



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Сенада Д. Павловић

**БИОМАРКЕРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ У
ИСХЕМИЈСКОЈ БОЛЕСТИ СРЦА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012

Мојој породици,

За бескрајну љубав и подршку.

1. Увод

Кардиоваскуларне болести су водећи узрок оболевања и смртности у развијеним земљама и земљама у развоју са тенденцијом значајног пораста у неколико последњих деценија. Од укупног кардиоваскуларног морталитета, око 52% је последица исхемијске болести срца (*Conti, 2005; Rosamond i sar., 2007*).

Исхемијска болест срца је водећи узрок смртности код мушкараца после 35 године старости, а код оба пола после 45 година старости. Између 35-55 године смртност је 5 пута већа код мушкараца него код жена. Жене пре менопаузе су релативно поштеђене ове болести, осим уколико имају више фактора ризика. Са годинама се постепено губи та разлика, тако да су у осмој деценији подједнако заступљена оба пола (*Vasiljević-Pokrajčić, 2004*).

Исхемијска болест срца је скуп клиничких синдрома који настају због исхемије миокарда, која је последица промењене коронарне циркулације и несразмера потребе миокарда за кисеоником и снабдевања миокарда кисеоником (*Štambuk, 2008*). Најчешћи узрок исхемијске болести срца, код 90% болесника, је атеросклероза коронарних артерија. Атеросклероза је сложен процес мултифакторијалне етиологије који настаје као ексцесиван инфламаторно-фибропролиферативан одговор на различите форме оштећења ендотела (*Sima i sar., 2009*). Како је атеросклероза у основи кардиоваскуларних обољења, манифестује се у зависности од тога да ли је атеросклеротична плоча, коју чине фиброзна капа и липидни базен, стабилна или нестабилна.

Иницијација атеросклеротске лезије у директној је корелацији са присуством бројних кардиоваскуларних фактора ризика који доводе до дисфункције ендотела (*Libby, 2002*). Фактори ризика појединачно или чешће удружени, доводе до промене функције ендотела и преваге вазоконстрикторних утицаја, проинфламаторних, протромботичних и пролиферативних процеса у зиду артеријских крвних судова (*De Backer i sar., 2003*).

Све је више доказа да традиционални фактори ризика за исхемијску болест срца, као што су липидни поремећаји, повишен крвни притисак, дијабетес и пушење, могу само делимично да објасне механизам настанка овог обољења и све више доказа у прилог маркера инфламације као потенцијалних фактора ризика за различита кардиоваскуларна обољења (*Patel i sar., 2008*). Инфламација има кључну улогу у процесу атеросклерозе, не само као фактор иницијације, већ и значајан фактор његове прогресије. Континуирани инфламаторни процеси воде еволуцији некомплицованих атероматозних плакова у комплексне и вулнерабилне атероме. Плак у коме букти инфламација сматра се извором ерозије интима и руптуре и, због тога, акутне исхемије (*Libby, 2006*). Мада је неколико клиничких студија указало на повећање степена инфламације у исхемијској болести срца, веза између степена инфламације и стадијума исхемијске болести срца и даље се истражује. Сама помисао да је инфламацијски процес у основи патогенезе исхемијске болести срца, довела је до постављања питања о постојању везе између маркера инфламације, показатеља ендотелне активности и степена прогресије исхемијске болести срца (*Patel i sar., 2008*).

2. Преглед литературе

2.1. Ишемијска болест срца и атеросклероза

Ишемијска болест срца има тајанствену еволутивност, често и асимптоматски ток, а у новије време и тенденцију подмлађивања болести, односно епидемиолошког ширења ка млађим старосним групама (*Vasiljević-Pokrajčić, 2000*).

Ишемијска болест срца, као последица хиперперфузије миокарда изазване дискрепанцом између његових тренутних потреба и снабдевености кисеоником, најчешће је узрокована коронарном атеросклерозом. Атеросклероза је хронична болест великих артерија, при чему инфламација има кључну улогу у настанку, прогресији и руптури атеросклеротског плака.

Атеросклеротске лезије, чије формирање почиње још током првих година живота, последица су динамичног узајамног дејства полигенске основе, имунолошких, метаболичких и хемостазних процеса који су потенцирани многобројним факторима ризика. Факторе ризика за атеросклерозу можемо поделити на велике (пушење цигарета, хипертензија, повећан укупни и LDL-холестерол, низак HDL-холестерол, дијабетес и године живота), предиспонирајуће (гојазност, посебно абдоминална, физичка неактивност, породично оптерећење за коронарну болест и психосоцијални фактор) и условне (повећани триглицериди, мале LDL честице, повишен хомоцистеин, повишен липопротеин (а) (Lp(a)), тромботски фактори и инфламаторни фактори) (*Vasiljević-Pokrajčić, 2004*). Фактори ризика за настанак атеросклерозе, на мање или више сличан начин, доводе до дисфункције ендотела, нарушавају васкуларну хомеостазу и иницирају инфламаторне процесе. На тај начин инфламаторни и хемостазни поремећаји доводе до иницијације и прогресије атеросклерозе (*De Backer i sar., 2003*).

Ендотелна дисфункција у атеросклерози карактерише се серијом раних промена које предходе формирању лезије. Иницијална лезија у развоју атеросклерозе настаје када леукоцити, односно моноцити, прођу кроз ендотелну баријеру у интиму кроз интактан, али активисан ендотел. Централну улогу у активацији ендотела има транскрипциони, нуклеарни фактор-капа Б (NF-κB), који је активисан учешћем цитокина и слободних радикала кисоника (ROS). Значај овог фактора у процесу атерогенезе потврђује чињеница да постоји изражена корелација проатерогених агенаса, као што су хиперхолестеролемија и оксидативно модификоване LDL-честице (ox-LDL), и активације NF-κB. Он је идентификован у глаткомишићним ћелијама, макрофагима и ендотелним ћелијама хуманих атеросклеротичних плакаова (*Tousoulis i sar., 2003*).

Описана активација ендотела је иницијални догађај у атерогенези изазван проинфламаторним цитокинима који су ослобођени из моноклеарних ћелија крви, моноцита, лимфоцита и тромбоцита. Активисане ендотелне ћелије експримирају аутокрине продукте- простаноиде, тромбоцитни активирајући фактор и азот-моноксид (NO). Цитокини индукују синтезу и секрецију ендотелних адхезионих молекула, као што су интрцелуларни адхезиони молекул-1 (ICAM-1), васкуларни адхезиони молекул-1 (VCAM-1) и Е-селектин који посредују у мобилизацији леукоцита ка месту инфламације. Индукују, такође, и продукцију интерлеукина (IL), IL-6 и IL-1, као и рецепторе за фактор

некрозе тумора (TNF) и IL-1, ендотелну NADPH оксидазу (која доводи до продукције ROS), IL-8 (моћан хемоатрактант за полиморфонуклеарне леукоците) и један додатни фактор који изазива дегранулацију неутрофила, стимулише оксидативни стрес и продукцију ROS. Продукцијом хемоатрактаната и адхезионих молекула мобилишу се моноцити и леукоцити и остварује процес миграције кроз васкуларни ендотел. У ендотелној дисфункцији долази до усходне регулације ендотелних адхезионих молекула, леукоцитне адхезије, повишене ендотелне пермеабилности, миграције леукоцита у артеријски зид и липопротеинске инфилтрације (*Greaves i Channon, 2002; Tedgui i Mallat, 2006*).

Након миграције у интиму, моноцити се трансформишу у макрофаге, који нормално нису компоненте ћелијског зида. Емигрирали моноцити могу ослободити цитотоксичне супстанце (хидролитичке ензиме и ROS), цитокине (TNF), факторе раста и прокоагулантне супстанце (*Ross, 1999*). Диференцирањем моноцита у макрофаге, који на својој мембрани такође експримирају лецитину сличан рецептор за ох-LDL (LOX-1), долази до преузимања и деградације ох-LDL, чиме се макрофаги претварају у пенасте ћелије. На тај начин настају иницијалне атеросклеротске лезије- масне пруге. Ендотелне ћелије и макрофаги се понашају као антиген презентујуће ћелије, доводе до активације Т-лимфоцита који продукују TNF и IL-1 (*Haraba i Antohe, 2011*). Интеракција CD40 на активираним Т-лимфоцитима, ендотелу, глаткомишићним ћелијама и CD40L на макрофагима, доводи до даље активације ендотелних ћелија (синтеза цитокина IL-1 и IL-6, хемокина IL-8, моноцитног хемоатрактантног протеина (MCP-1), ткивног фактора (TF), васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF), фактор раста фибробласта (FGF) и фактора раста пореклом из тромбоцита (PDGF), и ендотелних металопротеиназа), моноцита и макрофага (IL-6, TNF, MCP-1, инхибитора активације плазминогена (PAI-1), матриксних металопротеиназа-MMP), и глаткомишићних ћелија (IL-6, MCP-1, PAI-1, TF). На овај начин долази до прогресије у стадијум масне пруге- најраније препознатљиве лезије атеросклерозе, узроковане агрегацијом липидима богатих пенастих ћелија, насталих из макрофага, Т- лимфоцита и глаткомишићних ћелија (*Spagnoli i sar., 2007*).

Под утицајем IL-1, TNF, IL-18, IL-1 β , ох-LDL, ROS, долази са једне стране до активације MMP₉, а са друге стране до активације рецептора за тромбин, рецептор активације протеаза PAR-1 и PAR-4 (на мембрани тромбоцита са продукцијом PDGF) и PAR-2 на мембрани глаткомишићних ћелија. На овај начин, под утицајем MMP, долази до разградње базалне мембране глаткомишићних ћелија и њихове миграције у интиму, а PDGF доводи до њихове пролиферације, стварања колагена и фиброзне капе. Крварењем из неоваскуларних структура, стварају се услови за даљи раст плака и покретања процеса активације тромбоцита унутар плака. Њиховом дегранулацијом, ослобађају се цитокини, TF, PAI-1, PAI-3, XIII фактори коагулације, PDGF, тромбоксан А₂ (ТхА₂) и серотонин, што даље ствара услове за инфламацију, тромбозу *in situ* и пролиферацију глаткомишићних ћелија са последичном дестабилизацијом плака, ерозијом и/или руптуром, а потом и интракоронарном тромбозом (*Packard i Libby, 2008; Borissoff i sar., 2011*).

Развој атеросклеротског плака указује на напредујући стадијум процеса атеросклерозе и настаје услед смрти липидима богатих пенастих ћелија из масних пруга и даље акумулације макрофага. Нагомилане пенасте ћелије оштећују ендотел, што је један од значајних стимулатора миграције глаткомишићних ћелија из медије у интиму, али и њихове трансформације из контрактилног у секреторни тип праћених синтезом различитих компоненти екстраћелијског матрикса, што такође, доприноси развоју атеросклерозе. Поред тога, глаткомишићне ћелије луче MCP-1, који даље привлачи моноците у интиму.

Мембране глаткомишићних ћелија постају богате у неестерификованом холестеролу, убрзо после откривања хиперхолестеролемије у серуму. Са порастом мембранског холестерола, мембране постају тање и развијају посебне холестеролске домене. Ове промене у мембрани повећавају пермебилитет глаткомишићних ћелија за калцијум и индукују различите промене у њиховој функцији које доприносе ћелијским атерогеним процесима за време стварања плака. Доказано је да акумулација повишеног мембранског холестерола може допринети ћелијским дефектима одговорним за трансформацију глаткомишићних ћелија у атеросклеротични фенотип (*Tulenko i sar., 2001*).

Миграција глаткомишићних ћелија у интиму и укључивање колагених влакана резултује формирањем протективне фиброзне капе преко липидног језгра. Фиброзна капа је кључна компонента зрелог атеросклеротског плака и она одваја високо тромбогено, липидима богато језгро од циркулишућих тромбоцита и других фактора коагулације. Стабилни атеросклеротски плакови карактеришу се некротичним липидним језгром које је покривено фиброзном капом богатом глаткомишићним ћелијама. Лезије се шире на „раменима“ процесом континуиране леукоцитне адхезије (*Schrijvers i sar., 2007*).

Сам атеросклеротски плак може бити узрок компликација, које су последица његове величине, редукованог луминалног протока крви и његове тенденције да еродира или руптурира. Ерозија или руптура се јављају у плаковима који су вулнерабилни. Фактори који могу утицати на њихову вулнерабилност укључују хипертензију, турбулентни проток крви и повећан број инфламаторних ћелија, језгро богато липидима и танку фиброзну капу са ретким глаткомишићним ћелијама или колагеним влакнима. И ерозија и руптура могу водити формирању тромба на месту плака и оклузији крвног суда (*Pasterkamp i Falk, 2000*).

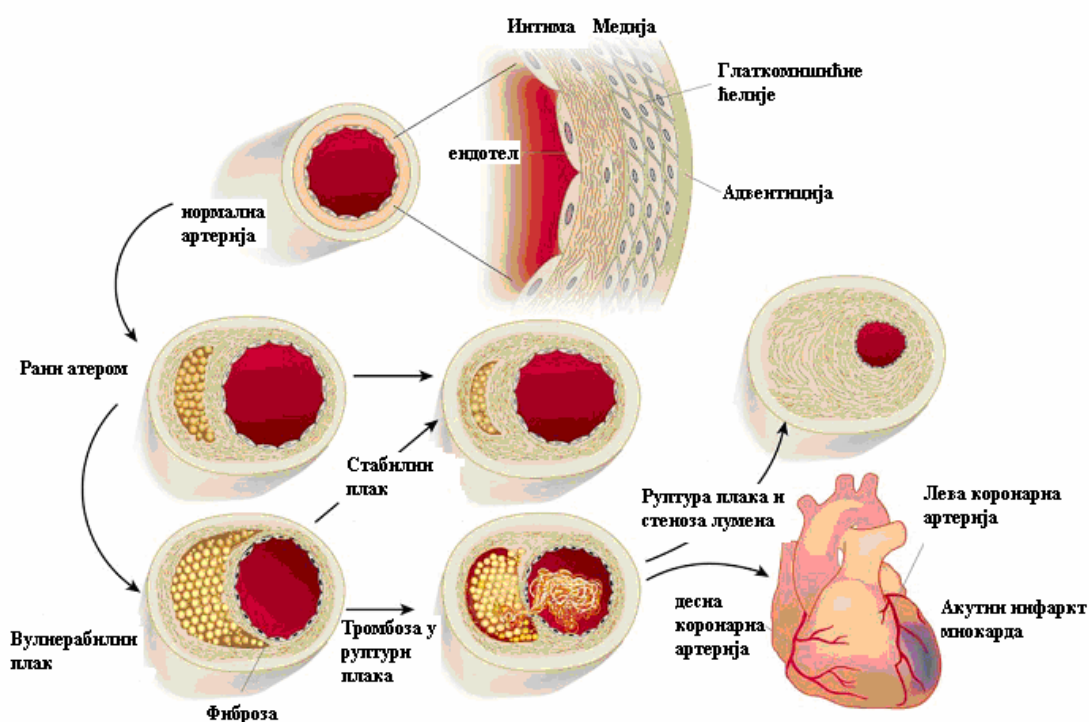
Стабилна фиброзна капа плака се састоји од густог фиброзног екстрацелуларног матрикса, који је одговоран за чврстину капе. Метаболизам матрикса и његово формирање зависе од равнотеже синтезе и разлагања у фиброзној капи, посебно у граничним регионима. Васкуларне глаткомишићне ћелије синтетишу протеине екстрацелуларног матрикса, колаген и еластин. У нестабилној фиброзној капи, активисани Т- лимфоцити обезбеђују сигнале преко интерферона гама (IFN- γ), који инхибише функцију мишићних ћелија и воде коначно снижењу формирања колагена. Макрофаги, активисани од стране IFN- γ , који се надовезују на IL-1, TNF, MCP-1 и стимулирајући фактор макрофагних колонија (M-CSF) воде повећаној продукцији колагеназа, желатиназа, стромелизина и других протеаза и пептидаза које даље разлажу и ограничавају формирање колагена у фиброзној капи.

Стабилни плак карактеришу оскудно липидно језгро, сиромашно инфламаторним супстратом и дебела фиброзна капа, са обиљем фиброзних елемената и мало инфламаторног супстрата. Стабилан атеросклеротски плак је патофизиолошка база за стабилну ангину пекторис, у којој се исхемија јавља као последица атеросклерозом сужене коронарне артерије, која није у стању да вазодилатацијом омогући довољну количину кисеоника у условима повећаног захтева. Насупрот њему, нестабилан или вулнерабилан плак карактеришу велико липидно језгро, са некротичним и инфламаторним супстратом, танка фиброзна капа, у ивичним регионима додатно истањена и са присуством мноштва запаљенских ћелија (*Schrijvers i sar., 2007; Li, 2011*).

Руптура атеросклеротичног плака удружена је са истањењем фиброзне капе богате глаткомишићним ћелијама која прекрива језгро. Пошто највише интерстицијалних колагених влакана, значајно за напетост фиброзне капе, произведу глаткомишићне ћелије, њихов губитак може смањити стабилност плака (*Stoneman i Bennett, 2004*). Руптура се

обично јавља на местима истањења и удружена је са регијама у којима постоји јачи улазак и активација макрофага уз ослобађање ММР. Дисфункционалан ендотел над лезијом, језгро богато липидима (посебно у граничним регијама лезије), обиље инфламаторних ћелија и танка фиброзна капа, морфолошка су карактеристика лезија склоних руптури (Li, 2011). Након фисуре, ерозије или руптуре фиброзне капе долази до директног контакта високо тромбогеног материјала липидног језгра са крвном струјом, до активације тромбоцита, активације коагулационе каскаде и стварања интраваскуларног и интраплакалног тромба, са клиничком сликом акутног коронарног синдрома. Зависно од тога да ли акутно формиран тромб доводи до комплетне или парцијалне опструкције лумена крвног суда, долази до различитих манифестација акутних исхемијских синдрома: нестабилна ангина пекторис (нестабилни атеросклеротични плак са неоклузивним тромбом), инфаркт миокарда (нестабилни атеросклеротични плак са оклузивним тромбом) и изненадна срчана смрт (због поремећаја вентрикуларног ритма узрокованог исхемијом).

Клиничка презентација исхемијске болести срца, сходно променама у крвним судовима, укључује нему исхемију, стабилну ангину пекторис, нестабилну ангину пекторис, миокардни инфаркт, срчану инсуфицијенцију и изненадну срчану смрт (Kanjuh i sar., 2011).



Слика 1. Иницијација, прогресија и компликација атеросклеротског плака.

2.2. Маркери инфламације у исхемијској болести срца

2.2.1. Ц-реактивни протеин (CRP)

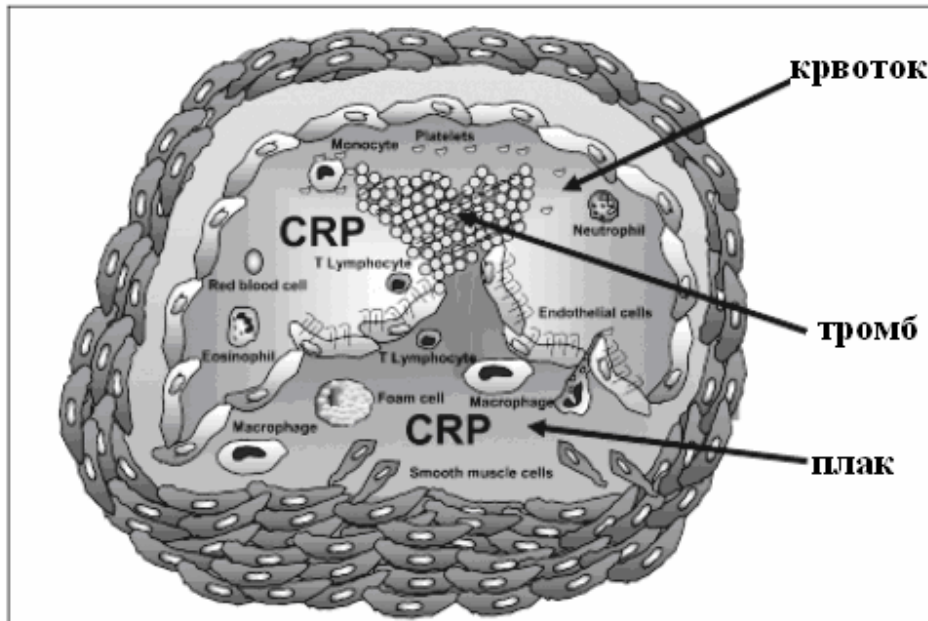
Ц-реактивни протеин (CRP) је први откривени протеин акутне фазе. Открили су га *Tillet* и *Francis* 1930. године у плазми болесника са пнеумокном пнеумонијом, као протеин који се везује за Ц-полисахарид ћелијског зида пнеумокока, отуда и назив Ц-реактивни протеин (*Tillet i Francis, 1930*). Први пут је изолован 1941 године. Ген за синтезу CRP је локализован на првом хромозому (1q21-q23). Припада фамилији пентамеричних протеина, молекулске масе око 118000 Da, изграђен од пет идентичних, негликозилисаних, нековалентно везаних, полипептидних субјединица од којих се свака састоји од остатака 206 аминокиселина (*Thompson i sar., 1999*).

Синтетише се у јетри у току инфекције или инфламације ткива, под дејством IL-6, TNF- α (*Bastard i sar., 2006*) и IL-1 β (*Vermeire i sar., 2004*), ослобођених од стране активираних макрофага, ендотелних ћелија и Т лимфоцита (*Gabay i sar., 1999; Khashabi i sar., 2004*). Његова синтеза је посебно индукована IL-6 који делује на нивоу генома (*Castell i sar., 1990*). Пораст концентрације CRP потенцира ослобађање веће количине IL-6R (рецептора) од стране леукоцита. Створени комплекси IL-6/IL-6R делују антиинфламаторно те тако и CRP утиче на интензитет инфламаторне реакције (*Jones i sar., 1999*).

Новији подаци указују да се CRP, осим у јетри, може продуковати и у атеросклеротској лезији, превасходно од стране глаткомишићних ћелија и макрофага, затим у ткиву бубрега, у неуронима, алвеоларним макрофагима и у адипозном ткиву (*Yasojima i sar., 2001; Calabro i sar., 2003; Kobayashi i sar., 2003; Ridker, 2005; Ramos i sar., 2009*). Запажено је да се mRNA за CRP и протеин експримирају у артеросклеротском плаку и да су њихови нивои десетоструко виши у плаку у односу на нормалну артерију (*Kobayashi i sar., 2003*). Такође је уочено да ендотелне ћелије аорте синтетишу и секретују CRP (*Venugopal i sar., 2005*). Комбинација IL-6 и IL-1 је најснажнији агонист за продукцију CRP. Синтеза и секреција CRP од стране ћелија атеросклеротске лезије паракрином/аутокрином петљом резултује далеко већом локалном концентрацијом CRP но што је у плазми и може допринети проинфламаторним и проатерогеним ефектима. Ово указује да CRP није само ендокрини (системски) инфламаторни маркер, већ и паракрини (локални) проатеросклеротски фактор (*Montecucco i Mach, 2008*).

Неколико студија је доказало да постоји инверзна повезаност нивоа CRP и ендотелне функције (*Fichtlscherer i sar., 2000; Tomai i sar., 2001*). У ендотелу умбиликалне вене, CRP индукује експресију ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина и MCP-1, што повећава адхезију ћелија моноцитне линије (*Pasceri i sar., 2001*). Пресудан ензим у ендотелу је ендотелна азот-моноксид синтаза (eNOS). У ендотелу аорте CRP доводи до значајног смањења нивоа mRNA за eNOS и протеина (*Venugopal i sar., 2002*), као и смањења активности eNOS. Уочено је да CRP разлаже eNOS што доводи до пораста продукције супероксида, смањеног стварања NO и мењања eNOS фосфорилације (*Singh i sar., 2007*). Ови ефекти су посредовани преко Fc γ рецептора CD32 и CD64. Излагање свињских коронарних артериола CRP значајно смањује ослобађање NO и вазодилатацију и, такође, повећава активност NADPH оксидазе и продукцију супероксида у артеријском ендотелу

(*Qamirani i sar., 2005*). У артериолама ретине, CRP инхибише ендотел-зависну NO-посредовану дилатацију стварањем супероксида из NADPH оксидазе (*Nagaoka i sar., 2008*). Делујући инхибиторно на експресију eNOS и ослобађање NO, CRP блокира NO-зависне процесе. Уочено је да CRP доводи до нисходне регулације eNOS и смањује реендотелизацију код мишева *in vivo* (*Schwartz u cap., 2007*). Такође, CRP повећава и активност индуцибилне азот-моноксид синтазе (iNOS). Пораст експресије адхезионих молекула и активности iNOS, као и смањење eNOS јасно указује на улогу CRP у ендотелној активацији (*Montecucco i Mach, 2008*).



Слика 2. Улога CRP у атеросклеротском процесу (*Montecucco i Mach, 2008*).

У ендотелу аорте и коронарних артерија, CRP повећава нитрозилацију ензима простагландин синтазе и смањује ослобађање стабилног метаболита простациклина-простагландина F-1 α (PGF-1 α), потентног вазодилатора и инхибитора агрегације тромбоцита и пролиферације глаткомишићних ћелија (*Venugopal i sar., 2003*).

Ц-реактивни протеин повећава експресију и активност PAI-1 и на тај начин стимулише тромбозу у крвним судовима. Инхибитор активатор плазминогена је маркер поремећене фибринолизе и атеротромбозе и значајно је повишен код пацијената са коронарном артеријском болешћу. Синтезише се у хепатоцитима, ендотелу, глаткомишићним ћелијама и макрофагима. Експресија PAI-1 је регулисана од стране многих фактора укључујући цитокине, оксидативни стрес и ћелијске сигналне молекуле, као што је митоген-активисана протеин киназа (МАРК) (*Chen i sar., 2008*). Уочено је да CRP појачава експресију ендотелина-1 (ET-1) и IL-6, што за узврат стимулише продукцију PAI-1 у ендотелу коронарних артерија (*Bisoendial i sar., 2005*). У ендотелу аорте, CRP индукује mRNA за PAI-1, антиген, и његову активност (*Devaraj i sar., 2003*) активацијом Rho киназе и NF- κ B (*Nakakuki i sar., 2005*). Недостатак PAI-1 успорава прогресију атеросклерозе у каротидној артерији миша. Ц-реактивни протеин инхибише активност ткивног плазминоген активатора (tPA) (*Singh i sar., 2005*), што сугерише улогу CRP као прокоагуланта са значајним уделом у атеротромбози.

У венском ендотелу, CRP подстиче ослобађање моћног ендотелног контрактилног фактора ET-1. Ендотелин-1 није само јак вазоконстриктор, већ и медијатор CRP-индуковане усходне регулације адхезионих молекула и MCP-1 (*Verma i sar., 2002*).

Уочено је да CRP индукује експресију IL-8, хемокина укљученог у адхезију и миграцију моноцита и Т лимфоцита кроз зид крвног суда, који се сматра једним од водећих фактора иницијације и прогресије атеросклерозе (*Devaraj i sar., 2004; Apostolakis i sar., 2009*). Такође, CRP усходно регулише и експресију CD40 и CD40 лиганда, који имају значајну улогу у стабилности плака (*Lin i sar., 2004*).

Скорије идентификован лецитину сличан рецептор за ox-LDL (LOX-1) на ендотелу, има водећу улогу у ox-LDL индукованој дисфункцији ендотела. Ц-реактивни протеин индукујући експресију mRNA за LOX-1 и протеин, повећава адхезију моноцита за ендотел, преузимање ox-LDL од стране макрофага и њихово претварање у пенасте ћелије. Уочено је да CRP покреће преузимање оксидативно модификоване, али не и нативне LDL честице. (*Chang i sar., 2002; Li i sar., 2004*).

Постоји огромно интересовање за специјални субтип прогениторних ћелија изолованих из периферне крви и коштане сржи, тзв. ендотелне прогениторне ћелије (EPC), које имају капацитет да циркулишу, пролиферишу и да се диференцирају у зреле ендотелне ћелије. Количина циркулишућих EPC је сурогат маркер ендотелне дисфункције и будућег кардиоваскуларног догађаја (*Werner i sar., 2005*). Клиничке студије указују да су традиционални фактори ризика за коронарну атеросклерозу повезани са ниским нивоима циркулишућих EPC (*Hill i sar., 2003; Fadini i sar., 2007*). Забележена је негативна корелација системских нивоа CRP и броја циркулишућих EPC код пацијената са нестабилном ангином пекторис (*George i sar., 2004*). *In vitro* студије указују да CRP у концентрацији $\geq 15\text{mg/L}$ значајно редукује број EPC, инхибишући експресију специфичног ендотелног маркера- ендотелне киназе тунике интерне-2, лектина и васкуларног ендотелног кадериона, повећавајући апоптозу EPC и оштећујући EPC индуковану ангиогенезу (*Fujii i sar., 2006*). Ц-реактивни протеин стимулише ангиогенезу и може бити медијатор формирања нових крвних судова у интими вулнерабилног плака, што указује да има различите биолошке ефекте на EPC и зреле ендотелне ћелије (*Turu i sar., 2008*). Уочено је да је EPC-индукована ангиогенеза зависна од присуства NO, и да третирање CRP изазива смањење експресије mRNA за eNOS од стране EPC. Има доказа да CRP изазива пораст оксидативног стреса и да индукује апоптозу EPC. На овај начин CRP има негативан ефекат на EPC сузбијајући антиоксидативну одбрану и покрећући инактивацију теломеразе. Велики број истраживања са доказима из *in vitro* студија истичу проатерогену и протромботску улогу CRP у ендотелу. Ови ефекти узрокују ендотелну дисфункцију, поремећај диференцијације EPC и смањење њиховог преживљавања.

Недавно је доказано да CRP индукује ослобађање проинфламаторних цитокина, IL-1 β , IL-6 и TNF- α из макрофага, као и да инхибише антиинфламаторну активност ових цитокина. Активацијом NF- κ B, CRP повећава адхезију моноцита за ендотел у склопу „shear stress“ и активира експресију ICAM-1 и VCAM-1. Покреће ослобађање M-CSF из макрофага и индукује пролиферацију макрофага. У неутрофилима, CRP значајно и дозно зависно индукује ослобађање супероксид анјон радикала *in vitro*. Функција неутрофила је под утицајем CRP. Неутрофилни N-формил-метионил-леуцил-фенилаланин који индукује хемотаксу и продукцију супероксида, је инхибиран од стране CRP (*Montecucco i Mach, 2008*).

Ц-реактивни протеин стимулише активност mRNA за MMP-1 и MMP-9, протеин и колагеназну активност у моноцитима/макрофагима. На ткивни инхибитор металопротеиназа-

1, CRP нема ефекта. У моноцитима, CRP покреће MCP-1 посредовану хемотаксу усходном регулацијом експресије ЦЦ-хемокинског рецептора 2 (CCR2). Усходна регулација експресије CCR2 се остварује везивањем CRP за Fc γ R и активацијом фофолипазе D1. Сматра се да CCR2 има водећу улогу у формирању атеросклеротског плака (*Han i sar., 2004*).

Проатерогена улога CRP на нивоу моноцита/макрофага се може објаснити способношћу да индукује експресију TF, покреће хемотаксу моноцита и адхезију за ендотел, покреће ослобађање реактивних кисеоничних радикала, MMP-1, CCR2, цитокина и M-CSF, поспешује преузимање ох-LDL и доводи до повећане продукције пенастих ћелија. Присутан је у пенастим ћелијама и активира комплемент у атеросклеротској лезији (*Yasojima i sar., 2001*).

Глаткомишићне ћелије крвних судова могу бити мета проинфламаторне и проатерогене активности CRP. Ангиотензин тип 1 рецептор (AT₁-R) је главни атеросклеротски окидач који убрзава продукцију ROS индуковану ангиотензином II (Ang-II) и миграцију, пролиферацију и ремоделовање глаткомишићних ћелија крвних судова (*Nickenig i Harrison, 2002*). Уочено је да, CRP доводи до усходне регулације mRNA за AT₁-R и протеина и да повећава број AT₁-R везујућих места у глаткомишићним ћелијама крвних судова. Такође, CRP повећава миграцију и пролиферацију глаткомишићних ћелија индуковану Ang-II и покреће продукцију колагена и еластина, кључних матриксних протеина зида крвног суда (*Paul i sar., 2004*). Покрећући апоптозу глаткомишићних ћелија, CRP доприноси прогресији атеросклеротске лезије и порасту вулнерабилности плака. Наиме, CRP индуковано стварање ROS од стране глаткомишићних ћелија, што захтева функционалну активацију Fc γ RIIa и NADPH оксидазе 4, указује на проинфламаторне активности глаткомишићних ћелија и може, евентуално, да покрене атерогенезу и руптуру плака (*Devaraj i sar., 2009*).

Регулацију миграције и пролиферације глаткомишићних ћелија CRP остварује и индиректно индукцијом експресије TF, интегралног мембранског гликопротеина који има кључну улогу у иницијацији коагулације (*Pandolfi, 2005; Cirillo i sar., 2005*). Индукција експресије TF од стране CRP је посредована Fc γ RIIa и стварањем ROS. ROS скавенџери инхибишу CRP-индуковану усходну регулацију експресије TF од стране глаткомишићних ћелија (*Wu i sar., 2008*). У атеросклеротској лезији TF након руптуре плака доводи до тромбозе, васкуларне оклузије и инфаркта миокарда.

Проинфламаторни ефекти CRP се остварују индукцијом експресије iNOS у цитокинима стимулираним кардиомиоцитима и макрофагима пацова, као и стимулацијом NF- κ B у глаткомишићним ћелијама. Парентерална ињекција хуманог CRP у експерименталном акутном инфаркту миокарда, изазваног лигатуром коронарне артерије, повећава поље инфаркта за око 40% (*Griselli i sar., 1999*). Инфузија 1,25mg/kg рекомбинантног хуманог CRP резултује порастом CRP у плазми (од 1,9 до 23,9mg/L), следственом активацијом биомаркера инфламације и коагулације, на шта указује пораст IL-6, IL-8, протромбина 1 и 2 и D-димера у серуму (*Bisoendial i sar., 2007*).

Има доказа да CRP делује као имуномодулатор, који када се комплексира помаже активирање комплемента класичним путем за уништавање страних и оштећених ћелија. Као и антитела, CRP може иницирати опсонизацију, фагоцитозу и лизу нападнутих ћелија, као одговор на запаљенску реакцију. Повећава фагоцитну моћ макрофага који су претходно извршили експресију рецептора за CRP, Fc γ рецептор (Fc γ R) I и II, што показује да може иницирати елиминисање апоптотичних и некротичних ћелија (*Li i Fang, 2004*).

Антиинфламаторни ефекти CRP се могу објаснити способношћу да превенира адхезију неутрофила за ендотелне ћелије смањивањем експресије L-селектина, инхибише продукције супероксид анјон радикала у неутрофилима и стимулише синтезу антагониста IL-1R у моноклеарним ћелијама. Стимулација неутрофила активише мембранске серин протеазе, које разлажу CRP и ослобађају биолошки активне пептиде. Ослобођени пептиди смањују адхезију неутрофила и експресију L-селектина. Ц-реактивни протеин испољава проинфламаторне и антиинфламаторне ефекте, али је нето ефекат антиинфламаторни (*Zouki i sar., 1997*).

Ц-реактивни протеин је најкориснији показатељ одговора акутне фазе и најбитнији маркер инфламације захваљујући својој специфичности, осетљивости и наглom повећању већ у току првих 4-6 сати од почетка инфламације (*Husain i sar., 2002; Khashabi i sar., 2004*). С обзиром да не постоји хепатична резерва, овај период представља време потребно за комплетну синтезу његовог молекула. Удвостручује своју вредност за 8h, највећу концентрацију достиже за 48-72h, има полуживот од 19h и константан клиренс (*Deodhare, 2001; Pepys i Hirschfield, 2003*). Вредности CRP могу бити и до 2000 пута веће од нормалних. Захваљујући свом кратком полуживоту, концентрација овог протеина опада нагло са смањењем интензитета инфламације (*Hansson i sar., 1995; Pepys i Hirschfield, 2003; Khashabi i sar., 2004*) У крви се може одредити већ за 24-48h (*Almirall i sar., 2004*). Код прогресије болести и појаве компликација долази до одражавања високих вредности CRP, чак и до њиховог пораста (*Clyne i sar., 1999; Pepys i Hirschfield, 2003*).

До 1970. год CRP се одређивао само квалитативно, након тога се користе и квантитативна мерења (*Husain i sar., 2002*). У здравих особа, концентрација CRP је испод 2 mg/l. Међутим, у неких особа се може кретати и до 10 mg/l, што се сматра последицом лимитиране стимулације процесима, због чега се вредности испод 10 mg/l сматрају клинички неважним. Нису уочене разлике у концентрацији овог протеина између мушкараца и жена (*Dorđević, 2006*).

У бројним проспективним епидемиолошким студијама је показано да је CRP инфламаторни маркер који предвиђа настанак инфаркта миокарда (*Boekholdt i sar., 2006*), периферне васкуларне болести (*Ridker i sar., 2001*), срчане инсуфицијенције (*Vasan i sar., 2003*), можданог удара (*Gussekkloo i sar., 2000*), поремећаја ритма и изненадне срчане смрти код наизглед здравих људи (*Albert i sar., 2002*).

Нивои CRP унутар 6h од настанка акутног инфаркта миокарда рефлектују почетне нивое CRP у крви и указују на вулнерабилност коронарне лезије која је праћена руптуром атеросклеротског плака, а није захваћена некрозом миокарда. У акутном коронарном синдрому CRP је предиктор нежељеног кардиоваскуларног исхода (*Piestrzeniewicz i sar., 2009*). Може се користити као прогностички маркер код болесника са акутним коронарним синдромом, чак и у одсуству некрозе миокарда, при чему CRP одражава „рањивост“ плака и вероватноћу његове руптуре. Међу водећим је маркерима стратификације ризика будућег коронарног догађаја, с обзиром на то да рефлектује нестабилност атеросклеротског плака и могућност његове руптуре. Повишен је након акутног инфаркта миокарда скоро искључиво на месту некрозе миокарда указујући на место миокардне инфламације. Измерени нивои CRP 12-24h од акутног инфаркта миокарда, предвиђају настанак срчане инсуфицијенције и изненадне срчане смрти (*Suleiman i sar., 2006*). Пик пораста CRP у раној фази инфаркта миокарда је повезан са раним механичким компликацијама, укључујући руптуру миокарда, вентрикуларну анеуризму и формирање тромба. Ниво CRP након инфаркта миокарда достиже свој пик у року од 2 до 4 дана, а затим је потребно 8 до 12 седмица да се врати на базални ниво. Интересантно је да

вредност CRP након акутног инфаркта миокарда не предвиђа могућност реинфаркта. Да би се CRP користио као предиктор новог акутног коронарног догађаја потребно је да прође око 12 седмица, тј. да се вредности CRP врате на базални ниво (*Chan i Ng, 2010*).

Повишени нивои CRP, код пацијената са стабилном и нестабилном ангином пекторис предвиђају будуће коронарне догађаје независно од налаза коронарографије. Корелација вредности CRP и будућих кардиоваскуларних догађаја је нађена независно од старости, пушења, нивоа холестерола, дијабетеса и осталих великих кардиоваскуларних фактора ризика (*Shishehbor i sar., 2003*).

Јасно је да је CRP маркер ризика за кардиоваскуларну болест и препорука је да се користи у примарној превенцији. Очигледно је да је CRP активни учесник у атеротромбози, те специфично деловање на CRP, у будућности, може имати одређене благотворне ефекте.

2.2.2. Фибриноген

Фибриноген је растворљиви гликопротеин плазме молекулске масе 340кДа. Изграђен је од три пара неидентичних, али хомологих полипетдиних ланаца (алфа, бета и гама ланци) међусобно повезаних дисулфидним везама (*Herrick i sar., 1999; Iacoviello i sar., 2001*). Синтетише се у хепатоцитима и фибробластима, а полуживот у плазми му је око 3-4 дана. Ниво фибриногена расте као одговор на инфламаторни стимулус; током акутне фазе вредности фибриногена се могу повећати за 100-200% (*Kritchevsky i sar., 2005*). Фибриноген је реактант акутне фазе, прекурсор фибрина и есенцијална компонента коагулационог система. Поред улоге у тромбози, фибриноген учествује у регулацији ћелијске адхезије, хемотаксе и пролиферације; у вазоконстрикцији на месту повреде зида крвног суда; у стимулацији агрегације тромбоцита и у регулацији вискозности крви (*Hackam i Anand, 2003*). Нормални ниво фибриногена у плазми је од 1,5 до 4,5g/L, док је минимална концентрација фибриногена неопходна за хемостазу 0,5-1,0g/L.

Многи демографски и фактори спољашње средине, као и генетски фактори одређују ниво фибриногена. Док су ефекти већине спољашњих фактора претежно преко реакције акутне фазе, 30-50% вредности фибриногена у плазми је генетски детерминисано (*De Maat, 2001*). Нивои фибриногена су повишени код пацијената са дијабетесом, хипертензијом, гојазношћу и код оних са смањеном физичком активношћу. Пушење и престанак пушења су повезани са порастом, односно смањењем нивоа фибриногена просечно за 0,15g/L (*Hackam i Anand, 2003*).

Фибриноген има значајну улогу у бројним патофизиолошким процесима у организму укључујући инфламацију, атерогенезу и тромбогенезу. Сазнања о улози фибриногена у процесу атеросклерозе су фрагментарна. Предложени механизми укључују инфилтрацију зида крвног суда фибриногеном, хемореолошки ефекат који доводи до повећања вискозности крви, пораст агрегације тромбоцита и формирање тромба. Пораст концентрације фибриногена, секундарно у току инфламације или инфекције, повећава кардиоваскуларни ризик повећавајући реактивност тромбоцита (*Jennings, 2009*).

Процес инфламације је примарно посредован интеракцијом фибриногена са леукоцитима преко површинских адхезионих рецептора, интегрина. Два леукоцитна интегрина, alpha M beta 2 (CD11b/CD18, Mac-1) и alpha X beta 2 (CD11c/CD18, p150,95), су главни фибриногенски рецептори експримирани на неутрофилима, моноцитима, макрофагима и лимфоцитима. Леуцити (моноцити и мијелоцити) могу специфично

индуковати Mac-1 рецептор да везује фибриноген. Способност Mac-1 рецептора да везује фибриноген проистиче из матурационих промена које се дешавају у рецептору током процеса ћелијске диференцијације и не дешавају се код леукоцита који мирују (*Ugarova i Yakubenko, 2001*).

Фирбиноген је и лиганд за ICAM-1, те појачава моноцитно-ендотелну интеракцију повезујући Mac-1 рецепторе на моноцитима са ICAM-1 на ендотелним ћелијама. Због тога се ICAM-1 понаша као ћелијски површински лиганд за α LB2 и α MB2 (Mac-1) интегрине и има кључну улогу у адхезији леукоцита за ендотел. Фирбиноген усходно регулише и повећава концентрацију протеина ICAM-1 на површини ендотелних ћелија, што доводи до пораста адхезије леукоцита на површини ендотела (*Harley i sar., 2000*). Везан за ICAM-1 на ендотелу, фибриноген посредује у адхезији тромбоцита. Интеракција фибриногена и ICAM-1 експримираног на ћелијама је повезана са ћелијском пролиферацијом (*Forsyth i sar., 2001*).

Везан за интегринске рецепторе на леукоцитима, фибриноген убрзава хемотактични одговор, тако да има значајну улогу у процесу инфламације. Један од предложених механизма којим фибриноген индукује проинфламаторне промене у леукоцитима је пораст слободног интраћелијског калцијума и пораст експресије маркера активације неутрофила. Ово доводи до пораста фагоцитозе, антитело-зависне леукоцитне токсичности и одложене апоптозе (*Rubel i sar., 2001*). Фибриноген учествује у убрзању ћелијско-ћелијске интеракције и интеракције ћелије са екстраћелијским матриксом као што је колаген. Стога, фибриноген представља значајан медијатор ћелијско-ћелијске интеракције, адхезије и инфламације (*Walzog i sar., 1995*).

Постоје докази да фибриноген убрзава инфламаторни одговор на биоматеријале. Интеракција са биоматеријалима доводи до конформационих промена унутар молекула фирбиногена и конвертује га у „проинфламаторни“ фибриноген, што резултује експресијом епитопа који интерагују са Mac-1 рецептором на макрофагима (*Hu i sar., 2001*).

Нема сумње да одлагање фибрина може покренути порец атерогенезе и допринети порасту атеросклеротског плака (*Levenson i sar., 1995*). Фибриноген и његови метаболити узрокују оштећење и дисфункцију ендотела бројним механизмима. Многе атеросклеротске лезије, иако не показују фисуру или улцерацију, могу садржати велику количину фибрина, који може бити у форми муралног тромба на интактној површини плака или у слојевима унутар фиброзне капе, затим у липидима богатом језгру или дифузно распоређен у плаку. Овај феномен може бити патофизиолошко објашњење смањене фибринолитичке активности у артеријској интими и смањење концентрације плазминогена код кардиоваскуларних обољења (*Hoffmeister i sar., 1999*).

Унутар интима крвног суда, фибриноген стимулише пролиферацију ћелија везивањем фибронектина који стимулише ћелијску миграцију и адхезију. Деградациони продукти фибрина, који су присутни у интими, стимулишу митогенезу и синтезу колагена, привлаче леукоците и повећавају ендотелну пермеабилност и васкуларни тонус. У одмаклом плаку, фибрин је укључен у везивање LDL и акумулацију липида, утичући на стварање липидног језгра атеросклеротске лезије (*Tousoulis i sar., 2002*).

Упркос сазнањима да је фибриноген значајан фактор ризика за многе кардиоваскуларне и цереброваскуларне поремећаје (*Lowe i sar., 1997*), његови ефекти на васкуларну рекативност су слабо разјашњени. Вазоактивни ефекти фибриногена као интактног протеина су први пут приказани од стране *Hicks u cap. (1996)*. Уочено је да ниска концентрација фибриногена (изнад 2 μ mol) индукује ендотелно-зависну дилатацију

изолованих прстенова вене сафене. Максимална релаксација посредована фибриногеном од око 60% је постигнута код концентрације фибриногена од 1,8 μ mol. Дијаметри изолованих прстенова су враћени на нормалне нивое у присуству виших концентрација фибриногена (5-6 μ mol). Везивање фибриногена за ендотелни ICAM-1 је могући механизам за иницијацију сигналног пута који доводи до синтезе вазоактивних медијатора, NO и простаглицлина (*Hicks i sar., 1996*).

Артеријска констрикција индукована везивањем фибриногена за ICAM-1 је први пут показана од стране *Lominadze u sar. (2005)*. Фибриногеном индукована вазоконстрикција може бити поништена инхибицијом рецептора за ендотелин типа А (*Lominadze i sar., 2005*). Повишени садржај фибриногена повећава продукцију ET-1 појачаном егзоцитозом Weibel-Palade телашаца из ендотелних ћелија. Активација екстрацелуларним сигналом регулисане киназе1/2 (ЕК-1/2), везивањем фибриногена за ендотелни ICAM-1, појачава продукцију ET-1 (*Sen i sar., 2009*).

Остали фибриногенски рецептори на мембрани ендотела су $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_5\beta_1$ интегрини (*Luscinskas i Laver, 1994*). Ендотелни $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_5\beta_1$ рецептори индукују супротне ефекте на васкуларни тонус као одговор на Arg-Gly-Asp-Asn (RGDN)-садржећи пептид. Дилатација васкуларних глаткомишићних ћелија индукована је интеракцијом RGD секвенце са ендотелним $\alpha_v\beta_3$ интегриним (*Mogford i sar., 1996*), док $\alpha_5\beta_1$ интегрин посредује у васкуларној констрикцији (*Mogford i sar., 1997*). Како је везивање фибриногена за ICAM-1 независно од његове RGD секвенце, ICAM-1 може бити укључен у везивање фибриногена за васкуларни ендотел и служи као могући механизам за фибриногеном индуковану вазоконстрикцију (*Pluskota i D'Souza, 2000*). Вазоконстрикторна улога ET-1 је индукована RGD/ $\alpha_5\beta_1$ интегринском интеракцијом (*Mogford i sar., 1997*). Редукција интраћелијског Ca²⁺ глаткомишићних ћелија крвних судова и активација K⁺ канала су укључени у RGD/ $\alpha_5\beta_1$ интегринском интеракцијом-индукованој вазодилатацији. Интегрини $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$ су укључени у миогену вазоконстрикцију артериола попречнопругастих мишића (*Martinez-Lemus i sar., 2005*). Даља испитивања су потребна да објасне дискрепанце у фибриногеном индукованим вазодилататорним и вазоконстрикторним ефектима и да разлуче механизме дејства ендотелних ICAM-1, $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$ интегрини током инфламацијом-индуковане ендотелне активације (*Lominadze i sar., 2005*).

Главна детерминанта вискозности крви је количина фибриногена у плазми. Фибриноген има највећи ефекат на агрегацију еритроцита у односу на остале протеине плазме. Уочено је да се фибриноген може специфично везивати за мембрану еритроцита и да у развоју хипертензије учествују измењени специфични фибриногенски рецептори (*Lominadze i sar., 2002*). Такође, и тромбоцити специфично везују ICAM-4 за мембрану еритроцита преко својих $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрини (GPIIb/IIIa), што покреће тромбозу и испољава штетне ефекте агрегације еритроцита на реолошка својства крви (*Hermand i sar., 2003*).

Повећана концентрација фибриногена у плазми је повезана са развојем хипертензије и можданог удара. Инфламаторни биомаркери као што су IL-6 и IL-1, који су укључени у синтезу фибриногена, су такође повезани са порастом крвног притиска. Ови подаци указују да прекомерна продукција фибриногена учествује у прогресији хипертензије и да чак може бити укључена у њен настанак. Површинска експресија и активност ендотелне ICAM-1 и $\alpha_5\beta_1$ интегрини је повећана током развоја кардиоваскуларне и/или цереброваскуларне болести и доприноси штетним ефектима индукованим порастом концентрације фибриногена (*Becker i sar., 2000; Shankar i sar., 2006; Wang i sar., 2007*).

Иако је разградња фибриногена плазмином *in vivo* прилично ретка, уочен је пораст васкуларне пермеабилности као резултат интеракције тромбина и фибриногена (*Gaffney,*

2001). Продукт деградације фибрина, фрагмент D, повећава пермеабилност ендотелног слоја *in vitro*. Повишен ниво неразграђеног фибриногена појачава формирање филамената актина (F-актин), доводећи до појачаног пропуштања албумина кроз ендотелни слој. Цурење фибриногена кроз ендотелни слој је такође повећано уколико је повишена концентрација фибриногена. Улога везивања фибриногена за ендотелни ICAM-1 и $\alpha_5\beta_1$ интегрин је изражена кроз фибриногеном-индуковану ендотелну пермеабилност (Tyagi i sar., 2008).

Има доказа да је *Ancrod* неделотворан у лечењу исхемија-реперфузија миокардног оштећења, иако редукује ниво фибриногена у крви, зато што истовремено повећава садржај његових деградационих продуката који могу појачати васкуларну озледу (Zacharowski i sar., 2006).

Интегритет ендотелног слоја је нарушен повећањем нивоа недеградисаног фибриногена. Улога активације ERK $\frac{1}{2}$ која прати везивање фибриногена за ендотелни ICAM-1 је могући патофизиолошки механизам за дисрупцију ендотелног слоја и пораста пермеабилности за албумин. Пораст нивоа фибриногена изазива смањену експресију са актином-повезаног протеина-оклудина, *zonule ocludens 1* и *zonule ocludens 2*. Везивање фибриногена за ICAM-1 је умешано у оштећење *zonule ocludens* и активацију матриксних металопроотеиназа. Разградња протеина адхерентног споја, изазвана активацијом MMP, има за последицу цурење фибриногена у субендотел и његову акумулацију у овај субћелијски компартмент. Фибриногеном индуковано цурење се такође може одвијати кроз трансендотелну екстравазацију (Tyagi i sar., 2008; Patibandla i sar., 2009).

Пораст микроваскуларне пермеабилности доводи до одлагања фибриногена у субендотелни матрикс. Уочена је корелација повишених нивоа фибриногена и формирања атеросклеротских плакова (Benet, 2001; Lowe i Rumley, 2001). Појачано везивање фибриногена за васкуларни ендотел и његово цурење у субендотелни матрикс обезбеђује погодне услове за његову конверзију у фибрин помоћу тромбина, као и његово стварање, што је појачано током хипертензије и дијабетеса (Cohen i sar., 2002). Појачано одлагање фибрина доводи до циркулаторних компликација кардиоваскуларних болести као што је развој атеросклеротског плака, неуроваскуларног оштећења и неуроинфламације (Paul i sar., 2007). Чак и најмањи ефекат плазмина на фибриноген или фибрин доводи до стварања њихових деградационих продуката као што је фрагмент D, што појачава деструктивне ефекте покренуте порастом нивоа фибриногена.

Повећана концентрација фибриногена има значајне штетне ефекте на микроциркулацију. Како су кардиоваскуларне и цереброваскуларне болести, као што су хипертензија, дијабетес и мождани удар повезани са порастом нивоа фибриногена у крви, његови штетни ефекти су наглашенији током ових инфламаторних болести. Везивање фибриногена за ендотелне рецепторе може активирати сигналну каскаду која мења вазоактивност кроз смањење биорасположивости ET-1/NO, порастом пермеабилности ендотела, порастом формирања F-актина, разарањем *zonule ocludens* и појачањем активности MMP које разарају протеине адхерентног споја. Повишени нивои фибриногена повећавају вискозност плазме и агрегацију еритроцита доводећи до пораста вискозности крви. Овај процес доводи до пораста „shear stress“ крви, активације васкуларних адхезионих молекула, интегрина и тромбоцита. Ови ефекти имају за последицу везивање фибриногена за васкуларни ендотел и појачану тромбогенезу (Ruggeri, 1993; Lowe i sar., 1997; Shyu i Chien, 2002; Davies i sar., 2003).

Разумевање механизма деструктивних ефеката фибриногена и утицаја на појаву компликација и васкуларне дисфункције током кардиоваскуларних болести може омогућити развој процедура и интервенција које ће умањити ове компликације.

2.2.3. Неоптерин

Неоптерин, 6-D-еритротрихидроксипропил-птерин је супстанца мале молекулске масе која се синтетише од стране макрофага под утицајем IFN- γ . То је маркер инфламације и активације имуног система (*Murr i sar., 2002*).

У инфламаторном процесу, активисани Т лимфоцити, Th-1 субтип, продукују проинфламаторни цитокин IFN- γ . Интерферон- γ стимулише активацију макрофага и индукује експресију GTP-циклохидролазе-1. Активисани макрофаги продукују неоптерин преко гуаносин трифосфатног (GTP) пута. Унутар макрофага ензим GTP-циклохидролаза-1 (усходно регулисан од стране IFN- γ), катализује разлагање GTP и настаје интермедијарни продукт 7,8-дихидронеоптерин-трифосфат. За разлику од других ћелија моноцити/макрофаги имају низак ниво ензима б-пировоилтетрахидроптерин синтетазе што узрокује нагомилавање 7,8-дихидронеоптерин-трифосфата (*Wirleitner i sar., 2002*). Под дејством интрацелуларне фосфатазе долази до ослобађања 7,8-дихидронеоптерина из активисаних макрофага у интрацелуларни простор, а онда у плазму, где оксидише у неоптерин под дејством HOCl. Неутрофили и макрофаги ослобађају значајну количину HOCl у току запаљења, што указује да највећи део неоптерина који се мери у плазми потиче са места запаљења где се ослобађа и HOCl (*Widner i sar., 2000*). Присуство неоптерина у плазми је доказ инфламаторног порекла птерина. Продукција 7,8-дихидронеоптерина и неоптерина карактеристична је за моноците, макрофаге и дендритичне ћелије, мада постоје докази да и ендотелне ћелије, епителне ћелије бубрега, фибробласти и глаткомишићне ћелије могу да ослобађају неоптерин (*Hamerlinck, 1999; Fuchs i sar., 2009*).

Интерферон- γ је једини цитокин који индукује значајну продукцију неоптерина. Индиректно, стимулишући ослобађање IFN- γ и TNF- α може да доведе до његове продукције. Ово је разлог зашто се степен продукције неоптерина рефлектује комбинованим ефектом позитивних- и негативних-регулаторних утицаја на популацију моноцита/макрофага активисаних IFN- γ . Степен активације Т лимфоцита (посебно Th-1 ћелија, које су одговорне за продукцију IFN- γ и IL-2) је од великог значаја за продукцију неоптерина (*Murr i sar., 2002*).

Супстанце које имају утицај на активност Т-ћелијске популације способне су да индиректно модификују степен активације моноцита/макрофага и следствено формирање неоптерина. Егзогена апликација IL-2 у периферне мононуклеарне ћелије повећава лучење неоптерина активацијом и експанзијом Т-ћелија, а не својим директним дејством (*Henderson i sar., 1991*). Слично томе и IL-12 је способан да повећа продукцију неоптерина. Имуносупресори као што су циклоспорин-А и Th-2 цитокини (IL-4 и IL-10) инхибирају формирање цитокина од стране Т-ћелија, што за последицу има и смањено стварање неоптерина. Исто важи и за антиинфламаторна једињења укључујући инхибиторе HMG-CoA редуктазе (статини) и салицилну киселину. Цитокинима индуковано стварање неоптерина представља део антимикробне и антинеопластичне функције макрофага (*Hagberg i sar., 2010*).

