atpiii/calculator.asp?uesrtype=prof>.
213. Canadian Cholesterol Guidelines. Risk assessment tool for estimating a patient's 10-year risk of developing cardiovascular disease. <http://www.cvdriskcheck.com/FraminghamRiskScore.aspx>
214. Pencina MJ, D'Agostino RB, Larson MG, Massaro JM, Vasan RS. Predicting the 30-year risk of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2009;119:3078–84. Data Supplement. <http://circ.ahajournals.org/content/119/24/3078/suppl/DC1>

215. Sheskin, DJ. Principal components analysis and factor analysis. U: Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 4th edition. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group. 2007:1616–45.
216. Wierzbicki AS, Reynolds TM, Gill K, Alg S, Crook MA. A comparison of algorithms for initiation of lipid lowering therapy in primary prevention of coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:63–71.
217. Hackman DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: A critical review of the evidence. *JAMA* 2003;290:932–40.
218. Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J, et al. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin Chem* 2001;418–25.
219. Hamwi A, Vukovich T, Wagner O, Rumpold H, Spies R, Stich M, et al. Evaluation of turbidimetric high-sensitivity C-reactive protein assays for cardiovascular risk estimation. *Clin Chem* 2001;47:2044–6.
220. Rothkrantz-Kos S, Schmitz MPJ, Bekers O, Menheere PPCA, van Dieijen-Viesser MP. High-sensitivity C-reactive protein methods examined. *Clin Chem* 2002;48:359–62.
221. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem* 1997;43:52-8.
222. Lolekha PH, Chittamma A, Roberts WL, Sritara P, Cheepudomwit S, Suriyawongpaisal P. Comparative study of two automated high-sensitivity C-reactive protein methods in a large population. *Clin Biochem* 2005;38:31-5.
223. Devleeschouwer N, Libeer JC, Chapelle JP, Struway CL, Gyssels C, L'Hoir A, Albert A. Factors influencing between-laboratory variability of C-reactive protein results as evidence by the Belgian External Quality Assessment (EQA) scheme. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:435-40.
224. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W; Atherosclerosis Risk in Communities Study Group. Coronary heart disease prediction

- from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 2001;104:1108–13.
225. Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Kremastinos DT. Inflammatory and non-invasive vascular markers: the multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008;199:3–11.
226. Mora S, Lee I, Buring J, Ridker PM. Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. *JAMA* 2006;295:1412–9.
227. Greenfield JR, Samaras K, Jenkins AB, Kelly PJ, Spector TD, Gallimore JR, et al. Obesity is an important determinant of baseline serum C-reactive protein concentration in monozygotic twins, independent of genetic influences. *Circulation* 2004;109:3022–8.
228. Mohamed-Ali V, Goodricke S, Rawest, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4196–200.
229. Ingelsson E, Schaefer EJ, Contois JH, McNamara JR, Sullivan L, Keyes MJ, et al. Clinical utility of different lipid measures for predictions of coronary heart disease in men and women. *JAMA* 2007;298:776–85.
230. Grundy SM. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. *Circulation* 2002;106:2526–9.
231. Mazzali M, Kanellis J, Han L, Feng L, Xia Y, Chen Q, et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F991–7.
232. Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003;41:1287–93.

233. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3553–62.
234. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003;108:2154–69.
235. Wannanethee SG, Shaper AG, Perry IJ. Serum creatinine concentration and risk of cardiovascular disease: a possible marker for increased risk of stroke. *Stroke* 1997;28:557–63.
236. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2008;74:S4–9.
237. Upadhyay A, Larson MG, Guo CY, Vasan RS, Lipinska I, O'Donnell CJ, et al. Inflammation, kidney function and albuminuria in the Framingham Offspring cohort. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:920–6.
238. Sarnak MJ, Poindexter A, Wang SR, Beck GJ, Kusek JW, Marcovina SM, et al. Serum C-reactive protein and leptin as predictors of kidney disease progression in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int* 2002;62:2208–15.
239. Muntner P, Hamm LL, Kusek JW, Chen J, Whelton PK, He J. The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004;140:9–17.
240. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003;107:87–92.
241. Grubb A, Nyman U, Bjork J, Lindstrom V, Rippe B, Sterner G, Christensson A. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the

- Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children. *Clin Chem* 2005;51:1420–31.
242. Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. Role of cysteine protease cathepsins in heart disease. Focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation* 2012;125:1551–62.
243. Berry JD, Liu K, Folsom AR, Lewis CE, Carr JJ, Polak JF, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study and Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation* 2009; 119:382–9.
244. Kim PY, Stewart RJ, Lipson SM, Nesheim ME. The relative kinetics of clotting and lysis provide a biochemical rationale for the correlation between elevated fibrinogen and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2007;5:1250–6.
245. Lee YS, Choi JW, Hwang I, Lee JW, Lee JH, Kim AY, et al. Adipocytokine orosomucoid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *J Biol Chem* 2010;285:22174–85.
246. Boncela J, Smolarczyk K, Wyroba E, Cierniewski CS. Binding of PAI-1 to endothelial cells stimulated by thymosin β 4 and modulation of their fibrinolytic potential. *J Biol Chem* 2006;281:1066–72.
247. Spagnuolo MS, Cigliano I, D'Andrea LD, Pedone C, Abrescia P. Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2005;280:1193–8.
248. deFilippi C, Seliger SL, Kelley W, Duh SH, Hise M, Christenson RH, et al. Interpreting cardiac troponin results from high-sensitivity assays in chronic kidney disease without acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2012;58:1342–51.
249. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 2011;121:4393–408.
250. Tsutamoto T, Kawahara C, Yamaji M, Nishiyama K, Fujii M, Yamamoto T, Horie M. Relationship between renal function and serum cardiac troponin T in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009;11:653–8.

251. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433–8.
252. Pischon T, Hu FB, Rexrode KM, Girman CJ, Manson JE, Rimm EB. Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men. *Atherosclerosis* 2008;197:392–9.
253. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391–7.
254. Aronson D, Avizohar O, Levy Y, Bartha P, Jacob G, Markiewicz, W. Factor analysis of risk variables associated with low-grade inflammation. *Atherosclerosis* 2008;200:206–12.
255. Williams K, Sniderman AD, Sattar N, D’Agostino R, Wagenknecht LE, Haffner SM. Comparison of the association of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol with other cardiovascular risk factors in the insulin resistance atherosclerosis study. *Circulation* 2003;108:2312–6.
256. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, Aubin F, Rattier S, Foucher C, et al. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation* 2003;107:1733–7.
257. Corsetti JP, Zareba W, Moss AJ, Rainwater DL, Sparks CE. Elevated HDL is a risk factor for recurrent coronary events in a subgroup of non-diabetic postinfarction patients with hypercholesterolemia and inflammation. *Atherosclerosis* 2006;187:191–7.
258. Zheng L, Nukuma B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529–41.

259. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *PNAS* 2004;101:13032–7.
260. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004;279:42977–83.

Biografija autora

Snežana Jovičić je upisala Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu školske 1995/96. godine, a diplomirala 01.02.2002. godine sa prosečnom ocenom 9,24. Od 20.02.2002. godine zaposlena je u Centru za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku Instituta za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije. Položila je specijalistički ispit iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu 26.12.2011. godine sa odličnim uspehom. Na doktorske studije iz medicinske biohemije prebačena je sa magistarskih posle diplomskih studija školske 2006/2007. godine. Od školske 2009/2010. godine angažovana je kao honorarni saradnik u nastavi na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Imenovana je za Načelnika Odeljenja laboratorije u Klinici za kardiohirurgiju Kliničkog centra Srbije od 21.09.2012.

U toku osnovnih studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Ministarstva nauke Republike Srbije od školske 1997/1998. godine do kraja studija. U periodu 2006–2010. godine bila je član Američke asocijacije za kliničku hemiju (AACC) zahvaljujući *Gallwas Membership Grant* nagradi. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS), gde je angažovana kao blagajnik, predsednik Komiteta za informatičku delatnost i član Komiteta za izdavačku delatnost, Komiteta za spoljašnju kontrolu kvaliteta, Komiteta za unapređenje rada podmlatka DMBS i Komiteta za saradnju sa IFCC, EFLM, BCLF i srodnim organizacijama u zemlji. Takođe, član je IFCC *e-newsletter* radne grupe i dopisni član radne grupe EFLM „*Patient Focused Laboratory Medicine*“. Od septembra 2011. godine radi i kao izvršni urednik *Journal of Medical Biochemistry*, časopisa koji izdaje DMBS. Član je Skupštine Komore biohemičara Srbije od njenog osnivanja.

Autor je ukupno 11 radova u međunarodnim i nacionalnim časopisima i 24 saopštenja na međunarodnim i skupovima od nacionalnog značaja štampanim u izvodu. Iz doktorske disertacije objavila je dva rada u međunarodnim časopisima i ima 8 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Снежана Јовичић _____

број индекса _____ 64/06 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Факторска анализа и повезаност липидних, инфламаторних, срчаних и бубрежних биомаркера са Ц-реактивним протеином у категоризацији кардиоваскуларног ризика»

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

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2013.

Снежана Јовичић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Снежана Јовичић

Број индекса 64/06

Студијски програм докторске студије из медицинске биохемије

Наслов рада «Факторска анализа и повезаност липидних, инфламаторних, срчаних и бубрежних биомаркера са Ц-реактивним протеином у категоризацији кардиоваскуларног ризика»

Ментор Проф. др Нада Мајкић-Singh

Потписани/а Снежана Јовичић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 21.06.2013.

Снежана Јовичић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

«Факторска анализа и повезаност липидних, инфламаторних, срчаних и бубрежних биомаркера са Ц-реактивним протеином у категоризацији кардиоваскуларног ризика»

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.06.2013.



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 прераде. 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 прераде. 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.