Неоптерин је маркер активације IFN- γ . Пораст концентрације неоптерина у серуму или у урину, рефлектује активацију целуларног имунитета и ендогено ослобађање IFN- γ (Pingle i sar., 2008). Мерење концентрације неоптерина сматра се супериорнијом методом у поређењу са директном анализом IFN- γ . Неоптерин је биохемијски инертан и његов полуживот зависи од реналне екскреције. Биолошки полуживот и његове последице на дијагностичку доступност цитокина су лимитиране јер се ослобођени IFN- γ врло брзо везује за циљне структуре или бива неутрализован од стране солубилних рецептора. Због тога су локално формиран цитокини често онемогућени да доспеју у циркулацију и нису погодни за рутинску лабораторијску дијагнозу. Осим тога, мерење неоптеринских нивоа не показује искључиво ефекте једног цитокина, тачније он одређује укупне ефекте имунолошког миљеа и интеракције популација моноцита/макрофага. Због овог осликавања многобројних кооперација између имунокомпетентних ћелија неоптерин представља значајно средство у имунодијагностици (Fuchs i sar., 1992; Schroecksnade i sar., 2004).

Иако је тачна улога синтезе и ослобађања неоптерина од стране активисаних макрофага непозната, утврђено је да неоптерин може деловати као про-оксидант, појачавајући продукцију оксиданата и покрећући ћелијску смрт или нестабилност атеросклеротског плака (Sugioka i sar., 2010).

Неоптерин има директан ефекат на ћелије коронарне циркулације усмеравајући их ка про-атеротромботичном фенотипу. Неоптерин има активну улогу у иницијацији атеросклеротске болести индукујући ендотелне ћелије да експримирају два битна ћелијска адхезиона молекула, VCAM-1 и ICAM-1. Ови адхезиони молекули су одговорни за адхезију и трансендотелну миграцију леукоцита и директно су укључени у патогенезу атеросклерозе. Серумска концентрација адхезионих молекула је повезана са коронарном артеријском болешћу и ризиком од кардиоваскуларних догађаја. Неоптерин индукује експресију ткивног фактора на ендотелу. Ткивни фактор је иницијатор спољашњег пута активације коагулације и окидач интраваскуларне тромбозе (Cirillo i sar., 2006; Hoffmann, 2007).

Ефекти неоптерина на коронарни ендотел се остварују кроз продукцију кисеоничних слободних радикала и активацију транскрипционог фактора NF- κ B. Овај транскрипциони фактор има централну улогу у активацији ендотела и присутан је у инактивном облику у цитоплазми многих ћелија, као што су: лимфоцити, моноцити, ендотелне ћелије и глаткомишићне ћелије. Неоптерин стимулише активацију NF- κ B, који се из инактивног комплекса у цитоплазми транслоцира у једру, где се везује за промоторе циљних гена и индукује експресију IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, Е-селектина, ткивног фактора, TNF- α и многих других инфламаторних протеина који активно учествују у атеросклерози и могу довести до дисрупције атеросклеротског плака и акутног коронарног догађаја (Ritchie i sar., 1998; Yan i sar., 1999; Brasier i sar., 2010).

Чињеница да се NF- κ B активира у периферним моноцитима и у нестабилним атеросклеротским плаковима пацијената са акутним коронарним синдромом, а да неоптерин индукује експресију ткивних фактора и адхезионих молекула тако што активира NF- κ B, може објаснити, макар делимично, зашто пацијенти са коронарном артеријском болешћу и повишеним серумским нивоима неоптерина имају лошију прогнозу од пацијената са нормалним нивоима неоптерина (Wilson i sar., 2002).

Скорашњи подаци указују на могуће учешће неоптеринских деривата у цитотоксичним механизмима макрофага. Са једне стране, нађена је значајна корелација неоптерина и способности моноцита/макрофага да ослобађају ROS. Због тога се

одређивање неоптерина може сматрати индиректним маркером имунолошки индукованог стреса (Hamerlinck, 1999). Са друге стране, деривати неоптерина имају утицаја на ефекте реактивног кисеоника, азота и хлора. Неоптерин је снажан појачивач различитих реактивних супстанци, као што су H_2O_2 , $HOCl$, хлорамина и пероксинитрита ($ONOO^-$, ефекторног молекула NO), док 7,8-дихидронеоптерин углавном делује као скавенџер (Wede i sar., 1999). Ово указује да неоптерин има улогу и као ендогени регулатор цитотоксичне функције активисаних макрофага.

Неоптерин поспешује инфламаторне процесе унутар вулнерабилног плака и заједно са проинфламаторним цитокином $TNF\alpha$ стимулише транскрипцију гена за $iNOS$, што резултује продукцијом цитотоксичних слободних радикала NO , кључних медијатора апоптозе (Avanzas i sar., 2005). Неоптерин модулира интрацелуларни редокс систем вероватно стимулацијом активности, како конститутивне тако и индуцибилне NOS (Hoffmann i Schobersberger, 2004).

Једна од најзначајнијих цитотоксичних реакција $IFN-\gamma$ стимулисаних макрофага је продукција NO из аргинина од стране $iNOS$. Индуцибилна NOS захтева 5,6,7,8-тетрахидробиоптерин као кофактор за своју функцију, који је доступан, услед сувишне продукције неоптерина, у изузетно малим концентрацијама у активисаним моноцито/макрофагима. Међутим, дефицит цитотоксичних механизма у моноцито/макрофагима може бити компензован повећаном продукцијом неоптерина (Wirleitner i sar., 2002; Pingle i sar., 2008).

Количина створеног неоптерина уско је повезана са продукцијом реактивних оксидативних молекула у ендотелној микросредини и рефлектује степен оксидативног стреса настао активацијом имуног система, који има кључну улогу у настанку ендотелне дисфункције и атеросклерозе (Weiss i sar., 1998). Инкубација васкуларних глаткомишићних ћелија са неоптерином подстиче експресију гена за NO и ослобађање NO . Такође, повећава количину интрацелуларног Ca^{2+} , што указује на директну улогу неоптерина у производњи ROS и NO . Неоптерин је директни учесник у каскади догађаја који доводе до оксидативног стреса (Razumovitcha i sar., 2003; Sghiri i sar., 2005).

Неоптерин има значајан ефекат на формирање $ox-LDL$. Потврђена је значајана корелација $ox-LDL$ и активације $NF-\kappa B$ (Giese i sar., 2008). Нивои $ox-LDL$ су повишени у акутном коронарном синдрому, а $ox-LDL$ -позитивни макрофаги су значајно виши код пацијената са нестабилном ангином пекторис у односу на пацијенте са стабилном ангином пекторис (Ehara i sar., 2001).

Новији подаци указују да неоптерин и 7,8-дихидронеоптерин усходно регулишу експресију прото-онкогена $c-fos$, тако да се може сматрати да су укључени, чак, и у малигну трансформацију ћелије. Апоптоза је индукована или убрзана неоптеринским дериватима, а стварање еритропоетина је заустављено (Minami, 2007). Треба имати на уму чињеницу да нивои неоптерина могу бити повишени и у другим не-кардиоваскуларним болестима (инфекције, аутоимуне болести, анемије, бубрежна инсуфицијенција, карциноми и одбацивање алографта (Grammer i sar., 2009; Sugioka i sar., 2010).

Неоптерин је „стимуланс“ инфламације и нестабилности атеросклеротског плака (Adachi i sar., 2007). Литературни подаци указују на значајну повезаност нивоа неоптерина и нестабилности атеросклеротског плака у коронарним крвним судовима (Ray i sar., 2007; Djordjevic i sar., 2008; Kaski i sar., 2008). Повећана продукција неоптерина од стране инфламаторних ћелија у атеросклеротском плаку доводи до повећања нивоа неоптерина у циркулацији. Не може се јасно детерминисати да ли повишење нивоа неоптерина у серуму

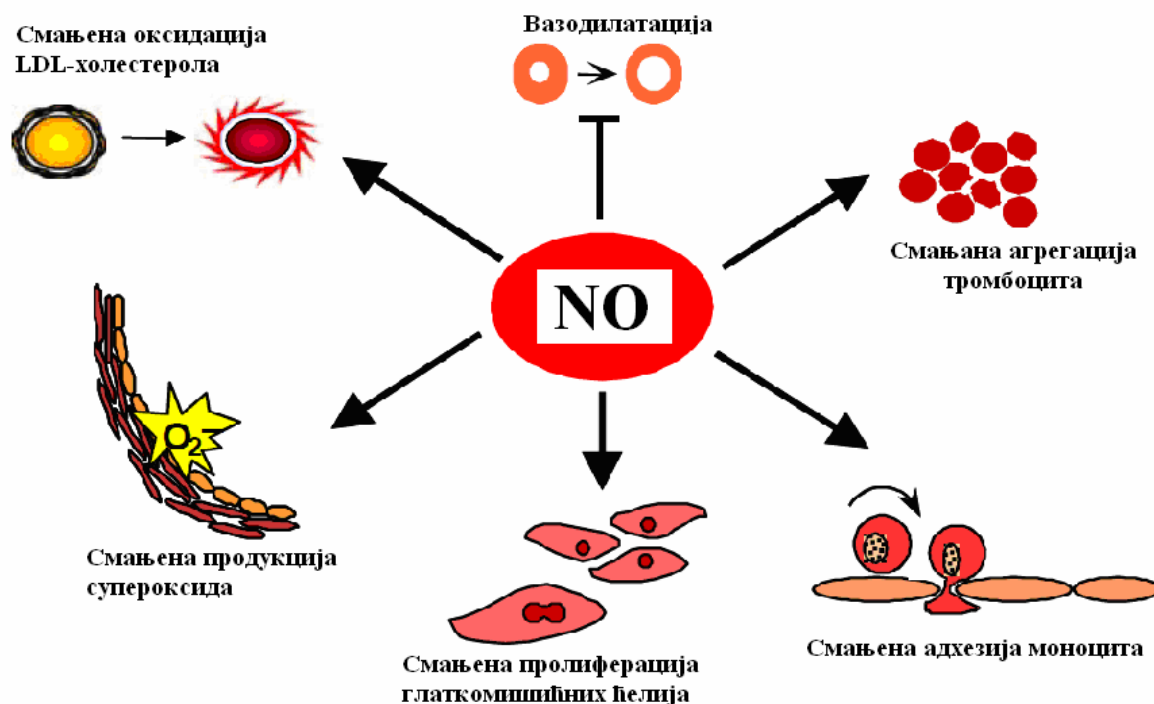
потиче из појединачног нестабилног плака или из системске атеросклеротске нестабилности (*Sugioka i sar., 2010*).

Циркулишући нивои неоптерина су повишени код пацијената са акутним коронарним синдромом и стабилном ангином пекторис (*Kaski i sar., 2005*). Налаз повећене концентрације неоптерина код пацијената са стабилном ангином пекторис указује да атероматозни плак није увек стабилан код клинички стабилних пацијената (*Zouridakis i sar., 2004*). Ангиографске студије су доказале сигнификантну повезаност нивоа циркулишућег неоптерина и комплексних коронарних лезија код пацијената са нестабилном ангином пекторис (*Garcia-Moll i sar., 2000*). Ипак, нивои неоптерина нису корелисали са бројем захваћених крвних судова, указујући да је неоптерин превасходно маркер инфламторне активности атеросклеротског плака, пре него маркер анатомске проширености коронарног атероматозног процеса (*Avanzas i sar., 2004*).

С обзиром да рефлектује нестабилност атеросклеротског плака и могућност његове руптуре, неоптерин се сматра значајним предиктором будућег коронарног догађаја. Повећани нивои неоптерина предвиђају будући кардиоваскуларни нежељени догађај код пацијената са хроничном коронарном артеријском болешћу (*Garcia-Moll i sar., 2000; Zouridakis i sar., 2004; Avanzas i sar., 2005*), акутним коронарним синдромом (*Auer i sar., 2001; van Haelst i sar., 2003; Dominguez-Rodriguez i sar., 2006*) и критичном исхемијом екстремитета (*Barani i sar., 2006*). Неоптерин може бити користан маркер активности атеросклеротског плака, значајан предиктор и фактор стратификације ризика за акутни коронарни догађај (*Ray i sar., 2007; Grammer i sar., 2009*). Откриће да је маркер имуне активације истовремено и маркер кардиоваскуларног ризика потврђује да је прогресија коронарне болести срца повезана са инфламаторним механизмима.

2.2.4. Азот-моноксид (NO)

Азот-моноксид (NO) је интерцелуларни сигнални молекул, који делује као модулатор низа физиолошких функција у организму: регулације васкуларног тонуса, мотилитета црева, агрегације и адхезије тромбоцита, пролиферације, апоптозе и неуротрансмисије. У различитим контекстима NO може имати улогу интерцелуларног сигналног молекула, трансцелуларног преношења сигнала или одбрамбеног молекула. Оно што одређује улогу NO као сигналног молекула или снажног цитотоксина и одређује биолошки одговор ћелија на NO, јесте тип хемијског реаговања NO, који зависи од флукса NO и околне микросредине (*Moncada i Higgs, 2006*).



Слика 3. Шематски приказ улоге NO (Böger, 2003).

Ендогена синтеза азот-моноксида је процес који катализује ензим азот-моноксид синтаза (NOS). Реч је о катализовању реакције у којој се семиесенцијална аминокиселина L-аргинин претвара у цитрулин, уз ослобађање NO, као продукта оксидације једног атома азота у молекулу L-аргинина. Познате су три изоформе овог ензима: неуронална (nNOS, тип I), заступљена у нервним ћелијама централног и периферног нервног система, али и у скелетној мускулатури и неким епителним ћелијама; ендотелна (eNOS, тип III), први пут идентификована у васкуларним ендотелним ћелијама; и индуцибилна или макрофагална (iNOS, macNOS, тип II), која нема сличности са претходне две и може бити индукована у макрофагима и ћелијама макрофагално/моноцитне линије. Инервација и васкулатура у свим ткивима има потенцијал за експресију nNOS и eNOS, док циркулишући елементи крви експримирају iNOS (Alderton *i sar.*, 2001; Manukhina *i sar.*, 2006; Luiking *i sar.*, 2010).

Поред nNOS, eNOS и iNOS, постоји и конститутивно активна изоформа NOS присутна у митохондријама означена као mtNOS. Смештена је у унутрашњој митохондријалној мембрани и изгледа да игра кључну улогу у модулацији митохондријалне респирације и митохондријалног трансмембранског потенцијала. За сада је још увек непознато како mtNOS интерагује са остале три познате изоформе ензима (Lacza *i sar.*, 2001).

Неуронална NOS и eNOS су углавном конститутивно експримиране; њихова активност је примарно регулисана интраћелијским нивоом Ca^{2+} /калмодулина и продукују NO фазично, као одговор на физиолошке стимулусе. Да би остварили своје ензимске активности NOS протеини морају везивати кофакторе (FAD и FMN) и димеризовати се

(Alderton i sar., 2001). Додатак L-аргинина, BH_4 и хема омогућава NOS протеинима да оформе димере. Димери eNOS и nNOS формирани овим путем су неактивни и зависе од везивања калмодулина што је стимулисано порастом интраћелијског калцијума. Димери iNOS везују Ca^{2+} /калмодулин и активни су чак и при ниским концентрацијама калцијума. Главни прекидач за активност nNOS и eNOS је пролазни пораст у интраћелијским концентрацијама Ca^{2+} , док је главни прекидач за iNOS на нивоу транскрипције (Yasa i Türkseven, 2005). Активност iNOS је независна од концентрације Ca^{2+} , конститутивно није експримирана, већ је за индукцију њене експресије неопходно присуство цитокина IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 или продуката микроорганизама који често делују синергистички. Активација транскрипционог фактора, NF- κ B може имати значајну улогу у индукцији ензима iNOS (Doi i sar., 2002). Текућа истраживања сугеришу значај хипоксије која такође може допринети индукцији овог ензима. Експресија све три изоформе NOS је високо регулисана будући да се NOS може индуковати у васкуларном ендотелу под дејством оксидативног стреса (Lim i sar., 2004).

Цитокини индукују експресију iNOS и могу индуковати ендотел да продукује NO. На пример, TNF- α са IFN- γ из активисаних Th-1 ћелија, представља снажан стимулус iNOS у ендотелу (Kofler i sar., 2005). Ипак, постоје подаци да третирање мезентеријалих артерија пацова са TNF- α доводи до инхибиције NO-зависне релаксације. Такође, TNF- α инхибише NO-посредовану ендотел-зависну релаксацију у малим коронарним артеријама преко активације сфингомијелиназе и следствене продукције O_2^{\bullet} у ендотелним ћелијама (De Palma i sar., 2006). Високе концентрације TNF- α , CRP и LDL директно смањују нивое mRNA за eNOS у ендотелу и покрећу продукцију слободних кисеоничних радикала у неутрофилима, глаткомишићним и ендотелним ћелијама (Verma i sar., 2002). Реактивне врсте кисеоника за узврат редукују биорасположивост NO што доводи до смањења васкуларне релаксације (Stocker i Keane, 2004).

Ендогени и егзогени извори NO могу лимитирати цитокинима изазвану активацију ендотела. Доказано је да NO може редуковати цитокинима-индуковану експресију бројних ефекторних молекула као што су VCAM-1, E-селектин, и IL-6 и, у мањој мери, IL-8 и ICAM-1, који су карактеристични за ендотелну активацију. Антиинфламаторни ефекат NO, који се огледа кроз смањену експресију MCP-1, VCAM-1 и ICAM-1, инхибише интеракцију леукоцита са ендотелом у раној фази инфламације. Способност NO да инхибише експресију молекула ендотелно-леукоцитне адхезије и проинфламаторних цитокина га сврстава у важан регулатор инфламаторног кретања и проласка кроз зид крвног суда. Инхибиција NF- κ B један је од механизма инхибиторних ефеката NO на ендотелну активацију. Доказано је да NF- κ B има значајну улогу у транскрипционо индукованој експресији адхезионих молекула и инфламаторних цитокина као што су IL-6 и IL-8. Када дође до активације NF- κ B помоћу TNF- α , NO може инхибирати NF- κ B сквинцирањем и инактивацијом O_2^{\bullet} . Донори NO инхибишу цитокинима индуковану експресију VCAM-1 и редукују адхезију моноцита на ендотел (De Caterina i sar., 1995; Spiecker i sar., 1998; Lubos i sar., 2008).

Обе изоформе, iNOS и nNOS су експримиране у глаткомишићним ћелијама атеросклеротских лезија и доприносе формирању лезије, тако што стварају NO који реагује са супероксидом и настаје екстремно потентни оксидант пероксинитрит. Тако, NO и пероксинитрит повећавају оксидативни стрес и оксидишу LDL. Атеросклеротске лезије садрже нитротирозин, који је доказ присуства пероксинитрита. У коронарним артеријама пацијената са коронарном болешћу доказана је повећана производња супероксида (Sorescu i sar., 2002). Повећана продукција ROS промовише оксидативну деградацију кофактора

eNOS, BH₄, што доводи до формирања „некупловане“ eNOS, а све то за последицу има смањено стварање NO и повећану продукцију супероксид анјон радикала (O₂⁻) помоћу овог ензима. Поред тога, постоји и редокс-осетљива инхибиција ензима диметиларгинин диметиламинохидролазе (DDAH), што доводи до повећања нивоа ендогеног инхибитора NOS, асиметричног диметиларгинина (ADMA) и смањења активности eNOS. Дакле, промене редокс стања ендотела могу имати велики утицај на биорасположивост ендотелног NO (*Laurson i sar., 2001; Vásquez-Vivar i sar., 2002; Landmesser i sar., 2003; d'Uscio i sar., 2003; Pope i sar., 2009*).

Ниво супероксида у васкулатури и биоактивност NO је одређен не само степеном продукције супероксида, већ и степеном његове разградње. Главни ензимски систем разградње супероксида је супероксид дисмутаза, чији је екстрацелуларни облик од посебног значаја у зиду крвног суда, јер је веома изражена и стратешки смештена између ендотела и васкуларних глаткомишићних ћелија (*Landmesser i Drexler, 2002; Fukai i sar., 2000*). Азот-моноксид, настао дејством eNOS, индукује експресију екстрацелуларног облика супероксид дисмутазе у артеријском зиду, као важан механизам позитивне повратне спреге да повећа свој биолошки ефекат. Насупрот томе, смањена расположивост NO би онда смањила активност екстрацелуларног облика супероксид дисмутазе у артеријском зиду и продубљивала ендотелну дисфункцију. У коронарним артеријама болесника са коронарном болешћу активност екстрацелуларног облика супероксид дисмутазе је значајно снижена. *In vivo* одређена активност екстрацелуларног облика супероксид дисмутазе је снижена и тесно повезана са ендотел зависном NO посредованом вазодилатацијом код болесника са коронарном болешћу, што сугерише да смањена активност овог ензима доприноси ендотелној дисфункцији (*Landmesser i sar., 2000*).

Како је ендотел главни извор NO у васкулатури, губитак нормалне ћелијске функције доводи до поремећаја функције eNOS, самим тим и синтезе NO. Ендотел има конститутивно снабдевање NO из eNOS и под одређеним условима, као што је запаљење, продукује прекомерне количине NO из индуцибилне изоформе NOS (*Sandoo i sar., 2010*). Базална транскрипција eNOS је контролисана уз помоћ два регулаторна региона-позитивни регулаторни домени I и II. Ови регулаторни домени везују различите типове транскрипционих фактора и регулишу eNOS транскрипцију комплексним *cis* и *trans* интеракцијама (*Searles, 2006*). Ови региони садрже и различите метилисане нуклеотиде који ограничавају eNOS транскрипцију у ендотелним ћелијама (*Chan i sar., 2004*). Регулација NOS и биорасположивост њених продуката је веома битна за развој и прогресију атеросклерозе.

У ендотелним ћелијама, eNOS се претежно налази у плазма мембрани кавеола, где је њена активност највећа у поређењу са формама повезаним са голџијевим апаратом, цитоскелетом и актином (*Oess i sar., 2006*). Кавеолини, кавеолин-1 у ендотелу и кавеолин-3 у срчаном мишићу, везују eNOS и инхибирају њену активност. Последњих година се разматра чињеница о сложеној и прецизној регулацији активности eNOS која укључује „multi-site“ фосфорилацију специфичних серинских и треонинских резидуа (*Boo i sar., 2006; Church i Fulton, 2006*). Регулација синтезе ендотелног NO помоћу „multi-site“ eNOS фосфорилације се дешава као одговор на различите хуморалне, механичке и фармаколошке стимулусе. Ова регулација укључује бројне киназе и фосфатазе, као и интеракције са осталима спектрима eNOS регулације, као што је флуks Ca²⁺ и протеин-протеин интеракција. Оксидативно модификоване LDL честице истискују eNOS из кавеола везујући се за ендотелни CD36 рецептор и доводе до поремећаја eNOS активације (*Feron i sar., 1999*). Стога, липопротеини имају снажно дејство на функцију eNOS у кавеолама

директним дејством, како на хомеостазу мембранског холестерола, тако и на ниво активације ензима. Ови процеси су пресудни у раним фазама атерогенезе.

Стварање NO и његова физиолошка дејства одређује доступност супстрата и кофактора реакције у ендотелу, присуство NO скавенџера и други фактори. Смањена доступност NO сматра се једним од најбитних фактора одговорним за васкуларну патологију. Још увек није довољно јасно да ли је то узрок или производ ендотелне дисфункције. Постоји неколико потенцијалних механизма за ендотелну дисфункцију и могу се поделити у три категорије: смањена експресија eNOS, редукована ензимска активност eNOS и брзо уклањање NO. Узроци дисфункције ендотела су бројни и могу се наћи на свим нивоима, од гена за eNOS (генски полиморфизам), mRNA (експресија гена и посттранслациона модификација), активности већ синтетисаног eNOS протеина (недостатак ензимског супстрата и/или кофактора), до самог молекула NO и његове стабилности, односно осетљивости ткива на његово дејство. Смањена стабилност mRNA за eNOS под утицајем инфламаторних материја и ox-LDL може се довести у везу са настанком атеросклерозе. Супстрат за синтезу NO, L-аргинин, може бити у ограниченим количинама у ткивима. Ендогени компетитивни инхибитор NOS, ADMA може смањити ендотелну продукцију NO, чак и у присуству адекватне количине L-аргинина (*Cooke, 2000*). У недостатку BH_4 кофактора за активност eNOS, трансфер електрона постаје „некуплован“, што резултује стварањем супероксид анјон радикала (*Li i Förstermann, 2009*). Азот-моноксид продукован дејством eNOS може бити брзо инактивисан реакцијом супероксида (O_2^-) до форме пероксинитритног анјона (OOHO^-). Овај супероксид се ствара помоћу NADPH оксидазе или некупловане eNOS (*Griendling i sar., 2000*). Сва претходно наведена стања су важни степеници у развоју ендотелне дисфункције.

Смањено или повећано стварање NO може довести до низа поремећаја, од тромбозе до крварења. Смањено дејство NO пореклом од eNOS има утицај на повећавање адхезије и активације тромбоцита. Донори NO и L-аргинин инхибирају спонтану активацију, адхезију и агрегацију тромбоцита у физиолошким условима. Инхибиторни ефекат NO на нивоу тромбоцита повезан је са порастом нивоа cGMP у тромбоцитима. Антитромбоцитни ефекти NO пореклом из ендотела могу се односити и на инхибицију експресије протромбоцитног протеина, PAI-1. Осим конститутивне изоформе NOS, у тромбоцитима се може доказати и присуство iNOS, што их чини способним да синтетишу NO. Код болесника са коронарном болешћу, смањена продукција NO пореклом из тромбоцита била је независни предиктор акутног коронарног догађаја (*Lubos i sar., 2008*).

Смањена продукција NO карактеристична је за миокардну исхемију и реперфузију, посебно у случају акутне коронарне оклузије. Миокардна исхемија доводи до повећане продукције ендотелних контрактилних фактора. Ниво плазматског ендотелина је у порасту у првим сатима од акутног инфаркта миокарда и пораст се одржава код пацијената са продуженом исхемијом. Механизми који су у основи губитка ослобађања базалног NO након миокардне исхемије и реперфузије нису још увек довољно јасни. Дефицит L-аргинина може настати након исхемије и реперфузије. Познато је да нормалне ћелије могу рециклирати L-цитрулин, копродукт синтезе NO из L-аргинина, продукујући додатни L-аргинин, што одржава високу концентрацију L-аргинина у ендотелу. Исхемија праћена реперфузијом зауставља рециклирање L-цитрулина у L-аргинин, што смањује концентрацију L-аргинина и продукцију NO у ендотелним ћелијама (*Sodha i sar., 2008; Chen i sar., 2010*).

Синтеза NO из L-аргинина може бити фармаколошки блокирана различитим аргининским аналозима. У кардиоваскуларном систему, ови инхибитори NOS изазивају

вазоконстрикцију, тромбозу и атерогенезу. Оба инхибитора, и N^G-моно-метил- L-аргинин (L-NMMA) и ADMA су једињења нормално присутна у циркулишућој плазми (*Vallance i Leiper, 2004*). Интравенска ињекција L-NMMA, компетитивног инхибитора синтезе NO, изазива хипертензивни одговор *in vivo*. Овај ефекат L-NMMA може се компетитивно и стереоселективно повратити L-аргинином као прекурсором NO.

Фармаколошко блокирање активности NOS указује на значајну улогу NO у регулацији контрактилности срца. Азот-моноксид се продукује како у ендотелним ћелијама, тако и у кардиомиоцитима. Ендотелне ћелије су богате eNOS и распоређене су дуж васкулатуре и ендокарда. Кардиомиоцити експримирају и eNOS и pNOS (*Massion i sar., 2003*). У кардиомиоцитима eNOS је смештена у сарколемалним кавеолама у интеракцији са кавеолином-3. Неуронална NOS је смештена у саркоплазматском ретикулуму, где је повезана са ријанодинским рецептором (*Barouch i sar., 2002*). Различита интраћелијска локализација eNOS и pNOS указује на њихову двоструку улогу у срчаној функцији.

Интраћелијска локализација pNOS у саркоплазматском ретикулуму указује да NO може модулирати кардиомиоцитну манипулацију калцијумом. Постоје директни докази да pNOS нитрозилише и активира ријанодински рецептор. Тако, pNOS нормално одржава функцију ријанодинског рецептора и у његовом ће одсуству бити оштећена контрактилност. Код пацијената са конгестивном срчаном слабошћу, постоје докази, да pNOS није одговарајуће локализована у саркоплазматском ретикулуму (*Damy, 2004*). У овом случају, pNOS се може преместити до L-типа калцијумског канала на површини ћелије и имати инхибиторну улогу врло сличну оној коју има eNOS. Важност pNOS на контрактилност и манипулацију калцијумом је наглашена налазима да је синдром продуженог QT-интервала, који је удружен са опасним вентрикуларним аритмијама, повезан са NOS1-активишућим протеином, који се везује за pNOS. Ово повећава могућност да NOS1-активишући протеин и pNOS не утичу само на контрактилност срца, већ и на вентрикуларне аритмије испољавајући своје ефекте на ријанодински рецептор и манипулацију калцијумом (*Arking i sar., 2006; Lim i sar., 2008*).

Давање L-аргинина или BH₄ ублажава прогресију атеросклерозе, док давање NOS инхибитора блокира овај протективни ефекат, указујући на директну повезаност NO и формирања атеросклеротске лезије (*Hattori i sar., 2007*). Сматра се да NO има двоструки и анти- и про-атеросклеротски ефекат који се заснива на правцу прогресије болести. Ниске концентрације NO, створене дејством конститутивних NOS испољавају цитопротективни, антиинфламаторни ефекат и улогу у превенцији адхезије и ослобађања оксиданаса од стране активисаних неутрофила у микроваскулатури. Високи нивои, резултат дејства iNOS, имају директно цитотоксично дејство на кардиомиоците и делују проапоптозно. Пероксинитрат, производ интеракције NO са супероксидом, се продукује у значајним количинама у атеросклеротским лезијама. Пероксинитрат оксидише BH₄ и смањује физиолошке нивое потребне за функцију eNOS, померајући eNOS од ензима који ствара NO ка ензиму који продукује супероксид (*Kohnen i sar., 2001; Xu i sar., 2006*). Суптилност метаболизма NO и недефинисане границе између јако ниских, ниских и високих концентрација NO у ћелији, које су кључни фактор контроле индукције и супресије експресије iNOS, представљају кључ, али и актуелну дилему у истраживањима рафинисаног дуалитета цитотоксичних и цитопротективних улога NO.

2.2.5. Асиметрични диметиларгинин (ADMA)

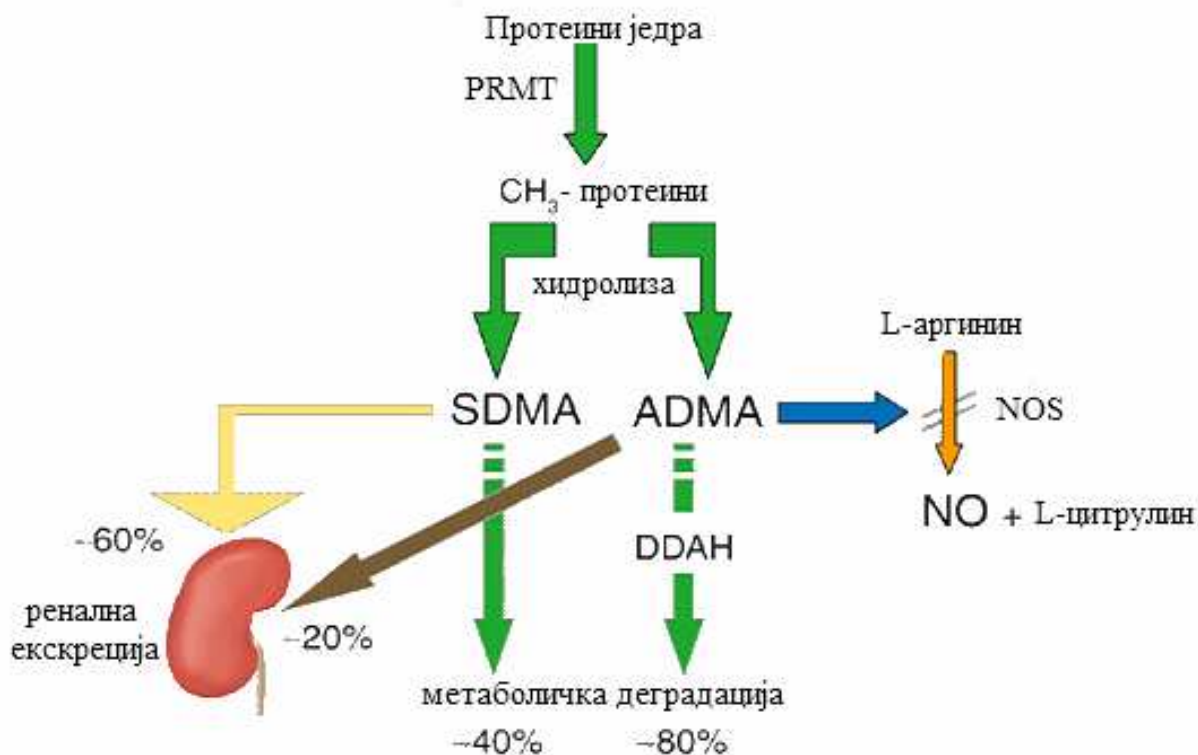
Асиметрични диметиларгинин (ADMA) је ендогена метилисана форма аминокиселине L- аргинина, која инхибише активност ензима NOS чиме се смањује синтеза NO (*Mangoni, 2009*). Синтезише се метилацијом аргининских остатака у протеинима једра дејством протеин аргинин метил трансферазе (PRMT), постранилационом модификацијом којом се додају једна или две метил групе азоту гванидина инкорпорисаног у протеинима. Ови ензими преносе метил групу од S-аденозилметионина до аргинина при чему се формира метилисани аргинин и S-аденозилхомоцистеин који се касније хидролизује до хомоцистеина. Идентификована су два типа PRMT. Тип I (PRMT₁) катализује формирање ADMA, док тип II (PRMT₂) катализује формирање симетричног диметиларгинина (SDMA). Оба ова ензима преносе метил радикал и продукују N^G-монометил-L-аргинин (L-NMMA). Само асиметрично метилисани облици (ADMA и L-NMMA) су компетитивни инхибитори NOS, а SDMA није (*Anthony i sar., 2005; Leiper i Vallance, 2006; Palm i sar., 2007*).

Потврђено је да ADMA инхибише све три изоформе NOS (eNOS, nNOS, cNOS). У смањењу активности NOS, L-NMMA је еквивалентан са ADMA, само су његове концентрације у плазми око десет пута ниже. Интрацелуларне концентрације L-NMMA и ADMA се могу поредити у неким ткивима, указујућу да су оба важни регулатори активности NOS (*Cardounel i Zweier, 2002*). Концентрација SDMA присутна у циркулацији се може упоредити са концентрацијом ADMA, али она нема инхибиторне ефекте на NOS. Доказ да сва три метиларгинина ометају транспорт L-аргинина, указује на инхибиторне ефекте SDMA на стварање NO (*Leiper i Vallance, 2006*).

Сва три метиларгинина се елиминишу реналном екскрецијом. Реналана екскреција је углавном одговорна за елиминацију SDMA. Више од 80% ADMA и L-NMMA се метаболише помоћу диметиларгинин диметиламинохидролазе (DDAH) до цитрулина и диметиламина или монометиламина. Код виших организама ова ензимска група је присутна у две изоформе кодиране генима на првом и шестом хромозому (DDAH₁ и DDAH₂) са различитом дистрибуцијом у ткивима, али са сличном активношћу. Изоформа DDAH₁ се углавном експримира у ткивима која садрже nNOS, а DDAH₂ у ткивима која садрже eNOS и iNOS. Фармаколошка инхибиција DDAH повећава концентрацију ADMA, смањује продукцију NO и изазива вазоконстрикцију, док прекомерна експресија DDAH има супротне ефекте. Регулација генске експресије и DDAH активности још увек је недовољно јасна. Инкубација ендотелних ћелија са TNF- α или ox-LDL смањује активност ових ензима, али не и њихову експресију. Оксидативни стрес повезан са S-нитрозилацијом, висок ниво глукозе и хомоцистеина, такође, доприносе смањењу активности DDAH, повећавајући на тај начин ниво ADMA (*Böger, 2004; Zoccali, 2006; Palm i sar., 2007; Teerlink i sar., 2009*).

Људски организам ствара просечно 300 $\mu\text{mol/d}$ (приближно 60mg) ADMA. Од ове количине, приближно 50 $\mu\text{mol/d}$ се екскретује урином. Због тога се ADMA акумулира код пацијената са бубрежном инсуфицијенцијом. Трансплантација бубрега нормализује нивое SDMA, док нивои ADMA остају повишени. Ово се вероватно дешава услед оштећене деградације ADMA (*Cooke, 2004; Nijveldt i sar., 2004*). Мада се DDAH може наћи у многим ткивима, укључујући ендотел, мозак, панкреас, главни органи у којима се одвија метаболизам ADMA су јетра и бубрези. Новија истраживања указују да је јетра есенцијални регулатор концентрације диметиларгинина у плазми. Доказано је да хепатоцити обилно експримирају у⁺ канале у својим мембранама и да садрже DDAH у

високој концентрацији. Поремећен метаболизам DDAH доприноси прекомерној акумулацији ADMA код пацијената са дисфункцијом јетре (Tsikas i sar., 2003; Nijveldt i sar., 2004)



Слика 4. Биосинтеза, метаболизам и екскреција ADMA (Zoccali, 2006).

Најјаснији ефекат повишених интрацелуларних нивоа ADMA је смањена продукција NO компетитивном инхибицијом NOS (Sun i sar., 2003). Сматра се да метиларгинини могу да регулишу и NOS-зависну продукцију супероксида. У недостатку BH₄, ADMA стимулише продукцију супероксида помоћу некупловане eNOS. Оксидативни стрес може оксидисати BH₄ до BH₂ што резултује стварањем некупловане eNOS (Fukai, 2007). Такође, ROS могу повећати интрацелуларне нивое ADMA, што представља потенцијални механизам позитивне повратне спреге за пролонгирано дејство оксидативног стреса. Културе ендотелних ћелија изложене 30 μmol/L ADMA у току 24 часа показују значајну продукцију ROS и вишеструки пораст концентрације TNF-α и IL-1β, значајно смањену продукцију нитрита/нитрата, повећану адхезију моноцита и активацију NF-κB, указујући на активацију инфламаторног пута (Sydow i sar., 2003). Ефекти ADMA на pNOS су различити од ефеката на eNOS. У присуству BH₄ продукција супероксида помоћу pNOS је инхибирана и од стране ADMA и од стране L-аргинина, док у одсуству BH₄ ни ADMA ни L-аргинин не утичу на стварање супероксида помоћу pNOS (Sydow i Munzel, 2003).

У ендотелним ћелијама, ADMA регулише сопствену деградацију. Сматра се да NO стимулише експресију гена за DDAH₂ преко индукције cGMP. Повећани интраћелијски нивои ADMA са следственом инхибицијом NOS и смањеном продукцијом NO, механизмом позитивне повратне спреге смањују деградацију ADMA редукцијом генске експресије DDAH₂ (Teerlink i sar., 2009).

Сматра се да ADMA регулише ћелијске нивое NO тако што инхибише и продукцију NO и био-инактивацију NO помоћу ROS. Новији докази указују да повишени нивои ADMA индукују пут који води до инфламације.

Узрок ендотелне дисфункције може бити и у повећаној ендегеној синтези ADMA. Доказано је да се ефекти NOS могу повратити високим концентрацијама L-аргинина. Додавање L-аргинина (повећање односа L-аргинин:ADMA) може бити корисно за реституцију вазодилаторне улоге ендотела. Сматра се да ADMA може бити одговорна за настанак, такозваног, „аргининског парадокса“ (*Bode-Böger i sar., 2007*). Докази из *in vitro* експеримената са клонираном, пречишћеном eNOS у слободном ћелијском систему са оптималном концентрацијом свих кофактора, указују да је Michaelis-Menten константа (K_m) за eNOS око $3\mu\text{mol/L}$. Са друге стране, у плазми су циркулишући нивои L-аргинина знатно већи од K_m за eNOS (око $40\text{--}100\mu\text{mol/L}$, то је 15-30 пута више од K_m за eNOS), што је довољно да се eNOS засити супстратом, те даље додавање L-аргинина не би требало да изазове додатне ефекте NO на ендотелну функцију. Међутим, *in vivo* није тако. Додавање L-аргинина изазива ефекте (побољшање ендотелне функције). Пошто је ADMA компетитивни инхибитор eNOS, у сувишку L-аргинина истискује се са места инхибиције, те се тиме смањује дејство ADMA, а потенцира дејство L-аргинина, eNOS и NO. Дакле, додавање L-аргинина у сувишку истискује компетитивни инхибитор и обнавља продукцију NO до физиолошких нивоа (*Böger, 2004; Sylwik i sar., 2005*).

Интересантно је да се сва три метиларгинина надмећу са плазматским мембранским катјонским аминокиселинским транспортером (γ^+) за ћелијско преузимање L-аргинина. Редукујући количину интрацелуларног аргинина, SDMA ограничава стварање NO. Зато што је ADMA „супстратно зависни“ инхибитор NOS, не може се искључити могућност да она мења активност осталих аргинин-метаболизујућих ензима као што је аргинин:глицин амидинотрансфераза, аргиназа или да испољава неке ефекте неvezано за инхибицију NOS (*Brunini i sar., 2004*).

Уместо NO, NOS у исхемији ствара супероксидни анјон радикал (O_2^-). Овај ефекат се назива „NOS некупловање“ и запажа се када су недовољно расположиви NOS супстрати, L-аргинин и/или кофактори реакције (BH_4 , NADPH, FAD) у ендотелу. При конкуренцији са аргинином ADMA и L-NMMA, могу такође индуковати „NOS некупловање“ што доводи до оксидативног стреса и оштећења вазодилаторне функције ендотела (*Sydow i Munzel, 2003; Cardounel i sar., 2005*). Оксидативни стрес може значајно повећати продукцију ADMA преко више механизма. До повећане синтезе ADMA може доћи услед редокс-регулисане генске експресије PRMT. Редокс-индукована нисходна регулација DDAH активности за последицу има смањену ензимску деградацију ADMA. Готово 80% ADMA се метаболише дејством DDAH до цитрулина и диметиламина, при чему ниједан од ових продукта нема утицаја на активност NOS. Показано је да оксидативни стрес изазива значајну нитрозилацију цистеинских резидуа DDAH и на тај начин инхибира његову активности (*Krempl i sar., 2005*).

Теоријски, четири механизма могу довести до акумулације ADMA: 1) пораст метилације протеина помоћу PRMT, 2) повећана протеолиза и ослобађање прекурсора метиларгинина, 3) смањена ренална екскреција и 4) редукована разградња ADMA помоћу DDAH.

Повећана експресија и активност PRMT је најчешће последица механичког дејства крвне струје („*shear stress*“). Изгледа да се модулација експресије PRMT и продукција ADMA одвија преко активације транскрипционог фактора NF- κ B (*Osana i sar., 2003*). С обзром да „*shear stress*“ може повећати и активност DDAH, повећана продукција ADMA у

овом случају јасно указује да је резултат повећане метилације протеина и да се одвија упркос истовременој стимулацији метаболизма ADMA. Осим тога, „*shear stress*“ може повећати продукцију ADMA у стањима хиперволемије, као што је срчана инсуфицијенција, бубрежна инсуфицијенција или исхрана са доста соли (*Dimitrow i sar., 2007*). Оксидативна форма LDL повећава активност PRMT и стварање ADMA у ендотелним ћелијама (*Böger i sar., 2000*). Метилација протеина је повећана у пролиферишућим ћелијама, те је концентрација ADMA виша у регенеришућим ендотелним ћелијама, него у ендотелним ћелијама које се налазе стању мировања (*Pullamsetti i sar., 2011*).

У многим експерименталним системима, акумулација ADMA је праћена редукацијом активности DDAH, упркос нормалним протеинским нивоима DDAH, што указује да специфична активност ензима (активност по јединици ензимске масе) опада. Цистеински остаци са слободним -SH групама су важни за одржавање DDAH активност, због чега је овај ензим изузетно осетљив на оксидативни стрес. Смањена активност DDAH је често удружено са акумулацијом ROS, док антиоксиданти показују протективну улогу. (*Fiedler, 2008*). До инактивације DDAH може доћи нитрозилацијом -SH група у одговарајући нитрозотиол (-S-NO), што се дешава у стањима повећане продукције NO насталог активношћу iNOS. Овај механизам доводи до акумулације ADMA и последичне ограничене продукције NO дејством iNOS (*Knipp i sar., 2003*). Ефекти цитокина на DDAH су нестални. У култури глаткомишићних ћелија пацова, IL-1 β стимулише експресију и iNOS и DDAH (*Ueda i sar., 2003*). Повећана активност DDAH смањује концентрацију ADMA, што за последицу има повећану продукцију NO. Тако, DDAH-ADMA пут може или да се придружи дејству iNOS, или да неутралише дејство iNOS у регулацији продукције NO у току инфламације (*Fiedler, 2008*).

Повећана синтеза ADMA се доводи у везу са губитком функције NO у атеросклерози. Смањено стварање NO у ендотелу води повећаној адхезивности и активацији леукоцита и тромбоцита, ослобађању бројних вазоактивних молекула, цитокина и фактора раста. С друге стране, ADMA стимулише многе процесе укључене у атерогенезу, као што су: адхезивност моноцита, експресија проинфламаторних и хемотактичних фактора и акумулација ox-LDL у макрофагима (*Smirnova i sar., 2004*). Концентрација ADMA у плазми је повећана код пацијената са атеросклерозом и код оних са факторима ризика за атеросклерозу, као што су: хиперхолестеролемија, хипертриглицеридемија, шећерна болест, гојазност и хиперхомоцистеинемија (*Böger i Ron, 2005*). Код ових пацијената, нивои ADMA у плазми корелишу са озбиљношћу ендотелне дисфункције и степеном развоја атеросклерозе. Хронична инфузија ADMA индукује атеросклерозу код мишева. Код људи, концентрација ADMA у плазми корелише са маркерима субклиничке атеросклерозе као што је дебљина интимо-медијалног комплекса каротидних артерија (*Furuki i sar., 2008*). Концентрација ADMA у плазми је предиктивни фактор за акутни кардиоваскуларни догађај не само код пацијената са бубрежном инсуфицијенцијом, већ и код оних са очуваном функцијом бубрега (*Schnabel i sar., 2005*).

Сматра се да ADMA има важну улогу у регулацији васкуларног тонууса. Инхибишући синтезу NO, ADMA редукује васкуларну комплијансу, повећава васкуларни отпор и ограничава проток крви. Такође, ADMA покреће атерогенезу насупрот вазопротективним ефектима NO. Пораст нивоа ADMA у плазми доводи до прогресије атеросклерозе и повећава ризик за настанак кардиоваскуларних догађаја. Вредности ADMA у плазми могу бити „Über marker“, показујући збирни ефекат различитих фактора ризика на васкуларни ендотел (*Cooke, 2004; Böger i Ron, 2005*).

2.2.6. Фактор некрозе тумора- α (TNF- α)

Фактор некрозе тумора (енгл. *Tumor Necrosis Factor* – TNF) је мултифункционални цитокин који делује као медијатор различитих физиолошких и патофизиолошких стања, као што су: инфламација, диференцијација, раст и ћелијска смрт (*Sack i sar., 2000*). Првобитно идентификован 1975. године од стране *Carswell u cap.* као супстанца присутна у серуму животиња третираних бактеријским ендотоксином, липополисахаридом (LPS), који проузрокује некрозу тумора у *in vivo* условима (*Carswell i sar., 1975*). Припада породици протеинских сигналних молекула, које карактерише екстрацитоплазматска локализација С-терминалног региона. Идентификоване су две изоформе TNF, које имају сличне инфламаторне активности. Мања изоформа, TNF- α , коју производе активисани макрофаги, богатија је за два пептида и сматра се да посредује у хомеостази срца. Друга изоформа, TNF- β , првобитно описана као лимфотоксин-а (LT-а), је мање богата пептидима и продукују је активисани лимфоцити (*Sack i sar., 2000*). Синтетишу се као пропептиди који процесовани интрацелуларно дају зрео, трансмембрански протеин који се везује за TNF рецептор и испољава своја дејства. Ензим TNF конвертаза је металопроотеиназа који учествује у стварању активне форме TNF- α (*Patel i sar., 1998*).

Своју активност TNF- α испољава посредством два различита мембранска рецептора: 55-кD, рецептор високог афинитета (TNF-R1, TNF-R β , TNF-R55) и 75-кD ниско афинитетни рецептор (TNF-R2, TNF-R α , TNF-R75). Оба рецептора везују и TNF- α и TNF- β са сличним афинитетима, али су независно регулисани (*Mackay i sar., 1993*). Екстрацелуларни домени ова два протеина рецепторске фамилије имају сличне, цистеинима богате секвенце, међутим, секвенце интрацелуларних домена су потпуно неповезане, што указује на различите путеве сигналне трансдукције. Специфична стимулација TNF-R55 омогућава активност TNF- α , као што је цитотоксичност, пролиферација фибробласта, синтеза простагландина. Мање се зна о специфичној функцији TNF-R75, сматра се да стимулише фибробласте, мононуклеарне ћелије и NK ћелијску пролиферацију (*Zhang i sar., 1995; Parameswaran i Patial, 2010*).

Проинфламаторни цитокин TNF- α има централну улогу у иницијацији и/или потпомагању сваког инфламаторног одговора. Највећи извор TNF- α су активирани мононуклеарни фагоцити, иако и антиген-стимулисани Т лимфоцити, NK ћелије, мастоцити, ендотелне ћелије, фибробласти, кардиомиоцити, адипоцити и нервно ткиво такође могу да секретују овај протеин (*Popa i sar., 2007*). Најснажнији стимулус који повећава продукцију TNF од стране макрофага је LPS, а IFN- γ секретован из Т ћелија и NK ћелија стимулише синтезу TNF од стране LPS стимулираних макрофага (*Borish i Steinke, 2003*). Ефекти TNF су најпре локални и испољавају се мобилизацијом антиген презентујућих ћелија и активацијом ендотелних ћелија које активирају експресију адхезионих молекула. Деловањем на ендотелне ћелије стимулише их да продукују селективне и лиганде за леукоцитарне интегрине у току дијапедезе и хемотаксе. Фактор некрозе тумора- α показује и системски ефекат индукцијом синтезе реактаната акутне фазе. Стимулише синтезу колагена, чиме индукује стварање везивног ткива. Регулише експресију различитих регулаторних фактора укључујући и IL-1, IL-6, фактор раста пореклом из тромбоцита, трансформишући фактор раста бета, као и групу еикосаноида и хормона, укључујући фактор активације тромбоцита и адреналин (*Tracey i sar., 1989*). При ниским концентрацијама, TNF- α делује на аутокрину или паракрину регулацију леукоцита и ендотелних ћелија, што га чини важним регулатором инфламаторног одговора. Подстиче хемотаксу макрофага и неутрофила, повећава њихову фагоцитну и цитотоксичну

активност, промовише леукотаксу индукцијом повећане експресије ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина на месту инфламације (Zhang *i sar.*, 2002). При високим концентрацијама, продукција TNF- α превазилази број TNF- α рецептора локализованих на површини ћелијске мембране, тако се вишак TNF- α ослобађа у циркулацију. У циркулацији испољава своје ендокрине или егзокрине ефекте, укључујући иницијацију катаболизма, микроваскуларну коагулацију, хипотензију и грозницу. Парадоксално, изгледа да TNF- α утиче и на деструкцију и на репарацију ткива. Стимулише пролиферацију фибробласта и мезенхималних ћелија и индукује биосинтезу фактора раста (Abarbanell *i sar.*, 2009). Делује директно цитотоксично на ендотелне ћелије и може да индукује биосинтезу колагеназа, протеаза, ROS и метаболита арахидонске киселине. Има значајну улогу у ћелијској смрти кроз различите механизме, укључујући путеве секундарног гласника, арахидонски метаболизам, протеин киназе, транскрипцију различитих цитотоксичних гена, регулацију нуклеарних регулаторних фактора, ADP-рибозилацију и, потенцијално, DNA фрагментацију (Chen *i sar.*, 2007). У физиолошким стањима, ови цитотоксични ефекти су од значаја у одбрани домаћина покретањем антитуморске активности и модулисањем ћелијског раста и диференцијације.

Ефекти TNF- α у васкуларном ендотелу се огледају кроз директан утицај на продукцију NO. Сматра се да TNF- α инхибира синтезу eNOS, смањујући стабилност њене mRNA, али и да повећава синтезу NO у ендотелним ћелијама аорте, пошто повећава доступност кофактора за ову синтезу. Инхибише NO-посредовану ендотел зависну релаксацију у малим коронарним артеријама активацијом сфингомијелиназе и следственом продукцијом супероксида у неутрофилима, глаткомишићним и ендотелним ћелијама. Активацијом NF κ B, TNF- α индукује експресију mRNA за iNOS. Насупрот овоме, TNF- β повећава синтезу eNOS (Yan *i sar.*, 2008; Zhang *i sar.*, 2009; Zhang *i sar.*, 2011).

Прекомерна експресија TNF- α и последична кардиомиоцитна стимулација TNF-R1 индукује контрактилну дисфункцију, хипертрофију миокарда, фиброзу и ћелијску смрт, док ниске концентрације TNF- α и последична кардиомиоцитна стимулација TNF-R2 показује протективно дејство (Kleinbongard *i sar.*, 2010). Везивањем за TNFR1, TNF- α доводи до активације каспаза и апоптозе или чак и некрозе. Стварање ROS није значајно у TNF-посредованој апоптози, док NO има кључну улогу и у индукцији и у инхибицији TNF- α посредоване апоптозе. Везивање TNF- α за TNFR1 индукује експресију iNOS, док инхибиција iNOS „укида“ кардиодепресивне ефекте TNF- α (Meldrum *i sar.*, 1998; Funakoshi *i sar.*, 2002).

Хемодинамски ефекти TNF- α се огледају кроз смањену миокардну контрактилност, смањену ејекциону фракцију, хипотензију, пад системске васкуларне резистенције и бивентрикуларну дилатацију. Механизми којима TNF- α изазива миокардну дисфункцију су дисхомеостаза калцијума, директно цитотоксично дејство, оксидативни стрес, апоптоза кардиомиоцита, као и индукција других кардиодепресивних цитокина као што су IL-1, IL-2, IL-6 (Saini *i sar.*, 2005). Интерлеукин-1 синергистички побољшава TNF- α индуковану миокардну депресију и цитотоксичност. Инхибиција NOS спречава кардиодепресивне ефекте TNF и IL-1, указујући да су негативни инотропни ефекти посредовани NO (Cain *i sar.*, 1999). Поред тога, TNF- α ефикасно одваја β адренергичне рецепторе од аденил циклазе преко утицаја на G инхибиторни протеин. Фактор некрозе тумора- α активира металопроотеиназе и блокира експресију инхибитора металопроотеиназа *in vivo*, ефекат који би могао бити одговоран за ремоделовање екстрацелуларног матрикса (Li *i sar.*, 1999).

Познато је да TNF- α повећава концентрацију триглицерида у плазми супресијом активности липопротеинске липазе, да стимулише хепатичну продукцију триглицерида и

смањује клиренс триглицеридима богатих VLDL партикула из циркулације. Изазива изразито повећање хепатичних нивоа цитрата, алостеријског активатора ацетил-СоА карбоксилазе, важног ензима у синтези слободних масних киселина. Стимулацијом активности HMG-СоА редуктазе, TNF- α повећава хепатичну синтезу холестерола. Такође, TNF- α смањује хепатичну синтезу и активност лецитин холестерол ацил трансферазе у плазми и снижава ниво HDL-холестерола. Доказано је да HDL-холестерол смањује продукцију TNF- α у моноцитима и да инхибира TNF- α индуковану експресију ендотелних адхезионих молекула, VCAM-1 и Е-селктина (*Cockerill i sar., 1995; Jovinge i sar., 1998; Popa i sar., 2007*).

Фактор некрозе тумора- α инхибира активност инсулина на молекуларном нивоу, тако што изазива фосфорилацију серина уместо тирозина инсулин рецептор супстрата, који затим ремети аутофосфорилацију инсулинског рецептора и сигналну трансдукцију инсулина (*Kanety i sar., 1995; Hotamisligil i sar., 1996*). Инхибиторни ефекти TNF- α на сигналне путеве инсулинског рецептора се одвијају посредством TNF-R1 (*Peraldi i sar., 1996*). У адипоцитима, TNF- α индукује нисходну регулацију експресије неколико протеина: инсулин рецептор супстрат-1, глукозни транспортер 4, пероксизом пролифератор-активирајући рецептор и адипонектин (*Stephens i Pekala, 1991*). Повећава продукцију лептина, смањује панкреасну продукцију инсулина и подстиче инсулинску резистенцију. Такође, TNF- α стимулише експресију и синтезу MCP 1, што повећава регрутовање макрофага у адипозно ткиво и доприноси инфламацији и инсулинској резистенцији (*Popa i sar., 2007*).

Посебно је значајно место TNF- α у процесу атеросклерозе. Ћелије атеросклеротског плака продукују проинфламаторне цитокине, TNF- α и IL-1 (два најважнија продукта активираних макрофага, и у одређеном степену, васкуларних глаткомишићних ћелија) и IFN- γ (цитокин активираних Т лимфоцита). Проинфламаторни цитокини, TNF- α и IL-1, ослобођени из инфламаторних ћелија делују синергистички у циркулацији индукујући периферну вазодилатацију, пораст васкуларног пермеабилитета и мењање функције ендотела фаворизујући тромбозу. Ови цитокини, могу синергистички да индукују активацију сфингомијелин-церамид сигналног пута и L-аргинин-NO пута. Оба пута сигналне трансдукције учествују у иницијацији и повећању апоптозе у глаткомишићним ћелијама (*Major i sar., 1999; Geng, 2001; Zhang i sar., 2002*). Способност TNF- α да стимулише макрофаге и глаткомишићне ћелије да синтетишу матриксне протеазе које лизирају већ створени еластин и колаген, истањују фиброзна капу атерома и доводе до дезинтеграције, ствара услове за последичну дестабилизацију плака, ерозију и/или руптуру и атеротромбозу (*Boesten i sar., 2005; Parameswaran i Patial, 2010*).

3. Циљ истраживања

За истраживања која су предвиђена овом студијом постављени су следећи циљеви:

1. Одредити ране (тропонин I, СКМВ и СК) и касне (AST, ALT, НВДН и LDH) биохемијске маркере оштећења миокарда у серуму болесника са исхемијском болешћу срца, у циљу процене степена исхемијске болести.
2. Испитати липидни профил (укупни холестерол, HDL, LDL, триглицериди) у серуму болесника са исхемијском болешћу срца.
3. Одредити стандардне маркере инфламације (CRP, укупан број леукоцита, фибриноген, брзина седиментације еритроцита) у крви болесника.
4. Одредити нестандардне маркере инфламације (неоптерин, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, iNOS, ADMA, TNF- α) у серуму или плазми болесника.
5. Анализом ROC крива одредити клиничку валидност маркера инфламације код испитаника.
6. Корелирати стандардне и нестандардне маркере инфламације.
7. Испитати кардиоваскуларне факторе ризика код пацијената и корелирати их са испитиваним биохемијским маркерима инфламације.

4. Пацијенти, материјал и методе

4.1. Пацијенти и биолошки материјал

Истраживањем је обухваћено 307 испитаника, који су подељени у четири групе, приказане у *Табели 1*. Прву, контролну групу испитаника, чинило је 66 клинички здравих (асимптоматских) добровољаца. У другој групи су болесници са дијагнозом стабилне ангине пекторис, укупно 74. Трећа група обухвата 73 испитаника код којих је дијагностикована нестабилна ангина пекторис. Четврту групу су чинили пацијенти (укупно 94) са акутним инфарктом миокарда.

Табела 1. Испитаници укључени у истраживање

Групе	Испитаници	n
Група 1	Контролна група- клинички здраве особе	66
Група 2	Болесници са стабилном ангином пекторис (SAP)	74
Група 3	Болесници са нестабилном ангином пекторис (NSAP)	73
Група 4	Болесници са акутним инфарктом миокарда (AIM)	94

Пацијенти су обрађени анамнестички, клинички и лабораторијски. Приликом обраде болесника детаљно су узети анамнестички подаци о локализацији, трајању, карактеру, ширењу бола, временском настанку и провоцирајућим факторима. Од анамнестичких података, посебна пажња је обрађена на присуство фактора кардиоваскуларног ризика (хипертензија, хиперхолестеролемија, хипертриглицеридемија, дијабетес мелитус, пушење, гојазност, наслеђе, физичка неактивност) код пацијената са исхемијском болешћу срца. Обављен је детаљан клинички преглед праћен електрокардиограмом (ЕКГ).

Стабилна ангина пекторис (SAP) је дефинисана на основу типичног ангинозног бола изазваног напором или психичким узбуђењем, а који ишчезава при мировању и/или после употребе нитроглицерина, са позитивним ЕКГ тестом (абнормалности ST- сегмента и Т- таласа) при тесту физичког оптерећења или позитивним стрес ехокардиографским тестом. Ниједан од ових пацијената није имао инфаркт миокарда или реваскуларизацију миокарда, обољење залистака, кардиомиопатију, малигну аритмију, акутно или хронично обољење јетре, реналну инсуфицијенцију или запаљенски процес.

Нестабилна ангина пекторис (NSAP) је дијагностикована на основу класификације из 2000. године (*Hamm i Braunwald, 2000*) и у истраживање су укључени само они пацијенти са III класом нестабилне ангине пекторис. Сви болесници су имали ангинозни бол, који је трајао краће од 30 минута, у току протеклих 48 сати, а на електрокардиограму су регистроване промене ST- сегмента и/или Т- таласа (перзистентна или транзисторна депресија ST- сегмента и/или инверзија, аплатираност или псеудонормализација Т- таласа), с тим што је тропонин био негативан.

Према универзалној дефиницији, акутни инфаркт миокарда (AIM) је смрт кардиомиоцита узрокована пролонгираном миокардном исхемијом, која је резултат перфузионог дисбаланса између захтева миокарда за кисеоником и снабдевања истим

(Thygesen i sar., 2007). Дијагностички критеријуми АИМ: детекција пораста вредности кардијачних биомаркера (пре свега, златног стандарда- тропонина) са бар једном вредношћу изнад 99% горње референтне вредности (URL), заједно са доказима за исхемију миокарда, на основу бар једног од наведених параметара: симптоми исхемије, ЕКГ промене које указују на новонасталу исхемију (новорегистроване промене ST- сегмента или новонастали блок леве гране), развој патолошког Q зубца. Испитаници су имали инфаркт тип 1. према новој универзалној дефиницији инфаркта миокарда (спонтани инфаркт миокарда узрокован исхемијом због примарног коронарног догађаја као што је ерозија и/или руптура, фисура или дисекција плака) (Thygesen i sar., 2007). Искључени су болесници са претходном реваскуларизацијом миокарда, предходним инфарктом, примљени након 6 сати од почетка бола и који су егзистирали унутар првог сата након пријема.

Испитивања биолошког материјала пацијената оболелих од исхемијске болести срца који су лечени на Институту за кардиоваскуларне болести у Нишкој Бањи извршена су у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра у Нишу.

4.2. Методологија рада

Од рутинских биохемијских параметара у серуму испитаника одређивани су: глукоза, уреа, креатинин, тотални протеини, укупни холестерол, LDL холестерол, HDL холестерол, триглицериди, трансминазе (AST, ALT), креатин-фосфокиназа (СРК), креатин киназа-МВ (СК-МВ), хидроксibuтират дехидрогеназа (HBDH), лактат дехидрогеназа (LDH). Сва испитивања обављена су у серуму комерцијалним тестовима фирме Olympus (Токио, Јапан), стандардним процедурама (препоручене методе од стране IFCC-а) на биохемијском анализатору Olympus AU400^е Chemistry Immuno Analyser у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра у Нишу.

4.2.1. Стандардни биохемијски параметри

За одређивање концентрације **глукозе** у крви коришћен је глукоза хексокиназа (HK-Olympus), ензиматски UV тест (метода са хексокиназом). Глукоза се фосфорилише уз учешће хексокиназе и АТР-а, а затим продуковани глукозо-6-фосфат реагује са NAD⁺ и глукозо-6-фосфат дехидрогеназом формирајући глуконат-6-фосфат и NADH. Пораст апсорбанце је пропорционалан концентрацији глукозе у крви. Референтне вредности су од 3,6 до 6,1 mmol/L.

Концентрација **уреа** је одређивана глутамат дехидрогеназа (GLDH) методом, кинетичким UV тестом фирме Olympus (метода са уреазом). Уреа се хидролизује уз учешће воде и уреазе на амонијак и угљен диоксид. Створени амонијак у реакцији са 2-оксоглутаратом и NADH и уз дејство глутамат дехидрогеназе ствара жуто обојени глутамат и NAD. Опadaње апсорбанце NADH у јединици времена је пропорционално концентрацији уреа. Референтне вредности су од 2,5 до 8,3 mmol/L.

Кинетички колор тест је коришћен за одређивање концентрације **креатинина** (JAFPE метода). Креатинин се пикринском киселином у алкалном медијуму формира једињење жуто наранцасте боје, а промена апсорбанце на 520 nm пропорционална је

концентрацији креатинина у серуму. Нормалне вредности за ову методу су од 72 до 127 $\mu\text{mol/L}$.

Концентрација **тоталних протеина** је мерена фотометријским колор тестом који се заснива на биурет методи. Референтне вредности су од 64 до 83 g/L .

4.2.2. Липидни профил

Укупни холестерол (HOL) је одређиван CHOD/PAP методом. То је ензимски колор тест где се холестерол одређује након ензиматске хидролизе и оксидације. Естри холестерола се хидролизују помоћу холестерол естеразе, настали холестерол оксидише помоћу холестерол оксидазе уз продукцију холестенона и водоник пероксида. У присуству фенола и пероксидазе настаје хинонимин у реакцији између водоник пероксида и 4-аминоптирина. Интензитет боје се чита на 546 nm. Референтне вредности су од 3,6 до 5,2 mmol/L .

ХДЛ холестерол (HDL-C) је одређиван ензимском колор CHOD/PAP методом после преципитације ЛДЛ и ВЛДЛ фосфолибдатом. Референтне вредности су: 0,86 - 1,5 (М) mmol/L и 1,0 - 1,7 (Ж) mmol/L .

ЛДЛ холестерол (LDL-C) је одређиван индиректном методом, односно прерачунаван по математичкој Friedwald-овој формули: ЛДЛ холесетрол = укупни холестерол - триглицериди / 2,2 - ХДЛ холестерол. Референтне вредности су од 2,8 до 3,9 mmol/L .

Триглицериди (TG) су одређивани ензимским колор GPO/PAP тестом, након ензиматске хидролизе липазом. Настали глицерол се помоћу глицерокиназе, у присуству АТР, преводи у глицерол-3-фосфат. Глицерол-3-фосфат се помоћу оксидазе, у присуству кисеоника, преводи у дихидроксиацетон фосфат и водоник пероксид. У присуству пероксидазе из водоник пероксида, 4-аминофеназона и 4-хлорфенола настаје хинонимин чија се апсорбанца мери на 546 nm. Референтне вредности су: 0,8 - 2,0 mmol/L .

4.2.3. Срчани маркери

Активност аспартат аминотрансферазе (AST, GOT) је одређивана кинетичким UV тестом, модификованом методом према препоруци „Интернационалне федерације за клиничку хемију (IFCC)“. Вредности од 10 до 31 U/L се сматрају нормалним за жене, и 10 до 37 U/L нормалним за мушкарце.

Аланин аминотрансфераза (ALT, GPT) је одређивана кинетичким UV тестом, модификованом методом према препоруци IFCC. Референтне вредности су < 45 U/L за мушкарце и < 34 U/L за жене.

Мерење **активности креатин киназе (СК)** је вршено кинетичким UV тестом СК-НАС, према препорукама IFCC. За жене су нормалне вредности до 145 U/L, а за мушкарце до 175 U/L.

Креатин киназа МБ (СК-МВ) одређивана је ензимским имуноинхибиционим тестом. Референтне вредности су: ≤ 24 U/L.

Лактат дехидрогеназа (LDH) је одређивана кинетичким UV тестом према препорукама Скандинавског комитета за ензиме. Нормалне вредности за активност овог ензима, уз коришћење лактата као супстрата су од 208 до 378 U/L.

Хидроксibuтират дехидрогеназа (HBDH) је одређивана кинетичким UV тестом. Референтне вредности су: 90-180 U/L.

Тропонин И (сTnI) је одређиван квантитативно у серуму MEIA методом (ензим имуноесеј на микропартикулама) на AxSYM анализатору (Abbot Ireland Diagnostics Division, Lisnamuck, Ireland). Примењена је сендвич техника која користи специфичну интеракцију два антитела са сTnI. Одређивање је стандардизовано према пречишћеном срчаном TnI. Инкубирањем серума са микрочестицама пресвученим антитропонин антителима настаје реакциона смеша. Везивањем сTnI из узорка за микропартикуле формира се антиген-антитело комплекс. Аликвот реакционе смеше се преноси на матрикс ћелије, где се микропартикуле иреверзивно везују на стаклени фибер матрикс. Испирањем матрикс ћелија одстрањује се вишак невезаног метријала. Коњугат 1 (биотином обележена анти-сTnI моноклонска антитела) се распршава на матрикс ћелију и доводи до везивања моноклонског антитела за комплекс антиген-антитело формирајући антитело-антиген-антитело комплекс. Поновним испирањем матрикс ћелија одстрањује се вишак невезаног материјала. Коњугат 2 (анти-биотин моноклонска антитела везана за алкалну фосфатазу) се распршава на матрикс ћелије и везује се за биотин у антитело-антиген-антитело комплекс стварајући антитело-антиген-антитело-антитело комплекс. Супстрат 4-метилумбелиферил фосфат се додаје у матрикс ћелију, а настали флуоресцентни продукт се мери помоћу оптичког MEIA уређаја. Коцентрација овог продукта је пропорционална концентрацији сTnI. Референтне вредности су до 0,04 ng/mL.

4.2.4. Стандардни маркери инфламације

Фибриноген, реактант акутне фазе, одређиван је Раг-Fontiје методом. Референтни опсег вредности овог параметра креће се до 3,9 g/L.

Седиментација еритроцита (**SE**) је рађена у вакуумским епруветама фирме Terumo (Leuven, Belgium) по модификованој методи Westergreen-a. Референтне вредности: 2 - 4 арб. јед. за први сат.

Укупан **број леукоцита** одређиван је на хематолошком анализатору AL816 (Graz, Austria). Референтне вредности: 4,0 - 10,0 x 10⁹/L.

Високо сензитивни Ц реактивни протеин (hsCRP) представља најосетљивији реактант акутне фазе. Квантитативно одређивање hsCRP-а у хуманом серуму и плазми је вршено имунотурбидиметријски на Olympus анализатору. На Olympus систему уз коришћење CRP Latex реагенса могу да се одреде јако ниске концентрације CRP-а. Мешањем узорка са пуфером и латекс суспензијом, CRP из узорка реагује са антихуманим CRP антителима обложеним на латекс партикулама при чему настају нерастворљиви агрегати. Вредност апсорбанце настале од ових агрегата је пропорционална концентрацији CRP-а у узорку. Референтне вредности су < 1,0 mg/L.

4.2.5. Нестандардни маркери инфламације

4.2.5.1. Одређивање вредности TNF- α

Фактор некрозе тумора-алфа је проинфламаторни цитокин који има централну улогу у иницијацији и/или потпомагању сваког инфламаторног одговора. Продукују га макрофаги, мастоцити, пенасте ћелије, неутрофили, активисани Т и В лимфоцити, НК ћелије, астроцити, ендотелне, глаткомишићне ћелије и неке трансформишуће ћелије. Ефекти TNF- α су најпре локални и испољавају се мобилизацијом антигенпредстављачких ћелија и активацијом ендотелних ћелија које активирају експресију адхезивних молекула. Такође, TNF- α стимулише макрофаге да секретују IL-1, активира неутрофиле, стимулише јетру да продукује протеине акутне фазе, а уз то активира и коагулациону каскаду. Стимулише синтезу колагена, чиме индукује стварање везивног ткива.

Quantikine Immunoassay kit (R&D, Minneapolis, USA) представља квантитативни сендвич ензим имуноесеј метод који је коришћен за одређивање TNF- α . Моноклонална антитела специфична за TNF и везана за зидове микрочашица реагују са постојећим TNF- α у узорцима и стандардима. Након инкубације, а затим испирања свих преосталих невезаних супстанци додаје се поликлонално антитело обележено ензимом и специфично за TNF- α (TNF- α коњугат). Поново се инкубира и вишеструко испира. Испирањем се уклања вишак антитела невезаних у првој фази реакције уз коришћење аутоматског испирача. Сам процес испирања је врло битан за добијање тачних резултата. Додавањем супстрата развија се боја пропорционална концентрацији TNF- α везаног у иницијалној фази. Даље развијање боје се стопа раствором 2N сумпорне киселине и интензитет боје чита при таласној дужини од 450nm на ELISA читачу. Добијене вредности TNF- α се читавају са стандардне криве и изражавају у pg/mL.

4.2.5.2 Одређивање концентрације NO

Азот моноксид је врло важан секреторни продукт ћелија који учествује у одбрани организма, хомеостазним и многобројним другим функцијама, делујући директно или у процесу интерцелуларне сигнализације. Као директни ефектор одговоран је за активацију регулаторних протеина, киназа и протеаза. Активација имуног система је повезана са порастом продукције NO у макрофагима. Учествује у регулацији васкуларног протока и крвног притиска, инхибицији агрегације и адхезије тромбоцита, инхибицији адхезије леукоцита и модулацији пролиферације глатке мускулатуре крвних судова.

Будући да се већи део NO оксидише у нитрите (NO_2^-) и нитрате (NO_3^-), мерење концентрације ових анјона се користи за квантитативно одређивање продукције NO. За мерење концентрације NO коришћен је R&D (Minneapolis, USA) System NO Assay. Ова метода укључује конверзију нитрата у нитрите, дејством ензима нитрат редуктазе. Колориметријска детекција нитрита, као азо-обојеног продукта је заснована на Gress-овој реакцији. Ова реакција представља двостепену диазотизацију у којој ацидификовани NO_2^- продукује нитролизациони агенс који реагује са сулфанилном киселином и ствара диазонијум јон. Он се затим куплује са N-(1-нафтил) етилендиамином формирајући обојене азо-деривате чији се интензитет боје чита на таласној дужини од 540nm. Вредности се читавају са стандардне криве и изражавају у $\mu\text{mol/L}$.

4.2.5.3 Одређивање концентрације неоптерина

Биосинтеза неоптерина је уско повезана са активацијом ћелијског имуног одговора. Доказано је да антигена стимулација циркулишућих моноклеарних ћелија доводи до ослобађања неоптерина под дејством IFN- γ . Одређивање нивоа неоптерина у телесним течностима нуди корисне и иновативне информације за праћење тока болести удружених са активацијом ћелијски посредованог имунитета.

Принцип извођења теста: ензим чврсте фазе везан за имуносорбент есеј (ELISA) заснован на основним принципима компетитивне ELISA. Непозната количина антигена у узорку и фиксна количина ензимом обележеног антигена се компетитивно бори за антители-везујућа места (зечији-анти-неоптерин). Оба антиген-антитело комплекса се везују за зид микротитарних трака које су пресвучене козијим-анти-зечијим антителима. Невезани антиген се уклања испирањем. Интензитет настале боје након инкубације супстрата је обрнуто пропорционалан количини антигена у узорку. Резултати у узорку се одређују директно коришћењем стандардне криве. Нормални ниво неоптерина у серуму је $< 10 \text{ nmol/L}$.

4.2.5.4. Одређивање концентрације ADMA

Асиметрични диметиларгинин је ендогени инхибитор активности NOS. Пораст синтезе и/или редуковани катаболизам ADMA може допринети настанку и прогресији атеросклерозе и тромбозе.

Дијагностичке индикације за праћење нивоа ADMA су: атеросклероза, хипертензија, хронична срчана инсуфицијенција, коронарна артеријска болест, хиперхолестеролемија, хронична бубрежна инсуфицијенција, шећерна болест и периферна артеријска оклузивна болест.

Анализа ADMA се заснива на методи компетитивног ензимског имуноесеја. Припрема узорка се врши додавањем ацилационог реагенса за везивање ADMA. Потом се третирају узорци и поликлонални ADMA-антисерум инкубирају у веловима на микроплочама пресвученим са ADMA обележивачем. Током инкубационог периода ADMA у узорку компетира са обележивачем имобилисаним на зиду микротитарске плоче за везивање са поликлоналним антителима. ADMA у узорку истискује антитела са обележивача. Због тога је концентрација обележивачем везаних антитела обрнуто пропорционална концентрацији ADMA у узорку. Током другог инкубационог периода, пероксидазом-коњуговано антитело се додаје у свако микротитарско удубљење да детектује анти-ADMA антитела. Након испирања невезаних компоненти, тетраметилбензидин се додаје као супстрат за пероксидазу. Коначно, ензимска реакција се прекида додатком киселине. Промене у боји су од плаве до жуте и апсорбанца се мери у фотометру при таласној дужини на 450nm . Интензитет жуте боје је обрнуто пропорционалан концентрацији ADMA у узорку. Вредности ADMA израчунаване су на основу стандардне криве. Референтне вредности ADMA у серуму/плазми су $0,41 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

4.2.6. Статистичка обрада података

Вредности испитиваних параметара су анализирани коришћењем статистичког софтвера Jandel SigmaStat® for Windows Version 3,5, а изражене као просечна вредност \pm стандардна девијација, медијана са распоном вредности (минимум-максимум), или апсолутна вредност са процентом. Тестирање вредности између група анализирано је коришћењем Studentovог Т-теста и непараметријског Mann-Whitney Rank Sum теста, односно коришћењем χ^2 -теста у зависности од дистрибуције и карактера вредности испитиваних параметара. Значајном се сматра вредност $p < 0,05$. Резултати су приказани табеларно и графички.

5. Резултати рада

5.1. Дистрибуција испитаника према старосној доби и према полу

Анализом је обухваћено 307 испитаника. Прва група се састојала од 74 испитаника са дијагнозом SAP. Другу групу је чинило 73 испитаника са NSAP. У трећу групу спада 94 испитаника са AIM. Четврту, контролну групу је чинило 66 клинички здравих испитаника.

Од укупног броја пацијената са SAP, 49 је било мушкараца и 25 жена, просечне старости $61,3 \pm 6,5$ година. У групи болесника са NSAP било је 43 мушкарца и 30 жена, просечне старости $60,8 \pm 9,8$ година. Групу болесника са AIM чинио је 61 мушкарац и 33 жене са просечном старосношћу $60,2 \pm 12,7$ година, док је у контролној групи испитаника био 31 мушкарац и 35 жена просечне старости $59,1 \pm 9,7$ година (Табела 2).

Табела 2. Старосна доб и пол испитаника

	Контрола (n=66)	SAP (n=74)	NSAP (n=73)	AIM (n=94)
Старост (године)	$59,1 \pm 9,7$	$61,3 \pm 6,5$	$60,8 \pm 9,8$	$60,2 \pm 12,7$
Пол				
мушкарци	31	49 ^A	43	61 ^A
жене	35	25	30	33

^A $p < 0,05$ у односу на контролну групу

Број мушкараца у групи са SAP, и у групи са AIM, је статистички значајно већи у односу на контролну групу ($p < 0,05$). Између иситиваних група није било статистички значајне разлике у годинама старости.

5.2. Кардиоваскуларни фактори ризика

Постоје бројни фактори ризика значајни за исхемијску болест срца. Процена болесника обухватила је све чиниоце ризика укључујући начин живота, биохемијске и физиолошке (променљиве), као и личне (непроменљиве) карактеристике. Ризичне биохемијске и физиолошке карактеристике представљене су хиперхолестеролемијом, хипертриглицеридемијом, дијабетес мелитусом и гојазношћу. Личне карактеристике су старост, пол и породична анамнеза. Битан податак у анамнези је и постојање лоших навика болесника као што су пушење и физичка неактивност.

Табела 3. Фактори ризика код испитаника са исхемијском болешћу срца

Фактори ризика	SAP	NSAP	AIM
Хипертензија (n, %)	42 (56,76) ^{A, D}	22 (29,73) ^{D, H}	75 (79,79) ^G
Хиперхолестеролемија (n, %)	28 (37,84)	35 (47,29)	42 (44,68)
Хипертриглицеридемија (n, %)	26 (35,14) ^B	41 (55,41) ^E	40 (42,55)
Дијабетес мелитус (n, %)	8 (10,81) ^{B, E}	21 (28,38) ^I	28 (29,79) ^H
Пушење (n, %)	32 (43,24)	30 (40,54)	47 (50)
Гојазност (n, %)	8 (10,81) ^{C, E}	1 (1,35) ^{D, H}	27 (28,72) ^I
Породична анамнеза (n, %)	25 (33,78) ^F	30 (40,54)	46 (48,94) ^I
Физичка неактивност (n, %)	29 (39,19) ^F	27 (36,49) ^E	54 (57,45)

^A p<0,001 у односу на NSAP

^B p<0,01 у односу на NSAP

^C p<0,05 у односу на NSAP

^D p<0,001 у односу на AIM

^E p<0,01 у односу на AIM

^F p<0,05 у односу на AIM

^G p<0,001 у односу на контролну групу

^H p<0,01 у односу на контролну групу

^I p<0,05 у односу на контролну групу

У групи болесника са SAP хипертензија је представљала најчешћи фактор ризика (56,76%), затим следи пушење (43,24%), физичка неактивност (39,19%) и хиперхолестеролемија (37,84%). Велики број пацијената је имао хипертриглицеридемију (35,14%), позитивну породичну анамнезу (33,78%), док је 10,81% пацијената имало дијабетес и гојазност као фактор ризика (Табела 3).

Најзаступљенији фактор ризика, у групи пацијената са NSAP, била је хипертриглицеридемија (55,41%), следи хиперхолестеролемија (47,29%), док су пушење и породична анамнеза заступљени подједнако (40,54%). Физичка неактивност је постајала код 36,49% пацијената, хипертензија код 29,73% пацијената, дијабетес мелитус у 28,38%, гојазност код 1,35%.

Највећу заступљеност у групи пацијената са AIM, је имала хипертензија (79,79%), потом следи физичка неактивност (57,47%), пушење (50%) и породична анамнеза (48,94%). Хиперхолестеролемију је имало 44,68% пацијената, хипертриглицеридемију 42,55%, дијабетес мелитус је заступљен са 29,79%, а гојазност са 28,72%.

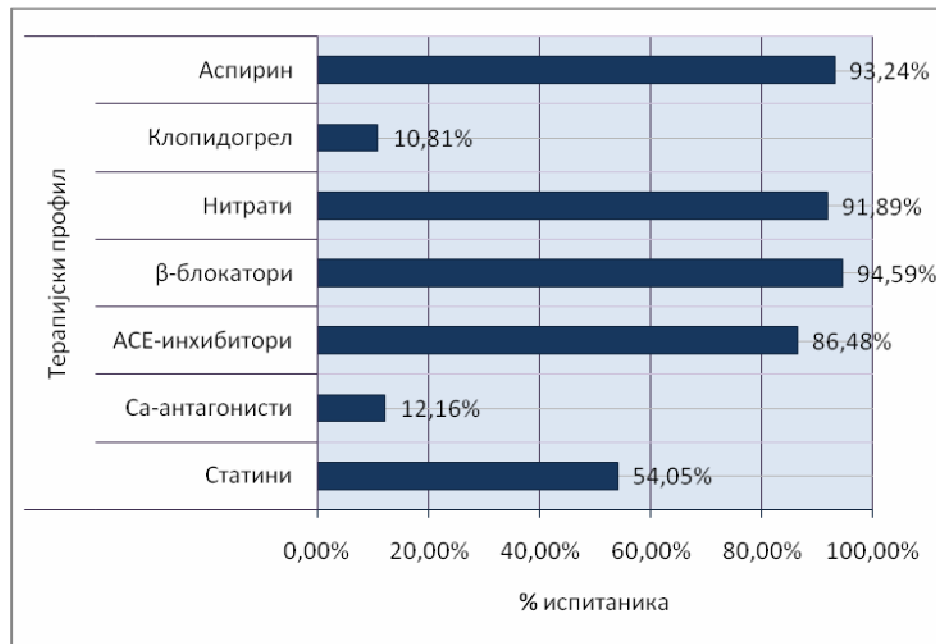
5.3. Терапијски профил испитаника са исхемијском болешћу срца

Према препорукама Европског удружења кардиолога за лечење кардиоваскуларних болесника прописује се дуготрајна и континуирана терапија у циљу секундарне превенције инфаркта миокарда. У секундарној превенцији треба применити лекове који имају ефекат на стабилизацију ендотела коронарног крвног суда, стабилизацију атероматозног плака, као и антиинфламаторно дејство.

Медикаментозна терапија болесника са SAP у превенцији инфаркта миокарда и смрти подразумева примену антиромбоцитне терапије и антиисхемијске терапије. Сви пацијенти који нису алергични на аспирин добили су аспирин (93,24%). Клопидогрел је

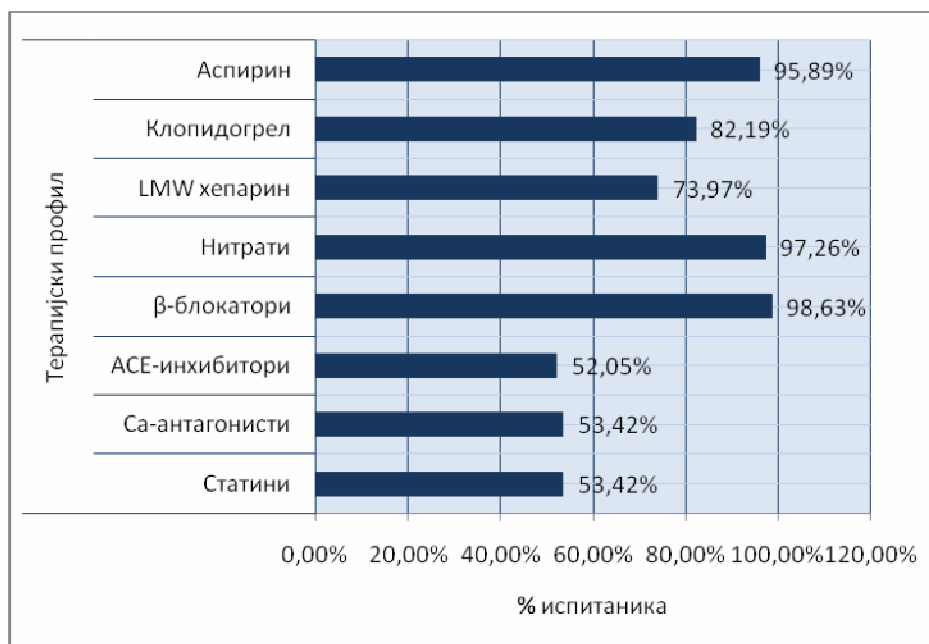
добило 10,81% пацијената. Бета-блокатори су лекови избора, у иницијалној терапији SAP, у одсуству контраиндикација, и били су заступљени код 94,59% пацијената. Нитрати су примењени у врло високом проценту (91,89%).

Према препорукама Европског удружења кардиолога терапија ACE-инхибиторима је резервисана за пацијенте са SAP који имају и дијабетес мелитус и/или систолну дисфункцију леве коморе. Терапију ACE-инхибиторима је добило 86,48% пацијената са SAP. Антагонисти калцијума су били заступљени код 12,16% пацијената. Терапија статинима у SAP је била резервисана за 54,05% пацијената (Слика 5).



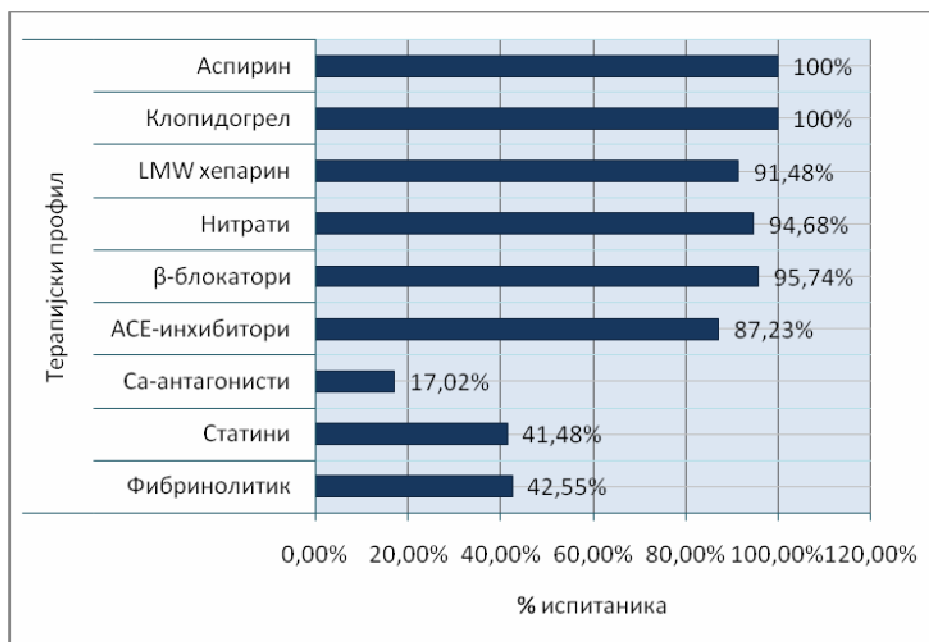
Слика 5. Терапијски профил испитаника са SAP.

Медикаментозна терапија болесника са NSAP подразумева двојну антиромбоцитну терапију, антиишемијску терапију и антикоагулантну терапију. Сви болесници, и ниско и високо ризични, захтевају терапију статинима. Двојна антиромбоцитна терапија је примењена у врло високом проценту у групи болесника са NSAP (аспирин са 95,89% и клопидогрел са 82,19%). Од антиишемијске терапије, нитрате је узимало 97,26% пацијената, β-блокаторе 98,63%, Са-антагонисте 53,42%. Антикоагулантна терапија у групи пацијената са NSAP је била заступљена код 73,97% пацијената. ACE-инхибиторе је користило 52,05% болесника. Статине је редовно узимало 53,42% пацијената (Слика 6).



Слика 6. Терапијски профил испитаника са NSAP.

Лечење болесника са АИМ подразумева примену тромболитичке терапије, коју чине: фибринолитичка терапија, антиромботска и антиромбоцитна. Фибринолитик је добило 42,55% пацијената. Антиромботска терапија је била заступљена код 91,48% пацијената са АИМ. Сви пацијенти са АИМ су добили двојну антиромбоцитну терапију.



Слика 7. Терапијски профил испитаника са АИМ.

Европске препоруке за лечење АИМ препоручују трајну терапију β -блокаторима и АСЕ-инхибиторима, као и употребу статина преваходно због њиховог плејотропног ефекта. Бета-блокаторе је редовно узимало 95,74% пацијената, а АСЕ-инхибиторе 87,23%. Нитрати су били заступљени код 94,68% пацијената, а антагонисти калцијума код свега 17,02%. Статине је узимало 41,48% пацијената (Слика 7).

5.4. Стандардни биохемијски параметри код испитаника

Од стандардних биохемијских параметара у серуму болесника са исхемијском болешћу срца одеђиване су концентрација глукозе, урее, креатинина и тоталних протеина (Табела 4).

Табела 4. Стандардни биохемијски параметри код испитаника са исхемијском болешћу срца

Параметар	Контрола	SAP	NSAP	АИМ
Глукоза (mmol/L)	5,30 \pm 0,56	5,72 \pm 1,43 ^A	6,22 \pm 2,51 ^B	6,71 \pm 2,71 ^{B, C}
Уреа (mmol/L)	4,95 \pm 1,25	6,93 \pm 4,13 ^B	8,71 \pm 4,83 ^{B, D}	7,96 \pm 4,03 ^{B, C}
Креатинин (μ mol/L)	83,74 \pm 12,38	93,07 \pm 23,97 ^A	113,99 \pm 77,96 ^{B, E}	100,15 \pm 35,05 ^B
Укупни протеини (g/L)	73,26 \pm 3,75	73,23 \pm 5,30	70,55 \pm 6,42 ^{A, E}	69,29 \pm 6,71 ^{B, D}

^A $p < 0,01$ у односу на контролну групу

^B $p < 0,001$ у односу на контролну групу

^C $p < 0,05$ у односу на SAP

^D $p < 0,001$ у односу на SAP

^E $p < 0,01$ у односу на SAP

Средња вредност глукозе је највиша у АИМ, и све групе болесника имају значајно већу концентрацију глукозе у односу на здраве испитанике (за SAP групу $p < 0,01$; за NSAP и АИМ $p < 0,001$), а у АИМ је статистички значајно виша и у односу на групу са SAP ($p < 0,05$). Вредност глукозе у АИМ је виша и односу на групу са NSAP, али та разлика није статистички значајна.

Највише вредности урее су забележене у групи пацијената са NSAP, сатистички значајно више у односу на SAP и у односу на контролу ($p < 0,001$ за обе групе). Такође, и испитаници са АИМ имају статистички значајно већу концентрацију урее у односу на групу болесника са SAP ($p < 0,05$) и у односу на контролне вредности ($p < 0,001$).

Просечна вредност креатинина је највиша у NSAP, статистички значајно виша у односу на групу испитаника са SAP ($p < 0,01$) и у поређењу са контролом ($p < 0,001$). Испитаници са АИМ имају нешто нижу просечну вредност креатинина у односу на NSAP, али статистички значајно вишу у поређењу са контролном групом ($p < 0,001$).

Код пацијената са SAP вредност урее је статистички значајно виша у односу на контролу ($p < 0,001$), као и вредност креатинина ($p < 0,01$).

Све три групе болесника имају ниже просечне вредности укупних протеина у односу на контролу, с тим што су код АИМ вредности статистички значајно ниже како у односу на контролу, тако и у односу на SAP ($p < 0,001$ за обе групе). Такође, и код NSAP вредности укупних протеина су статистички значајно ниже у односу на SAP, као и у односу на контролне вредности ($p < 0,01$ за обе групе).

5.5. Липидни статус

За процену липидног статуса испитаника одређивана је концентрација укупног холестерола, HDL-холестерола, LDL-холестерола и триглицерида. Резултати су приказани у Табели 5.

Табела 5. Липидни статус код болесника са исхемијском болешћу срца

Параметар	Контрола	SAP	NSAP	AIM
Холестерол (mmol/L)	5,73 ± 0,64	5,61 ± 1,64	5,85 ± 1,42	5,79 ± 1,42
HDL-C (mmol/L)	1,53 ± 0,38	1,18 ± 0,30 ^A	1,09 ± 0,29 ^A	1,11 ± 0,27 ^A
LDL-C (mmol/L)	3,25 ± 0,48	3,34 ± 1,05	3,65 ± 1,19	3,75 ± 1,18 ^B
Триглицериди (mmol/L)	1,60 ± 0,66	2,10 ± 0,96 ^C	2,39 ± 1,28 ^A	2,07 ± 0,93 ^B

^A p<0,001 у односу на контролну групу

^B p<0,05 у односу на контролну групу

^C p<0,01 у односу на контролну групу

Просечна вредност укупног холестерола била је највиша у групи пацијената са NSAP, али међу испитиваним групама нису забележене статистички значајне разлике.

Концентрација HDL-C била је статистички значајно повишена у контролној групи испитаника у односу на све три групе (SAP, NSAP, AIM) болесника (p<0,001).

Највише вредности LDL-C су забележене у AIM, статистички значајно више у односу на контролу (p<0,05). Вредности LDL-C, биле су више и у групи болесника са NSAP, и групи са SAP, у односу на контролне вредности, али та разлика није имала статистичку значајност.

Све три групе болесника имају статистички значајно више вредности триглицерида у односу на контролу (за SAP p<0,01, за NSAP p<0,001, за AIM p<0,05).

У овом раду је упоређиван липидни статус (просечна вредност укупног холестерола, HDL-C, LDL-C и триглицерида) пацијената који су били третирани статинима са липидним статусом пацијената који нису били третирани статинима, у све три групе испитаника (SAP, NSAP, AIM).

Табела 6. Липидни статус код болесника са SAP који нису третирани статинима (SAP (-)) и код болесника са SAP који су третирани статинима (SAP (+))

Параметар	SAP (-)	SAP (+)
Холестерол (mmol/L)	6,35 ± 0,71 ^A	4,65 ± 0,95
HDL-C (mmol/L)	1,25 ± 0,31 ^B	1,11 ± 0,29
LDL-C (mmol/L)	4,14 ± 0,72 ^C	2,65 ± 0,75
Триглицериди (mmol/L)	2,33 ± 0,87	1,91 ± 0,99

^A p< 0,001 у односу на SAP (+)

^B p< 0,05 у односу на SAP (+)

^C p< 0,001 у односу на SAP (+)

У групи пацијената са SAP који нису третирани статинима (Табела 6) добијене су статистички значајно повишене вредности укупног холестерола (p<0,001), HDL-C (p<0,05) и LDL-C (p<0,001) у односу на групу пацијената са SAP који су третирани статинима.

Такође, нађене су и више вредности триглицерида, али та разлика није била статистички значајна.

Табела 7. Липидни статус код болесника са NSAP који нису третирани статинима (NSAP (-)) и код болесника са NSAP који су третирани статинима (NSAP (+))

Параметар	NSAP (-)	NSAP (+)
Холестерол (mmol/L)	5,65 ± 1,33	6,00 ± 1,37
HDL-C (mmol/L)	1,04 ± 0,35	1,14 ± 0,23
LDL-C (mmol/L)	3,63 ± 1,12	3,67 ± 1,27
Триглицериди (mmol/L)	2,20 ± 1,18	2,55 ± 1,34

Одређивањем параметара липидног статуса болесника са NSAP који нису третирани статинима и болесника са NSAP који су третирани статинима, нису добијене статистички значајно измењене вредности (Табела 7).

Табела 8. Липидни статус код болесника са АИМ који нису третирани статинима (АИМ (-)) и код болесника са АИМ који су третирани статинима (АИМ (+))

Параметар	АИМ (-)	АИМ (+)
Холестерол (mmol/L)	5,66 ± 1,52	5,98 ± 1,27
HDL-C (mmol/L)	1,10 ± 0,29	1,12 ± 0,26
LDL-C (mmol/L)	3,67 ± 1,30	3,84 ± 0,98
Триглицериди (mmol/L)	1,95 ± 0,87	2,24 ± 0,99

Није било статистички значајних промена параметара липидног статуса између групе пацијената са АИМ који су третирани статинима у односу на пацијенте са АИМ који нису третирани статинима (Табела 8).

5.6. Срчани маркери

Дијагноза исхемијске болести срца, односно АИМ и стратификација болесника са ангинозним болом врши се на основу три критеријума: клиничке слике, ЕКГ промена и кардиоспецифичних срчаних маркера.

Када миоцити постану некротични, долази до оштећења мембране и дифузије интраћелијских макромолекула у срчани интерстицијум, а потом у срчану микроциркулацију и лимфоток. Ови макромолекули су детектабилни у периферној циркулацији. За њихово колективно описивање се користи термин „срчани маркери“.

Тропонин I, СК и СКМВ су одређивани као рани срчани маркери (резултати су приказани у Табели 9), а од средњих и касних срчаних маркера одређивани су АСТ, АЛТ, LDH и HBDH (Табела 10).

Највише вредности свих раних срчаних маркера (тропонин I, СК и СК-МВ) су забележене у групи пацијената са АИМ.

Просечна вредност тропонина I статистички је значајно већа у групи испитаника са АИМ, како у односу на контролне вредности, тако и у односу на испитанике са NSAP и SAP (p<0,001 за све три групе). Статистички значајно повишене вредности тропонина I

добијене су и у групи пацијената са NSAP у односу на контролне вредности, за мањи степен значајности ($p < 0,01$).

Одређивањем активности ензима СК добијене су статистички значајно повишене вредности у групи болесника са AIM у односу на све три групе испитаника за исти степен значајности ($p < 0,001$). Такође, и активност ензима СК-МВ је статистички значајно повишена у AIM у односу на контролу, SAP и NSAP ($p < 0,001$ за све групе).

Табела 9. Рани маркери некрозе кардиомиоцита код испитаника са исхемијском болешћу срца

Група	Troponin I (ng/mL)	СК (U/L)	СК-МВ (U/L)
Контрола	0,00 ± 0,00	125,62 ± 65,75	10,89 ± 3,80
SAP	0,04 ± 0,21	102,81 ± 70,33	10,88 ± 5,10
NSAP	0,21 ± 0,61 ^A	201,76 ± 572,17	17,34 ± 39,73
AIM	18,25 ± 30,06 ^{B,C,D}	812,23 ± 876,99 ^{B,C,D}	60,23 ± 75,05 ^{B,C,D}

^A $p < 0,01$ у односу на контролну групу

^B $p < 0,001$ у односу на NSAP

^C $p < 0,001$ у односу на SAP

^D $p < 0,001$ у односу на контролну групу

Просечне вредности свих средњих и касних срчаних маркера статистички су се значајно разликовале између испитиваних група. У групи испитаника са AIM утврђене су највеће вредности свих средњих и касних срчаних маркера.

Значајно повишена активност ензима AST и ALT забележена је у AIM, како у односу на контролне вредности, тако и у односу на болеснике са NSAP и SAP, за исти степен значајности ($p < 0,001$).

Активности ензима LDH и HBDH биле су статистички значајно повишене у групи пацијената са AIM у поређењу са контролом, SAP и NSAP, и то са истим степеном значајности ($p < 0,001$). Статистички значајно повишене активности ензима LDH и HBDH добијене су и у групи испитаника са NSAP у односу на групу испитаника са SAP, али је та разлика мање значајна ($p < 0,05$).

Табела 10. Средњи и касни маркери некрозе кардиомиоцита код испитаника

Група	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	HBDH (U/L)
Контрола	23,06 ± 6,54	24,83 ± 10,69	371,57 ± 98,08	120,38 ± 32,53
SAP	20,57 ± 7,00	23,41 ± 11,13	349,92 ± 91,33	114,47 ± 34,15
NSAP	33,61 ± 57,01	27,29 ± 24,87	418,27 ± 258,82 ^D	141,77 ± 103,72 ^D
AIM	124,41 ± 141,32 ^{A,B,C}	53,35 ± 71,85 ^{A,B,C}	1074,78 ± 883,85 ^{A,B,C}	412,81 ± 343,04 ^{A,B,C}

^A $p < 0,001$ у односу на NSAP

^B $p < 0,001$ у односу на SAP

^C $p < 0,001$ у односу на контролну групу

^D $p < 0,05$ у односу на SAP

5.7. Стандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца

Инфламација заузима значајно место у свим стадијумима атеросклеротског процеса и доприноси настанку дестабилизације вулнерабилног плака. Од стандардних маркера инфламације код испитиваних пацијената са исхемијском болешћу срца одређивани су укупан број леукоцита, фибриноген, брзина седиментације еритроцита и hsCRP. Добијени резултати приказани су у Табели 11.

Табела 11. Стандардни маркери инфламације код испитаника са исхемијском болешћу срца

Маркер	Контрола	SAP	NSAP	AIM
hsCRP (mg/L)	2,01 ± 1,75	4,07 ± 3,21 ^A	7,81 ± 6,54 ^{B,C}	39,31 ± 47,72 ^{D,E,F}
Фибриноген(g/L)	3,58 ± 0,62	4,14 ± 1,14	4,78 ± 1,13 ^F	5,19 ± 2,28 ^{E,F}
SE (arb. jed.)	13,68 ± 8,74	18,34 ± 12,35	25,07 ± 14,03 ^{F,G}	24,11 ± 21,25 ^{F,C}
LE (x10 ⁹ /L)	6,78 ± 1,55	7,55 ± 1,67	8,15 ± 2,01 ^B	10,62 ± 3,95 ^{D,E,F}

^A p<0,05 у односу на контролу

^B p<0,01 у односу на контролу

^C p<0,05 у односу на SAP

^D p<0,001 у односу на NSAP

^E p<0,001 у односу на SAP

^F p<0,001 у односу на контролну групу

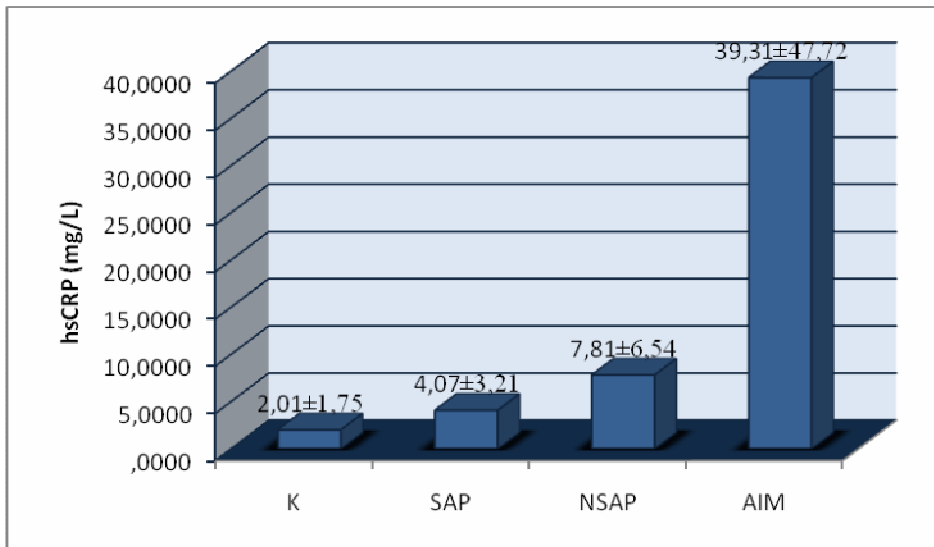
^G p<0,01 у односу на SAP

Највеће просечне вредности маркера hsCRP, фибриногена и леукоцита добијене су код испитаника са AIM, а SE код NSAP. Концентрација hsCRP је статистички значајно повишена у AIM у односу на контролу, SAP и NSAP, за исти степен значајности (p<0,001). Такође, присутна је и статистички значајна разлика између свих испитиваних група.

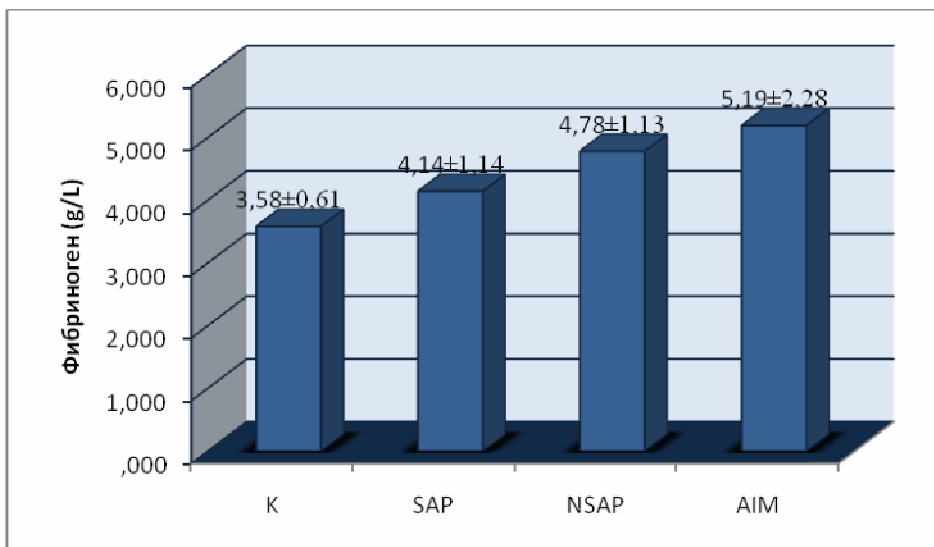
Просечна вредност фибриногена код болесника са AIM била је највиша и статистички значајно виша у односу на SAP и контролну групу (p<0,001). Такође, статистички значајно повишене вредности фибриногена постоје и код болесника са NSAP у односу на контролну групу испитаника (p<0,001).

Вредност SE у групи са NSAP је статистички значајно већа у односу на контролу (p<0,001), а у нешто мањој мери и у односу на групу испитаника са SAP (p<0,01). Такође, вредност SE у NSAP је већа и у поређењу са AIM, али та разлика није статистички значајна.

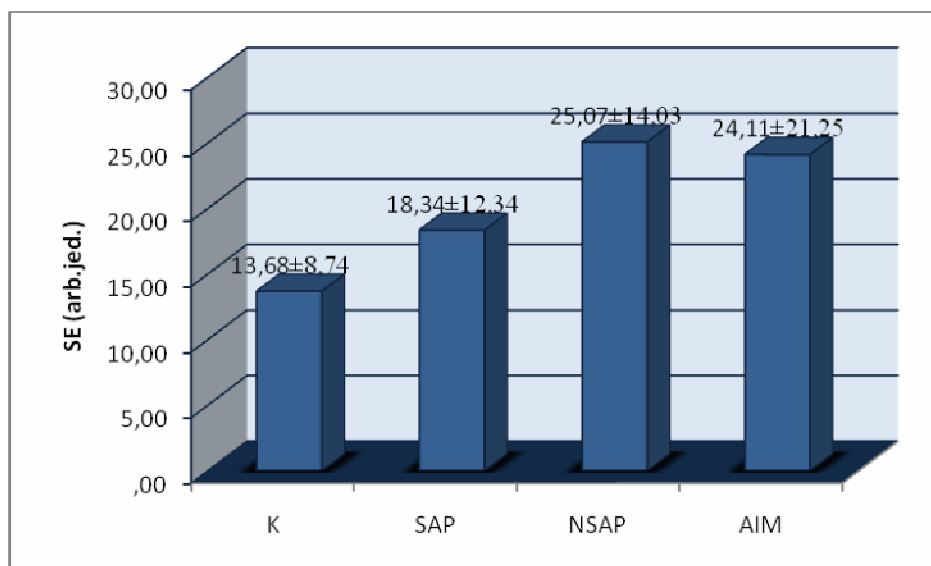
Статистички значајно повишена вредност леукоцита постоји у групи пацијената са AIM у поређењу са контролом, SAP и NSAP (p<0,001). Присутна је и статистички значајно виша вредност леукоцита у NSAP групи у односу на контролне вредности (p<0,01). Вредност леукоцита у групи испитаника са SAP показује само незнатан пораст без статистички значајне разлике у односу на контролне вредности.



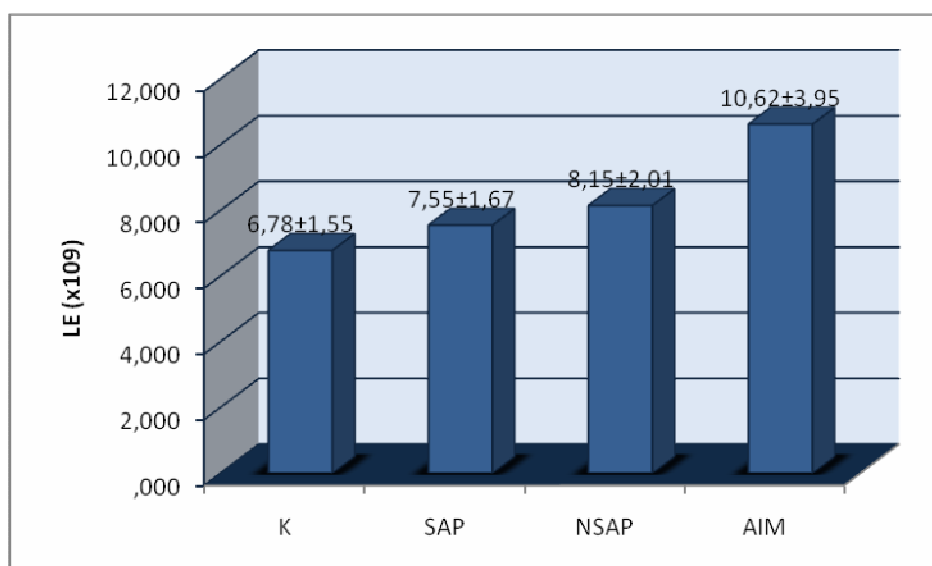
Слика 8. Просечне вредности hsCRP у испитиваним групама



Слика 9. Просечне вредности фибриногена у испитиваним групама



Слика 10. Просечне вредности SE у испитиваним групама



Слика 11. Просечне вредности LE у испитиваним групама

У овом раду су упоређиване вредности стандардних маркера инфламације (hsCRP, фибриноген, SE, LE) пацијената који су били третирани статинима са вредностима стандардних маркера инфламације пацијената који нису били третирани статинима, у све три групе пацијената (SAP, NSAP, AIM).

Табела 12. Стандардни маркери инфламације код болесника са SAP који нису третирани статинима (SAP (-)) и код болесника са SAP који су третирани статинима (SAP (+)).

Маркер	SAP (-)	SAP (+)
hsCRP (mg/L)	5,44 ± 3,52 ^A	2,91 ± 2,39
Фибриноген (g/L)	4,28 ± 1,26	4,02 ± 1,03
SE (arb. jed.)	22,18 ± 14,21 ^B	15,08 ± 9,52
LE (x10 ⁹ /L)	8,09 ± 1,70 ^B	7,08 ± 1,51

^A p<0,001 у односу SAP (+)

^B p<0,01 у односу SAP (+)

Концентрација hsCRP је статистички значајно повишена у групи пацијената са SAP који нису третирани статинима, у односу на групу пацијената са SAP који су третирани статинима (p<0,001). Такође, и вредности SE и LE су повишене у групи пацијената са SAP који нису третирани статинима, у односу на оне који су третирани статинима, при чему је степен значајности нешто нижи (p<0,01). Одређивањем вредности фибриногена у SAP (+) групи нису добијене статистички значајне промене у односу на SAP (-) групу (Табела 12).

Табела 13. Стандардни маркери инфламације код болесника са NSAP који нису третирани статинима (NSAP (-)) и код болесника са NSAP који су третирани статинима (NSAP (+)).

Маркер	NSAP (-)	NSAP (+)
hsCRP (mg/L)	13,06 ± 5,87 ^A	3,24 ± 2,24
Фибриноген (g/L)	5,02 ± 1,06	4,57 ± 1,16
SE (arb. jed.)	32,26 ± 13,47 ^A	18,79 ± 11,35
LE (x10 ⁹ /L)	8,76 ± 2,11 ^B	7,62 ± 1,78

^A p<0,001 у односу NSAP (+)

^B p<0,01 у односу NSAP (+)

У групи пацијената са NSAP, који нису третирани статинима, добијене су повишене вредности hsCRP и SE, у односу на оне који су третирани статинима, за исти степен значајности (p<0,001). Нешто мања статистичка значајност постоји и за LE (p<0,01). Није било статистички значајних промена у вредностима фибриногена између испитиваних група код пацијената са NSAP (Табела 13).

Табела 14. Стандардни маркери инфламације код болесника са AIM који нису третирани статинима (AIM (-)) и код болесника са AIM који су третирани статинима (AIM (+)).

Маркер	AIM (-)	AIM (+)
hsCRP (mg/L)	62,90 ± 50,48 ^A	6,04 ± 3,20
Фибриноген (g/L)	5,19 ± 2,35	5,19 ± 2,21
SE (arb. jed.)	27,85 ± 23,95 ^B	18,82 ± 15,56
LE (x10 ⁹ /L)	11,13 ± 4,21	9,91 ± 3,47

^A p<0,001 у односу AIM (+)

^B p<0,05 у односу AIM (+)

Статистички значајно повишена концентрација hsCRP забележена је у групи пацијената са АИМ који нису третирани статинима, у односу на групу пацијената са АИМ који су третирани статинима ($p < 0,001$). Значајно повећање SE добијено је у групи пацијената са АИМ који нису третирани статинима у односу на ону групу пацијената који су третирани статинима ($p < 0,01$). Вредности фибриногена и LE код пацијената са АИМ који су третирани статинима не показују статистички значајне разлике у односу на пацијенте који нису третирани статинима (Табела 14).

5.8. Нестандарни маркери инфламације у исхемијској болести срца

Од нестандартних маркера инфламације код испитиваних пацијената са исхемијском болешћу срца одређивана је концентрација TNF- α , неоптерина, ADMA, азот-моноксида, као и активност индубилне азот-моксид синтазе. Добијене вредности дате су у Табелама 15. и 16.

Табела 15. Вредности TNF- α , неоптерина и iNOS код испитаника са исхемијском болешћу срца

Маркер	Контрола	SAP	NSAP	АИМ
TNF- α (pg/ml)	12,99 \pm 1,56	12,74 \pm 1,25	13,75 \pm 1,85	14,50 \pm 2,03 ^{A,B}
Неоптерин (nmol/L)	10,90 \pm 6,49	17,86 \pm 11,02 ^{C,D}	19,76 \pm 17,26 ^{C,D}	13,73 \pm 9,85
iNOS (U/L)	2,05 \pm 0,91	2,21 \pm 1,21	3,01 \pm 1,34 ^D	2,85 \pm 1,28

^A $p < 0,01$ у односу на контролу

^B $p < 0,001$ у односу на SAP

^C $p < 0,05$ у односу на АИМ

^D $p < 0,05$ у односу на контролну групу

Проинфламаторни цитокин, TNF- α продукован од стране макрофага, пенстих ћелија и мастоцита подстиче инфилтрацију ћелија у атеросклеротски плак и стимулише продукцију других цитокина који повећавају нестабилност плака, што доводи до формирања тромба. У овом раду (Табела 15) су добијене статистички значајно повишене вредности TNF- α у АИМ у односу на групу пацијената са SAP ($p < 0,001$), и у нешто мањој мери у односу на контролну групу испитаника ($p < 0,01$). Сматра се да се пораст TNF- α јавља спонтано и у складу са ерупцијама болести, што значи да се ради о параметру карактеристичном за акутну фазу болести.

Неоптерин поспешује инфламаторне процесе унутар вулнерабилног плака и заједно са проинфламаторним цитокином TNF α стимулише транскрипцију гена за iNOS, што резултује продукцијом цитотоксичних слободних радикала NO. Највеће повећање неоптерина је забележено у NSAP, статистички значајно у односу на АИМ и на контролну групу ($p < 0,05$ за обе групе). Такође, статистички значајан пораст неоптерина забележен је и у SAP, како у односу на АИМ, тако и у односу на контролне вредности (за обе групе $p < 0,05$).

Највећа активност iNOS је забележена у групи пацијената са NSAP, статистички значајно у односу на контролне вредности ($p < 0,05$). Повишена активност iNOS нађена је и у АИМ, како у поређењу са SAP, тако и са контролом, али та разлика није показала статистичку значајност.

Табела 16. Вредности NO и ADMA код испитаника са исхемијском болешћу срца

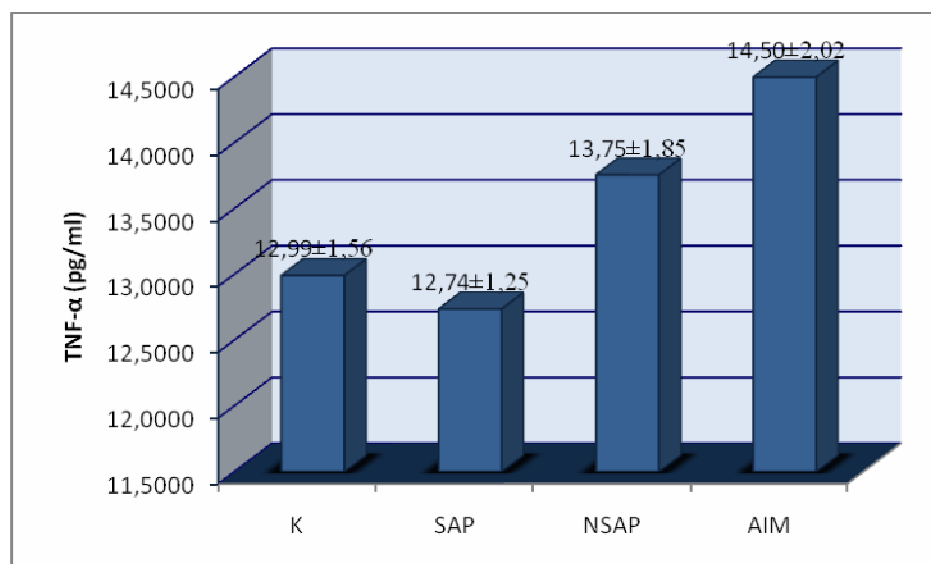
Маркер	Контрола	SAP	NSAP	AIM
NO ₂ + NO ₃ (μmol/L)	80,02 ± 34,04	95,23 ± 31,56	110,52 ± 35,91 ^{A,B}	111,61 ± 36,78 ^{A,B}
ADMA (μmol/L)	0,33 ± 0,16	0,98 ± 0,58 ^A	1,13 ± 0,63 ^A	1,09 ± 0,48 ^A

^A p<0,001 у односу на контролну групу

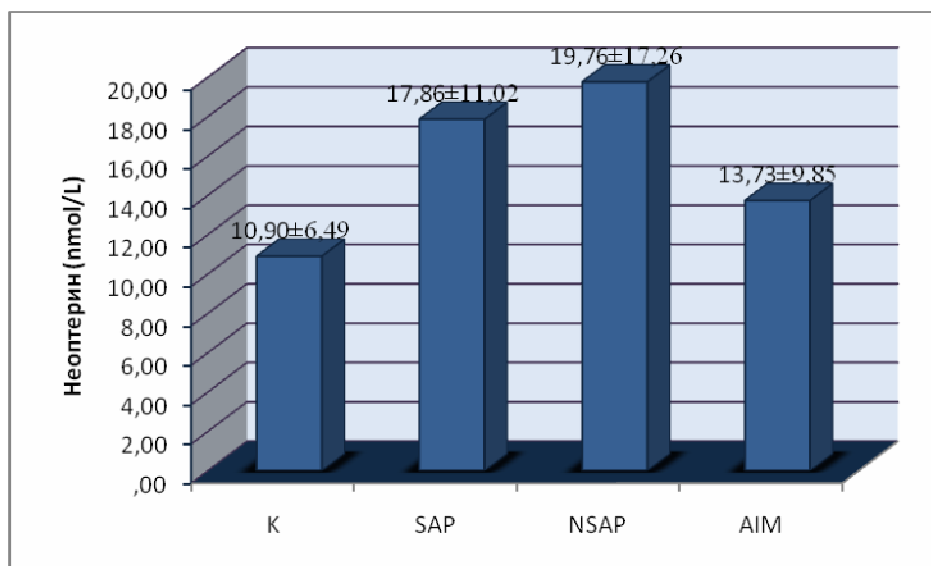
^B p<0,05 у односу на SAP

Асиметрични диметиларгинин је најзначајнија ендогена супстанца која блокира синтезу азот-моноксида, а смањено стварање азот-моноксида има кључну улогу у започињању процеса атеросклерозе. Највећа вредност ADMA је добијена код болесника са NSAP. Статистички значајан пораст концентрације ADMA забележен је у све три групе испитаника у односу на контролне вредности за p<0,001 (Табела 16).

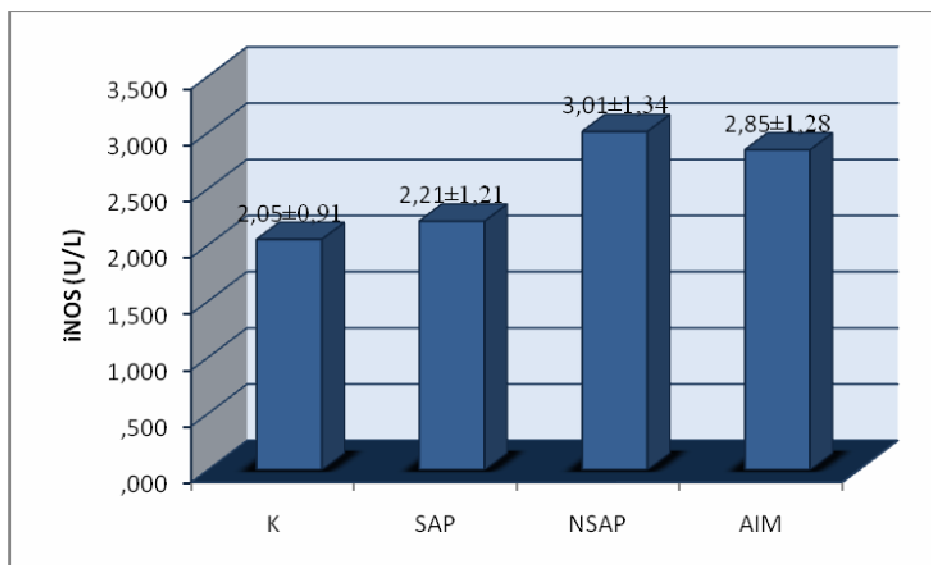
Значајно повишене вредности азот-моноксида су добијене у групи пацијената са AIM и са NSAP, у односу на контролне вредности (p<0,01). Нешто мања статистичка значајност постоји и у поређењу са SAP (p<0,05).



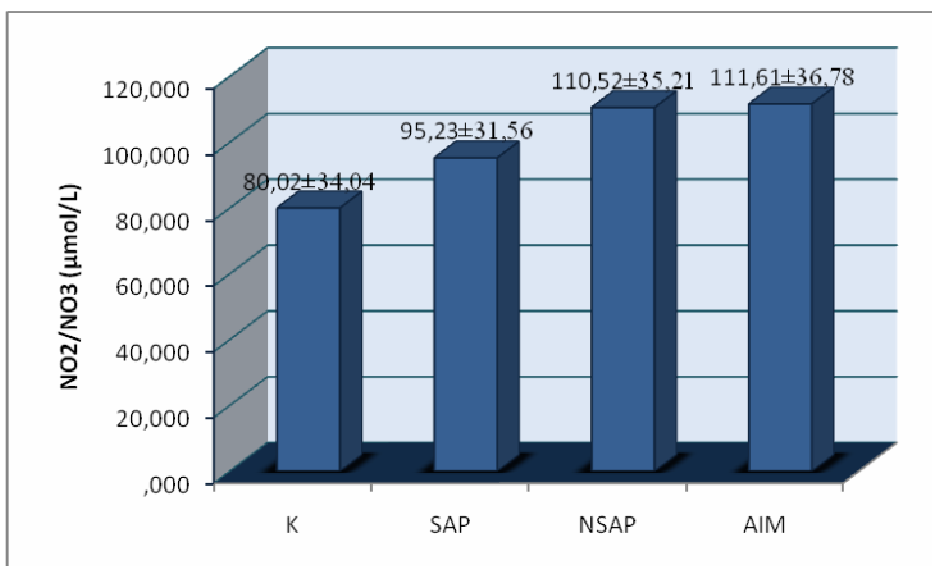
Слика 12. Просечне вредности TNF-α у испитиваним групама.



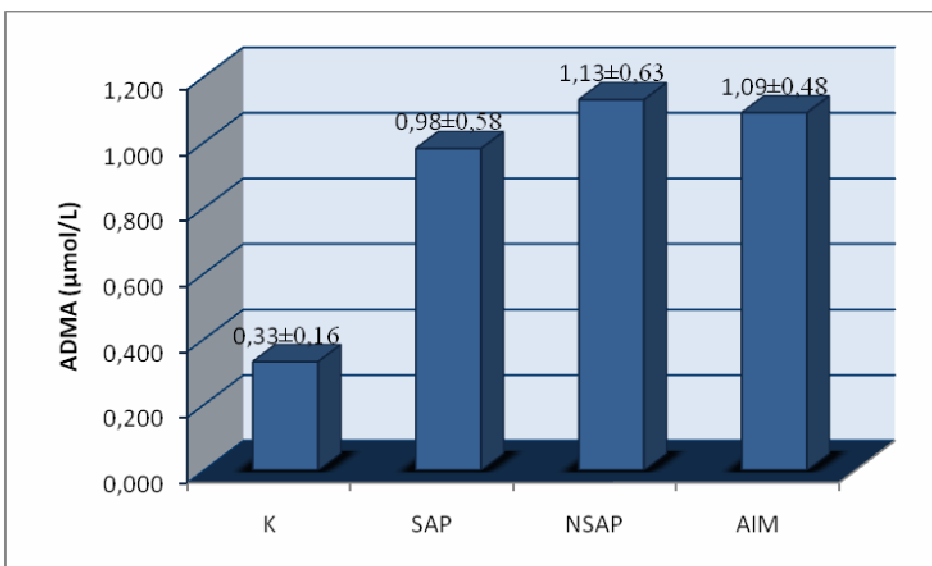
Слика 13. Просечне вредности неоптерина у испитиваним групама.



Слика 14. Просечна активност iNOS у испитиваним групама.



Слика 15. Просечне вредности NO₂/NO₃ у испитиваним групама.



Слика 16. Просечне вредности ADMA у испитиваним групама.

У овом раду су упоређиване вредности нестандардних маркера инфламације (TNF- α , неоптерин, iNOS, NO₂+NO₃, ADMA) пацијената који су били третирани статинима са вредностима нестандардних маркера инфламације пацијената који нису били третирани статинима, у све три групе пацијената (SAP, NSAP, AIM). Резултати су приказани у Табелама 17, 18 и 19.

Табела 17. Нестандардни маркери инфламације код пацијената са SAP који нису третирани статинима (SAP (-)) и код пацијената са SAP који су третирани статинима (SAP (+)).

Маркер	SAP (-)	SAP (+)
TNF- α (pg/ml)	12,89 \pm 1,32	12,57 \pm 1,21
Неоптерин (nmol/L)	16,76 \pm 8,43	19,07 \pm 13,42
iNOS (U/L)	2,39 \pm 1,48	2,02 \pm 0,84
NO ₂ + NO ₃ (μ mol/L)	92,20 \pm 34,61	97,98 \pm 28,75
ADMA (μ mol/L)	0,97 \pm 0,64	0,99 \pm 0,43

Статистички значајне промене у групи са SAP (Табела 17), у смислу налаза нижих вредности нестандардних маркера инфламације код пацијената који су третирани статинима у односу на оне који нису третирани статинима, нису добијене. Једино је активност iNOS била промењена, али та разлика није била статистички значајна.

Табела 18. Нестандардни маркери инфламације код пацијената са NSAP који нису третирани статинима (NSAP (-)) и код пацијената са NSAP који су третирани статинима (NSAP (+)).

Маркер	NSAP (-)	NSAP (+)
TNF- α (pg/ml)	13,18 \pm 1,05	14,38 \pm 2,34
Неоптерин (nmol/L)	16,66 \pm 7,61	16,81 \pm 8,42
iNOS (U/L)	3,07 \pm 1,09	2,94 \pm 1,63
NO ₂ + NO ₃ (μ mol/L)	110,97 \pm 39,83	110,14 \pm 32,94
ADMA (μ mol/L)	1,12 \pm 0,53	1,13 \pm 0,49

Није било статистички значајних промена нестандардних маркера инфламације између групе пацијената са NSAP који су третирани статинима у односу на пацијенте са NSAP који нису третирани статинима (Табела 18). Активност iNOS је била виша у групи пацијената са NSAP који нису третирани статинима у односу на пацијенте који су третирани статинима, али није била статистички значајно измењена.

Табела 19. Нестандардни маркери инфламације код пацијената са AIM који нису третирани статинима (AIM (-)) и код пацијената са AIM који су третирани статинима (AIM (+)).

Маркер	AIM (-)	AIM (+)
TNF- α (pg/ml)	14,82 \pm 2,11	13,84 \pm 1,77
Неоптерин (nmol/L)	12,91 \pm 6,99	13,74 \pm 9,14
iNOS (U/L)	3,12 \pm 1,28	2,28 \pm 1,14
NO ₂ + NO ₃ (μ mol/L)	108,94 \pm 37,28	115,28 \pm 36,35
ADMA (μ mol/L)	1,08 \pm 0,38	1,09 \pm 0,29

У испитиваној групи болесника са АИМ (Табела 19) нису добијене статистички значајно измењене вредности нестандардних маркера инфламације између оних који су третирани статинима у односу на оне који нису третирани статинима. Такође, као и у предходне две испитиване групе, са SAP и са NSAP и у групи са АИМ добијена је једино смањена активност iNOS код пацијената третираних статинима у односу на пацијенте који нису третирани статинима, али та разлика не показује статистичку значајност.

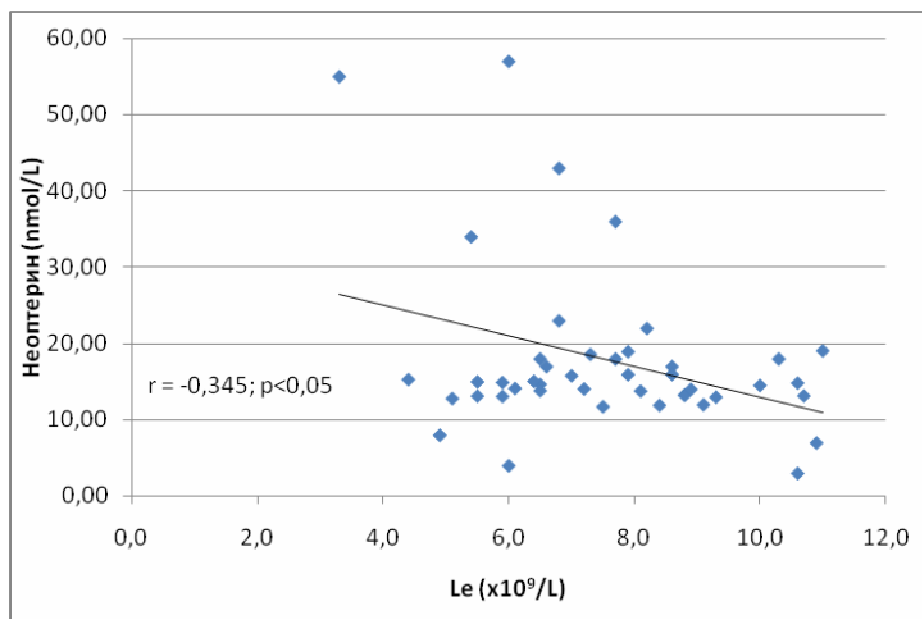
5.9. Корелације стандардних и нестандардних маркера инфламације код болесника са исхемијском болешћу срца

Корелације стандардних и нестандардних маркера инфламације представљене су Табелама 20-22.

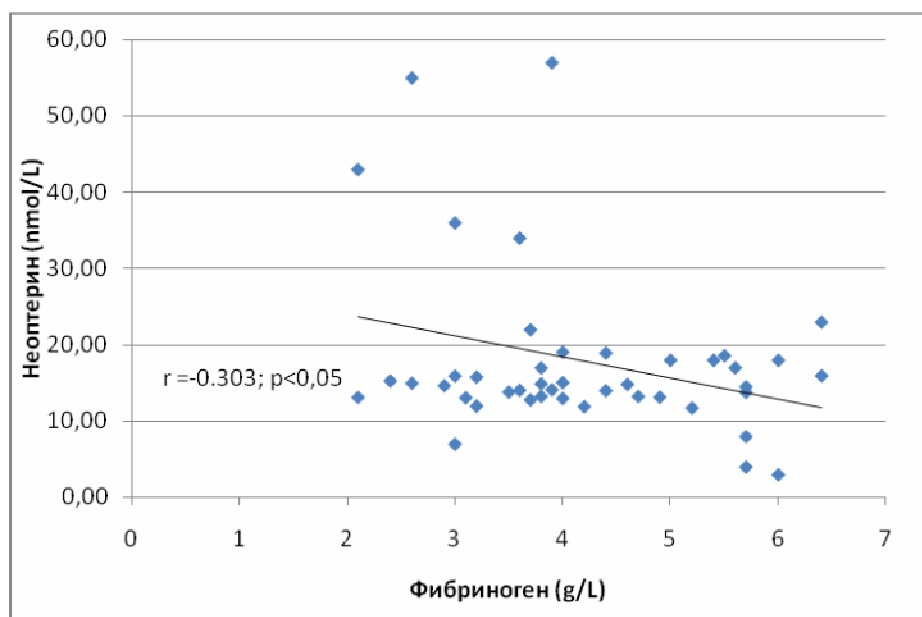
Забележена је статистички значајна негативна корелација концентрације неоптерина и фибриногена ($r = -0,303$; $p < 0,05$) у групи испитаника са SAP (Слика 17). Такође, постоји и статистички значајна негативна корелација вредности неоптерина и вредности LE ($r = -0,345$; $p < 0,05$). Све остале корелације маркера инфламације у групи испитаника са SAP су веома слабе, те и статистички незначајне.

Табела 20. Корелација стандардних и нестандардних маркера инфламације код SAP

Нестандардни маркери инфламације	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
TNF- α	r	0,295	-0,103	0,106	0,219
	p	0,152	0,624	0,615	0,292
Неоптерин	r	-0,022	-0,303	0,046	-0,345
	p	0,885	0,046*	0,767	0,022*
iNOS	r	0,287	0,096	0,206	0,351
	p	0,165	0,650	0,322	0,085
NO ₂ + NO ₃	r	-0,084	-0,028	0,042	-0,041
	p	0,504	0,825	0,739	0,748
ADMA	r	-0,113	0,229	-0,038	-0,168
	p	0,626	0,318	0,872	0,467



Слика 17. Корелација LE и неоптерина у SAP групи



Слика 18. Корелација фибриногена и неоптерина у SAP групи

Табела 21. Корелација стандардних и нестандардних маркера инфламације у NSAP

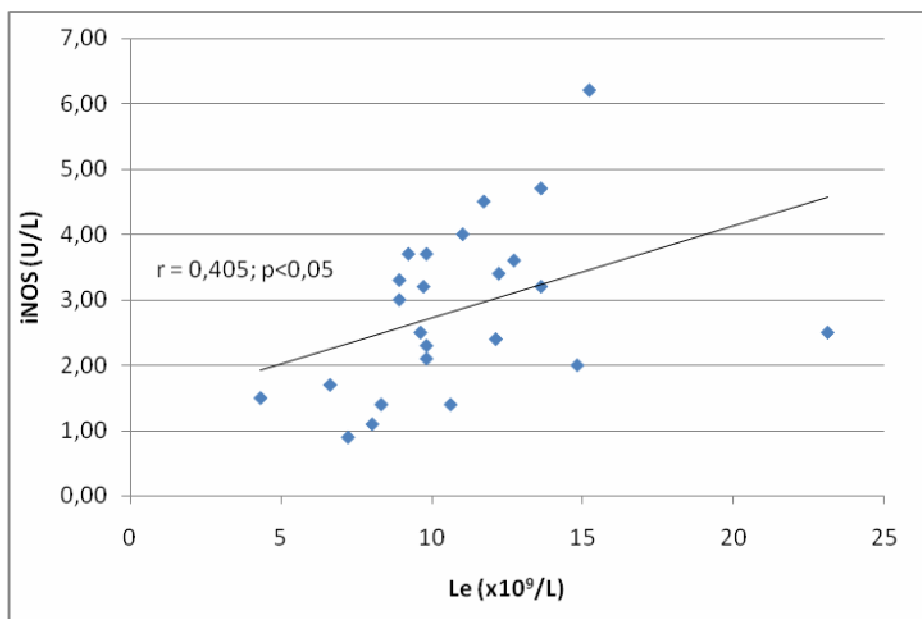
Нестандардни маркери инфламације	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
TNF- α	r	-0,322	-0,155	-0,021	-0,194
	p	0,134	0,480	0,925	0,374
Неоптерин	r	0,194	0,170	0,157	0,140
	p	0,196	0,258	0,297	0,354
iNOS	r	0,001	0,006	-0,131	0,046
	p	0,995	0,979	0,551	0,834
NO ₂ + NO ₃	r	0,075	-0,053	0,061	0,184
	p	0,545	0,670	0,623	0,136
ADMA	r	0,034	0,046	-0,140	-0,268
	p	0,881	0,839	0,533	0,227

Док у групи испитаника са NSAP нема статистички значајних корелација, у групи са AIM утврђена је статистички значајна позитивна корелација вредности LE и активности iNOS ($r=0,405$; $p<0,05$).

Табела 22. Корелација стандардних и нестандардних маркера инфламације у AIM

Нестандардни маркери инфламације	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
TNF- α	r	0,051	-0,099	-0,096	-0,033
	p	0,813	0,645	0,656	0,877
Неоптерин	r	-0,107	-0,070	0,038	0,130
	p	0,447	0,691	0,785	0,355
iNOS	r	0,241	-0,045	-0,106	0,405
	p	0,257	0,833	0,622	0,050*
NO ₂ + NO ₃	r	-0,046	-0,033	0,130	-0,069
	p	0,693	0,777	0,262	0,554
ADMA	r	0,259	0,161	0,351	0,026
	p	0,242	0,476	0,109	0,910

* $p<0,05$ vs. контрола



Слика 19. Корелација LE и iNOS у АИМ групи

5.10. Корелације стандардних маркера инфламације и фактора ризика код болесника са исхемијском болешћу срца

Корелације стандардних маркера инфламације и фактора ризика представљене су Табелама 23-25.

Статистички значајна позитивна корелација хипертриглицеридемије и седиментације ($r=0,232$; $p<0,05$) је забележена у групи испитаника са SAP. Такође, постоји и статистички значајна позитивна корелација пушења и вредности леукоцита ($r=0,232$; $p<0,05$). Све остале корелације маркера инфламације и фактора ризика у групи испитаника са SAP су веома слабе, те и статистички незначајне.

Табела 23. Корелација стандардних маркера инфламације и фактора ризика у SAP

Фактори ризика	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
Хипертензија	r	-0,002	-0,043	0,200	-0,073
	p	0,989	0,719	0,087	0,535
Хиперхолестеролемија	r	0,033	-0,074	0,113	0,118
	p	0,783	0,531	0,336	0,316
Хипертриглицеридемија	r	-0,076	0,028	0,232	-0,142
	p	0,520	0,814	0,046*	0,226
Дијабетес мелитус	r	0,096	0,038	0,123	0,070
	p	0,414	0,745	0,296	0,553
Пушење	r	-0,074	-0,084	-0,073	0,232
	p	0,530	0,478	0,537	0,047*
Гојазност	r	-0,037	0,076	0,151	-0,018
	p	0,752	0,521	0,198	0,876
Породична анамнеза	r	-0,049	-0,131	0,101	-0,035
	p	0,677	0,267	0,390	0,769
Физичка неактивност	r	-0,068	-0,208	-0,176	-0,222
	p	0,567	0,076	0,134	0,057

Постоји статистички значајна негативна корелација пушења и концентрације hsCRP ($r= -0,249$; $p<0,05$) у групи болесника са NSAP. Забележена је статистички значајна негативна корелација породичне анамнезе и фибриногена ($r= -0,263$; $p<0,05$) и породичне анамнезе и леукоцита ($r= -0,274$; $p<0,05$), као и статистички значајна позитивна корелација гојазности и леукоцита ($r=0,323$; $p<0,005$) у NSAP.

Табела 24. Корелација стандардних маркера инфламације и фактора ризика у NSAP

Фактори ризика	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
Хипертензија	r	-0,113	0,050	0,029	0,095
	p	0,341	0,676	0,808	0,425
Хиперхолестеролемија	r	-0,006	-0,042	-0,089	-0,038
	p	0,961	0,723	0,452	0,749
Хипертриглицеридемија	r	-0,067	0,011	0,032	0,042
	p	0,575	0,924	0,787	0,724
Дијабетес мелитус	r	-0,030	0,144	0,105	-0,049
	p	0,798	0,223	0,379	0,678
Пушење	r	-0,249	-0,085	-0,186	-0,041
	p	0,034*	0,476	0,115	0,731
Гојазност	r	0,093	0,083	0,164	0,323
	p	0,436	0,484	0,166	0,005**
Породична анамнеза	r	-0,012	-0,263	-0,101	-0,274
	p	0,918	0,024*	0,396	0,019*
Физичка неактивност	r	0,023	-0,086	0,066	-0,046
	p	0,850	0,470	0,578	0,697

У групи пацијената са АИМ добијена је статистички значајна позитивна корелација концентрације hsCRP и дијабетес мелитуса ($r=0,274$; $p<0,01$) и вредности леукоцита и дијабетес мелитуса ($r=0,210$; $p<0,05$).

Табела 25. Корелација стандардних маркера инфламације и фактора ризика у АИМ

Фактори ризика	Параметри корелације	Стандардни маркери инфламације			
		hsCRP	Фибриноген	SE	LE
Хипертензија	r	0,110	0,003	0,050	-0,077
	p	0,293	0,979	0,631	0,460
Хиперхолестеролемија	r	0,108	0,056	0,013	-0,032
	p	0,299	0,591	0,898	0,759
Хипертриглицеридемија	r	0,086	0,174	0,106	-0,156
	p	0,409	0,093	0,309	0,134
Дијабетес мелитус	r	0,274	0,095	0,120	0,210
	p	0,008*	0,364	0,250	0,042*
Пушење	r	0,057	-0,002	0,006	0,017
	p	0,583	0,988	0,956	0,868
Гојазност	r	0,194	0,010	0,052	0,085
	p	0,061	0,926	0,621	0,417
Породична анамнеза	r	-0,140	0,025	-0,142	-0,068
	p	0,179	0,809	0,173	0,514
Физичка неактивност	r	0,098	-0,014	-0,092	-0,031
	p	0,348	0,895	0,376	0,765

5.11. Корелације нестандардних маркера инфламације и фактора ризика код болесника са исхемијском болешћу срца

Корелације нестандардних маркера инфламације и фактора ризика представљене су Табелама 26-28.

У овом раду је добијена статистички значајна позитивна корелација вредности неоптерина и физичке неактивности ($r=0,344$; $p<0,05$), као и статистички значајна негативна корелација вредности NO и физичке неактивности ($r= -0,290$; $p<0,05$) код испитаника са SAP Такође, постоји и статистички значајна позитивна корелација вредности NO и дијабетес мелитуса ($r=0,367$; $p<0,01$). Све остале корелације маркета инфламације и фактора ризика у SAP су веома слабе, те и статистички незначајне.

Табела 26. Корелација нестандардних маркера инфламације и фактора ризика у SAP

Фактори ризика	Параметри корелације	Нестандардни маркери инфламације				
		TNF- α	Неоптерин	iNOS	NO ₂ +NO ₃	ADMA
Хипертензија	r	0,340	-0,030	0,232	-0,075	0,110
	p	0,096	0,848	0,265	0,552	0,636
Хиперхолестеролемија	r	-0,111	-0,155	0,119	0,004	-0,198
	p	0,596	0,314	0,572	0,974	0,389
Хипертриглицеридемија	r	-0,104	0,120	-0,166	0,068	0,380
	p	0,621	0,438	0,427	0,589	0,089
Дијабетес мелитус	r	-0,359	-0,247	0,260	0,367	0,163
	p	0,078	0,105	0,209	0,003*	0,481
Пушење	r	-0,104	-0,217	-0,020	0,078	0,109
	p	0,621	0,158	0,923	0,537	0,640
Гојазност	r	-0,195	0,172	0,223	-0,096	-0,008
	p	0,351	0,264	0,285	0,447	0,971
Породична анамнеза	r	0,324	0,125	-0,018	-0,050	-0,326
	p	0,114	0,420	0,931	0,692	0,149
Физичка неактивност	r	-0,106	0,344	0,024	-0,290	-0,149
	p	0,613	0,022*	0,910	0,019*	0,520

У групи болесника са NSAP постоји статистички значајна позитивна корелација вредности неоптерина и хиперхолестеролемије ($r=0,307$; $p<0,05$). Забележена је и статистички значајна позитивна корелација вредности NO и гојазности ($r=0,264$; $p<0,05$), као и статистички значајна негативна корелација вредности NO и физичке неактивности ($r= -0,346$; $p<0,01$).

Табела 27. Корелација нестандардних маркера инфламације и фактора ризика у NSAP

Фактори ризика	Параметри корелације	Нестандардни маркери инфламације				
		TNF- α	Неоптерин	iNOS	NO ₂ +NO ₃	ADMA
Хипертензија	r	-0,129	-0,099	0,365	0,073	-0,049
	p	0,557	0,511	0,087	0,560	0,829
Хиперхолестеролемија	r	0,268	0,307	0,168	0,034	0,303
	p	0,216	0,038*	0,443	0,783	0,170
Хипертриглицеридемија	r	-0,211	-0,014	0,234	-0,001	0,304
	p	0,333	0,927	0,283	0,993	0,169
Дијабетес мелитус	r	-0,328	0,039	-0,134	-0,018	-0,123
	p	0,127	0,799	0,544	0,882	0,586
Пушење	r	0,412	-0,123	0,182	0,090	0,128
	p	0,051	0,414	0,406	0,467	0,570
Гојазност	r	-0,049	0,023	0,116	0,264	-0,003
	p	0,825	0,881	0,597	0,031*	0,989
Породична анамнеза	r	-0,125	0,081	-0,019	0,009	0,079
	p	0,750	0,591	0,933	0,941	0,728
Физичка неактивност	r	-0,135	-0,128	-0,026	-0,346	-0,249
	p	0,538	0,398	0,905	0,004*	0,263

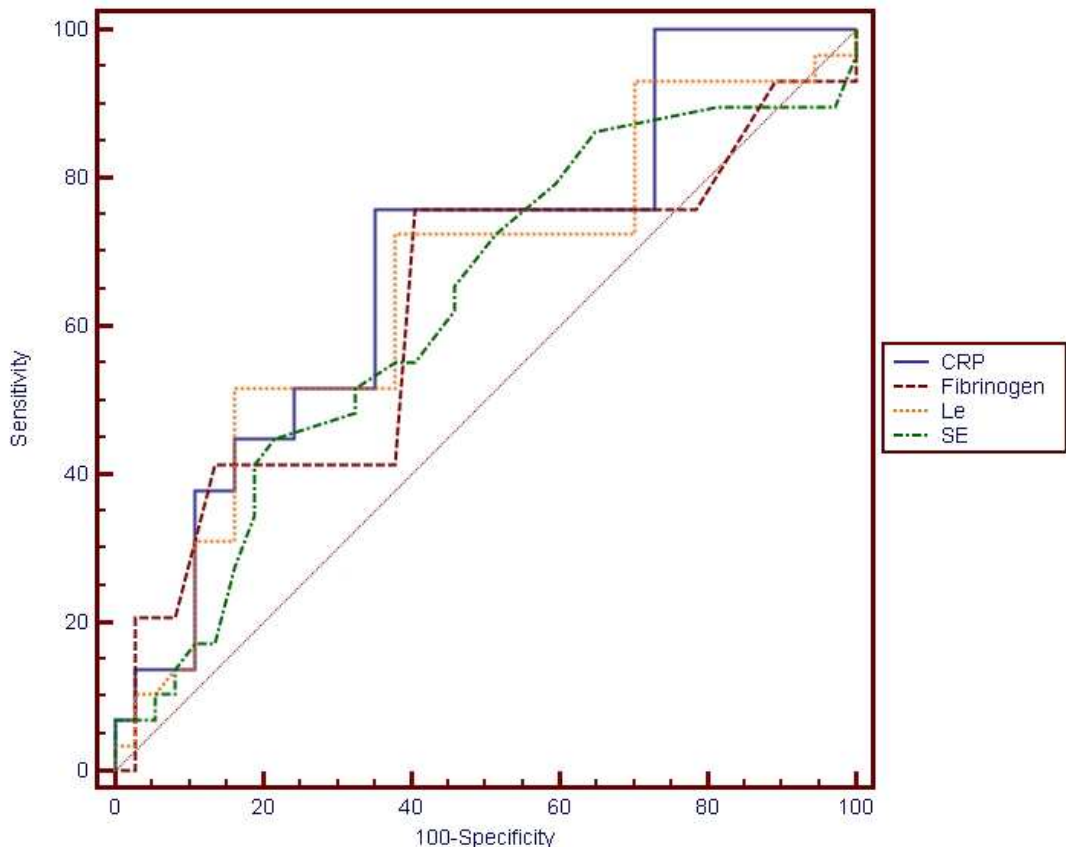
Постоји статистички значајна негативна корелација концентрације NO и хипертензије ($r = -0,287$; $p < 0,05$) у групи испитаника са АИМ. Такође, добијена је и значајна негативна корелација вредности ADMA и пушења ($r = -0,450$; $p < 0,05$), као и значајна позитивна корелација вредности ADMA и дијабетес мелитуса ($r = 0,427$; $p < 0,05$).

Табела 28. Корелација нестандардних маркера инфламације и фактора ризика у АИМ

Фактори ризика	Параметри корелације	Нестандардни маркери инфламације				
		TNF- α	Неоптерин	iNOS	NO ₂ +NO ₃	ADMA
Хипертензија	r	0,249	0,070	-0,071	-0,287	0,071
	p	0,240	0,618	0,741	0,012*	0,755
Хиперхолестеролемија	r	0,107	0,131	-0,114	-0,191	0,139
	p	0,619	0,351	0,597	0,098	0,538
Хипертриглицеридемија	r	-0,133	0,118	-0,207	-0,108	0,015
	p	0,536	0,402	0,332	0,354	0,947
Дијабетес мелитус	r	-0,380	-0,196	0,200	0,035	0,427
	p	0,067	0,159	0,349	0,761	0,047*
Пушење	r	-0,182	-0,141	0,054	0,049	-0,450
	p	0,393	0,313	0,802	0,673	0,036*
Гојазност	r	-0,023	-0,042	-0,167	-0,019	-0,215
	p	0,914	0,763	0,436	0,870	0,337
Породична анамнеза	r	0,039	0,214	-0,094	-0,003	-0,199
	p	0,858	0,123	0,663	0,977	0,375
Физичка неактивност	r	-0,270	0,018	-0,240	0,184	-0,271
	p	0,203	0,901	0,258	0,111	0,223

5.12. ROC криве биомаркера инфламације код пацијената са исхемијском болешћу срца

У циљу процене који од испитиваних биомаркера инфламације је највалиднији у евалуацији степена исхемијске болести срца, урађене су ROC криве како за стандардне (фибриноген, hsCRP, LE, SE), тако и за нестандартне (ADMA, iNOS, неоптерин, NO, TNF- α) маркере инфламације у све три групе пацијената.



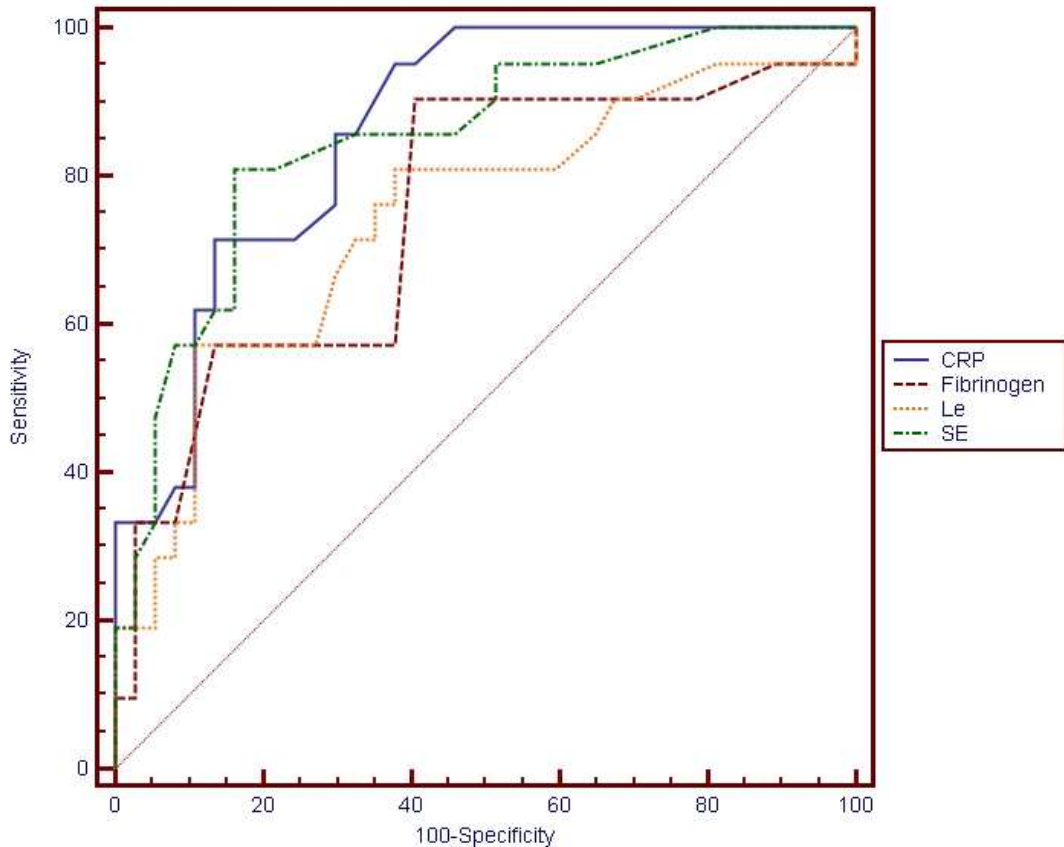
Слика 20. ROC криве стандардних биомаркера инфламације код пацијената са SAP

Табела 29. Анализа ROC крива стандардних биомаркера инфламације код пацијената са SAP

Маркер	AUC	SE	Senz.	95% Ci	Specif.	95% Ci	Cut-off	+LR	-LR
hsCRP	0,695	0,0449	75,68	64,3 – 84,9	57,58	44,8 – 69,7	>1,6	1,78	0,42
Фибриноген	0,667	0,0677	47,06	29,8 – 64,9	91,89	78,1 – 98,3	>5	5,80	0,58
LE	0,660	0,0464	52,70	40,7 – 64,4	77,27	65,3 – 86,7	>7,4	2,32	0,61
SE	0,618	0,0481	71,62	59,9 – 81,5	48,44	35,8 – 61,3	>10	1,39	0,59

Анализом ROC крива стандардних маркера инфламације код пацијената са SAP (Табела 29) нађено је да маркер инфламације hsCRP има највећу површину испод криве (AUC-area under curve; AUC = 0,695 \pm 0,0449) од свих испитиваних маркера, осетљивост

(сензитивност) од 75,68%, а специфичност 57,58%. Фибриноген има површину испод криве од $0,667 \pm 0,0677$, најнижу сензитивност (47,06%) у групи, али има највећу специфичност од 91,89%. Крива LE има површину од $0,660 \pm 0,0464$, ниску сензитивност (52,70%) и специфичност од 77,27%. ROC крива за SE има најмању површину ($0,618 \pm 0,0481$) и најмању специфичност од свих испитиваних стандардних маркера инфламације у SAP групи, а осетљивост од 71,62%.



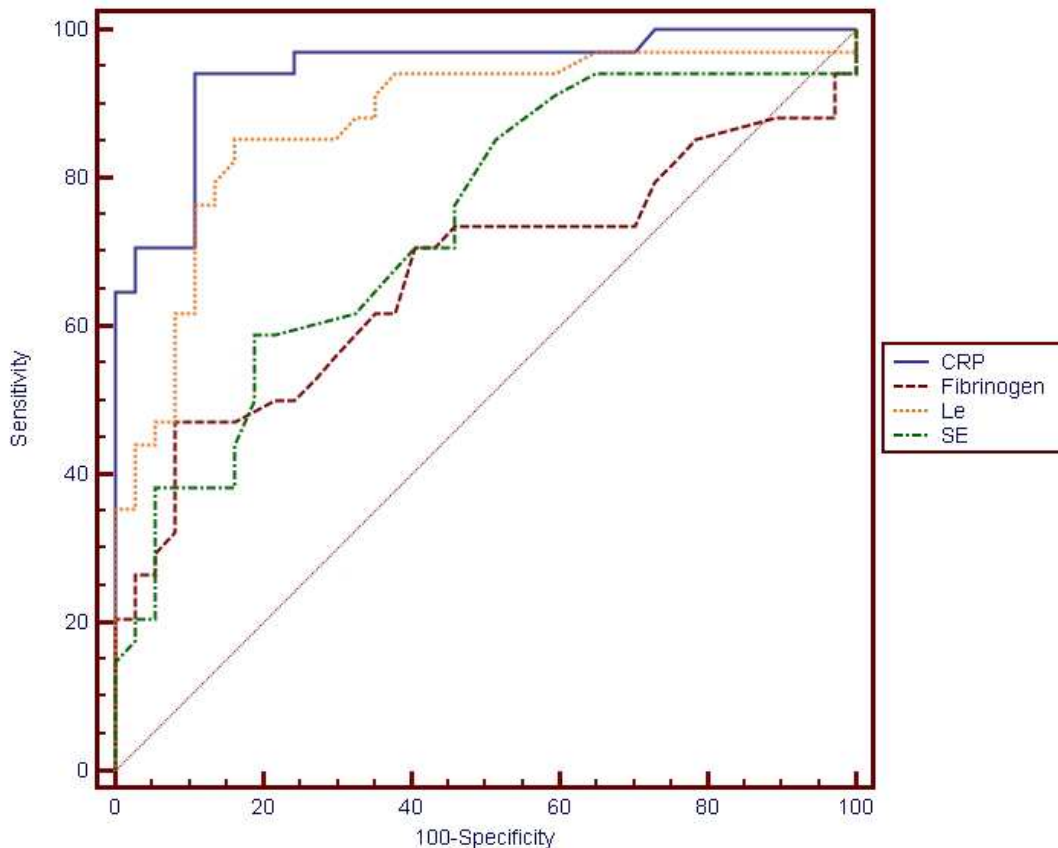
Слика 21. ROC криве стандардних биомаркера инфламације код пацијената са NSAP

Табела 30. Анализа ROC крива стандардних биомаркера инфламације код пацијената са NSAP

Маркер	AUC	SE	Senz.	95% Ci	Specif.	95% Ci	Cut-off	+LR	-LR
hsCRP	0,777	0,0393	86,30	76,2 – 93,2	59,09	46,3 – 71,0	>1,66	2,11	0,23
Фибриноген	0,750	0,0709	90,48	69,6 – 98,8	59,46	42,1 – 75,2	>3,9	2,23	0,16
LE	0,706	0,0449	50,00	37,8 – 62,2	90,91	81,3 – 96,6	>8,5	5,50	0,55
SE	0,734	0,0436	64,71	52,2 – 75,9	79,69	67,8 – 88,7	>20	3,19	0,44

Код пацијената са NSAP (Табела 30), такође, највећу површину испод криве има hsCRP ($0,777 \pm 0,0393$), високу сензитивност (86,30%), али има малу специфичност (59,09%). Крива фибриногена има површину од $0,750 \pm 0,0709$, ниску специфичност (59,09%) и највећу осетљивост (90,48%) од свих испитиваних стандардних маркера инфламације. ROC крива LE прави најмању површину ($0,706 \pm 0,0449$) и има најмању

осетљивост (50%) у групи, али истовремено и највећу специфичност (90,91%). У NSAP, SE има већу површину испод криве ($0,734 \pm 0,0436$) као у односу на AIM, тако и у односу на SAP, сензитивност од 64,71% и специфичност од 79,69%.

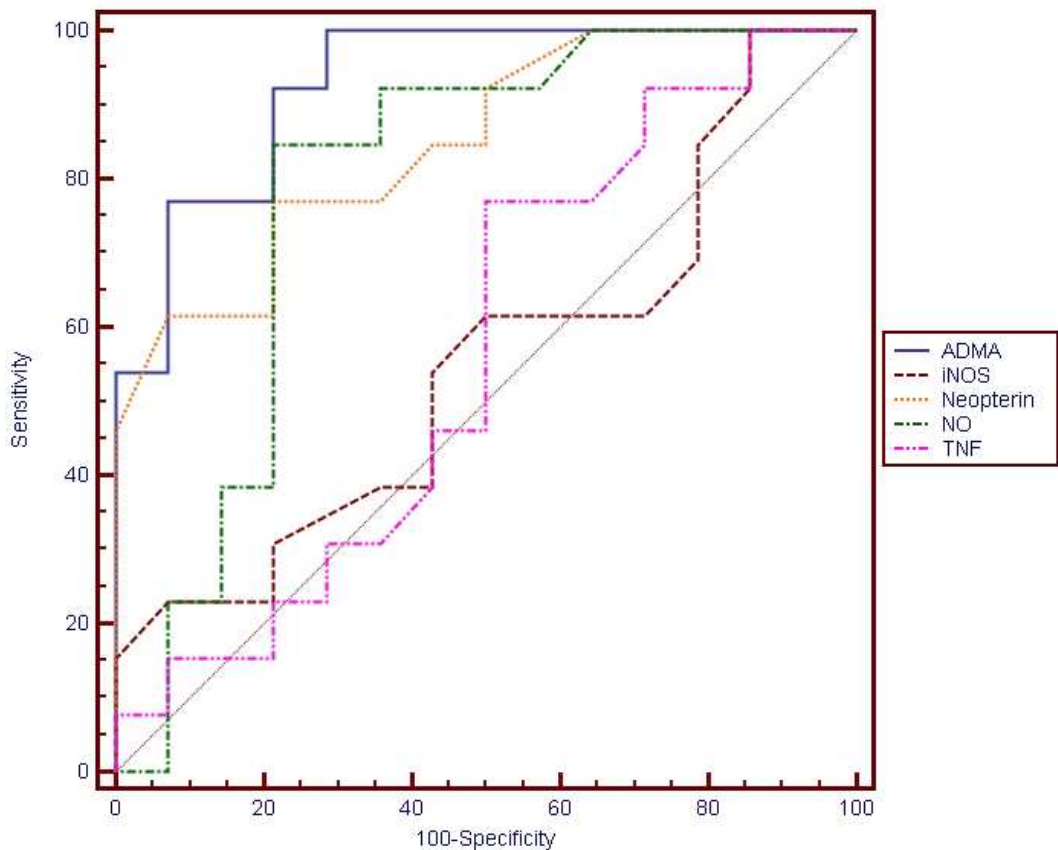


Слика 22. ROC криве стандардних биомаркера инфламације код пацијената са AIM

Табела 31. Анализа ROC крива стандардних биомаркера инфламације код пацијената са AIM

Маркер	AUC	SE	Senz.	95% Ci	Specif.	95% Ci	Cut-off	+LR	-LR
hsCRP	0,919	0,0210	87,23	78,8 – 93,2	84,85	73,9 – 92,5	>4,76	5,76	0,15
Фибриноген	0,667	0,0677	47,06	29,8 – 64,9	91,89	78,1 – 98,3	>5	5,80	0,58
LE	0,849	0,0312	77,66	67,9 – 85,6	84,85	73,9 – 92,5	>7,8	5,13	0,26
SE	0,628	0,0442	53,26	42,6 – 63,7	75,00	62,6 – 85,0	>17	2,13	0,62

Анализом ROC крива стандардних маркера инфламације код пацијената са AIM (Табела 31), нађено је да hsCRP има највећу површину испод криве ($0,919 \pm 0,0210$), истовремено и високу сензитивност (87,23%) и високу специфичност (84,85%). Друга по површини је крива LE ($0,849 \pm 0,0312$), која има исту специфичност као и крива hsCRP, и нешто нижу осетљивост од 77,66%. Највећу специфичност има крива фибриногена (91,89%), али истовремено и најмању осетљивост од свих испитиваних маркера у AIM. ROC крива SE има најмању површину испод криве ($0,628 \pm 0,0442$), ниску осетљивост од 53,26% и специфичност од 75% (Слика 22).

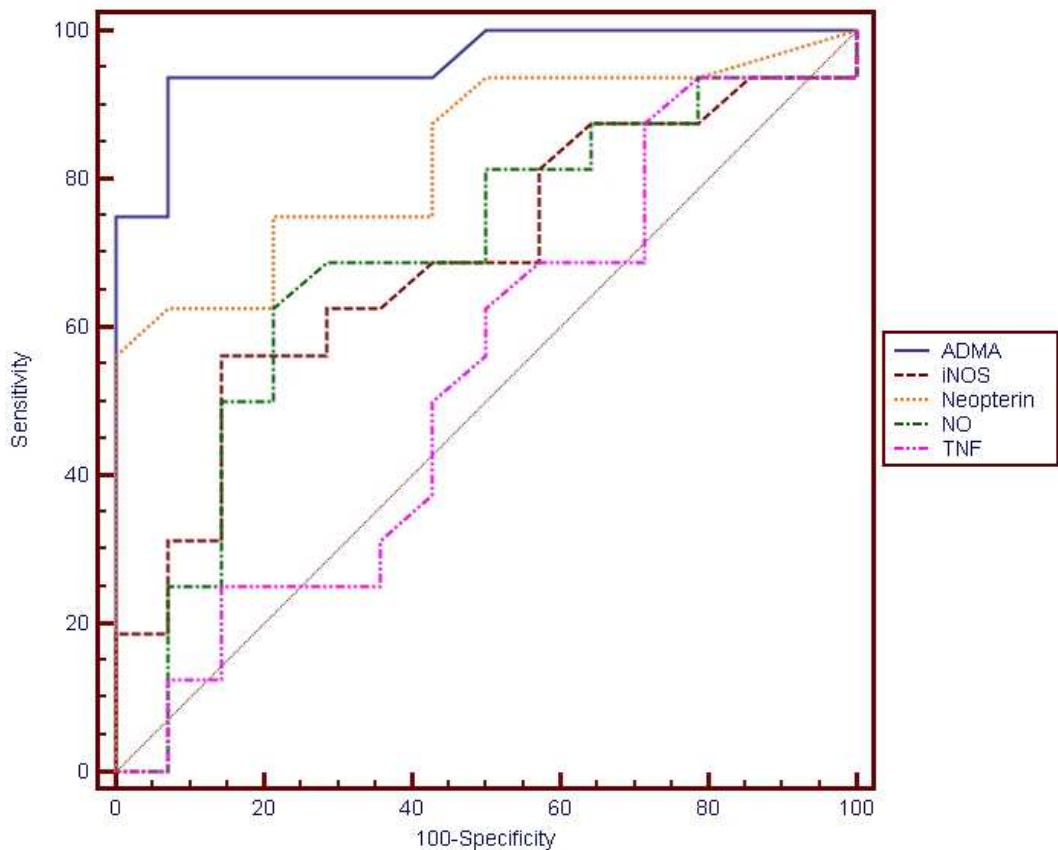


Слика 23. ROC криве нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са SAP

Табела 32. Анализа ROC крива нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са SAP

Маркер	AUC	SE	Senz.	95% Ci	Specif	95% Ci	Cut-off	+LR	-LR
ADMA	0,937	0,0340	95,24	76,2 - 99,9	81,48	61,9 - 93,7	>0,39	5,14	0,05
iNOS	0,498	0,0908	48,00	27,8 - 68,7	68,42	43,4 - 87,4	>2,4	1,52	0,76
Неоптерин	0,668	0,0635	88,64	75,4 - 96,2	44,12	27,2 - 62,1	>11,91	1,59	0,26
NO	0,730	0,0882	75,00	50,9 - 91,3	73,68	48,8 - 90,9	>64,3	2,85	0,34
TNF- α	0,602	0,0910	84,00	63,9 - 95,5	42,11	20,3 - 66,5	\leq 13,86	1,45	0,38

Анализом ROC крива код пацијената са SAP (Табела 32), нађено је да ADMA има највећу површину испод криве ($0,937 \pm 0,0340$), највећу осетљивост (95,24%) и највећу специфичност (81,48%). Крива NO код пацијената са SAP има већу површину испод криве него у групи са NSAP ($0,730 \pm 0,0882$), високу специфичност од 73,68% и високу осетљивост од 75%. ROC крива неоптерина има површину $0,668 \pm 0,0635$, високу сензитивност 88,64%, али ниску специфичност 44,12%. ROC крива TNF- α прави мању површину ($0,602 \pm 0,091$), има високу сензитивност 84% и најнижу специфичност 42,11%. Најмању површину испод криве у групи пацијената са SAP има iNOS ($0,498 \pm 0,0908$), специфичност од 68,42%, и истовремено и најнижу осетљивост 48% (Слика 23).

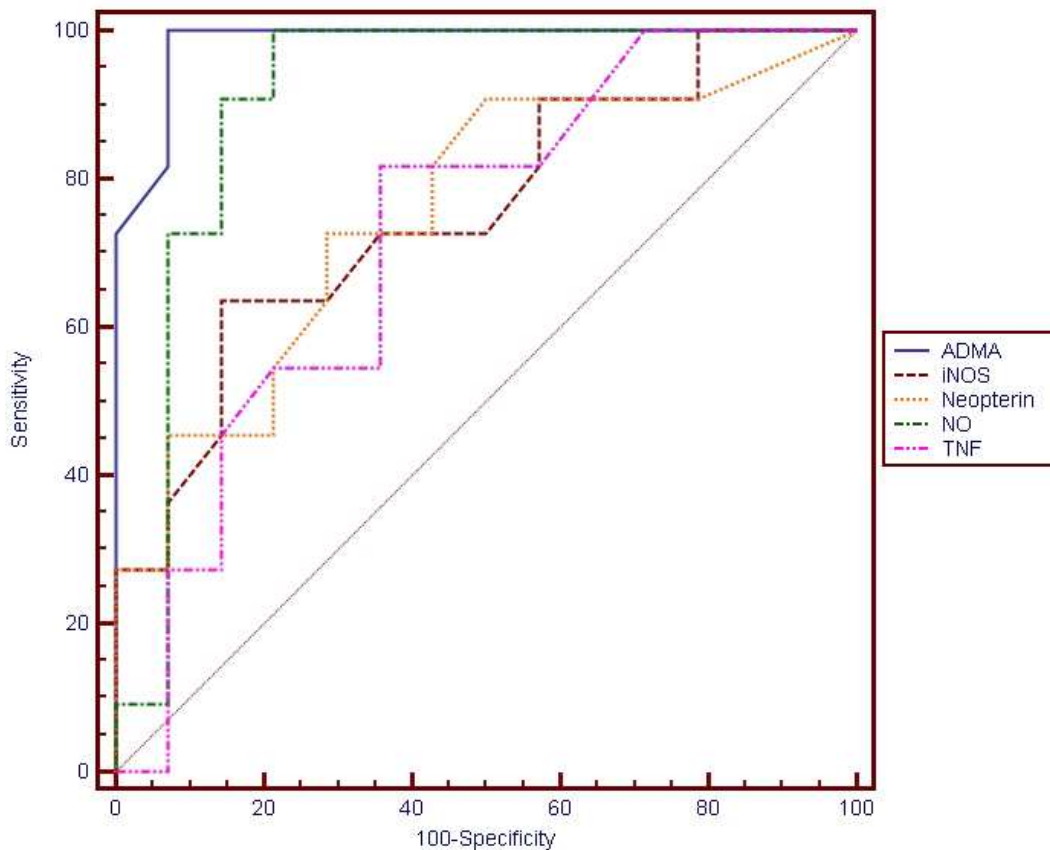


Слика 24. ROC криве нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са NSAP

Табела 33. Анализа ROC крива нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са NSAP

Маркер	AUC	SE	Senz.	95%Ci	Specif.	95%Ci	Cut-off	+LR	-LR
ADMA	0,971	0,0215	95,65	78,1 – 99,9	96,30	81,0 – 99,9	>0,61	25,83	0,04
iNOS	0,609	0,0924	50,00	28,2 – 71,8	78,95	54,4 – 93,9	>2,8	2,37	0,63
Неоптерин	0,660	0,0621	95,65	85,2 – 99,5	32,35	17,4 – 50,5	>6	1,41	0,13
NO	0,687	0,0877	66,67	43,0 – 85,4	73,68	48,8 – 90,9	>64,3	2,53	0,45
TNF- α	0,524	0,0968	95,45	77,2 – 99,9	26,32	9,1 – 51,2	>11,61	1,30	0,17

Код пацијената са NSAP, ADMA има највећу површину испод криве ($0,971 \pm 0,0215$), истовремено и највећу сензитивност (95,65%) и највећу специфичност (96,30%) од свих испитиваних нестандартних маркера инфламације. Неоптерин и TNF- α имају високу осетљивост (95,65% и 95,45%), али врло ниску специфичност (32,35% и 26,32%). Крива NO има већу површину ($0,687 \pm 0,0877$) од криве iNOS ($0,609 \pm 0,0924$), већу сензитивност, али мању специфичност (Слика 24, Табела 33).



Слика 25. ROC криве нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са АИМ

Табела 34. Анализа ROC крива нестандартних биомаркера инфламације код пацијената са АИМ

Маркер	AUC	SE	Senz.	95%Ci	Specif.	95%Ci	Cutt-off	+LR	-LR
ADMA	0,976	0,0183	90,91	70,8 - 98,9	96,30	81,0 – 99,9	>0,61	24,55	0,09
iNOS	0,630	0,0923	52,38	29,8 - 74,3	78,95	54,4 – 93,9	>2,8	2,49	0,60
Неоптерин	0,523	0,0645	15,09	6,7 - 27,6	100,00	89,7 – 100,0	>19,6		0,85
NO	0,865	0,065	100,00	85,2 - 100,0	73,68	48,8 – 90,9	>64,3	3,80	0,00
TNF- α	0,633	0,0904	66,67	43,0 - 85,4	57,89	33,5 – 79,7	>13,32	1,58	0,58

У групи пацијената са АИМ, највећу површину има ROC крива за ADMA ($0,976 \pm 0,0183$), али, истовремено, и високу специфичност (96,30%) и високу осетљивост (90,91%). Крива NO у АИМ групи је површине од $0,865 \pm 0,065$, има специфичност од 73,68% и највећу сензитивност од свих испитиваних маркера (100%). Највећу специфичност (100%) има неоптерин, али, истовремено и најмању површину испод криве ($0,523 \pm 0,0645$) и најмању осетљивост (15,09%) од свих испитиваних маркера у АИМ. Мала је разлика у површини испод криве између TNF- α ($0,633 \pm 0,0904$) и iNOS ($0,630 \pm 0,0923$) у АИМ (Слика 25, Табела 34).

6. Дискусија

Исхемија миокарда, патофизиолошки супстрат исхемијске болести срца, настаје услед неадекватног односа потребе и снабдевености миокарда крвљу. Ова поремећена физиолошка равнотежа се јавља када је потреба миокарда већа и/или његово снабдевање мање у различитим стањима и болестима са различитом клиничком сликом и прогнозом. Најчешћи узрок је атеросклероза коронарних артерија која сужава лумен крвног суда и смањује проток. Основни симптом исхемијске болести срца је ангинозни бол (*Vasiljević-Pokrajčić, 2004*).

Акутни инфаркт миокарда заједно са ангином пекторис нестабилног типа и изненадном срчаном смрти спада у групу акутних манифестација исхемијске болести срца- акутни коронарни синдром. У основи акутног коронарног синдрома у највећем проценту је механизам дестабилизације атеросклеротичног плака са руптуром или ерозијом, са различитим степеном надовезивања тромбозе и дисталне емболизације, што за последицу има смањену перфузију миокарда (*Gutstein i Fuster, 1999*). Најновији подаци о значају стабилности атеросклеротичног плака сугеришу да осим хроничних и дуготрајних, познатих фактора ризика и акутно настали фактори, као што је инфламација, могу бити од значаја у преласку стабилне у нестабилну форму коронарне болести (*Farmer i Torre-Amione, 2002*). Постоје подаци који показују да модификација маркера инфламације, нпр. применом аспирина и статина, може редуковати инфламацију плака (*Ridker i sar., 1997; Farzaneh-Far i sar., 2001*).

Биомаркери некрозе, инфламације и метаболизма липида имају значајну улогу у дијагностици, праћењу и прогнози, али и превенцији исхемијске болести срца. Упркос интензивним истраживањима бројних биомаркера, не постоји маркер задовољавајуће сензитивности и специфичности за процену активности атеросклеротске лезије. Обзиром да инфламација има кључну улогу у процесу атеросклерозе, не само као фактор иницијације, већ и значајан фактор њене прогресије (*Libby i sar., 2002*), ова студија је превасходно предузета у циљу утврђивања значаја биомаркера инфламације у исхемијској болести срца. Овом студијом су обухваћени болесници са исхемијском болешћу срца, који су на основу анамнезе ангинозног бола, налаза електрокардиограма, вредности кардиоспецифичних ензима и маркера некрозе подељени у три групе: група са стабилном ангином пекторис, група са нестабилном ангином пекторис и група са акутним инфарктом миокарда. За сваку групу одређена је просечна старост испитаника, као и заступљеност по полу. У свакој групи преовладавао је број мушкараца, а испитаници су били просечно старији од 60 година, што се уклапа у литературне податке о већој учесталости кардиоваскуларних болести код особа мушког пола. Овим истраживањем је обухваћено и испитивање следећих фактора ризика за сваку испитивану групу пацијената: артеријска хипертензија, повишене вредности укупног холестерола у плазми, повишене вредности триглицерида, повишене вредности шећера, гојазност, пушење, хередитет и физичка неактивност. Такође, овом студијом обухваћено је и испитивање терапијског профила сваке групе понаособ, које је представљено процентуално.

6.1. Фактори ризика у исхемијској болести срца

Фактори ризика за настанак атеросклерозе доводе до дисфункције ендотела, нарушавају васкуларну хомеостазу и иницирају инфламаторне процесе. На тај начин инфламаторни и хемостазни поремећаји доводе до иницијације и прогресије атеросклерозе (*Verma i Anderson, 2002*). Многобројне епидемиолошке студије потврдиле су да је коронарна атеросклероза мултифакторијалног настанка, те је од велике важности познавање свих фактора који су удружени са повећаном вероватноћом за њену појаву. Описан је већи број фактора ризика, од којих су неки везани за начин живота, други представљају биохемијске или физиолошке карактеристике, а треће су личне карактеристике појединаца. Показано је да је ризик за настанак исхемијске болести срца знатно већи ако постоји већи број фактора ризика, јер се њихов број мултиплицира, те кажемо да постоји „феномен мултиплог ризика“ (*Berenson i Srinivasan, 2005*). Такође, од значаја су интензитет фактора ризика (нпр. хипертензија, дијабетес, хиперхолестеролемија, пушење итд.) и дужина изложености појединим чиниоцима (трајање хипертензије, дијабетеса, пушачки стаж и др.). Неки од наведених фактора ризика су непроменљиви, док други могу да се модификују применом нефармаколошких мера и/или медикамената, чиме се ризик за појаву кардиоваскуларних обољења може значајно смањити. Старост, пол и породична предиспозиција представљају непроменљиве факторе ризика, док су хиперхолестеролемија, артеријска хипертензија, пушење, дијабетес мелитус, гојазност и физичка неактивност основни променљиви фактори ризика (*De Backer i sar., 2003*).

Повишен крвни притисак је потентни фактор ризика за исхемијску болест срца и доминантан фактор ризика за настанак шлога. Сматра се да хипертензија условљава хипертрофичне и хиперпластичне промене у зиду артерија, потом ендотелну дисфункцију, инфламаторне и друге промене, а сличне промене дешавају се и унутар миокарда, нарушавајући коронарну хемодинамику (*Li i Chen, 2005*). Мета анализа из 61 проспективне студије на милион испитаника показала је да свако повишење систолног крвног притиска од 115 mmHg за 20 mmHg и дијастолног крвног притиска од 75 mmHg за 10 mmHg, двоструко повећава ризик од кардиоваскуларних болести и шлога. Лечење хипертензије редукује кардиоваскуларни ризик за 2-3% за свако снижење крвног притиска од 1 mmHg (*Lewington i sar., 2002*). У овом истраживању, хипертензија је била најзаступљенији фактор ризика у групи пацијената са стабилном ангином пекторис (56,76%) и акутним инфарктом миокарда (79,79%).

Пораст серумског холестерола је добро познат независни фактор ризика за кардиоваскуларна обољења, са чврстим дозно-зависним односом, који је експоненцијалан при вишим нивоима холестерола. Хиперхолестеролемија је била заступљена са 47,29% у групи пацијената са нестабилном ангином пекторис, са 44,68% у акутном инфаркту миокарда и са 37,84% у стабилној ангини пекторис. Хипертриглицеридемија је била најзаступљенији фактор ризика у групи са нестабилном ангином пекторис (55,41%).

Особе са дијабетесом су на два до четири пута већем ризику да добију болест срца и на пет пута већем ризику да добију шлог у поређењу са особама без дијабетеса (*Rydén i sar., 2007*). Више од 80% особа са дијабетесом умире од неког облика кардиоваскуларне болести (*Nathan i sar., 2005*). У овом истраживању повишене вредности глукозе имало је 10,81% пацијената са стабилном и 28,38% пацијената са нестабилном ангином пекторис, као и 29,79% пацијената са акутним инфарктом миокарда.

Гојазност је утврђени променљиви фактор ризика кардиоваскуларних обољења и драматично је повећана последњих година. Особе са прекомерном тежином имају три пута већу вероватноћу да добију кардиоваскуларно обољење у поређењу са особама са нормалном тежином (*Ivanović i sar., 2003*). Одржавање идеалне тежине може редуковати ризик за настанак кардиоваскуларног обољења за 35-55% (*Flegal i sar., 2005*). Гојазност, као фактор ризика, највише је заступљена у групи пацијената са акутним инфарктом миокарда (28,72%).

Пушење цигарета је најпотентнији фактор ризика за настанак кардиоваскуларног обољења. Делује директно цитотоксично на крвне судове, никотин индукује вазоспазам, састојци дувана путем цитокина стимулишу инфламацију и путем слободних радикала поспешују оксидацију LDL честица (*Bakhru i Erlinger, 2005*). У смислу коронарне превенције, престанак пушења доводи до веће редукације ризика у поређењу са било којим другим променљивим фактором ризика. Инциденца кардиоваскуларног обољења код бивших пушача опада на нивое блиске онима код непушача за 2 године (*Bolego i sar., 2002*). У овој истраживању пушење је заступљено са 50% у групи испитаника са акутним инфарктом миокарда, са 40,54% у нестабилној и са 43,24% у стабилној ангини пекторис.

Смањена физичка активност узрокује више од 25.000 смрти годишње од кардиоваскуларних болести, а физички активан стил живота редукује ризик од инфаркта миокарда за 35-55% (*Graham i sar., 2007*). Савремена сазнања показују значајне измене у мултиплим факторима ризика под утицајем вежбања, укључујући поправљену инсулинску резистенцију, крвни притисак, HDL- холестерол, триглицериде и процесе фибринолизе (*Bronas, 2009*). Вероватноћа развоја кардиоваскуларне болести је 1,9 пута већа код седантарних особа у поређењу са другим факторима ризика. Физичка неактивност је била значајно заступљен фактор ризика у све три испитиване групе пацијената.

Наслеђе се сматра фактором ризика јер је уочено да постоји породична предиспозиција за атеросклерозу, посебно коронарних артерија. Ако у породици има случајева доказане коронарне болести или смрти због срчане болести у доби млађој од 55 година за мушкарце, односно 65 година за жене, то јасно упућује на повећан ризик (*JBS 2, 2005*). Тешко је, међутим, проценити колико је наслеђе независан фактор ризика, а колико је зависан од појаве хиперлиппротеинемике, хипертензије и шећерне болести у породици. У овом истраживању наслеђе, као фактор ризика, је било заступљено са 33,78% у стабилној, са 40,54% у нестабилној ангини пекторис и са 48,94% у акутном инфаркту миокарда.

6.2. Срчани маркери у исхемијској болести срца

Веома значајан критеријум у постављању дијагнозе акутног коронарног синдрома, поред анамнестичких података, клиничког налаза и електрокардиограмских промена, јесте одређивање кардиоспецифичних срчаних маркера. Мерење активности серумских ензима, њихових изоензима и изоформи, као и одређивање концентрација појединих структурних и других протеина који се ослобађају из срчаног мишића, упркос коришћењу низа медицинских техника, представља дијагностички стуб са особинама раних, сензитивних и специфичних маркера оштећења миокарда (*Lewandrowski i sar., 2002*).

Према препоруци Комитета за стандардизацију одређивања маркера срчаног оштећења (*Committee for Standardization of Markers Cardiac Damage*), који ради при

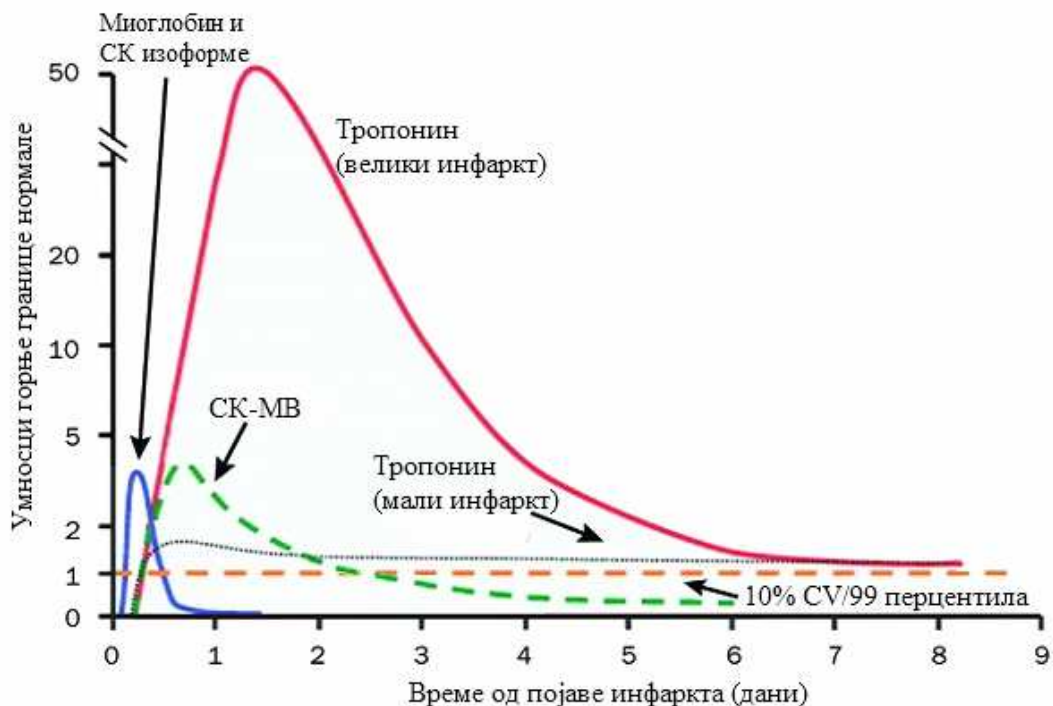
Међународној федерацији за клиничку хемију и лабораторијску медицину, 1999. године у ензимски дијагностички критеријум за акутни инфаркт миокарда укључени су кардијално специфични структурни протеини (*Panteghini i sar., 1999*).

Удружени комитет Европског кардиолошког друштва (*The European Society of Cardiology, ESC*) и Америчког кардиолошког удружења (*American College of Cardiology, ACC*) 2000. године је објавио да је тропонин маркер избора у детекцији инфаркта миокарда (*Alpert i sar., 2000*).

Мада је ECG најједноставнији, најпогоднији и најрепродуцибилнији поступак у дијагнози акутног инфаркта миокарда, акутни бол у грудима често остаје недијагностикован на основу ECG, делом због своје сензитивности за детекцију акутног инфаркта миокарда од само 60%, делом и због тога што велики број пацијената, до 33%, нема карактеристичан бол у грудима (*Canto i sar., 2000; Panteghini, 2002*).

Отприлике половина болесника, са акутним болом у грудима, после пријема на ургентна одељења са почетном дијагнозом акутни коронарни синдром, се касније отпушта кући под другом дијагнозом. С друге стране, неоткривени инфаркти миокарда и даље представљају озбиљан здравствени проблем и водећи узрок морбидитета и морталитета пацијената са акутним коронарним синдромом (*Storrow i Gibler, 2000; Dadkhah i sar., 2007*).

Након појаве симптома акутног коронарног синдрома настаје „time window“ („дијагностички прозор“) за које време се кардијални маркери ослобађају из ткива миокарда и почињу да расту у крви. Ово време је јединствено за сваки маркер и понекад варира између особа, стога је дефинисан типичан профил за сваки маркер (*Слика 26*).



Слика 26. Кинетика срчаних биомаркера након акутног инфаркта миокарда (*Kumar i Cannon, 2009*).

Серумски маркери срчане некрозе су протеини који се ослобађају у крв у великим количинама из некротичног ткива. Степен ослобађања зависи од њихове локализације у ћелији, молекулске масе и локалне циркулације. Количина ослобођених ензима добро корелира са величином инфаркта миокарда, а познавање односа концентрације у серуму и кинетике ослобађања и разградње ензима, омогућава процену масе некротичног миокарда и праћење ефикасности терапије.

У зависности од брзине појављивања, као и временског понашања ових маркера, постоје рани и касни срчани маркери.

6.2.1. Рани срчани маркери у исхемијској болести срца

У ране маркере срчане некрозе убрајају се тропонин I (TnI), креатин киназа (СК) и њен срчани изоензим МВ (СК-МВ).

Срчани тропонини су протеински маркери оштећења миокарда и играју виталну улогу у дијагностици и процени ризика код болесника са акутним коронарним синдромом. Тропонини се карактеришу раним порастом након оштећења миокарда и широким дијагностичким прозором, што значи да овај параметар омогућава ретроградну дијагностику оштећења кардиомиоцита, после неколико дана или недеља (*Thygesen i sar., 2007; Apple i sar., 2007*).

Обзиром на доказану сензитивност и високо ткивну специфичност у поређењу са другим биомаркерима некрозе миокарда, кардијачни тропонини се препоручују за дијагнозу акутног инфаркта миокарда од стране Националне академије за клиничку биохемију и Међународног комитета експерата из епидемиологије, патологије, клиничке и лабораторијске медицине (*Alpert i sar., 2000*).

Неколико добро дизајнираних студија су показале да су срчани тропонини (сTnI и сTnT) најсензитивнији и најспецифичнији биомаркери у дијагнози акутног инфаркта миокарда (*Keller i sar., 2009; Reichlin i sar., 2009; Kavsak i sar., 2009*).

Тропонински комплекс се састоји из три протеина: тропонин Т (тропомиозин-везујућа компонента), тропонин I (инхибиторна компонента) и тропонин С (калцијум-везујућа компонента). Тропонин I и Т се нормално у серуму не детектују. Врло мали пораст концентрације тропонина рефлектује микронекрозе миокарда, због чега кардијачни тропонини постају сурогат миокардне некрозе. Биохемијски индикатори за детекцију миокардне некрозе су:

- максимална концентрација тропонина I или Т која је већа од 99-процентуалне вредности контролне групе бар једанпут у току прва 24 сата након појаве бола у грудима;

- максимална вредност СК-МВ која је већа од 99-процентуалне вредности контролне групе у два сукцесивна узорка или максимална вредност два пута већа од горње границе нормалних вредности. Вредности СК-МВ морају да расту и да падају, вредности које остају повећане и не мењају се никада нису последица акутног инфаркта миокарда (*Đorđević, 2010*).

Тропонини имају скоро апсолутну миокардну ткивну специфичност. Тропонин I код болесника са акутним инфарктом миокарда почиње да расте у крви 2-8 сати након појаве бола. Време полуживота тропонина I износи 2-4 сата. У серуму остаје повећан 3 до 7 дана након инфаркта. Стога тропонин I и СК-МВ имају сличну дијагностичку сензитивност у току 48-72 сата, али тропонин I има бољу сензитивност 72-96 сати након инфаркта (*Jaffe, 2006*).

Пораст тропонина Т у серуму се јавља 4 сата након инфаркта, достиже пик између првог и другог дана, а нормализује се после 14 дана. Није погодан за рану дијагностику. Дијагностички значај тропонина Т у случају реинфаркта насталог након 14 дана много је мањи у односу на СК-МВ. Тропонин Т може дати лажно позитивне вредности код оштећења скелетних мишића и акутних и хроничних обољења бубрега, за разлику од тропонина I који је специфичан маркер за обољења миокарда (*Maynard i sar., 2000*).

Тропонински комплекс је примарно локализован у миофибрилама (94-97%), али се малим делом, 6-8% тропонина Т и 2,8-4,1% тропонина I налази у облику солубилне, цитоплазматске фракције. Стога се након акутног инфаркта миокарда и иреверзибилног минорног оштећења миокарда тропонини ослобађају бифазно са иницијалним излучивањем слободног облика из цитозолског пула и продуженим излучивањем услед оштећења контрактилног апарата. Зато су успостављене две „cutoff“ концентрације за интерпретацију резултата. Прва „cutoff“ вредност се налази на горњој граници нормалних вредности (за тропонин I износи 0,04 ng/mL) која се среће код 99% здравих испитаника и која омогућава откривање минорних оштећења миокарда. Друга вредност (за тропонин I износи 0,4 ng/mL) се користи за детекцију иреверзибилних оштећења, односно за разликовање нестабилне ангине пекторис од акутног инфаркта миокарда (*Morrow i sar., 2003; Babuin i Jaffe, 2005*).

Иако је брзина елиминације тропонина I из циркулације много бржа у односу на тропонин Т, обе изоформе остају повишене у серуму неколико дана након инфаркта и могу бити важан дијагностички маркер акутног инфаркта миокарда након нормализације СК-МВ.

Због дугог полувремена елиминације, један од недостатака употребе тропонина је, да се ни тропонина I ни тропонин Т тестови не могу користити за детекцију реинфаркта миокарда. Други недостатак је што је тропонин Т присутан у малим количинама и у скелетним мишићима и може дати лажно позитивне вредности код оштећења скелетних мишића и код акутних и хроничних оштећења бубрега (*Freda i sar., 2002*).

Концентрације тропонина често су повећане код појединих пацијената са акутним коронарним синдромом који су имали нормалне концентрације СК, СК-МВ и LDH. Ово се може објаснити на два начина: висока сензитивност и специфичност кардијачног тропонина омогућава коришћење ниских „cutoff“ вредности и бољу детекцију минорних оштећења миокарда; и тиме што се тропонин ослобађа и у слућају реверзибилне (цитозолски пул) и иреверзибилне (цитозоларна и структурна форма) исхемије миокарда (*Elliott i Antman, 2002*).

Мада кардијачни тропонини одражавају некрозу миокарда, они не указују на њен механизам настанка. Дакле, повишена вредност кардијачних тропонина у одсуству клиничких доказа исхемије миокарда захтева допунску дијагностику етиологије некрозе миокарда. Некоронарни узроци повишеног нивоа тропонина у крви могу бити: миокардитис, дисекција аорте, плућна емболија, срчана инсуфицијенција, перикардитис, хронична и акутна бубрежна инсуфицијенција, контузија срца, кардиотоксичност услед терапије карцинома, амилоидоза, акутна реуматска грозница итд (*Jaffe i sar., 2000; Jaffe i sar., 2006; Thygesen i sar., 2007*).

Према препорукама ACC/ESC (*American College of Cardiology/European Society of Cardiology*) и NACB (*The National Academy of Clinical Biochemistry*) повећане вредности изнад 99-процентуалне нормалне вредности уз прихватљиву прецизност (10% CV) дају информације за идентификацију пацијената са акутним инфарктом миокарда, али и за

идентификацију пацијената са ризиком за будуће догађаје или смртни исход (*Alpert i sar., 2000; Morrow i sar., 2007*).

Поред употребе у дијагностици акутног инфаркта миокарда, повишен ниво тропонина може да идентификује пацијенте са високим ризиком за развој неповољних срчаних догађаја (*Antman i sar., 1996; Ottani i sar., 2000*). Конкретно, подаци из мета-анализа показују да повишен ниво тропонина код пацијената са инфарктом миокарда без ST-елевације је повезан са скоро 4 пута већом стопом морталитета (*Elliott i Antman, 2002*). Код болесника без елевације ST-сегмента који су били узети у обзир за тромболитичку терапију, почетни ниво TnI на пријему био је у корелацији са морталитетом у току 6 недеља, док нивои СК-МВ нису предиктори неповољних срчаних догађаја и нису имали прогностичку вредност (*Newby i sar., 2006*).

Чак и мала повећања срчаних тропонина су показатељ значајног оштећења, а повишена концентрација маркера је у корелацији са ризиком. Студија FRISC (*FRagmin during InStability in Coronary artery disease*) из 1996. године је потврдила да су повишени нивои тропонина снажан предиктор како краткорочног (30 дана), тако и дугорочног (5 месеци) морталитета (*Lindahl i sar., 1996*).

Истраживања из ТИМИ ИВ (*The Thrombolysis In Myocardial Infarction III*) студије указују на знатно већу учесталост срчане смрти у групи тропонин позитивних пацијената са нестабилном ангином пекторис (*Antman i sar., 1996*).

У GUSTO IIa (*Global Utilization of Strategies To open Occluded arteries (GUSTO)-IIa troponin substudy*) студији, почетни ниво TnT био је снажан предиктор краткорочног морталитета (*Ohman i sar., 1996*).

Испитивања из кохортне студије (*A Community-Based Cohort Study*), су показала да је повишена концентрација TnI предиктор новог кардиоваскуларног догађаја и срчане смрти независно од конвенционалних, великих кардиоваскуларних фактора ризика. Тропонин I је индикатор ризика за развој неповољних кардиоваскуларних догађаја, како код мушкараца без клиничких знакова кардиоваскуларних обољења, тако и код болесника са израженим клиничким симптомима. Ови резултати указују на значај субклиничких оштећења миокарда (*Zethelius i sar., 2006*).

Неколико студија је потврдило да пацијенти са повећаном концентрацијом кардијачних тропонина имају лошију прогнозу у односу на оне пацијенте код којих се повишене вредности тропонина не детектује (*Bonaca i Morrow, 2008*).

Пацијенти са акутним инфарктом миокарда, обухваћени овим испитивањем, имали су статистички значајно повишене вредности TnI не само у односу на контролу, већ и у односу на пацијенте са нестабилном и са стабилном ангином пекторис. Такође, концентрација TnI код пацијената са нестабилном ангином пекторис била је статистички значајно повишена у односу на контролну групу здравих испитаника. Вредности TnI се код пацијената са стабилном ангином пекторис нису статистички значајно разликовале од вредности у контролној групи. Подаци добијени овим истраживањем уклапају се у, до сада познате, литературне податке.

Најбољи алтернативни маркер срчане некрозе, када тропонин није на располагању, је креатин киназа. Овај маркер је до скоро сматран „златним стандардом“ међу биохемијским маркерима у дијагнози акутног инфаркта миокарда, сад полако губи на свом клиничком значају због увођења нових биомаркера срчане некрозе (*Lewandrowski i sar., 2002*).

Креатин киназа, ензимски маркер оштећења миокарда, катализује реакцију интерконверзије фосфокреатина и креатина. Јавља се у три изоензимске форме: СК-ВВ,

СК-МВ и СК-ММ. Изоензим СК-ММ је у највећој мери присутан у скелетним мишићима (99%) у односу на друга ткива, СК-МВ у скелетним (79%) и срчаном мишићу (20%), а СК-ВВ у мозгу (97%). Због велике молекулске масе ензим СК и његов изоензим СК-МВ прелазе у крвоток само у случају иреверзибилног оштећења мембране миоцита и имају монофазни пораст. Пораст активности СК јавља се пре промене активности других ензима који су карактеристични за акутни инфаркт миокарда и запажа се након 3-6 сати од појаве ангинозног бола, а максималне вредности се достижу у периоду од 16 до 30 сати. Нормализује се 2-4 дана од почетка болести. Изоензим СК-МВ почиње да расте у крви 2-6 сати од настанка инфаркта, максималне вредности достиже током 12-16 сати, а нормализује се после 36 сати од почетка болести. Просечан пораст активности СК-МВ након акутног инфаркта миокарда је 10 до 20 пута у односу на горњу границу. Сензитивност и специфичност СК-МВ за акутни инфаркт миокарда су >90% унутар 7-18 сати. Највећу дијагностичку сензитивност и специфичност СК-МВ има између 8 и 12 сати од презентације болести (*Christenson i Azzazy, 1998; Walker, 2006; Loria i sar., 2008*).

Увећање ензимске активности СК сразмерно је степену деструкције ткива, односно, величини инфаркта. Динамика ензимских промена се не разликује битно у односу на масу некротизованих ћелија, док су нивои СК и СК-МВ у серуму индикатори тежине процеса и корелирају са размерама инфаркта. У поређењу са динамиком активности укупне серумске СК, СК-МВ раније достиже максималне вредности и раније пада на нормалу. Одређивање СК-МВ је важно за рану дијагнозу инфаркта, док је његово брзо ишчезавање из серума његова негативна страна у дијагностици. Изоензим СК-МВ је преферирани маркер за реинфаркт и неинвазивну процену реперфузије (*Rosalki i sar., 2004; Apple i Murakami, 2005*).

У CRUSADE (*Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress ADverse Outcomes with Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines*) регистру испитивано је скоро 30.000 пацијената и откривен је несклад између вредности тропонина и СК-МВ у 28% пацијената. Међутим, стопа интрахоспиталног морталитета пацијента који су били тропонин-негативни/СК-МВ-позитивни није била значајно повећана у односу на пацијенате који су били и тропонин-негативни/СК-МВ-негативни (*Newby i sar., 2006*).

Слично томе, у извештају из регистра проспективне мултицентричне GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*) студије у више од 10.000 пацијената са акутним коронарним синдромом, стопа интрахоспиталног морталитета је била највиша код пацијената који су били и тропонин-позитивни/СК-МВ-позитивни, средња стопа морталитета код пацијената који су били тропонин-позитивни/СК-МВ-негативни, а најнижа стопа код пацијената код којих су оба маркера били негативни, као и код оних који су тропонин-негативни/СК-МВ-позитивни. Према томе, изоловани пораст вредности СК-МВ има ограничени прогностички значај код пацијената са акутним коронарним синдромом (*Goodman i sar., 2006; Fox i sar., 2006*).

Резултати овог рада указују на статистички значајан пораст активности СК и СК-МВ код пацијената са акутним инфарктом миокарда, како у односу на контролну групу испитаника, тако и у односу на пацијенте са стабилном и са нестабилном ангином пекторис.

Забележен је пораст активности СК и СК-МВ и у групи болесника са нестабилном ангином пекторис у односу на контролну групу и у односу на пацијенте са стабилном ангином пекторис, али тај пораст није показао статистичку значајност.

6.2.2. Средњи и касни срчани маркери у исхемијској болести срца

Аспартатамино-трансфераза (AST) представља средњи маркер некрозе миокарда и први пут је примењена као биохемијски маркер у дијагностици акутног инфаркта миокарда 1954. године. Пораст ензимске активности у серуму болесника настаје 6-12 сати након појаве првих симптома, максималну вредност достиже између 24 и 48 сати, а нормализује се након 4-7 дана. Уколико се ради о мањој некрози миокарда, осетљивост теста је такође мања, 70-90%, а нормализовање вредности брже. Сваки реинфаркт праћен је поновним порастом вредности AST у серуму.

Обзиром на то да је пораст серумске активности AST пропорционалан маси миокарда која је захваћена некрозом, вредности овог ензима у серуму представљају важан прогностички параметар. Уколико је пораст активности AST већи од четвороструког и вредности се одржавају на високом нивоу и након 3-4 дана, пред собом имамо пацијента са најчешће лошом прогнозом болести. Умерен пораст активности AST након акутног инфаркта миокарда налазимо код болесника старијих од 60 година (*Dorđević, 2010*).

Пацијенти са ангином пекторис немају пораст активности AST, мада чести ангинозни болови могу довести до краткотрајног, пролазног пораста активности овог ензима. Миокардитис и перикардитис могу бити праћени благим порастом активности AST, премда повећање није нагло као код акутног инфаркта миокарда и дуже траје.

Код пацијената са акутним инфарктом миокарда, који су обухваћени овим испитивањем, нађене су статистички значајно повишене вредности AST, како у односу на контролну групу, тако и у односу на пацијенте са стабилном и са нестабилном ангином пекторис. Активност AST код пацијената са нестабилном ангином пекторис је била већа у односу на пацијенте са стабилном ангином пекторис и у односу на контролу, али та разлика није била статистички значајна.

У здравом миокарду има мало аланинамино-трансферазе (ALT), тако да активност овог ензима при акутном инфаркту миокарда обично не прелази границе референтних вредности. Уколико је некрозом захваћена већа маса миокарда, активност срумске ALT може бити нешто повишена, што има прогностички значај код процене тежине инфаркта. Повећање активности ALT након акутног инфаркта миокарда указује на срчану инсуфицијенцију са конгестијом јетре. Кинетика ензима је иста као и за AST, осим што максимум активности достиже између 24 и 48 сати након инфаркта миокарда. Индекс AST/ALT код болесника са акутним инфарктом миокарда износи $\geq 1,5$ (*Gaw, 2004*).

Код испитиваних пацијената са акутним инфарктом миокарда нађена је значајно повећана активност ALT како у односу на контролну групу, тако и у односу на пацијенте са стабилном и са нестабилном ангином пекторис.

Лактат дехидрогеназа (LDH) представља касни маркер миокардне некрозе, чија је примена у дијагностици инфаркта миокарда први пут описана годину дана након прве примене AST. Лактат дехидрогеназа је тетрамер, при чему комбинацијом H (heart) и M (muscle) субјединица настаје пет изоензимских форми: LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃) и LDH₅ (M₄). Ензим није ткивно специфичан јер је присутан у свим ткивима, али изоензими показују специфичну ткивну дистрибуцију. У миокарду су процентуално највише заступљени LDH₁ (60-65%) и LDH₂ (28-33%) (*Walker, 2006*).

Одређивање укупне активности LDH у серуму и испитивање изоензимских профила има велики значај у дијагностичкој пракси. Код акутног инфаркта миокарда се активност LDH у серуму повећава 10 сати од почетка болова, максимум достиже 36-48 сати, при чему активност ензима може бити 10-15 пута повећана у односу на референтне вредности.

Нормализовање активности настаје 7-14 дана од почетка болести. Испитивање активности је посебно значајно за касну дијагнозу инфаркта миокарда, јер се повишене вредности у серуму дуже задржавају у односу на друге ензиме који се користе у дијагностици акутног инфаркта миокарда. За разлику од инфаркта миокарда, перикардитис и анеуризма аорте нису праћени порастом активности LDH, што је од посебног значаја у диференцијалној дијагностици.

Одређивањем активности LDH код испитиваних пацијената, нађене су статистички значајно повећане вредности овог ензима код пацијената са акутним инфарктом миокарда у односу на контролу, стабилну и нестабилну ангину пекторис. Статистички значајна разлика у активности LDH нађена је и код пацијената са нестабилном ангином пекторис у односу на пацијенте са стабилном ангином пекторис.

Хидроксibuтират дехидрогеназа (HBDH) представља збирну активност изоензима LDH₁ и LDH₂. Код акутног инфаркта миокарда у серуму се углавном повећава LDH₁ и делимично LDH₂. Нормално, њихов однос је мањи од 1, а код инфаркта миокарда је увек већи од 1. Пораст серумске активности HBDH јавља се после 10-12 сати од болова и активност остаје повећана 2-3 недеље (*Majkić-Singh, 2003*).

Испитивањем ензимске активности HBDH, добијене су статистички значајно повећане вредности код пацијената са акутним инфарктом миокарда у односу на контролу, стабилну и нестабилну ангину пекторис. Повишена ензимска активност HBDH нађена је и код пацијената са нестабилном ангином пекторис у односу на пацијенте са стабилном ангином пекторис.

Резултати кардијачних маркера су валидни кад се користе у контексту са клиничком историјом болести, физикалним прегледом и интерпретацијом ECG-а.

6.3. Липидни маркери у исхемијској болести срца

Липиди имају значајну улогу у атерогенези од иницијалних промена па до настанка компликованих атеросклеротских лезија. Атеросклероза је стање у коме долази до задебљања артеријског зида, услед уградње холестерола и других масних материја. У основи се ради о хроничном и сложеном инфламаторно-фибропролиферативном одговору на акумулацију макрофага и ретенцију атерогених липопротеина из плазме у интими артерија. Масне пруге су најранија препознатљива лезија атеросклерозе и узроковане су агрегацијом липидима-богатих пенастих ћелија, насталих из макрофага и Т-лимфоцита, у интими (*Libby, 2002; Gotlieb, 2005*).

Највеће интересовање за липиде, нарочито за укупни и LDL-холестерол, данас је везано за њихову предиктивну вредност за кардиоваскулару болест. Липидни поремећаји имају огроман атерогени потенцијал и њихова корекција представља први корак у борби за редукацију кардиоваскуларног морбидитета и морталитета (*Chan i Watts, 2006*).

Повишен серумски холестерол је добро познат независни фактор ризика за атеросклерозу и исхемијску болест срца, са чврстим дозно-зависним односом, који је експоненцијалан при вишим нивоима холестерола (*Benfante i sar., 1994*).

Процењује се да у Сједињеним Америчким Државама приближно 98,8 милиона особа има повишен укупни холестерол > 5,2 mmol/L, а од тога 33,6 милиона особа има нивое укупног холестерола > 6,2 mmol/L (*Roger i sar., 2012*).

Резултати овог рада указују да су вредности укупног холестерола код пацијената са стабилном ангином пекторис биле нешто ниже у односу на контролну групу, док су пацијенти са нестабилном ангином пекторис и инфарктом миокарда имали нешто више вредности укупног холестерола у односу на контролну групу, али су све промене вредности укупног холестерола биле без статистичке значајности.

Такође, пацијенти са стабилном и са нестабилном ангином пекторис имали су средње вредности LDL-холестерола које су биле незнатно више од вредности LDL-холестерола у контролној групи. Једино су пацијенти са акутним инфарктом миокарда имали статистички значајно више вредности LDL-холестерола у односу на контролу.

Ови резултати се могу објаснити редовном медикаментозном терапијом ових пацијената статинима. Већина њих (54,05% пацијената са стабилном ангином пекторис, 53,42% пацијената са нестабилном ангином пекторис и 41,48% пацијената са акутним инфарктом миокарда) редовно узимају статине, па у складу са тим, имају вредности укупног холестерола и LDL-холестерола ниже од реалних.

Осим тога, особе старије од 60 година иначе имају ниже вредности укупног холестерола, а наши пацијенти су у групи са стабилном ангином пекторис били просечне старости $61,3 \pm 6,5$ година, у групи са нестабилном ангином пекторис $60,8 \pm 9,8$ година, а у групи са акутним инфарктом миокарда $60,2 \pm 12,7$ година.

Фрамингамска студија је показала постојање готово линеарног односа између концентрације укупног холестерола у плазми и ризика од настанка кардиоваскуларних болести – што је виши ниво холестерола, већа је инциденција кардиоваскуларних болести на 1000 особа (*Castelli, 1988*).

Студија Седам земаља, у којој су изнети и резултати студије у Србији, показала је однос серумског холестерола и mortalитета – више вредности укупног холестерола биле су повезане са повећаним mortalитетом услед кардиоваскуларних болести на 1000 мушкараца (*Kromhout, 1999*).

Раније студије су показале да је редукција укупног холестерола доводила до смањања инциденце коронарних догађаја. Мета-анализа 38 студија показала је да је за свако снижење укупног холестерола за 10%, коронарни mortalитет редукован за 15%, а укупни mortalитет за 11% (*Gould, 1998*).

На основу резултата бројних клиничких студија, LDL-холестерол је издвојен као примарни циљ липидних интервенција у превенцији кардиоваскуларних болести. Према NCEP ATP III (*National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III*) смерницама, интензитет интервенција зависи не само од повишеног укупног холестерола или LDL-холестерола, већ и од присуства бројних других кардиоваскуларних фактора ризика (*Grundy i sar., 2004*).

Уочена је повезаност LDL-холестерола са атеросклерозом и коронарним догађајима– 10% пораст LDL-холестерола резултује приближно 20% повећањем ризика од кардиоваскуларних болести. Највећи део холестерола у плазми нађен је у LDL партикулама. Мање и гушће LDL партикуле много су атерогеније у поређењу са већим, мање густим партикулама. У присуству других фактора ризика (низак ниво HDL-холестерола, пушење, хипертензија, дијабетес) повишен је ризик повезан са LDL-холестеролом.

Европске препоруке за превенцију кардиоваскуларног ризика су за LDL < 3 mmol/L и за укупни холестерол < 5 mmol/L, док NCEP ATP III препоруке подржавају постизање циљних вредности LDL-холестерола < 2,6 mmol/L код високо ризичних пацијената (пацијенати са кардиоваскуларним обољењем, некоронарни облик клиничке

атеросклеротске болести, дијабетес и мултипли фактори ризика са процењеним 10-годишњим ризиком > 20% на Фрамингамском скору ризика), али када је ризик веома висок, циљна вредност LDL-холестерола је < 1,8 mmol/L, што је засновано на резултатима клиничких студија (*Grundy i sar., 2004*).

Ризик од кардиоваскуларних болести код особа са високим вредностима LDL-холестерола два пута је већи од оних са нижим, док код особа са ниским вредностима HDL-холестерола, овај ризик се значајно повећава. Према подацима из литературе, ниво HDL-холестерола са вредностима < 0,9 mmol/L има петоструко већи ризик за атеросклерозу и коронарну болест у поређењу са нормалним вредностима. Ризик се увелико повећава са порастом LDL-холестерола и падом HDL-холестерола. Ове две липопротеинске честице независни су фактор ризика за појаву болести (*Miller i sar., 2003; Assmann i sar., 2010*).

Досадашња сазнања указују на инверзну повезаност плазма HDL-холестерола и ризика од кардиоваскуларних болести, тако да HDL има протективан ефекат, како код коронарних болесника, тако и код асимптоматских особа, мушкараца и жена, и независан је од LDL-холестерола и осталих фактора ризика (*Barter i sar., 2007*). Што је нижи ниво HDL-холестерола, виши је ризик од кардиоваскуларних болести; ниски нивои (<1,0 mmol/L) повећавају ризик, а виши нивои ($\geq 1,6$ mmol/L) могу се сматрати „негативним“ фактором ризика (*Assmann i Gotto, 2004*).

Ниске концентрације HDL-холестерола удружене су са атерогеним животним стилем, имајући у виду да нивое HDL-холестерола снижавају пушење, гојазност и физичка неактивност (*Tavintharan i sar., 2005*).

Многобројне епидемиолошке студије јасно су показале да је низак ниво HDL-холестерола, удружен са повећаним ризиком од развитка атеросклерозе и коронарне болести срца (*Asheikh i sar., 2005*). Повишени нивои HDL-холестерола удружени су са споријом прогресијом, али и стабилизацијом атеросклеротичног плака. Честице HDL-холестерола имају веома важан протективан ефекат јер реверзним транспортом холестерола одстрањују вишак холестерол из периферних ткива и крвних судова, а штите и LDL честице од оксидације. Недавна открића показују да је однос између HDL-холестерола и кардиоваскуларног ризика јако комплексан. Тако, HDL-холестерол може прекинути инфламаторни циклус инициран LDL-холестеролом. Такође, HDL-холестерол има способност да инхибира оксидативну модификацију LDL-холестерола (*Nakajima i sar., 2006*). Липопротеин HDL има и антиинфламаторна својства. *In vitro* инхибира експресију VCAM-1, ICAM-1 и Е-селектина од стране ендотелних ћелија које су биле активирани помоћу TNF- α или IL-1. Такође, HDL инхибира и експресију адхезионих протеина у ендотелним ћелијама која прати његову активацију помоћу CRP (*Barter i sar., 2004*).

Резултати овог рада показују статистички значајно ниже вредности HDL-холестерола у свим испитиваним групама пацијената у односу на контролну групу здравих испитаника.

Вредности триглицерида биле су статистички значајно више у односу на контролне вредности за све три испитиване групе пацијената. Највеће просечне вредности триглицерида забележене су код пацијената са нестабилном ангином пекторис.

Постоје контроверзе око тога да ли је хипертриглицеридемија удружена са повећаним ризиком од коронарних догађаја. Ова повезаност није тако чврста као код LDL-холестерола, а постаје и слабија када се анализирају и остали фактори ризика. Веза између триглицерида и повећаног коронарног ризика је комплексна и може да рефлектује атерогене ефекте триглицеридима богатих липопротеина, посебно њихових малих

партикула. У условима хипертриглицеридемије формирају се мање LDL честице, чија је склоност ка оксидацији већа и то доприноси процесу атерогенезе (*Dunbar i Rader, 2005*).

Триглицериди имају значајну улогу у атерогенези и тромбогенези. Триглицериди утичу на стварање прокоагулантног стања, преко подстицања ендотелних ћелија да појачано стварају инхибитор плазминоген активатора, што успорава процес фибринолизе (*Ginsberg, 2001; Ginsberg, 2002*).

У новије време се поставља питање да ли је ниво триглицерида у плазми биомаркер или независни фактор ризика за коронарну болест срца. Хидролизом триглицерида (хиломикрони и липопротеини врло мале густине-VLDL) настају високо атерогени, холестеролом богати липопротеински остаци (ремнант). Новија истраживања показују да је постпрандијална хипертриглицеридемија уско повезана са нивоом ремнант честица и да је бољи предиктор инциденце кардиоваскуларног догађаја у односу на хипертриглицеридемију „наташте“ (постапсортивну) (*Nordestgaard i sar., 2007; Bansal i sar., 2007; Miller i sar., 2011*).

Постпрандијална хипертриглицеридемија изгледа да изазива повећану експресију проинфламаторних гена (нпр. IL-6, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1), да индукује апоптозу и наглашава инфламаторни одговор у култури ендотелних ћелија за TNF- α (*Norata i sar., 2007; Ting i sar., 2007*).

После обилног масног obroка, постпрандијална хипертриглицеридемија може да повећа ниво микрочестица ендотелних ћелија у циркулацији, што је мера ендотелне дисфункције *in vivo* (*Ferreira i sar., 2004*).

Linsel-Nitschke u cap. (2009) истичу да триглицериди могу да супримирају атеропротективне и антиинфламаторне ефекте HDL-холестерола.

У већини проспективних и ретроспективних студија установљена је одређена повезаност нивоа серумских триглицерида, учесталости хипертриглицеридемије и ризика развитка атеросклерозе. Велике епидемиолошке студије показале су да триглицериди представљају независан фактор ризика за настанак срчаних болести (*Iso i sar., 2001; Gandotra i Miller, 2008*).

Према NCEP АТР III смерницама, просечни нивои триглицерида су $< 1,7$ mmol/L, гранично високи 1,7-2,2 mmol/L, високи 2,2-5,6 mmol/L и веома високи $\geq 5,6$ mmol/L.

Фрамингамска студија (*The Framingham Heart Study*) је била међу првим опсервационим студијама која је показала да је повишен ниво триглицерида предиктор кардиоваскуларног обољења код жена старости између 50 и 69 година (*Castelli, 1986*). Такође, *the Lipid Research Clinics Follow-Up Study* је потврдила да је ниво триглицерида >200 mg/dL снажан предиктивни фактор кардиоваскуларне смрти (*Bass i sar., 1993*). Истраживања из лонгитудиналне епидемиолошке студије *the Cardiovascular Study in the Elderly*, потврђују да је ниво триглицерида, такође, значајан предиктор кардиоваскуларног оболевања и смртности. Тренутне смернице за превенцију кардиоваскуларних обољења код жена предлажу ниво триглицерида „наташте“ < 150 mg/dL за однос LDL-холестерола/HDL-холестерола < 130 mg/dL (*Mosca i sar., 2011*).

У *Copenhagen Male* студији је показан повећан ризик од кардиоваскуларне смрти и одређен градијент ризика за нивое триглицерида према нивоима HDL-холестерола. Хипертриглицеридемија наташте била је снажан показатељ кардиоваскуларне смрти, независан од осталих фактора ризика, укључујући и HDL-холестерол (*Jeppesen i sar., 1998*).

Мета-анализа 17 популационо-базираних проспективних студија показује јак доказ за триглицериде као независан фактор ризика за кардиоваскуларну смрт. Испитивано је

46413 мушкараца и 10864 жена и пронађено је да услед повећаног нивоа триглицерида расте и кардиоваскуларни ризик за 30% код мушкараца и за 75% код жена (*Hokanson i Austin, 1996*).

Нису дефинисани специфични терапијски циљеви за HDL-холестерол и триглицериде, али њихова концентрација је значајна и користи се као маркер повећаног ризика. Вредности HDL-холестерола испод 1,0 mmol/L код мушкараца и испод 1,2 mmol/L код жена, триглицериди изнад 1,7 mmol/L, маркери су повећаног кардиоваскуларног ризика. Стога, вредност HDL-холестерола и триглицерида треба узети у обзир при дизајнирању медикаментозне терапије (*Graham i sar., 2007; Brunzell i sar., 2008*). Однос триглицерида/HDL-холестерола > 4 представља атерогени индекс, за који је доказано да је значајан независан предиктор инфаркта миокарда, значајнији и од односа укупни холестерол/HDL-холестерол и од односа LDL-холестерола/HDL-холестерола (*Lemos da Luz i sar., 2008*).

Асимптоматске особе са више фактора ризика за настанак кардиоваскуларног обољења, а чије су нелечене вредности холестерола близу 5 mmol/L, а LDL-холестерол близу 3 mmol/L, имају користи од снижавања вредности укупног холестерола испод 4,5 mmol/L, а LDL-холестерола испод 2,5 mmol/L, применом средњих доза лекова за снижење липида (*De Backer i sar., 2003*).

Према препорукама Британског удружења кардиолога, код болесника чији се нивои холестерола крећу од 5 до 6 mmol/L саветује се дијета уз контролу након 6 до 12 недеља и уколико нема позитивног одговора прибегава се медикаментозном лечењу (*JBS, 2005*). Међутим, став Америчког удружења кардиолога је да наведене вредности холестерола представљају индикацију за започињање медикаментозног лечења (*Brunzell i sar., 2008*).

Према најновијим закључцима са конференције ADA/ACC (*The American Diabetes Association/The American College of Cardiology*), код пацијената који су на високом ризику, нарочито оних са доказаним атеросклеротским кардиоваскуларним обољењем и оних са дијабетесом и минимум још једним фактором ризика циљ је смањење LDL-холестерола испод 1,75 mmol/L (*Brunzell i sar., 2008*).

Енергичним лечењем хиперлиппротеинемија може се утицати не само на прогресију атеросклерозе, већ се у одређеном степену постиже регресија већ створених атеросклеротичних промена и, што је нарочито значајно, стабилизација атеросклеротског плака после дуготрајног снижења нивоа липида и липопротеина у крви (*Reilly i sar., 2008*). Клиничке студије са употребом статина показују значајну редукацију кардиоваскуларног морталитета, која, вероватно, настаје модулацијом инфламаторних компоненти плака (*Gotto i Farmer, 2001*).

Антиинфламаторни ефекат статина се, највероватније, заснива на повећању функције eNOS, смањењу абнормалног колагена и експресије бета миозина, смањењу повећане активности MMP, нормализовању симпатичког одговора и побољшању преживљавања (*Mason, 2003*).

Експериментално је показано да симвастатин смањује адхезију леукоцита за ендотел, чак и у нормохолестеролемичних особа, смањује експресију адхезионих молекула ендотелних ћелија и леукоцита, и снижава ниво проинфламаторних цитокина. Статини превенирају поремећај регулације eNOS изазван хипоксијом, стабилизовањем mRNA за eNOS што доводи до пораста NO продукције. Симвастатин брзо активира и протеин киназу B у ендотелним ћелијама, што доводи до фосфорилације eNOS протеина и пораста њихове активности и повећане продукције NO. Овај позитивни ефекат на експресију eNOS, статини остварују првенствено преко посттранскрипционог механизма, смањењем

транскрипције mRNA за ET-1 што резултује редукцијом продукције ET-1 (*Schönbeck i Libby, 2004; Li i sar., 2009*).

Правастатин и аторвастатин снижавају повећану експресију MCP-1 и трансформишућег фактора раста (TGF- β 1), инхибишу цитотоксичну активност Т-лимфоцита, што има и имуномодулаторни ефекат. Свој имуномодулаторни ефекат статини показују и смањењем експресије главног хистокомпатибилног комплекса класе II (MHC-II) индуковане дејством IFN- γ (*Kwak i sar., 2000*).

Статини редукују број инфламаторних ћелија у атеросклеротском плаку. Сматра се да је то омогућено директним везивањем статина за β 2 место на интегрину, рецептору за везивање интерћелијског адхезионог молекула чиме се онемогућава везивање овог молекула за ендотелну ћелију (*Graf i sar., 2003*).

Интензивна терапија аторвастатином значајно смањује инфламацију у мононуклеарима и атеросклеротичним лезијама. Аторвастатин смањује вредност укупног холестерола и LDL-холестерола, као и PGE₂ у крви, смањује активацију NF- κ B и експресију mRNA за MCP-1 и COX-2 у мононуклеарима периферне крви и значајно редукује инфилтрацију каротидног атеросклеротичног плака од стране макрофага. Интензивни третман аторвастатином (80 mg/дневно) током месец дана смањује инфламаторну активност хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви и каротидног плака, док умерено давање аторвастатина (40 mg/дневно) у току три месеца не мења активност NF- κ B у атеросклеротском плаку (*Martín-Ventura i sar., 2005*).

Прва велика терапијска студија у којој је био примењен статин у оквиру примарне превенције коронарне болести је WOSCOPS студија (*West of Scotland Coronary Prevention Study*). Било је укључено 6595 мушкараца старости од 45 - 64 године, без доказане коронарне болести, али са хиперхолестеролемијом: LDL-холестерол од 4 - 6 mmol/L. Лабораторијски резултати били су следећи: укупни холестерол снижен за 20%, LDL-холестерол за 26%, триглицериди снижени за 12%, а HDL-холестерол повишен за 5%. Клинички резултати су били следећи: нефатални инфаркти миокарда смањени за 31%, ревакуларизација смањена за 37% и укупни морталитет смањен за 22%. Значај WOSCOPS студије је у томе што се први пут показало да примена статина може да смањи морталитет у примарној превенцији код болесника са умерено повишеним холестеролом (*Shepherd i sar., 1995*).

У оквиру познате Скандинавске студије, 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*) испитивано је 4444 пацијената са ангином пекторис од којих је већина већ имала инфаркт миокарда и концентрација холестерола у плазми је била између 5,5 - 8,0 mmol/L, са циљем да се утврди однос између липида и великих коронарних догађаја. Симвастатин употребљаван у дужем периоду од 4,9 до 6,3 године смањује коронарни морталитет до 40%, општи морталитет (независно од узрока) до 30%, инциденцу коронарне смртности и нефаталних инфаркта миокарда до 34%. Свако смањење LDL-холестерола за 1% смањује ризик великих коронарних догађаја за 1,7%. Већ у првих 6 недеља, симвастатин у дози од 20 mg/дневно редукује вредност укупног холестерола у серуму за 28%, LDL-холестерола за 38%, повећава HDL-холестерол за 8% и смањује ниво триглицерида за 15% (*Pedersen i sar., 2000*).

У CARE (*Cholesterol and Recurrent Events Study*) студији, терапија правастатином је редуковала инциденцу фаталних коронарних догађаја, нефаталних инфаркта миокарда, ревакуларизационих процедура и шлога. У терапијској групи средње вредности LDL-холестерола снижене су за 32%. Ова студија је дала нови значај терапији за снижење холестерола демонстрирајући значајну редукцију инциденце коронарних догађаја код

пацијената са прележаним инфарктом миокарда који су имали просечне нивое холестерола (*Sacks i sar., 1996*).

Студија примарне превенције, AFCAPS/TexCAPS (*Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*), спроведена на 5608 мушкараца и 997 жена, након годину дана терапије ловастатином, показала је снижење нивоа укупног холестерола за 18%, LDL-холестерола за 25%, триглицерида за 15% и повећање HDL-холестерола за 6%. Ове промене у нивоима липида резултовале су редукијом ризика од настанка акутних коронарних догађаја за 37% (фаталног/нефаталног инфаркта миокарда, напрасене срчане смрти и нестабилне ангине) (*Downs i sar., 1998*).

У примарној превенцији, подаци из *Helsinki Heart Study*, показали су да повишење ниског плазматског нивоа HDL-холестерола (за 11%) заједно са смањењем триглицерида за 35% и LDL-холестерола за 11%, доводи до смањења коронарних догађаја за 34%. Свако повишење HDL-холестерола од 1% је било удружено са 3% смањења коронарних догађаја, независно од промена у вредностима триглицерида и LDL-холестерола (*Manninen i sar., 1988*).

Студија MIRACL (*Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering*) је пратила ефекат аторвастатина који је примењен у високој дози (80mg) у првих 96 сати по хоспитализацији пацијената са нестабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда. У току студије вредности липидних параметара су значајно смањене, смањена је инциденца нежељених исхемијских догађаја, продужено је време до поновне хоспитализације и значајно је редукована, за 50%, појава можданог удара (*Schwartz i sar., 2001*).

Резултати PROVE IT-TIMI 22 (*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction*) испитивања, указују да је редукија нивоа триглицерида < 150 mg/dL била одговорна за смањивање ризика од великих кардиоваскуларних нежељених догађаја за 27% и да се сваким снижењем нивоа триглицерида за 10 mg/dL смањује кардиоваскуларни ризик за 1,6% (*Miller i sar., 2008*).

Примена аторвастатина у дози од 10mg у ASCOT-LLA (*Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm Study*) студији, код 10297 хипертензивних болесника који су имали вредности холестерола испод 6,6 mmol/L, значајно је смањила смртност од коронарне болести и ризик за настанак инфаркта миокарда и цереброваскуларног инzulта (*Sever i sar., 2003*).

Резултати VA-HIT студије (*The Veterans Affairs HDL Intervention Trial*) су показали да повишење HDL-холестерола, код пацијената са установљеном коронарном болешћу срца, повишеним вредностима триглицерида, прихватљивим нивоима LDL-холестерола и ниским нивоима HDL-холестерола, доводи до сигнификантног смањења ризика од великих коронарних догађаја. Закључци студије VA-HIT показују > 3:1 однос за смањење коронарног догађаја за свако повишење HDL-холестерола од 1%, упоређено са 1:1 односом процентуалног смањења клиничких догађаја показаних у студијама са статинима (*Robins i sar., 2001*).

У секундарној превенцији кардиоваскуларног ризика правастатин је испитиван у PLAC I студији (*Pravastatin, Lipids and Atherosclerosis in the Coronary Arteries*). У овој ангиографској студији са умереном хиперхолестеролемијом, правастатин у дози од 40 mg/дневно је код 40-50% успорио развој атеросклерозе, и сигнификантно смањив број инфаркта (само 8 у односу на 17 у плацебо групи) (*Pitt i sar., 1995*).

Терапија флувастатином, у студији FLARE (*Fluvastatin Angioplasty Restenosis trial*), је смањила инциденцу инфаркта миокарда и морталитет, мада није утицала на прогресију

рестенозе, док је у LISA студији (*Lescol in Severe Atherosclerosis*), код болесника са симптоматском исхемијском болешћу срца и умерено високим вредностима холестерола значајно смањила инциденцу свих кардиоваскуларних догађаја (*Serruys i sar., 1999; Riegger is sar, 1999*).

Студија JUPITER (*Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin study*) представља једну од тзв. “landmark” студија за росувастатин, обзиром да је показала значај примене овог лека у примарној превенцији. Наиме, остварено је значајно смањење стопе кардиоваскуларног догађаја, као и смањење стопе кардиоваскуларног морталитета у популацији са нормалним вредностима LDL-холестерола, а повишеним вредностима инфламаторног маркера hsCRP (вредностима већим од 2mg/L) (*Ridker i sar., 2009*).

Резултати мета-анализе *Cholesterol Treatment Trialists Collaboration*, испитивање бенефита интензивне терапије статинима, објављени крајем 2010. године, показују да смањење LDL-холестерола за само 1 mmol/L смањује учесталост великих нежељених кардиоваскуларних догађаја за једну петину, без обзира на почетни ниво холестерола, што подразумева да би смањење LDL-холестерола за 2-3 mmol/L, смањило ризик за 40-50% (*CTT, 2010*).

Мултипле компаративне терапијске/плацебо студије показале су значајне ефекте у редуковању атеросклеротских догађаја и генерално снижење морталитета. Резултати текућих студија треба да одговоре на питање да ли даља редукција LDL-холестерола може да обезбеди додатне повољности.

6.4. Маркери инфламације у исхемијској болести срца

Атеросклероза, као најчешћи узрок исхемијске болести срца, је имунолошки посредован инфламаторни процес удружен са поремећајем метаболизма липида, који почиње дисфункцијом ендотела крвног суда дејством фактора ризика (*Ross, 1999*). Садашњи докази подржавају централну улогу инфламације у свим фазама атеросклеротичног процеса, од иницијације преко прогресивне лезије до крајње фазе, тромботичних компликација атеросклерозе (*Blake u Ridker, 2002; Li i sar., 2005*).

Епидемиолошке и клиничке студије (*4S, 1994; LIPID Study, 1998; Heart Protection Study, 2002;*) показују константну повезаност маркера инфламације и ризика за будуће кардиоваскуларне догађаје. Обзиром да резултати ових студија показују повећан интерес потенцијалне употребе инфламаторних биомаркера да помогну у предвиђању ризика за будуће кардиоваскуларне догађаје, они такође указују на могућност да инфламаторни маркери могу бити таргети терапије. Постоје несумњиви докази да цитокини могу допринети развоју атеросклерозе, како директно повећањем адхеренције леукоцита и акумулације моноцита, тако и индиректно деловањем инфламаторних медијатора или инфективних агенаса који учествују у атеросклерози (*Epstein, 2002*).

6.4.1. Стандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца

6.4.1.1. Ц-реактивни протеин у исхемијској болести срца

Хипотеза да одређивање CRP може наићи на клиничку употребу код болесника са инфарктом миокарда датира из 1940 године, када је примећено да у току исхемије постоји одговор протеина акутне фазе (*Ridker, 2001*). Да би се разумео прелаз CRP од протеина акутне фазе ка најупотребљивијем инфламаторном биомаркеру за прогнозу кардиоваскуларних догађаја, неопходно је познавање улоге имуног система у патогенези атеросклерозе (*Yeh u Willerson, 2003*).

Многе проспективне епидемиолошке студије су показале да су повишене вредности CRP независан предиктор ризика будућих кардиоваскуларних догађаја (акутни инфаркт миокарда, мождани удар, периферна артеријска болест и изненадна срчана смрт) код асимптоматских, клинички здравих појединаца (*Rifai i Ridker, 2001*). У настојању да се пронађе начин за предикцију глобалног кардиоваскуларног ризика заузео је значајно место.

Најмање шест великих проспективних студија (*Ridker i sar., 2000*) говоре у прилог хипотезе да повишени нивои CRP могу допринети повећању кардиоваскуларног ризика. У Сједињеним Америчким Државама спроведене су четири велике студије: The Physician's Health Study (PHS) (*Ridker i sar., 1998*), Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) (*Downs i sar., 1998*), Women's Healthy Study (WHS) (*Ridker i sar., 2003*) и Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study (*Ballantyne i sar., 2005*); у региону Аугсбурга The Monitoring Trends and Determinants on Cardiovascular Diseases/Cooperative Health Research (MONICA/KORA Augsburg) (*Koenig i sar., 2008*) и у Европи The Age Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik студија (*Eiriksdottir i sar., 2006*).

Према саопштењу Америчког удружења кардиолога (*The American Heart Association*) и Центара за контролу и превенцију болести (*The Centers for Disease Control and Prevention*) препоручено је мерење вредности CRP као предиктор ризика болесника са акутним коронарним синдромом. Такође, према вредностима CRP, препоручена је подела свих пацијената у: групу са ниским ризиком ($= 1,0 \text{ mg/L}$), групу умереног ризика ($1,0\text{-}3,0 \text{ mg/L}$) и групу високог ризика за развој кардиоваскуларног догађаја ($\geq 3,0 \text{ mg/L}$). Код појединаца са повишеним вредностима CRP ($> 10,0 \text{ mg/L}$) из непознатих разлога, треба искључити кардиоваскуларне узроке (*Ridker i sar., 2002; Ridker, 2003; Ridker i sar., 2003; Pearson i sar., 2003*).

Пацијенти са акутним коронарним синдромом чије су вредности CRP у серуму више од $3,5 \text{ mg/L}$ имају једанаест пута већи ризик од коронарне смрти у поређењу са пацијентима чије су вредности CRP ниже од $3,5 \text{ mg/L}$ (*Kim i sar., 2006*). Такође, и истраживања *Schaan u cap. (2009)* потврђују доказе ранијих студија да је CRP важан прогностички и клинички користан маркер за идентификацију пацијената који су на повећаном ризику за развој великих нежељених кардиоваскуларних догађаја. Пацијенти, чије су вредности CRP у серуму биле $> 3 \text{ mg/L}$ показали су скоро пет пута већи ризик од смрти у поређењу са пацијентима са нижим нивоима, и чак седам пута већи ризик за развој инфаркта миокарда, исхемијског možданог удара или изненадне срчане смрти.

Проспективна кохортна студија предиктивне вредности CRP у дугорочном морталитету, спроведена на 1042 пацијента са акутним коронарним синдромом, је показала да су нивои CRP изнад 10 mg/L независни показатељи сигнификантне коронарне лезије. Дугорочни морталитет је износио 3,4% за вредности CRP мање од 3 mg/L , 4,4% за вредности CRP између 3 и 10 mg/L , и чак 12,7% за вредности изнад 10 mg/L . Такође, утврђено је да пацијенти са вредностима CRP изнад 10 mg/L имају четири пута већи ризик од смрти (*Mueller i sar., 2002*).

Подаци *TIMI 11A* студије (*The Thrombolysis in Myocardial Infarction 11A trial*) о нестабилној ангини пекторис и поп-Q инфаркту миокарда, показали су да маркантан пораст вредности CRP (преко $15,5 \text{ mg/L}$) код 437 пацијената на пријему, предвиђа нежељене догађаје унутар 14 дана од акутног коронарног синдрома (*Morrow i sar., 1998*).

Fiotti u cap. (2002) су истакли да су циркулишући нивои CRP значајно повећани код пацијената са нестабилном ангином пекторис, посебно код оних који су касније развили неки од нежељених кардиоваскуларних догађаја. У овој студији, релативни ризик за развој нежељених догађаја био је 5,2 код пацијената са вредностима CRP у највишој терцили.

Espliguero u cap. (2004) су објавили резултате студије која је показала да вредност CRP расте у акутном коронарном догађају и да корелира са бројем комплексних лезија, што потврђује његову улогу као маркера вулнерабилности атероматозног плака.

Одређивањем концентрације CRP добијен је статистички значајан пораст овог инфламаторног маркера у односу на контролне вредности у свим испитиваним групама болесника, што је у корелацији са резултатима *Ghazala* и *Mansoor (2008)*. Највећи пораст је забележен у групи болесника са акутним инфарктом миокарда у односу на контролну групу испитаника, затим у групи болесника са нестабилном ангином пекторис, а нешто мања статистичка значајност је присутна и код пацијената са стабилном ангином пекторис. Такође, постоји и статистички значајна разлика у вредностима CRP између свих испитиваних група. Резултати овог истраживања јасно указују да је серумски ниво CRP индекс активности атероматозног плака и његове вулнерабилности. Значајно повишене вредности CRP указују на активан инфламаторни процес и на његову кључну улогу у развоју дисрупције плака (*Ghazala u Mansoor, 2008*). Нивои CRP корелирају са клиничким

стадијумом исхемијске болести срца. Резултати добијени овом студијом су у корелацији са истраживањима *Mitra* и *Panja* (2005), који су доказали да су нивои CRP знатно нижи код пацијената са стабилном у односу на пацијенте са нестабилном ангином пекторис и са акутним инфарктом миокарда. Пораст концентracије CRP код пацијената са стабилном ангином пекторис одражава инфламаторну активност коронарног плака и корелише са величином некротичног језгра „culprit“ лезије (*Kubo i sar., 2009*).

Одређивање вредности CRP, како код пацијената са стабилном коронарном болешћу, тако и код пацијената са акутним коронарним синдромом, најкориснији је независни прогностички показатељ нежељених догађаја, укључујући смрт, инфаркт миокарда и рестенозу после коронарне реваскуларизације (*Pearson i sar., 2003*).

Roubille u cap. (2008) су проучавали прогностичку вредност CRP код пацијената са акутним инфарктом миокарда који су подвргнути реваскуларизацији, његову кинетику и корелацију са клиничким исходом. Ниво CRP расте у првим данима инфаркта миокарда, у складу са степеном ткива захваћеног некрозом, и достижу свој пик трећег дана од акутног догађаја (46,1 mg/L), а онда опадају између трећег и седмог дана. Продужен пораст CRP после акутног инфаркта миокарда показатељ је узнапредовале инфламације и предвиђа понављање догађаја. Актуелни подаци показују да је CRP независни показатељ морталитета код пацијената са акутним коронарним синдромом код којих је дошло до реваскуларизације.

Smit u cap. (2008) су анализирали прогностички потенцијал CRP и укупног броја леукоцита код пацијената са акутним инфарктом миокарда који су подвргнути перкутаној коронарној интервенцији. Није било статистички значајне корелације између броја леукоцита и CRP. Повишен ниво CRP био је значајан показатељ реинфаркта и смрти унутар годину дана, али није био у корелацији са ензимском активношћу LDH и ејекционом фракцијом леве коморе, док је пораст броја леукоцита био у корелацији са смањеном ејекционом фракцијом леве коморе и степеном ензимске активности LDH, али не и са инциденцом реинфаркта и смрти унутар годину дана. Такође, и у овом раду је забележен статистички значајан пораст концентрације CRP, укупног броја леукоцита и ензимске активности LDH у групи болесника са акутним инфарктом миокарда у односу на све испитиване групе.

Неколико студија је демонстрирало да одређивање вредности CRP на пријему, или на отпусту из болнице може користити као прогностички маркер код болесника са акутним коронарним синдромима чак и у одсуству некрозе миокарда, при чему CRP одражава рањивост плака и вероватноћу његове руптуре (*Rifai i Ridker, 2001*).

У ACUTY (*The Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy trial*) трајалу, базичне вредности CRP су независни предиктор краткорочног (30 дана) и дугорочног (1 година) морталитета код тропонин позитивних пацијената са акутним коронарним синдромом подвргнутих раном инвазивном третману (*Caixeta i sar., 2011*). *Lindahl u cap. (2000)* су указали на уску повезаност CRP и фибриногена, као маркера инфламације и тропонина Т, маркера миокардног оштећења, независних фактора ризика у дугорочној прогнози (34 месеца) пацијената са нестабилном коронарном болешћу. Међу тропонин негативним пацијентима, повишен ниво CRP предиктор је дугорочног морталитета (шесто-месечног), што је и потврдила FRISC (*FRagmin during InStability in Coronary artery disease trial*) студија (*Kenyon i sar., 2003*). Уколико су и CRP и тропонин негативни, мало је вероватно да се ради о коронарном обољењу (*Ridker, 2003*).

Möhlenkamp u cap (2011) су одређивањем Фрамингам ризик варијабли, CRP као маркера инфламације и садржаја Са у коронарним артеријама као мерило стабилности

коронарног плака, у 3966 пацијената са коронарном атеросклерозом и/или акутном инфламацијом настојали да утврде да ли ови маркери могу да предвиде ризик коронарног догађаја и свих узрока смрти у општој популацији у периоду праћења од пет година. Мерење циркулишућег нивоа CRP и Ca^{2+} у коронарним артеријама може помоћи у идентификацији пацијената са ризиком за кардиоваскуларне догађаје, при чему је CRP поузданији показатељ поготову код појединаца са ниским скором Ca^{2+} у коронарним артеријама.

Сматра се да је мерење нивоа CRP у дугорочној прогнози подједнако поуздана метода као и тест физичког оптерећења (*Shishehbor i sar., 2003*). Пораст концентрације CRP је бољи параметар од теста физичког оптерећења у идентификацији појединаца са нестабилним коронарним плаком (*Bazzino i sar., 2001*). *Rebuzzi u cap. (1998)* су анализирали који од следећих параметара, бол у грудима у протекла 24h, ECG, тропонин Т, CRP или 24h холтер мониторинг, је најбољи у предвиђању исхода пацијената са нестабилном ангином пекторис. Тропонин Т и CRP су показали статистички значајно бољу предиктивну вредност у односу на бол у грудима и ECG. Холтер мониторинг није дао статистички значајне информације за исход пацијената са нестабилном ангином пекторис.

У већини напоменутих студија CRP се показао као значајнији предиктор у односу на традиционалне факторе ризика. Упоређивањем свих нових фактора ризика за настанак акутних коронарних синдрома, какав је LP(a), хомоцистеин, укупни холестерол, однос укупног холестерола и HDL фракције, LDL-холестерол и триглицериди, са CRP, показало се да је најбољи униваријантни предиктор управо вредност CRP (*Rifai i Ridker, 2001*).

Комбинована евалуација CRP и LDL-холестерола је много боља за детекцију ризика од оба ова маркера понаособ. Код особа са вредностима LDL-холестерола између 3,36 mmol/L и 4,14 mmol/L, додатни налаз повећане концентрације CRP указује на повећани глобални ризик. Уколико је ниво LDL-холестерола мањи од 3,36 mmol/L, повишен налаз CRP указује на већи ризик него што то може да се предвиди само на основу концентрације LDL-холестерола.

У највећој Америчкој проспективној кохортној студији, WHS, код 27,939 жена, у периоду праћења од 8,3 године, просечне базичне вредности CRP су биле значајно више код жена које су имале кардијачне догађаје од оних које нису. Ц-реактивни протеин је супериорнији у односу на LDL-холестерол, па жене које имају висок CRP и низак HDL-холестерол су под већим ризиком за настанак коронарних догађаја од оних које имају висок LDL-холестерол и низак CRP (*Ridker i sar., 2002; Ridker i sar., 2003*).

Мерење нивоа CRP уз мерење липидног статуса може помоћи у идентификацији пацијената са ризиком за кардиоваскуларне догађаје. Ц-реактивни протеин може чак бити поузданији показатељ него ниво LDL-холестерола, поготово код ниских вредности LDL-холестерола. Новије студије истичу да статини, паралелно са својим хиполипидемичним ефектима испољавају и антиинфламаторна и антиоксидативна својства (*Jialal i sar., 2001; Tandon i sar., 2005*). Велике рандомизирани студије користећи високе дозе статина у циљу агресивног снижавања липида су показале да, независно од смањења липида, статини снижавају и нивое CRP. Статини смањују вредности CRP, при чему највеће користи од терапије статинима имају пацијенти са повишеним нивоима CRP, било после акутног инфаркта миокарда или у примарној превенцији кардијалних догађаја (*Ridker i sar., 2008*).

У проспективној PRINCE студији (*Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation study*) давање правастатина у дози од 40 mg/дневно смањује концентрацију CRP у току 24 седмице за 14% (*Albert i sar., 2001*), давање 20 mg/дневно росувастатина у току 16 седмица

смањује нивое CRP за 40%, а 20 mg/дневно аторвастатина за 34% (*Betteridge i Gibson, 2004*).

Студија JUPITER спроведена на 17,802 привидно здравих мушкараца и жена, са нормалним вредностима LDL-холестерола (< 3,36 mmol/L) и повишеним вредностима CRP (> 2,0 mg/L), је показала да дуготрајно узимање росувастатина у дози од 20 mg/дневно смањује ниво LDL-холестерола за 50% и CRP за 37% и на тај начин смањује инциденцу инфаркта миокарда, можданог удара, коронарне ревакуларизације, рехоспитализације због нестабилне ангине пекторис и кардиоваскуларне смрти (*Ridker i sar., 2008; Mora i sar., 2009*).

Испитивањем липидно независног ефекта статина на концентрацију CRP, добијене су статистички значајно ниже концентрације у све три испитиване групе које су биле третиране статинима, што је у корелацији са претходно изнетим резултатима.

Клиничке студије су показале да је поред статина и аспирин ефикасан у смањењу инциденце будићих коронарних догађаја код особа са повишеним концентрацијама CRP. Употреба аспирина у проспективној PHS студији (*Physician's Health Study*) значајно смањује ризик од акутног инфаркта миокарда код пацијената са вредностима CRP у највишој кватили, али не и код оних са вредностима CRP у најнижој кватили (*Ridker i sar., 1997*).

У клиничкој пракси се показало да је CRP бољи предиктор кардиоваскуларне болести од LDL-холестерола и да обезбеђује додатне податке на свим нивоима рачунања Фрамингамског ризика и у метаболичком синдрому. Ризик настанка коронарних обољења је двоструко већи у жена са метаболичким синдромом и повишеном концентрацијом CRP, него у оних са метаболичким синдромом и ниском концентрацијом CRP (*Devaraj i sar., 2010*). Резултати овог истраживања указују на статистички значајну позитивну корелацију CRP и дијабетеса код пацијената са акутним инфарктом миокарда.

Корелација нивоа CRP и будућих кардиоваскуларних догађаја је нађена независно од старости, пушења, нивоа холестерола, дијабетеса и осталих великих кардиоваскуларних фактора ризика (*Shishehbor i sar., 2003*).

6.4.1.2 Фибриноген у исхемијској болести срца

Фибриноген је реактант акутне фазе који има значајну улогу у бројним патофизиолошким процесима, као што су инфламација, атерогенеза и тромбогенеза. Има улогу у активацији ендотелних ћелија и експресији адхезионих молекула, што за последицу има дисфункцију ендотела и могућу улогу у прогресији атеросклеротске лезије. Резултати бројних епидемиолошких студија указују да су повишени нивои фибриногена повезани са порастом ризика од кардиоваскуларних обољења, укључујући исхемијску болест срца, мождани удар и тромбоемболизам (*Canseco-Avila i sar., 2006*).

Мета-анализа шест проспективних епидемиолошких студија (*Ernst i Resch, 1993*) са узорцима који су репрезентативни за општу популацију, закључује да је фибриноген независни кардиоваскуларни фактор ризика. Све проспективне студије су доказале да је повишен ниво фибриногена повезан са појавом инфаркта миокарда и/или можданог удара. Такође је запажено да је корисно смањење нивоа фибриногена код пацијената са повишеним нивоом фибриногена и коронарном болешћу срца.

У другој мета-анализи (*Maresca i sar., 1999*) која укључује 22 проспективне студије, које детерминишу улогу фибриногена као кардиоваскуларног фактора ризика, опште

мишљење је да је ризик за развој кардиоваскуларног догађаја код особа са изражено високим нивоом фибриногена дупло већи у односу на оне са благо повишеним вредностима фибриногена. Високи нивои фибриногена су повезани са повишеним ризиком за развој кардиоваскуларних болести како код високо-ризичних пацијената, тако и код потенцијално здравих индивидуа. Недавно су *Shojaie u cap. (2009)* и *Pineda u cap. (2009)* указали на значај повишеног нивоа фибриногена као маркера ризика превременог кардиоваскуларног обољења у особа млађих од 55 година.

У Framingham (*Kannel i sar., 1987*) и FRISC (*The Fragmin During Instability in Coronary Artery Disease study*) студији (*Toss i sar., 1997*), нађена је позитивна корелација нивоа фибриногена и кардиоваскуларног ризика, односно нивоа фибриногена и инциденце кардијалне смрти и/или инфаркта миокарда.

Фибриноген је значајан предиктор будућих коронарних догађаја код пацијената са ангином пекторис (*Stec i sar., 2000*). У студији *Acevedo u cap. (2002)*, ниво фибриногена је био у корелацији са појавом инфаркта миокарда и независан предиктор краткорочног морталитета. Мултиваријантна анализа података добијених из *Leigh General Practice* студије, је показала да је фибриноген значајан прогностички предиктор нежељених кардиоваскуларних догађаја, упоређивањем особа са високим нивоима фибриногена ($>3,5\text{g/L}$) са особама са ниским нивоима фибриногена ($<2,9\text{g/L}$) (*Stone i Thorp, 1985*).

Shi u cap. (2010) су проучавали прогностички значај фибриногена, мерењем концентрације фибриногена у плазми, серијски у 136 пацијената са акутним коронарним синдромом, 142 пацијента који су имали стабилну ангину пекторис, и у 82 здрава испитаника. Нивои фибриногена у плазми су били статистички значајно већи код болесника са акутним коронарним синдромом ($302 \pm 90 \text{ mg/dL}$), у односу на групу пацијената са стабилном коронарном болешћу ($274 \pm 61 \text{ mg/dL}$) и у односу на контролу ($243 \pm 55 \text{ mg/dL}$). Такође, значајно већи ниво фибриногена нађен је код пацијената који су развили нежељени коронарни догађај, у периоду праћења од 30 дана и 2 године. Вредности фибриногена се могу користити као независан предиктор великих нежељених срчаних догађаја током краткорочног и дугорочног праћења, независно од других класичних фактора ризика, као што су старост и пол. Такође и резултати ове студије показују значајан пораст нивоа фибриногена код пацијената са акутним инфарктом миокарда и са нестабилном ангином пекторис у односу на контролне вредности, што је у корелацији са резултатима *Shi u cap., (2010)* и потврђују улогу фибриногена у патофизиологији акутног коронарног синдрома.

Истраживања *Gil u cap. (2002)* указују на статистички значајан пораст фибриногена у нестабилној ангици пекторис у односу на стабилну ангину пекторис. И у овом раду је ниво фибриногена био виши код пацијената са нестабилном у поређењу са пацијентима са стабилном ангином пекторис, али та разлика није била статистички значајна.

Многе студије су указале на уску повезаност фибриногена са традиционалним факторима ризика кардиоваскуларних болести, као што су крвни притисак, хематокрит, гојазност, пушење цигарета и дијабетес. Чак и када су ови фактори укључени у мултиваријантну анализу повезаност фибриногена и кардиоваскуларне болести остаје статистички значајна, указујући да је фибриноген независни прогностички предиктор кардиоваскуларног ризика (*Kannel i sar., 1987; Kannel i sar., 1990*).

Повишен ниво фибриногена представља потенцијални механизам дејства бројних кардиоваскуларних фактора ризика. *Fogari u cap. (1994)* су доказали да постоји значајна корелација пушења и нивоа фибриногена. Што је конзумирање дувана веће, виши је ниво фибриногена. По престанку пушења, ниво фибриногена брзо опада и управо је снижење

нивоа фибриногена патофизиолошко објашњење смањења кардиоваскуларног ризика по престанку пушења.

Ditschuneit u cap. (1995) су одређивали вредности фибриногена у гојазних, пре и после шестомесечне ниско калоричне дијете и указали да редукција телесне масе снижава ниво фибриногена и смањује ризик за настанак кардиоваскуларних обољења.

Robinson u cap. (2004) су указали на повезаност повишених нивоа фибриногена и позитивне породичне анамнезе за инфаркт миокарда, истичићу на тај начин потенцијалну улогу фибриногена као наследног кардиоваскуларног фактора ризика. У овом раду је нађена статистички значајна позитивна корелација нивоа фибриногена и позитивне породичне анамнезе у групи пацијената са нестабилном ангином пекторис.

Студије *Caerphilly* и *Speedwell collaborative heart disease*, су показале да укупан број леукоцита, фибриноген и вискозност крви представљају независне факторе ризика за исхемијску болест срца. Такође, показале су да модел, у коме је узет у обзир старост, пушење, фибриноген, вискозитет крви и укупан број леукоцита, предвиђа исхемијску болест срца исто тако као и модел у коме је једна од три хемостатско-реолошке варијабле замењена тоталним холестеролом, дијастолним притиском и индексом телесне масе (*Yarnell i sar., 1991*).

Епидемиолошка студија *Northwick Park Heart Study (NPHS)*, је показала да су повишене концентрације фибриногена и фактора VII повезане са повећаним ризиком за исхемијску болест срца и да су хемостатски маркери бољи предиктори исхемијске болести срца од укупног холестерола (*Meade i sar., 1986*). Налаз повишених вредности фибриногена код пацијената чије су концентрације укупног холестерола повећане, указује на већи ризик од настанка коронарних догађаја у односу на оне са ниским вредностима фибриногена.

У PROCAM студији (*The Prospective Cardiovascular Munster study*) су одређивани нивои фибриногена, фактора VIIc, крвног притиска и липидни параметри. Након осмогодишњег праћења, уочено је да су нивои фибриногена у групи испитаника са коронарним догађајем били виши у односу на групу без коронарног догађаја за 0,32g/l. Инциденца коронарног догађаја код мушкараца чији је ниво фибриногена у највишој терцили референтног интервала је троструко виша у односу на оне са вредностима фибриногена у доњој терцили. Када су концентрације фибриногена и LDL-холестерола разматране заједно, нађен је осмоструки пораст у осмогодишњем ризику код мушкараца са фибриногеном и LDL-холестеролом у највишој терцили у односу на оне са вредностима оба параметра у доњој терцили (*Assmann i sar., 1996*).

Повишен ниво фибриногена у PROCAM студији повећава могућност предвиђања кардиоваскуларног ризика при свакој концентрацији LDL-холестерола. Ризик будућег коронарног догађаја значајно опада са смањењем нивоа фибриногена, чак и при повишеној концентрацији LDL-холестерола (*Heinrich i sar., 1994*). Код пацијената са коронарном артеријском болешћу, концентрација фибриногена је поузданији показатељ инциденце акутног коронарног догађаја од вредности LDL-холестерола (*Thompson i sar., 1995*).

Бројни епидемиолошки подаци потврђују да је пораст концентрације фибриногена индикатор клинички „silent“ атеросклерозе и да најављује атеротромботични догађај (*Sabeti i sar., 2005*). У проспективној кохортној CARDIA (*Coronary Artery Risk Development in Young Adults*) студији, налаз позитивне корелације повишеног нивоа фибриногена, калцификације каротидних артерија и повећања дебљине интимо медијалног комплекса, потврђује улогу фибриногена у субклиничкој атеросклерози (*Green u cap., 2009*). Најновија истраживања *De Luca u cap. (2011)* указују да постоји значајна повезаност нивоа

фибриногена, ангиографски верификоване хемодинамски сигнификантне коронарне стенозе и дебљине интимо медијалног комплекса. Налаз повећане концентрације фибриногена код пацијената који су развили нежељени коронарни догађај након перкутане коронарне интервенције, указује на потенцијалну улога фибриногена у предвиђању исхода перкутане коронарне интервенције (*Germing i sar., 2000*).

Rizzo u cap. (2009), су потврдили значајну предиктивну улогу фибриногена и CRP у субклиничкој и клиничкој атеросклерози код хипертензивних жена у постменопаузи. *Rodriguesu u cap. (2010)* су објавили да је повишен ниво фибриногена маркер прогресије коронарне артеријске калцификације код пацијената који болују од тип 1 дијабетес мелитуса.

Stec u cap. (2000), као и бројне проспективне студије, указују на значај фибриногена у предвиђању будућег кардиоваскуларног догађаја и потврђују да кардиоваскуларном скринингу треба придодати и одређивање вредности фибриногена као допунски тест глобалној процени ризика, тим пре што је реч о рутинској методи, која је релативно јефтина.

6.4.1.3 Укупан број леукоцита у исхемијској болести срца

Леукоцити су дуго признати маркер запаљења и повећан број леукоцита обично указује на значајан инфламаторни одговор. Могуће је да повишен број белих крвних зрнаца промовише атерогенезу. Иницијална лезија у развоју атеросклерозе настаје када леукоцити прођу кроз ендотелну баријеру у интиму. Леукоцити, услед абнормалне агрегације и адхеренције, као и због ослобађања бројних цитокина и хемокина, и својим протеолитичким и оксидативним оштећењем васкуларног ендотела доприносе прогресији атеросклерозе (*Shahzad i sar., 2009*).

Активирани леукоцити одражавају активност атероматозног плака и указују на његову вулнерабилност. Укупан број леукоцита расте са презентацијом симптома акутног инфаркта миокарда, указујући да је инфламација у основи миокардне некрозе (*Wong i sar., 2003*). Резултати овог рада су потврдили статистички значајан пораст укупног броја леукоцита код пацијената са акутним инфарктом миокарда у односу на све испитиване групе. Просечна вредност леукоцита у групи са нестабилном ангином пекторис била је статистички значајно виша у односу на контролну, као и у односу на стабилну ангину пекторис. Вредности леукоцита у групи са стабилном ангином пекторис биле су статистички значајно више у односу на контролу. Ови резултати указују на интензивнији инфламаторни одговор у акутном коронарном синдрому, у односу на стабилну коронарну болест.

Резултати добијени овим истраживањем указују да постоји значајна повезаност леукоцитозе код болесника са исхемијском болешћу срца и степена инфламације и у складу су са важећим концептом да су леукоцити користан фактор ризика и прогностички индикатор код пацијената са исхемијском болешћу срца, као и да је атеросклероза инфламаторна болест (*Pearson i sar., 2003; Pai i sar., 2004; Jia i sar., 2005*). Леукоцитоза посредује у кардиоваскуларном оштећењу путем неколико патофизиолошких механизма који покрећу инфламацију, изазивају протеолитичку и оксидативну алтерацију ендотела, активирају микроваскулатуру, индукују хиперкоагулабилност и промовишу експанзију инфаркта. Повезаност леукоцитозе са ангиографским карактеристикама коронарне

атеросклерозе, сугерише да гранулоцити могу да имају кључну улогу у патофизиологији атеросклерозе (*Jia i sar., 2005*).

Бројне проспективне студије су показале да инфламаторне ћелије и укупан број леукоцита могу бити користан прогностички индикатор код здравих, пацијената са стабилном и нестабилном ангином пекторис и инфарктом миокарда. *Framingham Offspring Study* спроведена на 1393 мушкараца и 1401 жена без кардиоваскуларног обољења (коронарна болест срца, мождани удар, периферна артеријска болест и срчана инсуфицијенција) на почетку истраживања, старости од 30 до 59 година, у периоду праћења од 12 година, је показала да укупан број леукоцита предвиђа будуће коронарне догађаје. Било је 180 нежељених догађаја код мушкараца и 80 код жена. Сваки пораст броја леукоцита за $1.0 \times 10^9/L$ праћен је повећаним кардиоваскуларним ризиком за 32% (*Kannel i sar., 1992*). *Rasouli u cap. (2007)* су испитивали улогу и дијгностичку вредност инфламаторних маркера, као што су укупан број леукоцита, леукоцитарна формула, hsCRP и брзина SE, у стабилној ангини пекторис и показали да су, од свих испитиваних маркера, укупан број леукоцита, број неутрофила и еозинофила потенцијални предиктори стабилне ангине пекторис. У току једногодишњег праћења пацијената са нестабилном ангином пекторис уочено је да пацијенти са изразито високим бројем леукоцита имају осам пута већи ризик да развију неки од нежељених коронарних догађаја у односу на оне пацијенте са умерено повишеним вредностима и пет пута већи ризик у односу на све остале пацијенте (*Zouridakis i sar., 2000*). Пораст укупног броја леукоцита у акутном инфаркту миокарда је повезан са повећаним ризиком за развој срчане инсуфицијенције, кардиогеног шока и срчане смрти (*Barron i sar., 2001; Sabatine i sar., 2002*). Повећан број леукоцита код пацијената који су уназад шест месеци прележали инфаркт миокарда значајан је показатељ реинфаркта и/или кардиоваскуларне смрти (*Hajj-Ali i sar., 2001*). Такође, повишен број леукоцита у *LIPID* студији, пет месеци и три године након нестабилне ангине пекторис, указује да вредности укупаног броја леукоцита могу послужити као кардиоваскуларни фактор ризика у дугорочној прогнози (*Stewart i sar., 2005*). Вредности леукоцита изнад 10,000 код високо ризичних пацијената са нестабилном ангином пекторис или са акутним инфарктом миокарда значајан су предиктор кардиоваскуларног морталитета (*Cannon i sar., 2001*), независно од традиционалних фактора ризика (*Brown i sar., 2001*).

Резултати неколико студија су потврдили да је укупан број леукоцита повезан са више кардиоваскуларних фактора ризика. Нађена је статистички значајна корелација укупног броја леукоцита са телесном масом, систолним крвним притиском, пушењем, са „наште“ нивоом глукозе и инсулина, као и негативна корелација са повишеним нивоом LDL-холестерола, породичном анамнезом, конзумирањем алкохола и физичком неактивношћу (*Hansen i sar., 1990; Friedman i sar., 1990; Nieto i sar., 1992*). Подаци добијени овим истраживањем указују на статистички значајну позитивну корелацију укупног броја леукоцита са телесном масом, пушењем и дијабетес мелитусом, као и на статистички значајну негативну корелацију укупног броја леукоцита са породичном анамнезом, што се уклапа са претходно изнетим литературним подацима. Такође, забележено је и статистички значајно смањење броја леукоцита зависно од употребе статина.

Одређивање броја леукоцита заслужује значајно место у предвиђању ризика за исхемијску болест срца и обезбеђује таргете за будуће терапијске интервенције, тим пре што је реч о рутинској, јефтиној и поузданој методи, која је лака за интерпретацију.

6.4.1.4 Брзина седиментације еритроцита у исхемијској болести срца

Брзина седиментације еритроцита (BSE, SE, на енгл. ESR-erythrocyte sedimentation rate) која показује тенденцију еритроцита да се таложе, временски је ограничена, рутинска анализа, углавном употребљавана да укаже на присуство узнапредовале акутне инфламације и дијагнозу и праћење хроничне инфламације (*Saadeh 1998; Happe i sar., 2002*). Представља брз и јефтин тест, и може послужити као вредно средство за процену снаге инфламаторног одговора у вези са атеросклеротским процесом и као носилац краткорочне и дугорочне прогнозе (*Erikssen i sar., 2000*).

Резултати неколико проспективних студија, које су истраживале брзину седиментације еритроцита као независног предиктора будућег кардиоваскуларног догађаја су противречни. Иако су неке студије показале повећан ризик од инфаркта миокарда и исхемијске смрти код мушкараца (*Rafnsson i Bengtsson, 1982*), оскудна литература која постоји о SE као независном фактору ризика за исхемијску болест срца код жена, до сада пружа негативан налаз (*Gillum i sar., 1995*).

Брзина седиментације еритроцита се повећава са годинама, за 2,5% годишње код мушкараца и за 1,9% годишње код жена. Иако је за жене карактеристична већа SE у односу на мушкарце, жене нису под већим ризиком настанка коронарних догађаја у односу на мушкарце (*Smith i Samadian, 1994*).

У проспективној кохортној *Reykjavik* студији, SE је била независан предиктор будућег коронарног догађаја у дугорочној прогнози и код мушкараца и код жена (*Andresdottir i sar., 2003*).

Erikssen u cap. (2000) су указали на значај SE као маркера кардиоваскуларног ризика код мушкараца са позитивним тестом физичког оптерећења, са ангином пекторис и код потенцијално здравих мушкараца.

Брзина седиментације еритроцита је у корелацији са интензитетом атеросклеротског процеса и може бити користан прогностички показатељ узнапредовале коронарне болести срца и маркер високог ризика артеријске тромбозе (*Caswell i sar., 1993*).

Истраживања *Danesh u cap. (2000)*, су показала значајну корелацију брзине SE и ризика за појаву коронарне артеријске болести. Упоредивањем појединаца чије су вредности SE биле у највишој терцили у односу на оне са вредностима у најнижој терцили референтног интервала, ризик је износио 1:33.

Брзина седиментације еритроцита је снажан независан предиктор краткорочног и дугорочног морталитета код пацијената са коронарном болешћу срца и чини се маркер агресивног облика коронарне болести срца (*Natali i sar., 2003*).

Код пацијената обухваћених овим истраживањем, запажена је статистички значајно повишена SE у свим испитиваним групама у односу на контролне вредности. Највише вредности SE су имали пацијенти у групи са нестабилном ангином пекторис, што се може довести у везу са нестабилним атеросклеротским плаком и могућношћу његове руптуре (*Natali i sar., 2003*).

Ангиографијом верификована коронарна атеросклеоза повезана је са повишеним вредностима SE. Седиментација еритроцита независно корелира са коронарном атеросклерозом и предвиђа кардијалну смрт код пацијената са исхемијском болешћу срца. Умерена, стално повишена SE требало би да скрене пажњу на постојање атеросклерозе и њених последица. Још увек је нејасно да ли моћ предвиђања представља резултат директне повезаности SE са степеном атеросклерозе. Неколико студија је показало да инфламација и вискозност крви рефлектују анатомски статус коронарне васкулатуре (*Rifai i sar., 1999*).

Испитивања изведена на малом броју пацијената којима је рађена коронарографија, као део клиничког испитивања код оштећења валвула, кардиомиопатије или аритмија, показала су да је SE била независна у односу на атеросклерозу (*Natali i sar., 2003*).

Осим повезаности за пол, SE је уско повезана са старошћу, нивоом хемоглобина, пушачким стажом, нивоом холестерола у серуму и хипертензијом. Такође, значајна корелација постоји и са нивоом триглицерида, наше глукозом и степеном физичке активности (*Bochen i sar., 2011*). Резултати овог истраживања указују на статистички значајну позитивну корелацију хипертриглицеридемије и SE у групи испитаника са стабилном ангином пекторис.

Danesh u cap. (2004) су поређењем прогностичких вредности укупног холестерола и крвног притиска са инфламаторним маркерима, као што су CRP, SE и von Willebrand фактор, утврдили да инфламаторни маркери имају сличан предиктивни потенцијал као и крвни притисак и липиди и да могу да послуже као предиктори у дугорочној прогнози болесника са исхемијском болешћу срца.

У Cox регресионом моделу атеросклерозе, у коме је разматрана кардијачна смрт као „крајња тачка“, фактори ризика какви су пол, хиперхолестеролемија и пушење, постали су статистички незначајни предвиђајући фактори у односу на SE, за коју се сматра да има значајну моћ предвиђања (*Natali i sar., 2003*). Ни присуство исхемије, нити предходни инфаркт миокарда не модификују ризик од кардијачне смрти који постоји код високе SE. У принципу, овај податак о повезаности SE и кардијачне смрти може се применити само на пацијенте са високим ризиком за исхемијску болест срца.

Nilton u cap. (2009) истичу да одређивање SE, у предвиђању ризика од првог коронарног догађаја, има релативно малу сензитивност. Додатна истраживања су неопходна да би објаснила зашто ниво CRP, у жена, предвиђа ризик за појаву миокардне исхемије, а ниво SE не.

У проспективној студији *Ingelsson u cap. (2005)*, SE је значајан предиктор срчане инсуфицијенције, независно од познатих фактора ризика какви су хипертензија, дијабетес, хипертрофија леве коморе, пушење, гојазност и ниво холестерола у серуму.

Кохортна студија *Steinvil u cap. (2008)* је показала да су главне детерминанте SE пол, ниво фибриногена, хемоглобин, глобулини и триглицериди и да SE није уско повезана са старошћу. Такође, указала је на значај SE у раном откривању хиперфибриногемиије и на потенцијалну улогу SE у откривању микроинфламације и субклиничке атеросклерозе у привидно здравој популацији.

6.4.2. Нестандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца

6.4.2.1. Неоптерин у исхемијској болести срца

Инфламација има кључну улогу у развоју атеросклерозе, од иницијалне, стабилне атеросклеротске лезије, до дисрупције (руптура, ерозија или фисура) нестабилног атеросклеротског плака и развоја акутног коронарног синдрома (*Libby i sar., 2002*). У вулнерабилном атеросклеротском плаку, IFN- γ , ослобођен од стране активираних Т-лимфоцита, стимулише макрофаге да продукују неоптерин. Неоптерин стимулише транслокацију NF- κ B, који има централну улогу у активацији ендотела, из инактивног комплекса у цитосолу у једру, где се везује за промоторе циљних гена и индукује експресију ћелијских адхезионих молекула, цитокина, фактора раста и многих других

молекула одговорних за дисрупцију атеросклеротског плака и прогресију коронарне артеријске болести (*Pacileo i sar., 2000; Cirillo i sar., 2006*).

Литературни подаци, у последњих неколико година, указују на потенцијалну улогу неоптерина, имуног медијатора продукованог од стране активираних макрофага, у стратификацији кардиоваскуларног ризика код пацијената са коронарном болешћу срца. Удруженост повишених нивоа неоптерина и атеросклерозе, па последично и повећаног кардиоваскуларног ризика, је потврђена резултатима ранијих истраживања (*Garcia-Moll i sar., 2000; Avanzas i sar., 2004; Ray i sar., 2007; Kaski i sar., 2008*).

Неоптерин је „стимуланс“ инфламације и нестабилности атеросклеротског плака (*Adachi i sar., 2007*).

Недавно објављени резултати студије *Kaski i sar. (2008)* су показали да је повећана концентрација неоптерина у серуму независни предиктор будућих кардиоваскуларних догађаја код пацијената са инфарктом миокарда без елевације СТ-сегмента. Налаз повећане концентрације неоптерина на пријему значајан је предиктор инфаркта миокарда, нестабилне ангине пекторис или срчане смрти, већ у току шестомесечног праћења пацијената. Неоптерин је не само маркер клиничког исхода пацијената са коронарном болешћу срца, већ има и важну улогу у патогенези и прогресији коронарне артеријске болести.

Garcia-Moll u cap. (2000) су нашли значајно веће концентрације неоптерина код жена које болују од нестабилне ангине пекторис у односу на оне са стабилном ангином пекторис. Код жена са стабилном ангином пекторис, које су у току периода праћења од годину дана, развиле неки од нежељених коронарних догађаја, доказане су значајно веће концентрације неоптерина у односу на оне код којих није било коронарних догађаја. Просечне базичне вредности неоптерина су биле исте код жена са нестабилном ангином пекторис и код жена са стабилном ангином пекторис које су развиле кардијачне догађаје. Ово се објашњава тиме да је активност болести независна од клиничке стабилности и да је водећи фактор који утиче на серумске концентрације неоптерина. Налаз повећане концентрације неоптерина идентификује „вулнерабилног“ пацијента, како међу пацијентима са стабилном ангином пекторис, тако и са акутним коронарним синдромом (*Kaski i sar., 2005*).

Показано је да су повишени нивои неоптерина код пацијената са стабилном ангином пекторис повезани са бржом прогресијом болести. То указује на значај неоптерина у активацији и прогресији исхемијске болести срца (*Zouridakis i sar., 2004*).

Резултати ове студије су показали да су највише вредности неоптерина добијене у групи пацијената са нестабилном и са стабилном ангином пекторис и статистички су се значајано разликовале у односу на вредности у акутном инфаркту миокарда и у односу на контролу. Налаз повишених вредности неоптерина у серуму пацијената са стабилном ангином пекторис указују да је активност болести присутна упркос клиничкој стабилности. Ови резултати се слажу са добијеним подацима из литературе и говоре у прилог постојања нестабилног атеросклеротског плака.

Zouridakis u cap. (2004) су указали на уску повезаност повишених нивоа неоптерина са ангиографски верификованом прогресивном стенозом коронарних крвних судова код пацијената са стабилном ангином пекторис. Такође, и повишене вредности неоптерина код пацијената са акутним коронарним синдромом су у позитивној корелацији са укупним бројем сигнификантних коронарних лезија и кардиоваскуларним ризиком (*Avanzas i sar., 2004*).

Повећана концентрација неоптерина снажан је предиктор целокупног и кардиоваскуларног морталитета код пацијената подвргнутих перкутаној коронарној интервенцији, независно од ангиографског налаза и од стадијума исхемијске болести срца. Повећан ризик од смрти при високим концентрацијама неоптерина забележен је како код пацијената са стабилном и нестабилном ангином пекторис, са инфарктом миокарда, тако и код особа без доказане кардиоваскуларне болести (*Grammer i sar., 2009*).

Значај LURIC (*Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study*) студије, која је испитивала дијагностичку и прогностичку улогу неоптерина, је у томе што указује на значај неоптерина као независног предиктора како кардиоваскуларног морталитета, тако и целокупног морталитета, код пацијената са и/или без коронарног обољења (*Grammer i sar., 2009*). Ова корелација повишеног нивоа неоптерина у плазми и ризика целокупног и кардиоваскуларног морталитета је независна од традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика, ангиографски доказане коронарне болести срца, па чак и од CRP, најупотребљивијег инфламаторног биомаркера за прогнозу кардиоваскуларних догађаја.

Повишен ниво неоптерина у плазми је поуздан показатељ ризика дугорочног морталитета независно од нивоа CRP (*Ray i sar., 2007*). Концентрација неоптерина мерена након 7 дана, 4 месеца и 2 године од акутног коронарног догађаја у PROVE IT–TIMI 22 (*The Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 trial*) трајалу није показала статистички значајну разлику, што је складу са текућим доказима да вредности неоптерина остају стабилне за дужи временски период и да су поуздан маркер у дугорочној прогнози.

Код пацијената са non-Q инфарктом миокарда комбинована евалуација концентрације CRP и неоптерина је значајнији предиктор будућих кардиоваскуларних догађаја од евалуације неоптерина (*van Haelst i sar., 2003*). Предходним истраживањем је показано да ниво неоптерина не корелише са маркерима кардијачне некрозе, указујући на то да имуна активација доприноси акутном коронарном догађају, пре него да рефлектује имуни одговор на миокардно оштећење (*Auer i sar., 2001*).

Резултати овог рада указују да постоји статистички значајна негативна корелација нивоа неоптерина и инфламаторних биомаркера, као што су фибриноген и укупан број леукоцита у групи пацијената са стабилном ангином пекторис.

Занимљиво је, да и поред појаве оксидативног стреса код пушача, није нађена позитивна корелација нивоа неоптерина и пушачког стажа (*Schennach i sar., 2002; Grammer i sar., 2009*). Ово се може објаснити супресијом Th1-лимфоцита код пушача, који су одговорни за секрецију IFN- γ , најзначајнијег стимулатора продукције неоптерина (*Moszczynski i sar., 2001*). Ови резултати су у корелацији са резултаима нашег истраживања.

Испитивање повезаности нивоа неоптерина и употребе статина, пружа контроверзне резултате. Статини смањују продукцију неоптерина нисходном регулацијом имунореактивности Т-ћелија и макрофага у *in vitro* условима, као и у клинички контролисаним студијама код пацијената који су подвргнути коронарној ангиографији. Статини такође учествују у супресији цитокина и експресији адхезионих молекула путем редукције активности NF- κ B у инфламаторним и васкуларним ћелијама (*Neurauter i sar., 2003; van Haelst i sar., 2003; Walter i sar., 2003*).

Подаци из недавно објављене студије *Grammer u cap. (2009)* показују да су нивои триглицерида и LDL-холестерола били снижени код пацијената са повишеним вредностима неоптерина. Инверзна корелација нивоа неоптерина и LDL-холестерола је потврђена независно од употребе статина. Ово се може објаснити утицајем акутне и/или

хроничне активације имуног система, на коју указују повишена концентрација неоптерина у плазми, на ослобађање IL-6 и усходну регулацију LDL-рецептора, што за последицу има смањење нивоа триглицерида и LDL-холестерола.

Резултати овог рада указују на статистички значајну негативну асоцијацију вредности неоптерина у плазми са хиперхолестеролемијом у групи пацијената са нестабилном ангином пекторис, што је у корелацији са резултатима *Şahin u cap. (2008)*. У овом истраживању, нису нађене статистички значајне промене нивоа неоптерина зависно од употребе статина, што доказују и резултати *Grammer u cap. (2009)*.

Постоје докази о повезаности повишених нивоа неоптерина у плазми и прекомерне телесне масе (индекс телесне масе $> 25\text{kg/m}^2$) (*Bozdemir i sar., 2006*). Само 10,81% пацијената у овој студији са стабилном ангином пекторис је било гојазно, 1,35% са нестабилном и 28,72% са акутним инфарктом миокарда, тако да у овом истраживању није било статистички значајне корелације нивоа неоптерина и гојазности.

Подаци из недавно спроведене студије *Estévez-Loureiro u cap., (2009)*, су показали да су концентрације неоптерина у серуму обрнуто пропорционалне ејекционој фракцији леве коморе код пацијената са стабилном ангином пекторис. Неоптерин је значајан предиктор степена дисфункције леве коморе и клинички користан маркер стратификације ризика за акутни коронарни догађај. Могуће патофизиолошко објашњење је да неоптерин стимулише пролиферацију глаткомишићних ћелија, индукује експресију iNOS, продукује велике, потенцијално цитотоксичне количине азот-моноксид радикала, да производи екстрацелуларни матрикс и интерстицијална колагена влакна. Све ово има за последицу дисфункцију ендотела, смањену коронарну резерву и смањену миокардну перфузију, апоптозу кардиомиоцита и ендотелних ћелије, цитотоксичност миоцита и/или инхибицију контракције миоцита (*Dominguez-Rodriguez i sar., 2006*). Како је ремоделовање леве коморе релативно честа последица инфаркта миокарда, а неоптерин предиктор дисфункције леве коморе код пацијената са коронарном болешћу срца, *Dominguez-Rodriguez u cap. (2010)* су испитивали повезаност неоптерина и В-тип натриуретског пептида (BNP-brain natriuretic peptide) са ехокардиографским параметрима ремоделовања леве коморе. Доказано је да је неоптерин независни предиктор ремоделовања леве коморе након једногодишњег праћења пацијената са инфарктом миокарда.

Повећана концентрација неоптерина је независни предиктор смрти код пацијената са субклиничком атеросклерозом (*Abdou i sar., 2009*). Нађена је и значајна корелација повишених нивоа неоптерина и степена каротидне стенозе (*Sugioka i sar., 2010*). Такође, постоје и докази о повезаности повишених нивоа неоптерина и болести периферне циркулације (*Pacileo i sar., 2007*).

Доказ повећане концентрације неоптерина у хипертензивних пацијената без опструктивних атеросклеротских промена коронарне циркулације, сматра се независним предиктором ризика будућег коронарног догађаја (*Avanzas i sar., 2004*).

У студији *Vengen u cap. (2009)* потврђена је улога неоптерина као независног предиктора фаталне исхемијске болести срца код пацијената који болују од дијабетес мелитус тип 2.

Многобројне студије указују на повишену вредност неоптерина код пацијената са исхемијском болешћу срца и висок степен корелације са активношћу болести. Ови резултати сугеришу да неоптерин може бити обећавајући маркер за праћење болесника са исхемијском болешћу срца. Тренутни подаци указују да се дијагностичка перформанса тестирања неоптерина може упоредити са добро познатим маркерима кардиоваскуларног ризика, као што су CRP и ниво холестерола у плазми.

6.4.2.2. Азот-моноксид у исхемијској болести срца

Ендотел има важну улогу у васкуларној хомеостази јер модулише регулацију пермеабилности липопротеина, адхезије леукоцита, ослобађање прокоагулантних и антикоагулантних фактора, фактора раста и вазоактивних супстанци. Оштећењем ендотела и дејством многобројних кардиоваскуларних фактора ризика, долази до активације и дисфункције ендотелних ћелија која је у основи атеросклерозе и атеротромбозе. Кардиоваскуларни фактори ризика, већину својих непожељних биолошких ефеката на васкуларни ендотел остварују управо ремећењем метаболизма NO. Азот-моноксид је кључни релаксирајући фактор ендотелног порекла са незаменљивом улогом у одржавању базалног тонуса и акутне реактивности артеријске моторике (*Yasa i Türkseven, 2005; Kleinbongard i sar., 2006*)

Неравнотежа продукције и деградације NO представља водећи механизам комплексне патогенезе ендотелне дисфункције и атеросклерозе. Иако многе студије са инхибиторима NOS указују на протективну улогу NO у кардиоваскуларном систему, ове студије не искључују могућност да и прекомерна продукција NO може имати штетну улогу (*Malyshev i sar., 1999; Brunner i sar., 2003; Kobara i sar., 2003*). Повећана синтеза NO настаје као последица индукције експресије iNOS у току запаљенске реакције у активираним макрофагима, у кардиомиоцитима и у васкуларним глаткомишићним ћелијама (*Muller i sar., 2000*). Значајну улогу у индукцији експресије iNOS има активација транскрипционог фактора NF-κB, која је кључна за покретање многих процеса, као што су инфламација, пролиферација, диференцијација и апоптоза (*Pavlović i sar., 2002*). Индуцибилна NOS продукује NO сатима/данима, након иницијалног периода потребног за синтезу протеинског молекула ензима. Ниске концентрације NO, створене дејством конститутивних NOS, су кардиопротективне и испољавају вазодилататорну, антиинфламаторну (спречава експресију адхезионих молекула на мембрани ендотелних ћелија и интеракцију са леукоцитима, спречава синтезу проинфламаторних цитокина од стране ендотелних и глаткомишићних ћелија), антипролиферативну (спречава синтезу неких фактора раста) и антиагрегациону улогу (спречава агрегацију тромбоцита). Сматра се да су високе концентрације NO, настале дејством iNOS, про-атерогене јер доводе до дестабилизације атеросклеротског плака различитим механизмима (*Wever u cap., 1998*). Азот-моноксид реагује са супероксид анјон радикалом и формира пероксинитрит, који подстиче адхезију и агрегацију тромбоцита, индукује васкуларну хиперреактивност и врши нитровање тирозина и тирозинских остатака. Цитотоксична дејства пероксинитрита су приписана iNOS (*White i sar., 1994; Buttery i sar., 1996; Ryou i sar., 2008*). Међутим, друге студије, указују на анти-атерогену улогу активације iNOS и следствене повећане продукције NO, која се огледа у вазодилатацији и инхибицији адхезије леукоцита и миграције и пролиферације глаткомишићних ћелија у атеросклеротском плаку. Улога iNOS у атеросклеротском плаку је контроверзна јер испољава и протективно и патогено дејство (*Fukumoto i sar., 1997*).

Нестабилност атеросклеротског плака у коронарним крвним судовима се доводи у везу са повећаном експресијом iNOS (*Moreno i sar., 1994; Behr-Roussel i sar., 2000*) и истовремено са смањеном експресијом mRNA за eNOS (*Oemar i sar., 1998*). Дисбаланс настаје када због нисходне регулације eNOS долази до индукције и iNOS и nNOS (*Wilcox i sar., 1997*) и следствене хиперпродукције NO, или пак услед смањене експресије супероксид дизмутазе, ензима који спречава формирање пероксинитрита (*Luoma i sar.,*

1998). Док експериментални радови на зечијем моделу атеросклерозе демонстрирају пораст експресије eNOS и mRNA за eNOS у атеросклерозом захваћеној аорти, упркос поремећају ендотел-зависне релаксације (највероватније због инактивације NO супероксидом) (Kanazawa i sar., 1996). Oemar u cap. (1998) указују на смањено ослобађање NO и смањену експресију eNOS у хуманом атеросклеротском плаку. Могуће патофизиолошко објашњење је у трајању атеросклеротског процеса. Сматра се да се нормална или повећана експресија eNOS и продукција NO јавља у раним стадијумима атеросклерозе. Прогресивне, комплексне атеросклеротске лезије карактерише смањена продукција NO и смањена експресија eNOS. Абнормална ендотел-зависна релаксација у раном стадијуму атеросклерозе може бити последица смањења супстрата и/или концентрације кофактора или пак повећане продукције супероксида. Зато администрација L-аргинина или кофактора BH4 поправља функцију ендотела само у раним фазама атеросклерозе и у микроциркулацији, када још није дошло до развоја атеросклеротског плака, али не и у епикардним коронарним крвним судовима пацијената са клинички релевантним коронарним обољењем (Drexler i sar., 1991).

Хипоксија може утицати на продукцију NO, на концентрацију NO у ткивима и на експресију NOS, на неколико начина: ограничена продукција NO услед неадекватног NOS супстрата; ефекат O₂ на NOS „feedback“ инхибицијом; модулација биорасположивости NO; индукција хипоксија индуцибилног фактора-1 и других NOS транскрипционих фактора; промене у интрацелуларној концентрацији Ca²⁺ и инфлукусу Ca²⁺; и индукција NOS регулаторних *heat shock* протеина (Manukhina i sar., 2006).

Клинички и експериментални модели коронарне исхемије су доказали штетну улогу неутрофила у прогресији миокардног оштећења због њихове способности да продукују реактивне врсте кисеоника, пре свега супероксид-анјон радикал. Недавно је доказано да неутрофили могу да продукују и NO. Ослобођен из активисаних неутрофила NO спречава адхезију неутрофила за васкуларни ендотел и контролише агрегацију и адхезију тромбоцита у окружењу. Sánchez de Miguel u cap. (2002) су указали на значајно повећану продукцију NO у неутрофилима пацијената који су прележали акутни инфаркт миокарда у односу на пацијенте са нестабилном ангином пекторис. Повећана продукција NO је праћена и индукцијом експресије iNOS изоформе. Такође, способност NO ослобођеног из неутрофила пацијената са акутним инфарктом миокарда да повећа концентрацију cGMP у тромбоцитима је смањена, у односу на способност NO ослобођеног из неутрофила пацијената са нестабилном ангином пекторис. Ове разлике у NO могу делом допринети другачијем формирању тромба унутар коронарног крвног суда пацијената са акутним инфарктом миокарда у односу на пацијенте са нестабилном ангином пекторис.

Ендотелне ћелије у нормалним околностима поседују механизме којима се спречава адхезија, активација и агрегација тромбоцита. Синтеза медијатора од стране интактног ендотела, као што су NO, простагландин (PGI₂) и ензим ADP-аза, инхибира функцију тромбоцита (Marcus i sar., 2001). Не само да NO смањује адхезију тромбоцита, већ има и улогу моћне антиагрегационе супстанце. Феномен резистенције тромбоцита на антиагрегациони ефекат NO и простагландина доказан је у пацијената са стабилном ангином пекторис (Chirkov i sar., 1995). Chirkov u cap. (2001) су показали да је у акутном коронарном синдрому израженији феномен тромбоцитне резистенције на антиагрегациони ефекат NO него у стабилној ангини пекторис. Резистенција на NO индуковану инхибицију агрегације тромбоцита је посредована повећаним концентрацијама супероксид анјон радикала и делимичном инактивацијом солубилне гванилат циклазе (Chirkov i sar., 1999).

У студији *Katoh i sar. (2002)* ниске концентрације NO пореклом из тромбоцита код болесника са кардиоваскуларним обољењем корелирају са смањеном продукцијом ендотелног NO. Концентрација NO пореклом из тромбоцита опада како расте број кардиоваскуларних фактора ризика. Резистенција тромбоцита на NO је значајан предиктор кардиоваскуларног морбидитета и морталитета код високо ризичних пацијената и сензитивнији прогностички маркер у односу на традиционалне маркере ендотелне дисфункције (*Willoughby i sar., 2005*).

Многи експериментални радови на животињском моделу су показали да повећана експресија iNOS рефлектује нестабилност атеросклеротског плака. *Depre i sar. (1999)* су први доказали повећану експресију iNOS у хуманом атеросклеротском плаку пацијената са нестабилном ангином пекторис. Показано је да су TNF- α позитивни макрофаги присутни како у стабилном, тако и у нестабилном атероматозном плаку, док је iNOS доказана искључиво у нестабилној лезији. Постоји висока корелација интракоронарне тромбозе, анамнезе учесталих болова у грудима у миру и повећане експресије iNOS у атеросклеротском плаку (*Depre i sar., 1999*). Резултати ове студије су у корелацији са претходно поменутих подацима и говоре у прилог активације нестабилног атеросклеротског плака, пошто је највећа активност iNOS забележена у групи пацијената са нестабилном ангином пекторис. Праћење активности iNOS представља валидан параметар у процени активности атеросклеротичног плака и може омогућити стратификацију пацијената са исхемијском болешћу срца.

Експериментални радови на зечијем моделу демонстрирају повишену концентрацију нитрита и нитрата ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), оксидативних производа NO у плазми, трећег дана након лигатуре коронарне артерије и симултану миокардну индукцију експресије iNOS. Активност iNOS расте првог постоперативног дана, перзистира најмање 14 дана и нормализује се три седмице након експериментално изазване исхемије миокарда (*Akiyama i sar., 1997*).

У биолошком експерименталном моделу акутног инфаркта миокарда доказан је максимални пад биорасположивости NO седмог дана након прележаног инфаркта миокарда и његово перзистирање током идућа 42 дана са истовременим развојем генерализованог ремоделовања миокарда (*Csanyi i sar., 2006*). Налаз знатно нижих серумских нивоа $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ код болесника са акутним коронарним синдромом маркер су значајне ендотелне дисфункције и оштећене коронарне перфузије (*Rizk i sar., 2004*). У студији *Djordjevic i sar. (2008)*, серумски нивои $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у акутном инфаркту миокарда, идентификују пацијенте који су под већим ризиком од настанка поновног коронарног догађаја. У групи пацијената са стабилном ангином пекторис, вредности $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ рефлектују будућу нестабилност атеросклеротског плака.

Резултати овог истраживања указују на статистички значајано повишене вредности $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ код пацијената са акутним инфарктом миокарда и са нестабилном ангином пекторис, у односу на контролне вредности. Нешто мања статистичка значајност постоји и у односу на групу пацијената са стабилном ангином пекторис. Овакав налаз се може објаснити ослобађањем NO из активираних тромбоцита у току агрегације, упркос употреби аспирина, попут оне резистенције тромбоцита на антиагрегациони ефекат NO која се описује у пацијената са исхемијском болешћу срца.

Сматра се да један део $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у плазми настаје као последица прекомерне активације eNOS у коронарном, церебралном или периферном васкуларном ендотелу. (*Wiest i sar., 1999*). Да постоје и други извори повећане продукције $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у плазми потврђује налаз *Akiyama i sar. (1997)* само делимичног смањења плазматских нивоа NO_2^-

NO_3^- под дејством S-метилизотиоуреа, селективног инхибитора iNOS у експерименталном моделу акутног инфаркта миокарда. Други могући разлог повећане концентрације $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у плазми је акумулација нитратног аниона када продукција $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ превазилази њихову елиминацију (Zeballos *i sar.*, 1995). Такође, и смањен ренални клиренс $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, који се јавља у хроничној срчаној инсуфицијенцији, може довести до повећане концентрације $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у плазми (Winlaw *i sar.*, 1994). Пораст концентрације $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ у плазми болесника са хроничном срчаном инсуфицијенцијом, настаје и услед повећане експресије mRNA за iNOS у миокарду (Haywood *i sar.*, 1996). Селективна инхибиција iNOS код мишева са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом значајно редукује морталитет и поправља дијастолну дисфункцију и ремоделовање миокарда, чиме је потврђена патофизиолошка улога, iNOS продукованог NO, у овом обољењу (Saito *i sar.*, 2002). Високе концентрације NO имају директно цитотоксично и проапоптозно дејство на кардиомиоците (Fukuchi *i sar.*, 1998).

Налаз повећане експресије iNOS и смањене експресије mRNA за eNOS откривен је у стањима исхемије и у хиперхолестеролемији (Kawashima *i Yokoyama*, 2004). Испитивањем липидно-независног ефекта статина на синтезу NO, доказано је да статини превенирају поремећај регулације eNOS изазван хипоксијом, стабилизовањем mRNA за eNOS (Alfon *i sar.*, 1999; Madonna *i sar.*, 2005; Jones *i Bolli*, 2006). Симвастатин активира протеин киназу Б у ендотелним ћелијама, што доводи до фосфорилације eNOS протеина и пораста њихове активности, самим тим и до повећане продукције NO. Флувастатин смањује стварање супероксид аниона, чиме се смањује и везивање NO и стварање пероксинитрита. Статини значајно супримирају експресију iNOS и повећавају интратромбоцитни ниво NO (Tannous *i sar.*, 1999). За разлику од поменутих резултата, испитивањем липидно-независног ефекта статина на експресију iNOS, добијене су ниже вредности овог ензима у свим групама болесника, али та разлика није била статистички значајна. Такође, у овој студији, нису нађене статистички значајне промене концентрације $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ зависно од употребе статина.

6.4.2.3. Асиметрични диметиларгинин у исхемијској болести срца

Смањено стварање NO у ендотелу води повећаној адхезивности и активацији леукоцита и тромбоцита, ослобађању бројних вазоактивних молекула, цитокина и фактора раста и повећаној пропустљивости унутрашњег слоја крвног суда. Поремећај синтезе NO може бити један од првих догађаја у патогенези ендотелне дисфункције и атеросклерозе (Davignon *i Ganz*, 2004). Повећана синтеза ендогеног инхибитора NOS, ADMA, се доводи у везу са губитком функције NO система у атеросклерози (Cooke, 2000).

Од самог открића, као ендогеног инхибитора, од стране Vallance *u cap.* (1992), истиче се значајна улога ADMA у ендотелној дисфункцији и патогенези атеросклерозе. Налаз повећане концентрације ADMA у раној фази атеросклерозе указује да ADMA може бити не само маркер, већ и медијатор васкуларног оштећења (Böger, 2005).

Неколико проспективних епидемиолошких студија су показале да је повишен ниво ADMA у плазми повезан са кардиоваскуларним обољењем. У проспективној студији Valkonen *u cap.* (2001), мушкарци без клиничких знакова постојања болести са вредностима ADMA > 0,62 $\mu\text{mol/L}$ имају 3,9 пута већи ризик за настанак акутног коронарног догађаја. Krempl *u cap.* (2005) су спровели прву проспективну студију која је имала за циљ да упореди вредности ADMA у стабилној са вредностима у нестабилној

ангини пекторис. Подаци указују да су концентрације ADMA значајно више код пацијената са нестабилном ангином пекторис. У овој групи пацијената је забележен значајан пад концентрације ADMA 6 седмица након перкутане коронарне интервенције којом је постигнута комплетна реваскуларизација. Међутим, нивои ADMA остају повећани код болесника са нестабилном ангином пекторис који су развили коронарни догађај током периода праћења. За разлику од стабилне ангине пекторис, акутни коронарни синдром је удружен са повећањем оксидативног стреса и појачаном продукцијом цитокина. Перзистентна елевација ADMA у нестабилној ангином пекторис могуће да рефлектује перзистентни оксидативни стрес и њиме изазвану ендотелну дисфункцију. Могуће патофизиолошко објашњење клиничког погоршања ових пацијената током периода праћења лежи управо у оксидативним стресом појачаној продукцији ADMA (*Krempl i sar., 2005*). Налаз значајне корелације неоптерина, маркера имуне активације, и ADMA код ових пацијената, указује и на потенцијалну улогу имуне активације у повећаној продукцији ADMA (*Murr i sar., 2009*).

У овом раду су забележене статистички значајно повишене вредности ADMA код свих испитиваних група пацијената у односу на контролну групу испитаника. Највеће повећање је забележено код болесника са нестабилном ангином пекторис, што је у корелацији са резултатима *Vae u cap. (2005)*. Налаз повећане концентрације ADMA код ових пацијената одражава активност атеросклеротског плака и указује на његову вулнерабилност. Резултати овог рада истичу ADMA као маркер са највећом површином испод криве у све три групе пацијената и најбољом осетљивошћу и специфичношћу код болесника са стабилном и са нестабилном ангином пекторис и кандидују га за најбољег индикатора активности атеросклеротске лезије.

Налаз повишених вредности ADMA, мерене препроцедурално, код пацијената са стабилном ангином пекторис који су подвргнути перкутаној коронарној интервенцији, указује на значај ADMA у предвиђању кардиоваскуларних акцидентата (инфаркт миокарда, поновна реваскуларизације, срчана смрт) (*Lu i sar., 2003*). Значајно повећани нивои ADMA на пријему пацијената са инфарктом миокарда, који су подвргнути примарној перкутаној коронарној интервенцији, независни су предиктор једногодишњег морталитета и имају могућност идентификације високо ризичних пацијената са нарушеном миокардном перфузијом и лошом прогнозом (*Sen i sar., 2011*).

Концентрација ADMA у плазми је повишена код пацијената са атеросклерозом, хипертензијом, дијабетес мелитусом, хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, хиперхолестеролемијом и у позитивној је сразмери са факторима ризика за ове поремећаје и са ризиком настанка коронарног догађаја, указујући да ADMA може бити нови маркер кардиоваскуларног догађаја (*Lenzen i sar., 2006*).

Проспективна студија *Furuki u cap. (2008)* је показала (мултипла линеарна регресиона анализа) да је ADMA снажан независни предиктор прогресије каротидне атеросклерозе и након прилагођавања за познате факторе ризика, као што су: хипертензија, хиперхолестеролемија, дијабетес мелитус и пушење.

У рандомизираној, дупло слепој, плацебо контролисаној студији *Achan u cap. (2003)* су на 12 здравих, нормотензивних добровољаца доказали статистички значајно смањење срчане фреквенције и минутног волумена и значајан пораст крвног притиска и системске васкуларне резистенције након интравенске апликације ADMA.

Нивои ADMA предвиђају настанак кардиоваскуларних догађаја код пацијената оболелих од дијабетес мелитуса тип 2. *Krzyzanowska u cap. (2007)* су показали да је комбинована евалуација CRP и ADMA много боља за детекцију кардиоваскуларног ризика

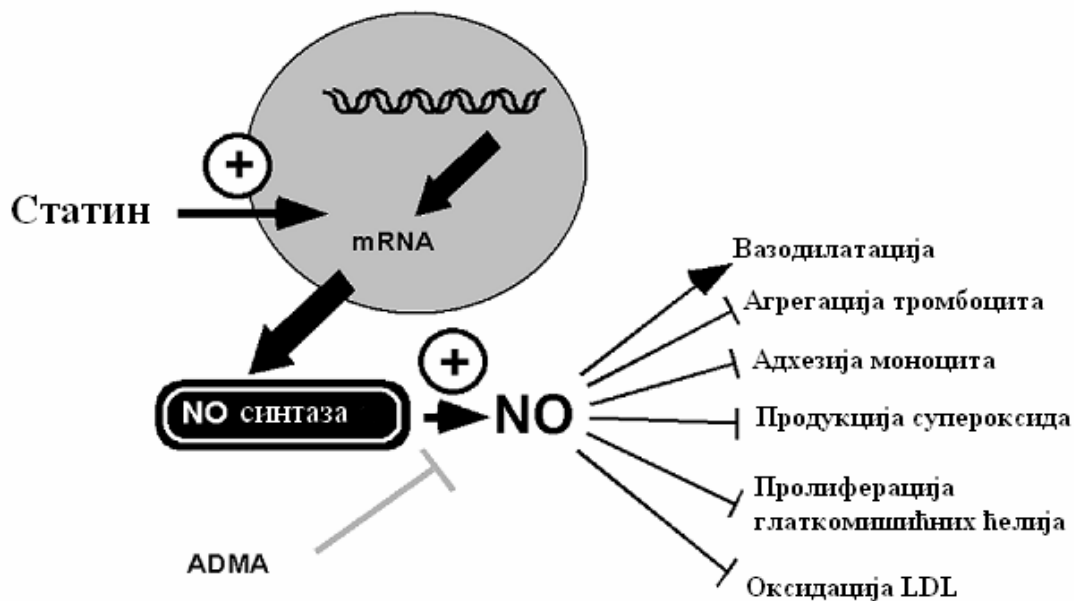
код ових пацијената од оба ова маркера понаособ, као и да ADMA увећава предиктивну вредност CRP. У овој проспективној кохортној студији, пацијенти са нивоима ADMA и CRP у највишој терцили имали су 4,5 пута већи ризик за појаву кардиоваскуларног догађаја у односу на оне са вредностима ADMA и CRP у најнижој терцили. Повишена концентрација ADMA код пацијената са дијабетесом је значајан предиктор и фактор стратификације ризика будућих коронарних догађаја независно од бројних клинички значајних предиктора, као што су године старости, ангиографски регистрована коронарна атеросклероза и инфламаторни маркери, CRP и фибриноген. Повећан ниво ADMA код ових пацијената је не само предиктор нефаталног инфаркта миокарда, можданог удара и коронарног морталитета, већ и значајан предиктор укупног морталитета (*Cavusoglu i sar., 2010*). Резултати ове студије указују на статистички значајну позитивну корелацију ADMA и дијабетеса код пацијената са акутним инфарктом миокарда, што се уклапа у досадашње литературне податке.

Код пацијената са терминалним стадијумом бубрежне инсуфицијенције су доказане повећане концентрације ADMA и удруженост са значајно већим ризиком од кардиоваскуларног морталитета (*Zoccali i sar., 2001*). Повишене вредности ADMA су нови предиктивни параметар активне атеросклерозе код ових пацијената и независне су од претходне историје о кардиоваскуларном обољењу, класичних фактора ризика за атеросклерозу (дијабетес, хиперхолестеролемија, хипертензија, пушење) (*Zoccali i Boger, 2003*) и маркера инфламације (CRP, BNP) (*Mallamaci i sar., 2005*).

Активни пушачи имају значајно ниже концентрације ADMA у односу на непушаче. Међутим, вредности ADMA након престанка пушења су значајно више у односу на непушаче. Специфични путеви којима пушење модулира концентрације ADMA у плазми остају нејасни (*Sobczak i sar., 2009*). У овом раду постоји статистички значајна негативна корелација ADMA и пушења код болесника са акутним инфарктом миокарда. Негативна корелација пушења и ADMA описана је и од стране *Eid u cap. (2004)* и *Onat u cap. (2008)*.

Доказано је да жене старије животне доби (старије од 50 година) имају значајно виши ниво ADMA у односу на мушкарце истих година. Ова разлика између полова је изгледа условљена хормонским догађањима у организму жена у постменопаузи, обзиром да се повећане концентрације ADMA нормализују након хормонске супституционе терапије. У прилог овоме говоре и подаци да жене у репродуктивном периоду имају значајно ниже вредности ADMA у односу на мушкарце (*Post i sar., 2003; Schulze i sar., 2005*).

Показано је да статини побољшавају NO-зависну васкуларну релаксацију различитих васкуларних корита тако што усходно регулишу експресију eNOS. *Janatuinen u cap. (2003)* су указали на значајну улогу ADMA у модулацији васкуларних ефеката статина. Примарни циљ студије је био да се испита ефекат концентрације ADMA на клинички бенефит статина младих мушкараца са умереном хиперхолестеролемијом. Студија је показала статистички значајно повећање миокардног протока, за 35%, код пацијената са ниским концентрацијама ADMA ($< 0,35 \mu\text{mol/L}$), док је у групи пацијената са вредностима ADMA изнад $0,35 \mu\text{mol/L}$ изостао клинички бенефит статина. Могуће објашњење одсуства позитивних ефеката статина на ендотелну функцију (повећана ендотелна продукција NO, услед усходне регулације генске експресије NOS) је због компетитивне инхибиције ензима повећаним концентрацијама ADMA (*Böger, 2003*).



Слика 27. Ефекат статина на синтезу NO (Böger, 2003).

Päivä u sar. (2003) су показали да примена статина није довела до смањења концентрације ADMA у плазми. Такође и рандомизирана, дупло слепа, плацебо контролисана студија *Valkonen u sar. (2003)* у трајању од 8 седмица, није показала клиничку корист од примене статина у редукцији нивоа ADMA.

У овом раду, испитивањем липидно-независног ефекта статина на концентрацију ADMA у плазми, нису добијене статистички значајно смањене вредности ADMA код пацијената који су третирани статинима у односу на пацијенте који нису третирани статинима, за све испитиване групе, што је у корелацији са резултатима горе наведених студија.

За разлику од поменутих резултата у мултицентричној студији *Lu u sar. (2004)* на 46 пацијената са повишеним LDL-холестеролом, који су третирани росувастатином у дози од 10 mg/дан или плацебом у трајању од 6 седмица, запажено је значајно смањење нивоа ADMA и LDL-холестерола. *Nishiyama u sar. (2011)* су указали на користан ефекат статина у превенцији атеросклеротске болести пацијената са исхемијским можданим ударом услед редукције вредности ADMA, чак и у пацијената са нормалним вредностима LDL-холестерола. Специфични путеви којима статини утичу на концентрације ADMA у плазми остају нејасни.

6.4.2.4. Фактор некрозе тумора- α у исхемијској болести срца

Фактор некрозе тумора- α је проинфламаторни цитокин са значајном улогом у патогенези многих кардиоваскуларних обољења, као што су атеросклероза, акутни инфаркт миокарда, хронична срчана инсуфицијенција, вирусни миокардитис (*Meldrum i sar., 1998*). Синтетише се у атеросклеротском плаку, од стране макрофага, пенастих ћелија и мастоцита, где подстиче ћелијску инфилтрацију и стимулише стварање других цитокина

чиме доприноси дестабилизацији плака и формирању тромба (Libby, 2006). Због значајне улоге у ослобађању ендотелних адхезионих молекула, активацији леукоцита и секрецији фактора активације тромбоцита, TNF- α се сматра једним од водећих фактора иницијације и прогресије атеросклерозе (Ozeren i sar., 2003; Kleinbongard i sar., 2010). Описана је значајна позитивна корелација концентрације TNF- α и солубилних адхезионих молекула, као и концентрације TNF- α и дебљине интимо-медијалног комплекса, што сугерише његову улогу као маркера субклиничке атеросклерозе (Skoog i sar., 2002).

Повећана концентрација TNF- α код пацијената са нестабилном ангином пекторис маркер је дестабилизације нестабилног атеросклеротског плака и значајан фактор стратификације ризика за акутни коронарни догађај. Значајно повишена концентрација TNF- α код ових пацијената, сугерише његову удруженост са минималним оштећењем кардиомиоцита. Минорно повећање тропонина настаје услед тромба у коронарном крвном суду и микроваскуларне емболизације и говори у прилог минималног миокардног оштећења код пацијената са нестабилном ангином пекторис. Значајна разлика нивоа TNF- α и IL-6 између коронарног синуса и корена аорте код ових пацијената, посебно код оних са повећаним TnT, указује на миокардну продукцију цитокина и на њихову удруженост са оштећењем кардиомиоцита, руптуром плака и формирањем тромба. Рана миокардна инфламаторна активација код пацијената са нестабилном ангином пекторис показатељ је лоше прогнозе (Cusack i sar., 2002).

Mizia-Stec и сар. (2002) су одређивањем концентрације проинфламаторних (TNF- α , IL-2) и антиинфламаторних цитокина (IL-10) у плазми болесника са стабилном и са нестабилном ангином пекторис добили статистички значајан пораст концентрације TNF- α у обе групе болесника у односу на контролу групу здравих испитаника. Резултати ове студије одступају од претходно изнетих података, јер једина статистички значајна разлика у вредности TNF- α постоји код пацијената са акутним инфарктом миокарда у односу на групу пацијената са стабилном ангином пекторис и у односу на контролне вредности, док код пацијената са нестабилном ангином пекторис нема статистички значајне разлике у односу на контролу.

Перзистентна елевација TNF- α код пацијената који су прележали инфаркт миокарда, указује на 3 пута већи ризик за настанак реинфаркта или коронарне смрти. Ови ефекти су били независни од свих других фактора ризика и били су присутни и међу непушачима, као и код негојазних пацијената, два фактора ризика, пушење и гојазност, за које се зна да повећавају ниво TNF- α у плазми (Ridker i sar., 2000). Чињеница, да су узорци крви ових пацијената добијени унутар 9 месеци од прележаног инфаркта миокарда, указује да повећан ризик за настанак кардијалног догађаја није само резултат пролазног повећања овог цитокина услед коронарне оклузије (Gabay i Kushner, 1999). Узрок перзистентне елевације TNF- α код ових пацијената остаје нејасан (Ridker i sar., 2000). Резултати ранијих истраживања указују да се продукција цитокина у акутном инфаркту миокарда одвија првенствено у инфламаторним ћелијама периинфарктне зоне и да је перзистентна елевација последица повећане инфилтрације инфламаторним ћелијама (Marx i sar., 1997). У експериментално изазваном инфаркту миокарда пацова, лигатуром предње леве десцендентне коронарне артерије, миокардна експресија TNF- α перзистира и након инфаркта, чак и у здравом сегменту миокарда. Перзистентна протеинска и генска експресија TNF- α у кардиомиоцитима, указује на потенцијалну дугорочну улогу овог цитокина у ремоделовању васкулатуре (Irwin i sar., 1999). Перзистентна инфламација и неколико месеци након инфаркта миокарда код појединаца који су на високом ризику за настанак рекурентног догађаја показатељ је коронарне исхемије. Претходно изнети

результати указују да субклиничка перзистентна нестабилност, односно склоност ка рекурентној нестабилности, може бити детектована концентрацијама TNF-а у плазми, чак и код наизглед стабилних пацијената након доброг клиничког опоравка.

Исхемичан миокард ослобађа TNF-а у количини довољној да изазове миокардну дисфункцију (*Shames i sar., 2002*). У току исхемије миокарда долази до значајног пораста концентрације TNF-а, услед локалне, миокардне продукције TNF-а у зони исхемије и услед продукције у макрофагима, моноцитима и мастоцитима периферне циркулације. Уколико дође до реперфузије и настане некроза кардиомиоцита, TNF-а се појачано ослобађа не само из исхемичног ткива, већ и из околног здравог миокарда. Такође, TNF-а ослобођен из миокарда може да активира механизам позитивне повратне спреге који ће покренути системску синтезу TNF-а и додатно компромитовати већ исхемичан миокард (*Takenaka i sar., 1998; Schulz i sar., 2004*). У експерименталном зечијем моделу, исхемија-реперфузија миокардног оштећења, третман TNF-а антителима смањује инфарктну зону. Такође, третман TNF-а антителима побољшава контрактилност оштећеног миокарда изазвано микроемболизацијом коронарне артерије у експерименту на псима (*Schulz i sar., 2004*).

Gao u cap. (2008), су истраживали микроваскуларни бенефит неутрализације TNF-а специфичним антителима, у исхемичном миокарду миша, пре него да настане реперфузија, у експерименталном моделу исхемија-реперфузија миокардног оштећења. Студија је имала за циљ да разјасни TNF-а иницирану ендотелну дисфункцију у коронарној микроциркулацији. Примена анти TNF-а антитела довела је до делимичне реституције NO-зависне коронарне вазодилатације, указујући да се TNF-а индукована микроваскуларна дисфункција одвија кроз NO-зависну сигналну каскаду. Такође, неутрализација TNF-а смањује продукцију ROS инхибицијом активности NAD(P)H оксидазе и ксантин оксидазе. Примена анти TNF-а антитела, пре него настане реперфузија, смањује експресију mRNA за TNF-а у исхемичном миокарду миша (*Zhang i sar., 2006; Gao i sar., 2007*).

Dinh u cap. (2009) су указали на значајну позитивну корелацију TNF-а и дијастолне дисфункције леве коморе у пацијената са стабилном коронарном болешћу, као и на значај инфламације у патогенези дијастолне дисфункције. Пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом имају повишене вредности TNF-а у плазми. Концентрација TNF-а у плазми пацијената са узрапредовалим стадијумом срчане инсуфицијенције представља снажан независан предиктор морталитета. Третман TNF-а антителима код ових пацијената није довео до клиничког побољшања (*Schulz i sar., 2004*).

Проспективна студија *Jefferis u cap. (2009)*, имала је за циљ да утврди повезаност TNF-а и ризика за настанак инфаркта миокарда и могућег удара у односу на познате кардиоваскуларне факторе ризика и инфламаторне маркере CRP и IL-6. Студија је показала статистички значајну позитивну корелацију TNF-а и ризика за настанак инфаркта миокарда. Степен значајности је смањен након прилагођавања за присутне кардиоваскуларне факторе ризика, а након прилагођавања за инфламаторне маркере CRP и IL-6 постаје статистички несигнификантан. Ова умерена повезаност TNF-а и ризика за настанак инфаркта миокарда дискредитује TNF-а као маркера стратификације ризика, али не умањују његову потенцијалну улогу у етиопатогенези кардиоваскуларних обољења. За разлику од поменутих резултата у Cox моделу и „инфламаторни“ фактори (CRP, IL-6, фибриноген) и фактори „оштећења“ (TnT, СКМВ, TNF-а) представљају независне предикторе ризика коронарне смрти и великих коронарних догађаја (коронарна смрт, нефатални инфаркт миокарда) (*Koukkunen i sar., 2001*).

Студија *Bruunsgaard i sar. (2000)* је показала да старије особе имају значајно више вредности TNF- α у плазми у односу на контролну групу младих испитаника. Такође, ово истраживање сугерише повезаност повећане концентрације TNF- α са бројним факторима ризика (висок ниво триглицерида, смањен однос HDL/триглицериди, висок CRP, леукоцитоза) који су одговорни за развој атеросклерозе и тромбоемболијских компликација. Повећана концентрација TNF- α предиктор је коронарног ризика у старих особа.

Бројне експерименталне студије указују на значај TNF- α у настанку липидних поремећаја и инсулинске резистенције. Примена TNF- α код здравих људи смањује инсулинску осетљивост, доводи до компензаторне хиперинсулинемије и индукује хипергликемију (*Raina i sar., 1995*). Експериментални радови на мишијем моделу демонстрирају да инфузија TNF- α , доводи до пораста концентрације триглицерида и холестерола у плазми (*Feingold i Grunfeld, 1987*). Уочено је да TNF- α снижава концентрацију HDL-холестерола у плазми. *Niemann-Jonsson i sar. (2000)* су указали на значајан пораст експресије mRNA за TNF- α у култури глаткомишићних ћелија аорте пацова стимулираних LDL-холестеролом. Повећана концентрација TNF- α у плазми последица је ox-LDL честицама стимулисане продукције моноцита и макрофага унутар атеросклеротског плака (*Jovinge i sar., 1996*). Скорашњи докази индикују да статини снижавају ниво TNF- α у плазми пацијената са коронарном артеријском болешћу и хиперхолестеролемијом. Механизам којим статини изазивају супресију TNF- α и адхезионих молекула се највероватније одвија путем редукције активности NF- κ B у инфламаторним и васкуларним ћелијама (*Ferro i sar., 2000*). У овом раду, није забележено статистички значајно смањење нивоа TNF- α у плазми пацијената третираних статинима.

7. Закључци

- Упркос интензивним истраживањима бројних маркера, не постоји маркер задовољавајуће сензитивности и специфичности за процену активности атеросклеротске лезије. С обзиром да инфламација има кључну улогу у процесу атеросклерозе, не само као фактор иницијације, већ и значајан фактор њене прогресије, ова студија је превасходно предузета у циљу утврђивања значаја маркера инфламације у исхемијској болести срца.
- Рани срчани маркери тропонин I, СК-МВ и СК који су одређивани у тренутку акутног коронарног догађаја, статистички су значајно повишени код болесника са акутним инфарктом миокарда. Болесници са нестабилном ангином пекторис имају значајно повишене вредности најсензитивнијег срчаног маркера тропонина I, док код болесника са стабилном ангином пекторис не постоји значано повишење вредности ниједног раног срчаног маркера.
- Средњи и касни срчани маркери исхемије миокарда (AST, ALT, LDH и HBDH) показују значајно повишене вредности код болесника са акутним инфарктом миокарда у односу на болеснике са стабилном ангином пекторис, нестабилном ангином пекторис, као и у односу на здраве испитанике. Болесници са нестабилном ангином пекторис имају значајно већу активност ензима HBDH и LDH у односу на болеснике са стабилном ангином пекторис.
- Анализом липидног статуса код болесника са исхемијском болешћу срца може се констатовати да се концентрација укупног холестерола и LDL-холестерола не разликују значајно од концентрација код здравих испитаника, док су концентрације HDL-холестерола значајно снижене код све три групе болесника у односу на контролу. Триглицериди су значајно повишени код све три групе болесника у односу на контролу.
- Пацијенти са стабилном ангином пекторис који су примали статине имали су значајно нижи укупни холестерол и LDL-холестерол, а значајно виши HDL-холестерол у односу на пацијенте који нису третирани овим леком.
- Највеће просечне вредности маркера hsCRP, фибриногена и леукоцита добијене су код испитаника са акутним инфарктом миокарда, а SE код испитаника са нестабилном ангином пекторис. Просечна вредност hsCRP је градуално расла са степеном исхемијске болести и значајно се разликовала између свих група пацијената.
- Концентрације hsCRP и SE су биле значајно више код болесника све три групе који нису примали статине у односу на болеснике који су примали ове хиполипемике.
- Значајно виша концентрација неоптерина уочена је код пацијената са стабилном ангином пекторис и нестабилном ангином пекторис у односу на акутни инфаркт миокарда и на контролну групу, док је концентрација TNF α била значајно виша код болесника са акутним инфарктом миокарда у поређењу са контролом и групом стабилне ангине пекторис. Активност iNOS је била највиша код болесника са нестабилном ангином пекторис и значајно се разликовала од активности ензима у контролној групи.

- Значајно виша концентрација NO је забележена у групи пацијената са акутним инфарктом миокарда и са нестабилном ангином пекторис, у односу на контролне вредности и стабилну ангину пекторис. Највећа концентрације ADMA је забележена код болесника са нестабилном ангином пекторис. Статистички значајан пораст концентрације ADMA добијен је у све три групе испитаника у односу на контролне вредности.
- Забележена је статистички значајна негативна корелација концентрације неоптерина и концентрације фибриногена, као и вредности неоптерина и вредности леукоцита у групи испитаника са стабилном ангином пекторис. У групи болесника са акутним инфарктом миокарда утврђена је статистички значајна позитивна корелација броја леукоцита и активности iNOS.
- Постоји статистички значајна позитивна корелација хипертриглицеридемије и седиментације еритроцита и пушења и вредности леукоцита у групи испитаника са стабилном ангином пекторис.
- Забележена је статистички значајна негативна корелација пушења и концентрације hsCRP, породичне анамнезе и фибриногена и породичне анамнезе и леукоцита, а значајна позитивна корелација гојазности и леукоцита у групи болесника са нестабилном ангином пекторис.
- Постоји статистички значајна позитивна корелација концентрације hsCRP и дијабетес мелитуса и вредности леукоцита и дијабетес мелитуса у групи пацијената са акутним инфарктом миокарда.
- Значајна позитивна корелација вредности неоптерина и физичке неактивности, као и вредности NO и дијабетес мелитуса, а значајна негативна корелација вредности NO и физичке неактивности нађена је у групи испитаника са стабилном ангином пекторис.
- У групи болесника са нестабилном ангином пекторис постоји статистички значајна позитивна корелација концентрације неоптерина и хиперхолестеролемије, као и NO и гојазности, а значајна негативна корелација вредности NO и физичке неактивности.
- Значајна негативна корелација вредности NO и хипертензије и ADMA и пушења, а значајна позитивна корелација ADMA и дијабетес мелитуса забележена је у групи испитаника са акутним инфарктом миокарда.
- Анализа ROC крива стандардних маркера инфламације показала је да hsCRP има највећу AUC у све три групе пацијената и највећу сензитивност у стабилној ангини пекторис и у акутном инфаркту миокарда, док највећу сензитивност у групи нестабилне ангине пекторис има фибриноген. У групи пацијената са стабилном ангином пекторис и акутним инфарктом миокарда највећу специфичност има фибриноген, а у групи нестабилне ангине пекторис леукоцити.
- Анализа ROC крива нестандартних маркера инфламације истиче ADMA као маркер са највећом AUC у све три групе пацијената и највећом сензитивношћу и специфичношћу код болесника са стабилном ангином пекторис и са нестабилном ангином пекторис, док у акутном инфаркту миокарда највећу сензитивност има NO, а највећу специфичност неоптерин.
- Резултати ове студије сугеришу ADMA као маркер исхемијске болести независно од степена инфламације. Континуирано праћење неоптерина и NO може омогућити стратификацију болесника и указати на активацију нестабилног атеросклеротског плака.

8. Литература

Abarbanell AM, Coffey AC, Fehrenbacher JW, Beckman DJ, Herrmann JL, Weil B, Meldrum DR. Proinflammatory Cytokine Effects on Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Ischemic Heart. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1036-1043.

Abdou AS, Magour GM, Mahmoud MM. Evaluation of some markers of subclinical atherosclerosis in Egyptian young adult males with abdominal obesity. *Br J Biomed Sci* 2009;66(3):143-147.

Acevedo M, Foody JAM, Pearce GL, Sprecher DL. Fibrinogen: associations with cardiovascular events in an outpatient clinic. *Am Heart J* 2002;143:277-282.

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric Dimethylarginine Causes Hypertension and Cardiac Dysfunction in Humans and Is Actively Metabolized by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-1459.

Adachi T, Naruko T, Itoh A, Komatsu R, Abe Y, Shirai N, et al. Neopterin is associated with plaque inflammation and destabilisation in human coronary atherosclerotic lesions. *Heart* 2007;93:1537-1541.

Akiyama K, Suzuki H, Grant P, Bing RJ. Oxidation products of nitric oxide, NO₂ and NO₃, in plasma after experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):1-9.

Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002;105:2595-2599.

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(1):64-70.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.

Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M, Badimon L. Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventative effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1999;145:325-331.

Almirall J, Bolibar I, Toran P, Pera G, Boquet X, Blanzo X, Sauca G. Contribution of C-reactive protein to diagnosis and assessment of severity community-acquired pneumonia. *Chest* 2004;125:1335-1342.

Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology

Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):959-969.

Andresdottir MB, Sigfusson N, Sigvaldason H, Gudnason V. Erythrocyte Sedimentation Rate, an Independent Predictor of Coronary Heart Disease in Men and Women. The Reykjavik Study. *Am J Epidemiol* 2003;158:844-851.

Anthony S, Leiper James, Vallance P. Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med* 2005;10:S3-9.

Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996;335:1342-1349.

Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2009;84:353-360.

Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115:e352-e355.

Apple FS, Murakami MM. Cardiac Troponin and Creatine Kinase MB Monitoring during In-Hospital Myocardial Reinfarction. *Clin Chem* 2005;51(2):460-463.

Arking DE, Pfeufer A, Post W, Kao WHL, Newton-Cheh C, Ikeda M, et al. A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* 2006;38:644-651.

Asheikh AA, Kuvin JT, Karas RH. High-density lipoprotein cholesterol in the cardiovascular equation: Does the "good" still count? *Atherosclerosis* 2005;180:217-223.

Assmann G, Cullen P, Heinrich J, Schulte H. Hemostatic variables in the prediction of coronary risk: results of the 8 year follow-up of healthy men in the Munster Heart Study (PROCAM). Prospective Cardiovascular Munster Study. *Isr J Med Sci* 1996;32:364-370.

Assmann G, Cullen P, Schulte H. Non-LDL-related dyslipidaemia and coronary risk: a case-control study. *Diab Vasc Dis Res* 2010;7(3):204-212.

Assmann G, Gotto AM. HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-8-III-14.

Auer J, Berent R, Labetanig E, Eber B. Serum neopterin and activity of coronary artery disease. *Heart Dis* 2001;3:297-301.

Avanzas P, Arroyo-Espiguero R, Cosín-Sales J, Aldama G, Pizzi C, Quiles J, et al. Markers of inflammation and multiple complex stenoses (pancoronary plaque vulnerability) in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes. *Heart* 2004;90:847-852.

Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Quiles J, Roy D, Kaski JC. Elevated serum neopterin predicts future adverse cardiac events in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2005;26(5):457-463.

Aydin M, Tekin IO, Dogan SM, Yildirim N, Arasli M, Sayin MR, Aktop Z. The Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 in Patients with Isolated Coronary Artery Ectasia. *Mediators Inflamm* 2009;2009:106145.

Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005;173(10):1191-1202.

Bae SW, Stühlinger MC, Yoo HS, Yu KH, Park HK, Choi BY, Lee YS, Pachinger O, Choi YH, Lee SH, Park JE. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment. *Am J Cardiol* 2005;95(6):729-733.

Bakhru A, Erlinger TP. Smoking cessation and cardiovascular disease risk factors: results from the Third national health and nutrition examination survey. *Plos Med* 2005;2(6):528-536.

Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, Myerson M, Wu KK, Sharrett AR, Boerwinkle E. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med* 2005;165(21):2479-2484.

Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309-316.

Barani J, Mattiasson I, Lindblad B, Gottsäter A. Cardiac function, inflammatory mediators and mortality in critical limb ischemia. *Angiology* 2006;57(4):437-444.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002;416:337-339.

Barron HV, Harr SD, Radford MJ, Wang Y, Krumholz HM. The association between white blood cell count and acute myocardial infarction mortality in patients ≥ 65 years of age: findings from the Cooperative Cardiovascular Project. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1654-1661.

Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJP, Bittner V, Fruchart JC. HDL Cholesterol, Very Low Levels of LDL Cholesterol, and Cardiovascular Events. *N Engl J Med* 2007;357:1301-1310.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-772.

Bass KM, Newschaffer CJ, Klag MJ, Bush TL. Plasma lipoprotein levels as predictors of cardiovascular death in women. *Arch Intern Med* 1993;153:2209-2216.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4-12.

Bazzino O, Ferreirós ER, Pizarro R, Corrado G. C-reactive protein and the stress tests for the risk stratification of patients recovering from unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2001;87(11):1235-1239.

Becker B, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000;89:160-167.

Behr-Roussel D, Rupin A, Sansilvestri-Morel P, Fabiani J-N, Verbeuren TJ. Histochemical Evidence for Inducible Nitric Oxide Synthase in Advanced but Non-ruptured Human Atherosclerotic Carotid Arteries. *Histochem J* 2000;32(1):41-51.

Benfante R, Yano K, Hwang LJ, Curb D, Kagan A, Ross W. Elevated Serum Cholesterol Is a Risk Factor for Both Coronary Heart Disease and Thromboembolic Stroke in Hawaiian Japanese Men. *Stroke* 1994;25:814-820.

Bennett J. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:340-354.

Berenson GS, Srivivasan SR. Cardiovascular risk factors in youth with implications for aging: The Bogalusa Heart Study. *Neurobiol Aging* 2005;26: 303-307.

Betteridge JD, Gibson M. Effect of rosuvastatin and atorvastatin on LDL-C and CRP levels in patients with type 2 diabetes: results of the ANDROMEDA study. *Atherosclerosis* 2004;5(Suppl 1):S107-S108.

Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, Zwaginga JJ, van den Bogaard B, Reitsma PH, Meijers JC, Hartman D, Levi M, Stroes ES. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res* 2005;96:714-716.

Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Peters SL, Levels JH, Birjmohun R, Rotmans JJ, et al. Effects of CRP infusion on endothelial function and coagulation in normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects. *J Lipid Res* 2007;48:952-960

Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252(4):283-294.

Bochen K, Krasowska A, Milaniuk S, Kulczyńska M, Prystupa A, Dzida G. Erythrocyte sedimentation rate – an old marker with new applications. *JPCCR* 2011;5(1):23-28.

Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* 2007;114(3):295-306.

Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS, et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. *Atherosclerosis* 2006;187:415-422.

Boesten LSM, Zadelaar ASM, Nieuwkoop A, Gijbels MJJ, de Winther MPJ, Havekes LM, van Vlijmen BJM. Tumor necrosis factor- α promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2005;66(1):179-185.

Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005;10(1):14-23.

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.

Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med* 2005;10:S19-25.

Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function – therapeutic implications. *Vasc Med* 2003;8:149-151.

Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134:2842S-2847S.

Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59(4):824-833.

Bolego C, Poli A, Paoletti R. Smoking and gender. *Cardiovasc Res* 2002;53(3):568-576.

Bonaca MP, Morrow DA. Defining a role for novel biomarkers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2008;54:1424-1431.

Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med* 2006;41:144.

Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S460-S475.

Borisssoff JI, Spronk HMH, Cate Ht. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364:1746-1760.

Bozdemir AE, Barutcuoglu B, Dereli D, Kabaroglu C, Habif S, Bayindir O. C-reactive protein and neopterin levels in healthy non-obese adults. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(3):317-321.

Brasier AR. The nuclear factor- κ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2010;86:211-218.

Bronas UG. Exercise training and reduction of cardiovascular disease risk factors in patients with chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2009;16(6):449-458.

Brown DW, Giles WH, Croft JB. White blood cell count: An independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol* 2001;54(3):316-322.

Brunetti ND, Troccoli R, Correale M, Pellegrino PL, Di Biase M. C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome: correlation with diagnosis, myocardial damage, ejection fraction and angiographic findings. *Int J Cardio* 2006;109:248-256.

Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozental A, Mann G, Ellory J et al. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:738-740.

Brunner F, Maier R, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2003;57:55-62.

Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard BV, Stein JH, Witztum JL. Lipoprotein Management in Patients With Cardiometabolic Risk. Consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Diabetes Care* 2008;31(4):811-822.

Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol* 2000;121(2):255-260.

Buttery LDK, Springall DR, Chester AH et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996;75:77-85.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844.

Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999;27:1309-1318.

Caixeta A, Stone GW, Mehran R, Lee EA, McLaurin BT, Cox DA, Bertrand ME, Lincoff AM, Moses JW, White HD, Ohman EM, Palmerini T, Syros G, Kittas C, Fahy M, Hooper WC, Lansky AJ, Dangas GD. Predictive value of C-reactive protein on 30-day and 1-year mortality in acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY trial. *J Thromb Thrombolysis* 2011;31(2):154-164.

Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003;108:1930-1932.

Cankurtaran M, Ulger Z, Halil M, Yavuz BB, Onal IK, Unal S, Ariogul S. How to assess high erythrocyte sedimentation rate (ESR) in elderly? *Arch Gerontol Geriatr* 2010;50(3):323-326.

Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Bentley JH, Braunwald E, for the OPUS-TIMI 16 Investigators. Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial

infarction and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2001;87:636-639.

Canseco-Avila LM, Jerjes-Sánchez C, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Guzmán-Ramírez D. Fibrinogen. Cardiovascular risk factor or marker? *Arch Cardiol Mex* 2006;76(Suppl 4):S158-172.

Canto JG, Shlipak MG, Rogers WJ, Malmgren JA, Frederick PD, Lambrew CT, et al. Prevalence, clinical characteristics, and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain. *JAMA* 2000;283:3223-3229.

Cardounel AJ, Xia Y, Zweier JL. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2005;280:7540-7549.

Cardounel AJ, Zweier JL: Endogenous methylarginines regulate neuronal nitric-oxide synthase and prevent excitotoxic injury. *J Biol Chem* 2002;277:33995-34002.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72:3666-3670.

Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Henrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by IL-6. *Hepatology* 1990;12(5):1179-1186.

Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary heart disease: the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol* 1988;4(Suppl A):5A-10A.

Castelli WP. The triglyceride issue: a view from Framingham. *Am Heart J* 1986;112:432-437.

Caswell M, Pike LA, Bull BS. Effect of patient age on tests of the acute phase response. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:906-910.

Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Poludasu S, Yanamadala S, Frishman WH, Eng C, Pinsky DJ, Marmur JD. Relation of baseline plasma ADMA levels to cardiovascular morbidity and mortality at two years in men with diabetes mellitus referred for coronary angiography. *Atherosclerosis* 2010;210:226-231.

Chan D, Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Med* 2010;8:34.

Chan DC, Watts GF. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM* 2006;99(5):277-287.

Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM, Marsden PA. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem* 2004;279:35087.

Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized

LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13043-13048.

Chen C, Nan B, Lin P, Yao Q. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Thromb Res* 2008;122(1):125-133.

Chen Q, Kim E E J, Elio K, Zambrano C, Krass S, Teng J C, Kay H, Perkins K-A, Pershad S, McGraw S, Emrich J, Adams J S, Young L H. The Role of Tetrahydrobiopterin and Dihydrobiopterin in Ischemia/Reperfusion Injury When Given at Reperfusion. *Adv Pharmacol Sci* 2010;2010:963914.

Chen C-C, Young JL, Monzon RI, Chen N, Todorović V, Lau LF. Cytotoxicity of TNF α is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *EMBO J* 2007;26:1257-1267.

Chirkov YY, Chirkova LP, Sage RE, Horowitz JD. Impaired responsiveness of platelets from patients with stable angina pectoris to antiaggregating and cyclicAMP-elevating effects of prostaglandin E1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:961-966.

Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation* 1999;100:129-134.

Chirkov YY, Holmes AS, Willoughby SR, Stewart S, Wuttke RD, Sage PR, Horowitz JD. Stable angina and acute coronary syndromes are associated with nitric oxide resistance in platelets. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1851-1857.

Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010;376(9753):1670-1681.

Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998;44(8):1855-1864.

Church JE, Fulton D. Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *J Biol Chem* 2006;281:1477.

Cirillo P, Golino P, Calabrò P, Cali G, Ragni M, De Rosa S, et al. C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2005;68:47-55.

Cirillo P, Pacileo M, De Rosa S, Calabro` P, Gargiulo A, Angri V, Granato-Corigliano F, Fiorentino I, Prevete N, De Palma R, Mauro C, Leonardi A, Chiariello M. Neopterin induces pro-atherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2006;4:2248-2255.

Clyne B, Olshaker J. The C-reactive protein. *Am J Emerg Med* 1999;17(6):1019-1025.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit

cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1987-1994.

Cohen Z, Gonzales R, Davis-Gorman G, Copeland J, McDonagh P. Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thromb Res* 2002;107:217-221.

Conti CR. Cardiovascular risk profiles around the world. *Clin Cardiol* 2005;28:213-214.

Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?. *Circulation* 2004;109:1813-1818.

Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-2037.

Csanyi G, Bauer M, Dietl W, Lomnicka M, Stepuro T, Podesser BK, Chlopicki S. Functional alterations in NO, PGI₂ and EDHF pathways in the aortic endothelium after myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail* 2006;8:769-776.

Cusack MR, Marber MS, Lambiase PD, Bucknall CA, Redwood SR. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1917-1923.

Cylwik D, Mogielnicki A, Buczko W. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol Rep* 2005;57:14-22.

d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, et al. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2003;92:88-95.

Dadkhah S, Sharain K, Sharain R, Kiabayan H, Foschi A, Zonia C, et al. The value of bedside cardiac multibiomarker assay in rapid and accurate diagnosis of acute coronary syndromes. *Crit Pathw Cardiol* 2007;6:76-84.

Damy T, Ratajczak P, Shah P, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel J, Heymes C. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 2004;363:1365-1367.

Danesh J, Collins R, Peto R, Lowe GD. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2000;21(7):515-520.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GDO, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350(14):1387-1397.

Davies P, Zilberberg J, Helmke B. Spatial microstimuli in endothelial mechanosignaling. *Circ Res* 2003;92:359-370.

Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109[suppl III]:III-27–III-32.

De Backer G, Ambrosini E, Borch-Johnsen K, Brontos C, Cifkova R, Dallongeville J 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 Heart J* 2003;24:1601-1610.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96(1):60-68.

De Luca G, Verdoia M, Casetti E, Schaffer A, Cavallino C, Bolzani V, Marino P; High fibrinogen level is an independent predictor of presence and extent of coronary artery disease among Italian population. *J Thromb Thrombolysis* 2011;31(4):458-463.

De Maat M. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:509-521.

De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:99-105.

Deodhare GS. C-reactive Protein: clinical applications. Pathology, Microbiology and Clinical Pathology Series. Group of hospitals. Mumbai 2001.

Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JLJ, Wijns W. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* 1999;41(2):465-472.

Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1359-1363.

Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:405-410.

Devaraj S, Singh U, Jialal I. The Evolving Role of C-Reactive Protein in Atherothrombosis. *Clin Chem* 2009;55(2):229-238.

Devaraj S, Valleggi S, Siegel D, Jialal I. Role of C-Reactive Protein in Contributing to Increased Cardiovascular Risk in Metabolic Syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 2010;12(2):110-118.

Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003;107:398-404.

Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 2007;59(6):715-720.

Dinh W, Füh R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, Bansemir L, Bufe A, Barroso

MC, Lankisch M. Elevated plasma levels of TNF-alpha and Interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:58-65.

Ditschuneit HH, Flechtner-Mors M, Adler G. Fibrinogen in obesity before and after weight reduction. *Obesity Res* 1995;3:43-48.

Djordjevic VB, Stojanovic I, Cosic V, Zvezdanovic L, Deljanin-Ilic M, Dimic S, Kundalic B, Cvetkovic T, Jevtovic-Stoimenov T. Serum neopterin, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with ischemic heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(8):1149-1155.

Doi M, Shichiri M, Katsuyama K, Ishimaru S, Hirata Y. Cytokine-activated Jak-2 is involved in inducible nitric oxide synthase expression independent from NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;160(1):123-132.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M. Usefulness of neopterin levels and left ventricular function for risk assessment in survivors of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006;111(2):318-320.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P, Laynez-Cerdeña I, Kaski JC. Neopterin predicts left ventricular remodeling in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2010;211(2):574-578.

Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279(20):1615-1622.

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991;338:1546-1550.

Dunbar RL, Rader DJ. Demystifying triglycerides: A practical approach for the clinician. *CCJM* 2005;72(8):661-680.

Durán WN, Dillon PK. Effects of ischemia-reperfusion injury on microvascular permeability in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1989;5:223-239.

Đorđević BV. Proteini akutne faze. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević BV, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. *Biohemija (IV izdanje)*. Savremena administracija, Beograd 2006:1195-1205.

Đorđević BV. Biohemijska dijagnostika bolesti srca i skeletne muskulature. U: *Klinička biohemija*. Đorđević VB (ur). Medicinski fakultet, Niš, 2010,49-62.

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary

syndromes. *Circulation* 2001;103:1955-1960.

Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004;53(12):1574-1579.

Eiriksdottir G, Aspelund T, Bjarnadottir K, Olafsdottir E, Gudnason V, Launer LJ, Harris TB. Apolipoprotein E genotype and statins affect CRP levels through independent and different mechanisms: AGES-Reykjavik Study. *Atherosclerosis* 2006;186(1):222-224.

Elliott M, Antman MD. Decision Making with Cardiac Troponin Tests. *N Engl J Med* 2002;346:2079-2082.

Epstein SE. The Multiple Mechanisms by Which Infection May Contribute to Atherosclerosis Development and Course. *Circ Res* 2002;90:2-4.

Erikssen G, Liestol K, Bjornholt JV, Stormorken H, Thaulow E, Erikssen J. Erythrocyte sedimentation rate: a possible marker of atherosclerosis and a strong predictor of coronary heart disease mortality. *Eur Heart J* 2000;21:1614-1620.

Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-963.

Espliguero AR, Avanzas P, Cosín-Sales J, Aldama G, Pizzi C, Kaski JC. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2004;25(5):401-408.

Estévez-Loureiro R, Recio-Mayoral A, Sieira-Rodríguez-Moret JA, et al. Neopterin levels and left ventricular dysfunction in patients with chronic stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2009;207:514-518.

Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007;194:46-54.

Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2002;4(2):92-98.

Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL. Inflammatory mechanisms. Ischaemic heart disease. *Br Med Bull* 2001;59(1):55-68.

Feingold KR, Grunfeld C. Tumour necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest* 1987;80:184-190.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999;103:897.

Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, Ghany R, Virani S, Garcia S, Horstman LL, Purow J, Jy W, Ahn YS, de Marchena E. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* 2004;110: 3599-3603.

Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(2):427-431.

Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:1000-1006.

Fiedler L. The DDAH/ADMA pathway is a critical regulator of NO signalling in vascular homeostasis. *Cell Adh Migr* 2008;2(3):149-150.

Fiotti N, Di Chiara A, Altamura N, Miccio M, Fioretti P, Guarnieri G, Giansante C. Coagulation indicators in chronic stable effort angina and unstable angina: relationship with acute phase reactants and clinical outcome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:247-255.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Jama* 2005;293(15):1861-1867.

Fogari R, Zoppi A, Marasi G, Vanasia A, Villa G. Associations between plasma fibrinogen levels and cardiovascular risk factors in hypertensive men. *J Cardiovasc Risk* 1994;1(4):341-345.

Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP, Plow EF. Integrin alpha(M)beta(2)-mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *J Exp Med* 2001;193:1123-1133.

Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, Avezum A, Goodman SG, Flather MD, Anderson FA Jr., Granger CB. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 2006;333:1091.

Freda BJ, Tang WH, van Lente F, et al. Cardiac troponins in renal insufficiency. Review and clinical implications. *J Am Coll Card* 2002;40:2065-2071

Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, et al. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 1999;84:1416-1421.

Friedman GD, Tekawa I, Grimm RH, et al. The leukocyte count: correlates and relationship to coronary risk factors. The CARDIA Study. *Int J Epidemiol* 1990;19:889-893.

Fuchs D, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Jenny M, Consuegra-Sanchez L, Kaski JC. The role of neopterin in atherogenesis and cardiovascular risk assessment. *Curr Med Chem* 2009;16(35):4644-4653.

Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29(3-4):307-341.

Fujii H, Li SH, Szmitko PE, Fedak PW, Verma S. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2476-2482.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000;105:1631-1639.

Fukai T. Endothelial GTPCH in eNOS Uncoupling and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1493-1495.

Fukuchi M, Hussain SNA, Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. *Circulation* 1998;98:132-139.

Fukumoto Y, Shimokawa H, Kozai T, Kadokami T, Kuwata K, Yonemitsu Y, Kuga T, Egashira K, Sueishi K, Takeshita A. Vasculoprotective role of inducible nitric oxide synthase at inflammatory coronary lesions induced by chronic treatment with interleukin-1 β in pigs in vivo. *Circulation* 1997;96:3104-3111.

Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Disruption of Inducible Nitric Oxide Synthase Improves β -Adrenergic Inotropic Responsiveness but Not the Survival of Mice With Cytokine-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res* 2002;90:959-965.

Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M, Fukami A, Kumagae S, Matsuoka H, Nanjo Y, Kakuma T, Imaizumi T. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: six-year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res* 2008;31(6):1185-1189.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340(17):448-454.

Gaffney P. Fibrin degradation products: a review of structures found in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:594-610.

Gandotra P, Miller M. The role of triglycerides in cardiovascular risk. *Curr Cardiol Rep*. 2008;10(6):505-511.

Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, Capobianco S, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. *Circulation* 2007;115:245-254.

Gao X, Zhang H, Belmadani S, Wu J, Xu X, Elford H, Potter BJ, Zhang C. Role of TNF- α induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *Am J*

Physiol Heart Circ Physiol 2008;295:H2242-H2249.

Garcia-Moll X, Cole D, Zouridakis E, Kaski JC. Increased serum neopterin: a marker of coronary artery disease activity in women. *Heart* 2000;83:346-350.

Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, O'Reilly DStJ, Stewart MJ, Shepherd J. *Clinical Biochemistry*, Third edition, Elsevier Limited, Edinburgh, 2004.

Geng Y-J. Biologic effect and molecular regulation of vascular apoptosis in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001;3(3):234-242.

George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004;25:1003-1008.

Germing A, von Dryander S, Machraoui A, Bojara W, Lawo T, Grewe P, Barmeyer J, Lemke B. Hyperfibrinogenemia increases the risk of cardiac events after coronary artery stenting. *Heart Vessels* 2000;15:263-267.

Ghazala I, Mansoor A. Highly sensitive C-reactive protein concentration and angiographic characteristics of coronary lesion. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2008;20(3):100-103.

Giese SP, Crone EM, Flavall EA, Amit Z: Potential to inhibit growth of atherosclerotic plaque development through modulation of macrophage neopterin/7,8-dihydro-neopterin synthesis. *Br J Pharmacol* 2008;153:627-635.

Gil M, Zarebiński M, Adamus J. Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. *Int J Cardiol* 2002;83:43-46.

Gillum R, Mussolino M, Makuc D. Erythrocyte sedimentation rate and coronary heart disease. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *J Clin Epidemiol* 1995;48:353-361.

Ginsberg HN. Hypertriglyceridemia: new insights and new approaches to treatment. *Am J Cardiol* 2001;87:1174-1180.

Ginsberg HN. New Perspectives on Atherogenesis. Role of Abnormal Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism. *Circulation* 2002;106:2137-2142.

Goodman SG, Steg PG, Eagle KA, Fox KA, López-Sendón J, Montalescot G, et al. The diagnostic and prognostic impact of the redefinition of acute myocardial infarction: lessons from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J* 2006;151(3):654-660.

Gotlieb AI. Atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Cardiovasc Path* 2005;14(4):181-184.

Gotto AM, Farmer JA. Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol* 2001;12(4):391-394.

Gould AL, Rossouw JE, Santanello NC, et al. Cholesterol reduction yields clinical benefits: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946-952.

Graf K, Kappert K, Stawowy P, Bokemeyer J, Blaschke F, Schmidt G, Kintscher U, Goetze S, Fleck E. Statins Regulate $\alpha_2\beta_1$ -Integrin Expression and Collagen I-Dependent Functions in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41(1):89-96.

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(Suppl2):E1-40.

Grammer TB, Fuchs D, Boehm BO, Winkelmann BR, Maerz W. Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem* 2009;55(6):1135-1146.

Greaves DR, Channon KM. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol* 2002;23(11):535-541.

Green D, Foiles N, Chan C, Schreiner PJ, Kang J. Elevated Fibrinogen Levels and Subsequent Subclinical Atherosclerosis: The CARDIA Study. *Atherosclerosis* 2009;202(2):623-631.

Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-2183.

Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 1999;190:1733-1740.

Grundy SM, Cleeman JI, Baird Merz CN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Stone NJ. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004;110:227-239.

Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF- α reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:320-328.

Gussekloo J, Schaap MC, Frölich M, et al. C-reactive protein is a strong but nonspecific risk factor of fatal stroke in elderly persons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1047-1051.

Gutstein DE, Fuster V. Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999;41:323-333.

Hackam DG, Anand SS. Emerging Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease. *JAMA* 2003;290(7):932-940.

Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, Price RW, Fuchs D. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res Ther* 2010;7:15.

Hajj-Ali R, Zareba W, Ezzeddine R, Moss AJ. Relation of the leukocyte count to recurrent cardiac events in stable patients after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2001;88:1221-1224.

Hamerlinck FFV. Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999;8:167-176.

Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000;102:118-122.

Han KH, Hong KH, Park JH, Ko J, Kang DH, Choi KJ, et al. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation* 2004;109:2566-2571.

Hansen LK, Grimm RH, Neaton JD. The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* 1990;19:881-888.

Hansson LO, Carlsson I, Hansson E, Hovelius B, Svensson P, Tryding N. Measurement of C-reactive protein and the erythrocyte sedimentation rate in general practice. *Scand J Prim Health Care* 1995;13:39-45.

Happe MR, Battafarano DF, Dooley DP, Rennie TA, Murphy FT, Casey TJ, Ward JA. Validation of the Diesse Mini-Ves Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Analyzer Using the Westergren ESR Method in Patients With Systemic Inflammatory Conditions. *Am J Clin Pathol* 2002;118:14-17

Haraba R, Antohe F. T cells are active participants in the progression of atherosclerotic plaques. *DJNB* 2011;6(4):1529-1534.

Harley SL, Sturge J, Powell JT. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:652-658.

Hattori Y, Hattori S, Wang X, Satoh H, Nakanishi N, Kasai K. Oral administration of tetrahydrobiopterin slows the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:865.

Haywood G, Tsao P, von der Leyen H, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996;93:1087-1094.

Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360(9326):7-22.

Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk: results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:54-59.

Henderson DC, Sheldon J, Riches P, Hobbs JR. Cytokine induction of neopterin production. *Clin Exp Immunol* 1991;83(3):479-482.

Hernand P, Gane P, Huet M, Jallu V, Kaplan C, Sonneborn HH, Cartron JP, Bailly P. Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated alpha IIb beta 3 integrin. *J Biol Chem* 2003;278:4892-4898.

Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:741-746.

Hicks R, Golledge J, Mir-Hasseine R, Powell J. Vasoactive effects of fibrinogen on saphenous vein. *Nature* 1996;379:818-820.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.

Hoffmann G, Schobersberger W. Neopterin: a Mediator of the Cellular Immune System. *Pteridines* 2004;15:107-112.

Hoffmann G. More on: neopterin induces the proatherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2007;5:211-212.

Hoffmeister HM, Heller W, Seipel L. Blood coagulation and fibrinolysis in arteriosclerosis. *Z Kardiol* 1999;88(5):315-23.

Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3(2):213-219.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.

Hu WJ, Eaton JW, Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* 2001;98:1231-1238.

Husain MT, Kim HD. C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in orthopaedics. *Orthop J* 2002;15:13-16.

Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M. Genes Encoding Fibrinogen and Cardiovascular Risk. *Hypertension* 2001;38(5):1199-1203.

Iida M, Yamamoto M, Yamazaki M, Sawaguchi M, Honjo H, Kodama I, Kamiya K. Association of aortic valve sclerosis with thrombin generation in hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 2008;22:781-787.

Ingelsson E, Ärnlöv J, Sundström J. Inflammation, as Measured by the Erythrocyte Sedimentation Rate, Is an Independent Predictor for the Development of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1802-1806.

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen W-H, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999;99:1492-1498.

Iso H, Naito Y, Sato S, Kitamura A, Okamura T, Sankai T, Shimamoto T, Iida M, Komachi Y. Serum Triglycerides and Risk of Coronary Heart Disease among Japanese Men and Women. *Am J Epidemiol* 2001;153(5):490-499.

Ivanović B, Karadžić A, Kalimanovska D, i dr. Modifikacija faktora rizika i promena načina života u prevenciji infarkta miokarda. *Balneoklimatologija* 2003;27:461-469.

Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation* 2000;102:1216-1220.

Jaffe AS. Chasing troponin: how low can you go if you can see the rise?. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1763-1764.

Jaffe AC, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1-11.

Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimaäki T, Raitakari OT, Knuuti J. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med* 2003;8:185-189.

JBS 2: Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart* 2005;91:v1-v52.

Jefferis BJ, Whincup PH, Welsh P, Wannamethee SG, Rumley A, Lennon LT, Thomson AG, Carson C, Ebrahim S, Lowe GD. Circulating TNF α levels in older men and women do not show independent prospective relations with MI or stroke. *Atherosclerosis* 2009;205(1):302-308.

Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103(3 Suppl):4A-10A.

Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride Concentration and Ischemic Heart Disease. An Eight-Year Follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 1998;97:1029-1036.

Jia EZ, Yang ZJ, Yuan B, Zang XL, Wang RH, Zhu TB, Wang LS, Chen B, Ma WZ. Relationship between leukocyte count and angiographical characteristics of coronary atherosclerosis. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(9):1057-1062.

Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor Therapy on High Sensitive C-Reactive Protein Levels. *Circulation* 2001;103:1933-1935.

Jones AS, Novick D, Horiuchi S, Yamamoto N, Szalai JA, Fuller MG. C-reactive protein: a physiological activator of IL-6 α shedding. *J Exp Med* 1999;189(3):599-604.

Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *JMCC* 2006;40:16–23.

Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF- α in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(12):1573-1579.

Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Båvenholm P, Ericsson CG, Godsland I, de Faire U, Nilsson J. Evidence for a role of tumor necrosis factor α in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 1998;47(1):113-118.

Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995;270:23780-23784.

Kannel WB, Anderson K, Wilson PWF. White Blood Cell Count and Cardiovascular Disease: Insights From the Framingham Study *JAMA* 1992;267(9):1253-1256.

Kannel WB, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, Gagnon DR. Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience. *Am Heart J* 1990;120:672-676.

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1987;258:1183-1186.

Kanjuh V, Beleslin B, Dinčić D, Marković-Lipkovski J, Oprić D. Klinički entiteti koronarne aterotrombotične ishemijske bolesti srca i njihovi patološko-morfološki supstrati. *Srce i krvni sudovi* 2011;30(2):67-68.

Kaski JC, Consuegra-Sanchez L, Fernandez-Berges DJ, Cruz-Fernandez JM, Garcia-Moll X, Marrugat J, et al. Elevated serum neopterin levels and adverse cardiac events at 6 months follow-up in Mediterranean patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2008;201:176-183.

Kaski JC, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R. Neopterin: Still a Forgotten Biomarker. *Clin Chem* 2005;51(10):1902-1903.

Katoh A, Ikeda H, Takajo Y, Haramaki N, Murohara T, Shintani S, Kanaya S, Yokoyama S, Ueno T, Honma T, Imaizumi T. Coexistence of impairment of endothelium-derived nitric oxide and platelet-derived nitric oxide in patients with coronary risk factors. *Circ J* 2002;66:837-840.

Kavsak PA, Wang X, Ko DT, MacRae AR, Jaffe AS. Short- and long-term risk stratification using a next-generation, high-sensitivity research cardiac troponin I (hs-cTnI) assay in an emergency department chest pain population. *Clin Chem* 2009;55:1809-1815.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:998-1005.

Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009;361:868-877.

Kennon S, Timmis A D, Whitbourn R, Knight C. C reactive protein for risk stratification in acute coronary syndromes? Verdict: unproven. *Heart* 2003;89:1288-1290.

Khashabi J, Karamiyar M, Taghinejhad H, Shirazi M. Use of serial C-reactive protein measurements for determination of the length of empiric antibiotic therapy in suspected neonatal sepsis. *Iran J Med Sci* 2004;29(1):31-35.

Kim H, Yang DH, Park Y, Han J, Lee H, Kang H, Park HS, Cho Y, Chae SC, Jun JE, Park WH. Incremental prognostic value of C-reactive protein and N-terminal proB-type natriuretic peptide in acute coronary syndrome. *Circ J* 2006;70(11):1379-1384.

Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;40(2):295-302.

Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther* 2010;127(3):295-314.

Knipp M, Braun O, Gehrig PM, Sack R, Vasak M. Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation. *J Biol Chem* 2003;278:3410-3416.

Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J, Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2003;98:319-328.

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;23:1398-1404.

Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C. Prospective study of high-sensitivity C-reactive protein as a determinant of mortality: results from the MONICA/KORA Augsburg Cohort Study, 1984-1998. *Clin Chem* 2008;54(2):335-342.

Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2005;108(3):205-213.

Kohnen SL, Mouithys-Mickalad AA, Deby-Dupont GP, Deby CM, Lamy ML, Noels AF. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite or oxoferryl species occurs by a radical pathway. *Free Radic Res* 2001;35:709.

Kosonen O, Kankaanranta H, Uotila J, Moilanen E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2000;394:149-156.

Koukkunen H, Penttilä K, Kemppainen A, Halinen M, Penttilä I, Rantanen T, Pyörälä K. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med* 2001;33(1):37-47.

Krempl TK, Maas R, Sydow K, Meinertz T, Böger RH, Kähler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J* 2005;26:1846-1851.

Kritchevsky SB, Cesari M, Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. *Cardiovasc Res* 2005;66(2):265-275.

Kromhout D. On the waves of the Seven Countries Study. A public health perspective on cholesterol. *Eur Heart J* 1999;20:796-802.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Schernthaner G. Asymmetric Dimethylarginine Predicts Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1834-1839.

Kubo T, Matsuo Y, Hayashi Y, Yamano T, Tanimoto T, Ino Y, Kitabata H, Takarada S, Hirata K, Tanaka A, Nakamura N, Mizukoshi M, Imanishi T, Akasaka T. High-sensitivity C-reactive protein and plaque composition in patients with stable angina pectoris: a virtual histology intravascular ultrasound study. *Coron Artery Dis* 2009;20(8):531-535.

Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc* 2009;84(10):917-938.

Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6:1399-1402.

Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and its functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1609-1615.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in hypertension: role of the NAD(P)H oxidase. *J Clin Invest* 2003;111:1201-1209.

Landmesser U, Drexler H. Toward understanding of extracellular superoxide dismutase regulation in atherosclerosis: a novel role of uric acid? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1367-1368.

Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, et al. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2000;101:2264-2270.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-1288.

Leiper JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:33-38.

Lemos da Luz P, Favarato D, Faria-Neto Junior JR, Lemos P, Palandri Chagas AC. High Ratio of Triglycerides to HDL-Cholesterol Predicts Extensive Coronary Disease. *Clinics* 2008;63(4):427-432.

Lenzen H, Tsikas D, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: relationship with traditional risk factors as assessed in the multicenter CARDIAC study. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:45-49.

Levenson J, Giral P, Razavian M, Gariépy J, Simon A. Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1263-1268.

Lewandrowski K, Chen A, Januzzi J. Cardiac Markers for Myocardial Infarction. *Am J Clin Pathol* 2002;118(Suppl 1):S93-S99.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360(9349):1903-1913.

Li H, Förstermann U. Prevention of Atherosclerosis by Interference with the Vascular Nitric Oxide System. *Curr Pharm Des* 2009;15:3133-3145.

Li J, Chen J. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2005;64(5):925-929.

Li JJ, Fang CH, Hui RT. Is hypertension an inflammatory disease? *Med Hypotheses* 2005;64(2):236-240.

Li JJ, Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses* 2004;62(4):499-506.

Li J-j. Inflammation in coronary artery diseases. *Chin Med J* 2011;124(21):3568-3575.

Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 2004;95:877-883.

Li X, Wang P, Xu X, Wang Y, Xia Y, Wang D. Simvastatin increases the activity of endothelial nitric oxide synthase via enhancing phosphorylation. *J Huazhong Univ Sci Technol* 2009;29(3):286-290.

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 1999;42:162-172.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.

Libby P. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.

Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83(2):456S-460S.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.

Lim G, Venetucci L, Eisner D A, Casadei B. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc Res* 2008;77(2):256-264.

Lim S, Kang KW, Park SY, Kim SI, Choi YS, Kim ND, Lee KU, Lee HK, Pak YK. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by a novel compound, mercaptopyrazine, through suppression of nuclear factor-kappaB binding to DNA. *Biochem Pharmacol* 2004;68(4):719-728.

Lin R, Liu J, Gan W, Yang G. C-reactive protein-induced expression of CD40-CD40L and the effect of lovastatin and fenofibrate on it in human vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1537-1543.

Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000;343:1139-1147.

Lindahl B, Venge P, Wallentin L. Relation between troponin T and the risk of subsequent cardiac events in unstable coronary artery disease. The FRISC study group. *Circulation* 1996;93(9):1651-1657.

Linsel-Nitschke P, Jansen H, Aherrahou Z, Belz S, Mayer B, Lieb W, Huber F, Kremer W, Kalbitzer HR, Erdmann J, Schunkert H. Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Lipids Health Dis* 2009;8:14.

Lominadze D, Schuschke D, Joshua I, Dean W. Increased ability of erythrocytes to aggregate in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2002;24:397-406.

Lominadze D, Tsakadze N, Sen U, Falcone J, D'Souza S. Fibrinogen- and fragment D-induced vascular constriction. *Am J Physiol* 2005;288:H1257-H1264.

Loria V, Leo M, Biasillo G, Dato I, Biasucci LM. Biomarkers in acute coronary syndrome. *Biomark Insights* 2008;3:453-468.

Lowe G, Lee A, Rumley A, Price J, Fowkes F. Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 1997;96:168-173.

Lowe G, Rumley A. Fibrinogen and its degradation products as thrombotic risk factors. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:560-565.

Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004;94(2):157-161.

Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003;24(21):1912-1919.

Lubos E, Handy D E, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci* 2008;13:5323-5344.

Luiking YC, Engelen MPKJ, Deutz NEP. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(1):97-104.

Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, et al. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:157-167.

Luscinskas F, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 1994;8:929-938.

Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *JEM* 1993;177(5):1277-1286.

Madonna R, Di Napoli P, Massaro M, Grilli A, Felaco M, De Caterina A, Tang D, De Caterina R, Geng YJ. Simvastatin attenuates expression of cytokine-inducible nitric-oxide synthase in embryonic cardiac myoblasts. *J Biol Chem* 2005;280(14):13503-13511.

Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1229-1235.

Majkić-Singh N. Biohemijski markeri: Od tradicionalnih enzima do srčanih markera. U: Majkić-Singh N ur. Srčani markeri – primena u dijagnostici i IFCC standardizacija. Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd, 2003,13-28.

Major CD, Gao Z-y, Wolf BA. Activation of the Sphingomyelinase/Ceramide Signal Transduction Pathway in Insulin-Secreting b-Cells. Role in Cytokine-Induced b-Cell Death. *Diabetes* 1999;48:1372-1380.

Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C: Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with SRD. *Kidney Int* 2005;67:2330-2337.

- Malyshev IY, Zenina TA, Golubeva LYu, Saltykova VA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide Biol Chem* 1999;3:105-113.
- Mangoni AA. The emerging role of symmetric dimethylarginine in vascular disease. *Adv Clin Chem* 2009;48:73-94.
- Manninen V, Elo MO, Frick MH, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA* 1988;260(5):641-651.
- Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(4):343-365.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Pinsky DJ, Islam N, Gayle RB 3rd, Maliszewski CR. Thromboregulation by Endothelial Cells: Significance for Occlusive Vascular Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:178-182.
- Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and MI: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1368-1377.
- Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, Meininger GA. $\alpha_v\beta_3$ - and $\alpha_5\beta_1$ -integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H322-H329.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, Muñoz-García B, Vega M, Serrano J, Ortega L. Intensive Treatment With Atorvastatin Reduces Inflammation in Mononuclear Cells and Human Atherosclerotic Lesions in One Month. *Stroke* 2005;36:1796-1800.
- Marx N, Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Koch W, Pinkau T, Schomig A. Induction of cytokine expression in leukocytes in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:165-170.
- Mason JC. Statins and their role in vascular protection. *Clin Sci* 2003;105:251-266.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 2003;93:388-398.
- Maynard SJ, Menown IBA, Adgey AAJ. Troponin T or troponin I as cardiac markers in ischaemic heart disease. *Heart* 2000;83:371-373.
- Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-537.
- Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998;274:R577-R595.

Miller M, Cannon CP, Murphy SA, Qin J, Ray KK, Braunwald E. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:724-730.

Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner C, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S. Triglycerides and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2011;123:2292-2333.

Miller M. Raising an isolated low HDL-C level: Why, how, and when? *CCJM* 2003;70:2003:553-560.

Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Facilitation of Granulocyte Responses, Which Is Severely Altered in Age-Related Inflammatory Biomarker, Neopterin, Suppresses B Lymphopoiesis for Possible Stromal-Cell-Impaired Mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med* 2007;232:134-145.

Mitra B, Panja M. High sensitive C-reactive protein: a novel biochemical markers and its role in coronary artery disease. *J Assoc Physicians India* 2005;53:25-32.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99(9):1141-1146.

Mizia-Stec K, Mandecki T, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E, Szymanski L, Majewski T. Selected cytokines and soluble forms of cytokine receptors in coronary artery disease. *Eur J Intern Med* 2002;13(2):115-122.

Mogford J, Davis G, Meininger G. RGDN peptide interaction with endothelial $\alpha_5\beta_1$ integrin causes sustained endothelial-dependent vasoconstriction to rat skeletal muscle arterioles. *J Clin Invest* 1997;100:1647-1653.

Mogford J, Davis G, Platts S, Meininger G. Vascular smooth muscle $\alpha_v\beta_3$ integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptides. *Circ Res* 1996;79:821-826.

Möhlenkamp S, Lehmann N, Moebus S, Schmermund A, Dragano N, Stang A, Siegrist J, Mann K, Jöckel KH, Raimund Erbel R. Quantification of Coronary Atherosclerosis and Inflammation to Predict Coronary Events and All-Cause Mortality. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(13):1455-1464.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147(S1):S193-S201.

Montecucco F, Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin Interv Aging* 2008;3(2):341-349.

Mora S, Musunuru K, Blumenthal RS. The Clinical Utility of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Cardiovascular Disease and the Potential Implication of JUPITER on Current Practice Guidelines. *Clin Chem* 2009;55(2):219-228.

Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-778.

Morris BJ, Glenn CL, Wilcken DEL, Wang XL. Influence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary artery disease. *Clin Sci* 2001;100:551-556.

Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115:356-375.

Morrow DA, Rifai N, Sabatine MS, Ayanian S, Murphy SA, de Lemos JA, Braunwald E, Cannon CP. Evaluation of the AccuTnI Cardiac Troponin I Assay for Risk Assessment in Acute Coronary Syndromes. *Clin Chem* 2003;49(8):1396-1398.

Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial infarction. J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1460-1465.

Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:1243-1262.

Moszczynski P, Zabinski Z, Moszczynski P, Jr, Rutowski J, Slowinski S, Tabarowski Z. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett* 2001;118:121-127.

Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JM, Marsch S, Perruchoud AP, Roskamm H, Neumann FJ. Inflammation and long-term mortality after non-ST elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation* 2002;105:1412-1415.

Muller B, Kleschyov AL, Gyorgy K, Stoclet J-C. Inducible NO synthase activity in blood vessels and heart: new insight into cell origin and consequences. *Physiol Res* 2000;49:19-26.

Murr C, Meinitzer A, Grammer T, Schroecksnadel K, Böhm BO, März W, Fuchs D. Association between asymmetric dimethylarginine and neopterin in patients with and without angiographic coronary artery disease. *Scand J Immunol* 2009;70(1):63-67.

Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab* 2002;3(2):175-187.

Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2053-2060.

Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta* 2006;367:36-47.

Nakakuki T, Ito M, Iwasaki H, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, et al. Rho/Rho-kinase pathway contributes to C-reactive protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2088-2093.

Natali A, L'Abbate A, Ferrannini E. Erythrocyte sedimentation rate, coronary atherosclerosis, and cardiac mortality. *Eur Heart J* 2003;24(7):639-648.

Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;353(25):2643-2653.

Newby LK, Roe MT, Chen AY, Ohman EM, Christenson RH, Pollack CV Jr, et al. Frequency and clinical implications of discordant creatine kinase-MB and troponin measurements in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(2):312-318.

Neurauter G, Wirleitner B, Laich A, Schennach H, Weiss G, Fuchs D. Atorvastatin suppresses interferon-gamma-induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and in monocytic cell lines. *Clin Exp Immunol* 2003;131:264-267.

Nickenig G, Harrison DG. The AT₁-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002;105:393-396.

Niemann-Jonsson A, Dimayuga P, Jovinge S, et al. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor- α expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2205-2211.

Nieto FJ, Szklo M, Folsom AR, et al. Leukocyte count correlates in middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 1992;136:525-537.

Nijveldt RJ, Siroen MPC, Teerlink T, van Leeuwen PAM. Elimination of Asymmetric Dimethylarginine by the Kidney and the Liver: A Link to the Development of Multiple Organ Failure? *J Nutr* 2004;134(10):2848S-2852S.

Nilton Salles RN, Freire de Carvalho J, Shoenfeld J. Screening tests for inflammatory activity: applications in rheumatology. *Mod Rheumatology* 2009;19:469-477.

Nishiyama Y, Ueda M, Otsuka T, Katsura K, Abe A, Nagayama H, Katayama Y. Statin treatment decreased serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in ischemic stroke patients. *J Atheroscler Thromb* 2011;18(2):131-137.

Norata GD, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, Eriksson P, Catapano AL. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis* 2007;193:321-327.

Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299-308.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. *Circulation* 1998;97:2494-2498.

Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Muller-Esterl W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 2006;396:401.

Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. *N Engl J Med* 1996;335:1333-1341.

Onat A, Hergenç G, Can G, Karabulut A. Serum asymmetric dimethylarginine levels among Turks: association with metabolic syndrome in women and tendency to decrease in smokers. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2008;36:7-13.

Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003;42:985-990.

Ottani F, Galvani M, Nicolini FA, Ferrini D, Pozzati A, Di Pasquale G, Jaffe AS. Elevated cardiac troponin levels predict the risk of adverse outcome in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2000;140(6):917-927.

Ozeren A, Aydin M, Tokac M, Demircan N, Unalacak M, Gurel A, Yazici M. Levels of serum IL-1beta, IL-2, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha in patients with unstable angina pectoris. *Mediators Inflamm* 2003;12(6):361-365.

Pacileo M, Cirillo P, De Rosa S, Ucci G, Petrillo G, Musto D'Amore S, Sasso L, Maietta P, Spagnuolo R, Chiariello M. The role of neopterin in cardiovascular disease. *Monaldi Arch Chest Dis* 2007;68(2):68-73.

Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem* 2008;54(1):24-38.

Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 2004;351(25):2599-2610.

Päivä H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajärvi M, Ruukonen I, Laaksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41(2):219-222.

Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3227-H3245.

Pandolfi A. C-reactive protein: a potential new molecular link between inflammation, thrombosis and vascular cell proliferation? *Cardiovasc Res* 2005;68(1):3-4.

Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AH. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. IFCC Scientific Division, Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. International Federation of Clinical Chemistry. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(6):687-693.

Panteghini M. Acute coronary syndrome: biochemical strategies in the troponin era. *Chest* 2002;122:1428-1435.

Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010;20(2):87-103.

Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531-2534.

Pasterkamp G, Falk E. Atherosclerotic Plaque Rupture: an Overview. *J Clin Basic Cardiol* 2000;3:81-85.

Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, Amin AR. TNF- α Convertase Enzyme from Human Arthritis-Affected Cartilage: Isolation of cDNA by Differential Display, Expression of the Active Enzyme, and Regulation of TNF- α . *J Immunol* 1998;160:4570-4579.

Patel S, Celermajer DS, Bao S. Atherosclerosis-underlying inflammatory mechanisms and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(4):576-580.

Patibandla PK, Tyagi N, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM, Lominadze D. Fibrinogen induces alterations of endothelial cell tight junction proteins. *J Cell Physiol* 2009;221:195-203.

Paul A, Ko KWS, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-Reactive Protein Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* 2004;109:647-655.

Paul J, Strickland S, Melchor JP. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 2007;204:1999-2008.

Pavlović D, Đorđević BV, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija-modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslov Med Biohem* 2002;21(2):69-84.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Centers for disease control and prevention; American heart association. 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.

Pedersen TR, Wilhelmsen L, Færgeman O, Strandberg TE, Thorgeirsson G, Troedsson L, Kristianson J, Berg K, Cook TJ, Haghfelt T, Kjekshus J, Miettinen T, Olsson AG, Pyörälä K, Wedel H for the Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Follow-Up Study of Patients Randomized in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) of Cholesterol Lowering. *Am J Cardiol* 2000;86:257-262.

Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111(12):1805-1812.

Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1996;271:13018-13022.

Piesterziewicz K, Łuczak K, Goch JH. Factors associated with C-reactive protein at the early stage of acute myocardial infarction in men. *Cardiol J* 2009;16(1):36-42.

Pineda J, Marín F, Marco P, et al. Premature coronary artery disease in young (age <45) subjects: interactions of lipid profile, thrombophilic and haemostatic markers. *Int J Cardiol* 2009;136:222-225.

Pingle SK, Tumane RG, Jawade AA. Neopterin: Biomarker of cell-mediated immunity and potent usage as biomarker in silicosis and other occupational diseases. *IJOEM* 2008;12(3):107-111.

Pitt B, Mancini GB, Ellis SG, Rosman HS, Park JS, McGovern ME. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): reduction in atherosclerosis progression and clinical events. PLAC I investigation. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(5):1133-1139.

Plow E, Haas T, Zhang L, Loftus J, Smith J. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-21788.

Pluskota E, D'Souza S. Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival. *Eur J Biochem* 2000;267:4693-4704.

Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007;48:751-762.

Pope AJ, Karrupiah K, Kearns PN, Xia Y, Cardounel AJ. Role of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolases in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Production. *J Biol Chem* 2009;284(51):35338-35347.

Porteri E, Rizzoni D, Piccoli A, Castellano M, Bettoni G, Muiesan M, Pasini G, Guelfi D, Zulli R, Rosei E. Effects of hypotensive and non-hypotensive doses of manidipine on structure, responses to endothelin-1 and ICAM-1 production in mesenteric small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Blood Press* 1998;7:324-330.

Post MS, Verhoeven MO, van der Mooren MJ, Kenemans P, Stehouwer CD, Teerlink T. Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4221-4226.

Pullamsetti SS, Savai R, Schaefer MB, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Fleming I, Mayer K, Leiper J, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. cAMP phosphodiesterase inhibitors increases nitric oxide production by modulating dimethylarginine dimethylaminohydrolases. *Circulation* 2011;123(11):1194-1204.

Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:995-1001.

Rafnsson V, Bengtsson C. Erythrocyte sedimentation rate and cardiovascular disease. Results from a population study of women in Goteborg, Sweden. *Atherosclerosis* 1982;42:97-107.

Raina N, Matsui J, Cunnane SC, Jeejeebhoy KN. Effect of tumor necrosis factor-alpha on triglyceride and phospholipid content and fatty acid composition of liver and carcass in rats. *Lipids* 1995;30:713-718.

Ramos AM, Pellanda LC, Gus I, Portal VL. Inflammatory markers of cardiovascular disease in the elderly. *Arq Bras Cardiol* 2009;92(3):221-228.

Rasouli M, Kiasari AM, Bagheri B. Total and differential leukocytes counts, but not hsCRP, ESR, and five fractioned serum proteins have significant potency to predict stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2007;377:127-132.

Ray KK, Morrow DA, Sabatine MS, Shui A, Rifai N, Cannon CP, Braunwald E. Long-Term Prognostic Value of Neopterin. A Novel Marker of Monocyte Activation in Patients With Acute Coronary Syndrome. *Circulation* 2007;115:3071-3078.

Razumovitcha JA, Semenkova GN, Fuchs D, Cherenkevich SN. Influence of neopterin on the generation of reactive oxygen species in human neutrophils. *FEBS Lett* 2003;549:83-86.

Rebuzzi AG, Quaranta G, Liuzzo G, Caligiuri G, Lanza GA, Gallimore JR, Grillo RL, Cianflone D, Biasucci LM, Maseri A. Incremental prognostic value of serum levels of troponin T and C-reactive protein on admission in patients with unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(6):715-719.

Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009;361:858-867.

Reilly SD, Litovsky SH, Steinkampf MP, Caulfield JB. Statins Improve Human Coronary Atherosclerotic Plaque Morphology. *Tex Heart Inst J* 2008;35(2):99-103.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR. 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;107:391-397.

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;336:973-979.

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359(21):2195-2207.

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009;373(9670):1175-1182.

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(20):2007-2011.

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(12):836-843.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-2153.

Ridker PM, Rifai N, Rose L. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565.

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;285:2481-2485.

Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003;107:363-369.

Ridker PM. C-reactive protein, inflammation and cardiovascular disease – Clinical Update. *Tex Heart Inst J* 2005;32:384-386.

Ridker PM. High-Sensitivity C-Reactive Protein. Potential Adjunct for Global Risk Assessment in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Circulation* 2001;103:1813-1818.

Riegger G, Abletshauser C, Ludwig M, Schwandt P, Widimsky J, Weidinger G, Welzel D. The effect of fluvastatin on cardiac events in patients with symptomatic coronary artery disease during one year of treatment. *Atherosclerosis* 1999;144:263-270.

Rifai N, Jourbran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in man with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999;45(11):1967-1973.

Rifai N, Ridker PM. High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease. *Clin Chem* 2001;47(3):403-411.

Rifai N, Ridker PM. Proposed Cardiovascular Risk Assessment Algorithm Using High-Sensitivity C-Reactive Protein and Lipid Screening. *Clin Chem* 2001;47(1):28-30.

Ritchie ME. Nuclear Factor- κ B Is Selectively and Markedly Activated in Humans With Unstable Angina Pectoris. *Circulation* 1998;98:1707-1713.

Rizk A, Abd El Fattah A, Wadie A, Ashraf M, Samy W, Mokhtar S. Serum nitric oxide in patients with acute coronary syndromes: correlation with the extent of myocardial ischemia and role of diabetes mellitus. *Critical Care* 2004;8(Suppl 1):P80.

Rizzo M, Corrado E, Coppola G, Muratori I, Novo G, Novo S. Markers of inflammation are strong predictors of subclinical and clinical atherosclerosis in women with hypertension. *Coron Artery Dis* 2009;20:15-20.

Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:1585-1591.

Robinson DM, Schwahn C, Alte D, John U, Felix SB, Völzke H. Plasma fibrinogen levels are associated with a strong family history of myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:497-502.

Rodrigues TC, Snell-Bergeon JK, Maahs DM, Kinney GL, Rewers M. Higher Fibrinogen Levels Predict Progression of Coronary Artery Calcification in Adults with Type 1 Diabetes. *Atherosclerosis* 2010;210(2):671-673.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee; Heart Disease and Stroke Statistics--2012 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2012;125(1):188-197.

Rosalki SB, Roberts R, Katus HA, Giannitsis E, Ladenson JH, Apple FS. Cardiac Biomarkers for Detection of Myocardial Infarction: Perspectives from Past to Present. *Clin Chem* 2004;50(11):2205-2213.

Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ,

Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007;115(5):e69-171.

Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.

Roubille F, Cayla G, Picot MC, Pradet V, Massin F, Gervasoni R, Pasquie JL, Macia JC, Piot C, Leclercq F. C-reactive protein (CRP) after revascularized STEMI: is CRP a prognostic factor? *Rev Med Interne* 2008;29(11):868-874.

Rubel C, Fernandez GC, Dran G, Bompadre MB, Isturiz MA, Palermo MS. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol* 2001;166:2002-2010.

Ruggeri Z. Mechanisms of shear-induced platelet-adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993;70:119-123.

Rydén L, Standl E, Bartnik M, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007;28:88-136.

Ryou M-G, Sun J, Oguayo KN, Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Hypoxic Conditioning Suppresses Nitric Oxide Production upon Myocardial Reperfusion. *Exp Biol Med* 2008;233(6):766-774.

Saadeh C. The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical applications. *South Med J* 1998;91:220-225.

Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 substudy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1761-1768.

Sabeti S, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Quehenberger P, Rumpold H, Maurer G, Minar E, Wagner O, Schillinger M. Prognostic Impact of Fibrinogen in Carotid Atherosclerosis Nonspecific Indicator of Inflammation or Independent Predictor of Disease Progression? *Stroke* 2005;36:1400-1404.

Sack MN, Smith RM, Opie LH. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia - an anti-apoptotic perspective. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):688-695.

Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335(14):1001-1009.

Şahin M, Varol E, Ozaydin M, Altinbas A, Aydin O, Aslan S, Dogan A, Kaya S. Comparison of Neopterin Levels in Patients with Coronary Artery Ectasia Versus Patients with Obstructive Coronary Artery Disease. *South Med J* 2008;101(5):476-479.

Saini HK, Xu Y-J, Zhang M, Liu PP, Kirshenbaum LA, Dhalla NS. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp Clin Cardiol* 2005;10(4):213-222.

Saito T, Hu F, Tayara L, Fahas L, Shennib H, Giaid A. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H339-H345.

Sánchez de Miguel L, Arriero MM, Farré J, Jiménez P, García-Méndez A, de Frutos T, Jiménez A, García R, Cabestrero F, Gómez J, de Andrés R, Montón M, Martín E, De la Calle-Lombana LM, Rico L, Romero J, López-Farré A. Nitric oxide production by neutrophils obtained from patients during acute coronary syndromes: expression of the nitric oxide synthase isoforms. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(5):818-825.

Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten J.J.C.S, Metsios G S, Carroll D, Kitis G D. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J* 2010;4:302-312.

Schaan BD, Pellanda LC, Maciel PT, Duarte ER, Portal VL. C-reactive protein in acute coronary syndrome: association with 3-year outcomes. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(12):1236-1241.

Schennach H, Murr C, Gachter E, Mayersbach P, Schonitzer D, Fuchs D. Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors. *Clin Chem* 2002;48:643-645.

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97(5):e53-e59.

Schönbeck U, Libby P. Inflammation, Immunity, and HMG-CoA Reductase Inhibitors: Statins as Antiinflammatory Agents? *Circulation* 2004;109:II-18-II-26.

Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 2007;73(3):470-480.

Schroeksnade K, Murr C, Winkler C, Wirleitner B, Fuith LC, Fuchs D. Neopterin to Monitor Clinical Pathologies Involving Interferon-g Production. *Pteridines* 2004;15:75-90.

Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G. TNFalpha in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004;99(1):8-11.

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Böger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005;35:622-626.

Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of Atorvastatin on Early Recurrent Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes. The MIRACL Study: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2001;285(13):1711-1718.

Schwartz R, Osborne-Lawrence S, Hahner L, Gibson LL, Gormley AK, Vongpatanasin W, et al. C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice. *Circ Res* 2007;100:1452-1459.

Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C803.

Sen N, Ozlu MF, Akgul EO, Kanat S, Cayci T, Turak O, Yaman H, Sokmen E, Ozcan F, Maden O, Demir AD, Covic A, Kanbay M. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine level in acute myocardial infarction patients as a predictor of poor prognosis and angiographic impaired reperfusion. *Atherosclerosis* 2011;219(1):304-310.

Sen U, Tyagi N, Patibandla PK, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM, Lominadze D. Fibrinogen-induced endothelin-1 production from endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C840-C847.

Serruys PW, Foley DR, Jackson G et al. A randomised placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty: final results of the FLUvastatin Angiographic Restenosis (FLARE) trial. *Eur Heart J* 1999;20:58-69.

Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; 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(9364):1149-1158.

Sghiri R, Feinberg J, Thabet F, Dellagi K, Boukadida J, Ben Abdelaziz A, Casanova JL, Barbouche MR. Gamma interferon is dispensable for neopterin production in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(12):1437-1441.

Shahzad F, Tawwab S, Abbas A. Relationship of white blood cell counts, haemoglobin and ESR with IHD. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2009;21(3):59-62.

Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-119.

Shankar A, Wang JJ, Rohtchina E, Mitchell P. Positive association between plasma fibrinogen level and incident hypertension among men: population-based cohort study. *Hypertension* 2006;48(6):1043-1049.

Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002;64:749-774.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.

Shi Y, Wu Y, Bian C, Zhang W, Yang J, Xu G. Predictive Value of Plasma Fibrinogen Levels in Patients Admitted for Acute Coronary Syndrome. *Tex Heart Inst J* 2010;37(2):178-183.

Shishehbor MH, Bhatt DL, Eric J Topol EJ. Using C-reactive protein to assess cardiovascular disease risk. *CCJM* 2003;70(7):634-640.

Shojaie M, Pourahmad M, Eshraghian A, Izadi HR, Naghshvar F. Fibrinogen as a risk factor for premature myocardial infarction in Iranian patients: a case control study. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:673-676.

Shyy J-J, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 2002;91:769-775.

Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 2009;335:191-203.

Singh U, Dasu MR, Yancey PG, Afify A, Devaraj S, Jialal I. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res* 2008;49:1015-1023.

Singh U, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases tissue plasminogen activator activity in human aortic endothelial cells: evidence that C-reactive protein is a procoagulant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2216-2221.

Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I. C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:780-791.

Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 2002;23:376-383.

Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H782-H7890.

Smit JJJ, Ottervanger JP, Slingerland RJ, Kolkman JJE, Suryapranata H, Hoorntje JCA, Dambrink JHE, Gosselink ATM, de Boer MJ, Zijlstra F, van 't Hof AWJ. Comparison of Usefulness of C-reactive Protein Versus White Blood Cell Count to Predict Outcome After Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 2008;101(5):446-451.

- Smith EM, Samadian S. Use of the erythrocyte sedimentation rate in the elderly. *Br J Hosp Med* 1994;51:394-397.
- Sobczak A, Goniewicz ML, Szoltysek-Boldys I. ADMA and SDMA levels in healthy men exposed to tobacco smoke. *Atherosclerosis* 2009;205(2):357-359.
- Sodha N R, Boodhwani M, Clements R T, Feng J, Xu S H, Sellke F W. Coronary Microvascular Dysfunction in the Setting of Chronic Ischemia is Independent of Arginase Activity. *Microvasc Res* 2008;75(2):238-246.
- Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429-1435.
- Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, Mauriello A. Role of Inflammation in Atherosclerosis. *J Nucl Med* 2007;48:1800-1815.
- Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hübner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 1998;63(6):732-739.
- Stec JJ, Silbershatz H, Tofler GH, Matheney TH, Sutherland P, Lipinska I, Massaro JM, Wilson PFW, Muller JE, D'Agostino RB. Association of Fibrinogen With Cardiovascular Risk Factors and Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation* 2000;102:1634-1638.
- Steinvil A, Shapira I, Arbel Y, Justo D, Berliner S, Rogowski O. Determinants of the Erythrocyte Sedimentation Rate in the Era of Microinflammation. Excluding Subjects With Elevated C-Reactive Protein Levels. *Am J Clin Pathol* 2008;129:486-491.
- Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1991;266:21839-21845.
- Stewart RAH, White HD, Kirby AC, Heritier SR, Simes RJ, Nestel PJ, West MJ, Colquhoun DM, Tonkin AM. White Blood Cell Count Predicts Reduction in Coronary Heart Disease Mortality With Pravastatin. *Circulation* 2005;111:1756-1762.
- Stocker R, Keaney JF. The role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478.
- Stone MC, Thorp JM. Plasma fibrinogen-a major coronary risk factor. *J Roy Coll Gen Pract* 1985;35:565-569.
- Stoneman VEA, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci* 2004;107:343-354.
- Storrow AB, Gibler WB. Chest pain centers: diagnosis of acute coronary syndromes. *Ann Emerg Med* 2000;35:449-461.

Sugioka K, Naruko T, Matsumura Y, Shirai N, Hozumi T, Yoshiyama M, Ueda M. Neopterin and atherosclerotic plaque instability in coronary and carotid arteries. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(11):1115-1121.

Suleiman M, Khatib R, Agmon Y, Mahamid R, Boulos M, Kapeliovich M, Levy Y, Beyar R, Markiewicz W, Hammerman H, Aronson D. Early inflammation and risk of long-term development of heart failure and mortality in survivors of acute myocardial infarction predictive role of C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:962-968.

Sun KH, Tang SJ, Wang YS, Lin WJ, You RI. Autoantibodies to dsDNA cross-react with the arginine-glycinerich domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (hnRNP A2) and promote methylation of hnRNP A2. *Rheumatology* 2003;42:154-161.

Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003;4:41-51.

Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57:244-252.

Štambuk K. Ishemijska bolest srca. U:Vrhovac B ur. *Interna medicina*. Naklada, Zagreb, 2008,573-606.

Takenaka H, Oshiro H, Kim DD, Thompson PN, Seyama A, Hobson RW 2nd, Durán WN. Microvascular transport is associated with TNF plasma levels and protein synthesis in postischemic muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;274:H1914-H1919.

Tandon V, Bano G, Khajuria V, Parihar A, Gupta S. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Pharmacol* 2005;37(2):77-85.

Tannous M, Cheung R, Vignini A, Mutus B. Atorvastatin increases ecNOS levels in human platelets of hyperlipidemic subjects. *Thromb Haemost* 1999;82(5):1390-1394.

Tavintharan S, Lim SC, Sum CF. Patients with low levels of high-density lipoprotein cholesterol: to treat or not to treat? *Singapore Med J* 2005;46(10):519-528.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev* 2006;86(2):515-581.

Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 2009;60(6):448-460.

Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 1999;7:169-77.

Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of MI or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-641.

Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-2195.

Tillett WS, Francis T. Serologic reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930;52:561-571.

Ting HJ, Stice JP, Schaff UY, Hui DY, Rutledge JC, Knowlton AA, Passerini AG, Simon SI. Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 2007;100:381-390.

Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, Chiariello L, Gioffre PA. Unstable angina and elevated C-reactive protein levels predict enhanced vasoreactivity of the culprit lesion. *Circulation* 2001;104:1471-1476.

Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997;96(12):4204-4210.

Tousoulis D, Davies G, Ambrose J, Tentolouris C, Stefanadis C, Toutouzas P. Effects of lipids on thrombotic mechanisms in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2002;86(2-3):239-247.

Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary Atherosclerosis. *Heart* 2003;89:993-997.

Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989;1:1122-1126.

Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frölich JC. Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF_{2 α} in end-stage liver disease. *Hepatology* 2003;38:1063-1064.

Tulenko TN, Sumner AE, Chen M, Huang Y, Laury-Kleintop L, Ferdinand FD. The smooth muscle cell membrane during atherogenesis: a potential target for amlodipine in atheroprotection. *Am Heart J* 2001;141(2 Suppl):S1-11.

Turu MM, Slevin M, Matou S, West D, Rodríguez C, Luque A, et al. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biol* 2008;9:47-53.

Tyagi N, Roberts A, Dean W, Tyagi S, Lominadze D. Fibrinogen induces endothelial cell permeability. *Mol Cell Biochem* 2008;307:13-22.

Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003;92:226-233.

Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:368-85.

Valkonen VP, Laakso J, Päivä H, Lehtimäki T, Lakka TA, Isomustajärvi M, Ruokonen I, Salonen JT, Laaksonen R. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels? *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):19-22.

Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358(9299):2127-2128.

Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023.

Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-575.

van Haelst PL, Liem A, van Boven AJ, Veeger NJ, van Veldhuisen DJ, Tervaert JW, et al. Usefulness of elevated neopterin and C-reactive protein levels in predicting cardiovascular events in patients with non-Q-wave myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003;92:1201-1203.

Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003;107:1486-1491.

Vasiljević-Pokrajčić ZM. Ishemijska bolest srca. U: *Kardiologija*. Nedeljković S, Kanjuh V, Vukotić M ur. Društveno preduzeće za izdavačko trgovinsku delatnost i strucno usavršavanje, Beograd, 2000;1105-1111.

Vasiljević-Pokrajčić ZM. Ishemijska bolest srca i principi lečenja. U: Kažić T, Ostojčić M ur. *Klinička kardiovaskularna farmakologija*. Integra, Beograd, 2004,243-268.

Vásquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, et al. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1655-1661.

Vengen IT, Dale AC, Wiseth R, Midthjell K, Videm V: Neopterin predicts the risk for fatal ischemic heart disease in type 2 diabetes mellitus. Long-term follow-up of the HUNT 1 study. *Atherosclerosis* 2009;207:239-244.

Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003;108:1676-1678.

Venugopal SK, Devaraj 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;166:1265-1271.

Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation* 2002;106:1439-1441.

Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.

Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1890-1896.

Verma S, Wang CH, Lonn E, et al. Cross-sectional evaluation of brachial artery flow-mediated vasodilation and C-reactive protein in healthy individuals. *Eur Heart J* 2004;25:1754-1760.

Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:661-665.

Wagner AH, Schwabe O, Hecker M. Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ. *Br J Pharmacol* 2002;136(1):143-149.

Walker DB. Serum Chemical Biomarkers of Cardiac Injury for Nonclinical Safety Testing. *Toxicol Pathol* 2006;34(1):94-104.

Walter RB, Fuchs D, Weiss G, Walter TR, Reinhart WH. HMG-CoA reductase inhibitors are associated with decreased serum neopterin levels in stable coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1314-1319.

Walzog B, Schuppan D, Heimpel C, Hafezi-Moghadam A, Gaehtgens P, Ley K. The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen. *Exp Cell Res* 1995;218:28-38.

Wang TJ, Gona P, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Tofler GH, Jacques PF, Meigs JB, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Newton-Cheh C, Vasan RS. Multiple biomarkers and the risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:432-438.

Wede I, Widner B, Fuchs D. Neopterin derivatives modulate toxicity of reactive species on *Escherichia coli*. *Free Radic Res* 1999;31(5):381-388.

Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *Br J Anaesth* 1998;81(Suppl 1):6-9.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.

Wever RMF, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998;97:108-112.

White CR, Brock TA, Chang L.Y., Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley W A, Gianturco S H, Gore J, Freeman BA. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:1044-1048.

Widner B, Mayr C, Wirleitner B, Fuchs D. Oxidation of 7,8-dihydroneopterin by hypochlorous acid yields neopterin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(2):307-311.

Wiest R, Shah V, Sessa WC, Groszmann RJ. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999;276:G1043-1051.

Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2479-2488.

Willoughby SR, Stewart S, Holmes AS, Chirkov YY, Horowitz JD. Platelet nitric oxide responsiveness: a novel prognostic marker in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(12):2661-2666.

Wilson SH, Best PJM, Edwards WD, Holmes DR, Carlson PJ, Celermajer DS, Lerman A. Nuclear factor- κ B immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002;160(1):147-153.

Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS. Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet* 1994;344:373-374.

Wirleitner B, Reider D, Ebner S, Böck G, Widner B, Jaeger M, Schennach H, Romani N, Fuchs D. Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. *J Leukoc Biol* 2002;72:1148-1153.

Wong CK, French JK, Gao W, White HD. Relationship between initial white blood cell counts, stage of acute myocardial infarction evolution at presentation, and incidence of Thrombolysis in Myocardial Infarction-3 flow after streptokinase. *Am Heart J* 2003;145:95-102.

Wu J, Stevenson MJ, Brown JM, Grunz EA, Strawn TL, Fay WP. C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(4):698-704.

Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2688.

Yan G, You B, Chen S-P, Liao JK, Sun J. TNF- α Downregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability via Translation Elongation Factor 1- α 1. *Circ Res* 2008;103(6):591-597.

Yan ZQ, Sirsjo A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF- κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2854-2862.

Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991;83:836-844.

Yasa M, Türkseven S. Vasoprotective Effects of Nitric Oxide in Atherosclerosis. *J Pharm Sci* 2005;30:41-53.

Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001;158:1039-1051.

Yeh ETH, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein. Using inflammatory markers in cardiology. *Circulation* 2003;107:370-372.

Zacharowski K, Zacharowski P, Reingruber S, Petzelbauer P. Fibrin(ogen) and its fragments in the pathophysiology and treatment of myocardial infarction. *J Mol Med* 2006;84:1434-1440.

Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, et al. Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 1995;91:2982-2988.

Zethelius B, Johnston N, Venge P. Troponin I as a Predictor of Coronary Heart Disease and Mortality in 70-Year-Old Men. *Circulation* 2006;113:1071-1078.

Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagby GJ, Chilian WM. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:475-480.

Zhang DX, Yi F-X, Zou A-P, Li P-L. Role of ceramide in TNF- α -induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries. *AJP - Heart* 2002;283(5):H1785-H1794.

Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW, Hartle DK. Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis* 2002;161(2):381-386.

Zhang H, Park Y, Wu J, ping Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci* 2009;116(3):219-230.

Zhang L, Sun T, Yu E, Yu L, Luo J, Li H, Fu Z. TNF- α expression, not iNOS expression, is correlated with NF- κ B activation in the spinal cord of rats following peripheral nerve injury. *Afr J Biotechnol* 2011;10(34):6372-6380.

Zhang Y, Harada A, Bluethmann H, Wang JB, Nakao S, Mukaida N, Matsushima K. Tumor Necrosis Factor (TNF) Is a Physiologic Regulator of Hematopoietic Progenitor Cells: Increase of Early Hematopoietic Progenitor Cells in TNF Receptor p55-Deficient Mice In Vivo and Potent Inhibition of Progenitor Cell Proliferation by TNF α In Vitro. *Blood* 1995;86:2930-2937.

Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich JC, Boger RH. Plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-2117.

Zoccali C, Boger RH. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):23-28.

Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine in end-stage renal disease patients: A biomarker modifiable by calcium blockade and angiotensin II antagonism? *Kidney Int* 2006;70:2053-2055.

Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of In Vitro Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells through Shedding of L-Selectin by C-Reactive Protein and Peptides Derived from C-Reactive Protein. *J Clin Invest* 1997;100(3):522-529.

Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Fredericks S, Kaski JC. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004;110:1747-1753.

Zouridakis EG, Garcia-Moll X, Kaski JC. Usefulness of the blood lymphocyte count in predicting recurrent instability and death in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000;86:449-451.

9. Прилог

9.1. Кључна документацијска информатика

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: монографска публикација

ТД

Тип записа: текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: докторска дисертација

ВР

Аутор: Сенада Д. Павловић

АУ

Ментор/коментор: Проф. др Видосава Б. Ђорђевић, редовни професор
Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област Биохемија

МН

Наслов рада: Биомаркери инфламације у исхемијској болести срца

НР

Језик публикације: Српски (ћирилица)

ЈП

Језик извода: Српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања: Република Србија

ЗП

Уже географско подручје: Србија

УГП

Година: 2012

ГО

Издавач: ауторски репринт

ИЗ

Место и адреса: Факултет Медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића
69, 34000 Крагујевац,

МС

Физички опис рада: докторска дисертација на 170 страна, садржи девет поглавља,
27 слика и 34 табеле и 612 референци.

ФО

Научна област: медицина

Научна дисциплина: кардиологија

ДИ

Предметна одредница/ кључне речи: маркери инфламације, атероскелроза
исхемијска болест срца,

ПО

УДК

Чува се: у библиотеци факултета Медицинских наука у Крагујевцу

ЧУ

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Датум прихватања теме од стране ННВ: 09. 03. 2011. године

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

- 1) Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник комисије

- 2) Проф. др Снежана Живанчевић-Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
- 3) Проф. др Горан Кораћевић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан

9. 2. Key Words Documentation

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type: monograph

DT

Type of record: text printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Senada D. Pavlović

AU

Menthor/co-mentor: Prof. dr Vidosava B. Djordjević, full-time professor of Medical faculty Niš, Department of Biochemistry

Title: Biomarkers Of Inflammation In Ischemic Heart Disease

TI

Language of abstract: english

LT

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Serbia

LP

Publication year: 2012

PY

Publisher: author reprint

PU

Publication place: Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac.

PP

Physical description: PhD thesis has 168 pages, including 9 chapters, 27 figures, 34 tables and 612 references.

PD

Scientific field: Medicine

SF

Scientific discipline: Cardiology

SD

Subject/key words: markers of inflammation, atherosclerosis, ischemic heart disease

SKW

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences Kragujevac

Note:

N

Abstract:

AB

Background: Ischemic heart disease is mostly a consequence of atherosclerosis. Atherosclerosis, a chronic inflammatory disease, underlies the pathogenesis of coronary artery disease. The present study assessed the diagnostic and prognostic validity of inflammatory biomarkers, including high sensitive C-reactive protein (hsCRP), fibrinogen, ESR, leukocytes, serum neopterin, nitrite/nitrate ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) and their correlation with risk factors in patients with acute coronary syndrome and stable angina pectoris.

Methods: We studied 74 patients with chronic stable angina pectoris, 73 with unstable angina, 94 with acute myocardial infarction and 66 age-matched healthy volunteers (control group). Serum neopterin, ADMA, iNOS and TNF- α were determined by the commercially available enzyme linked immunosorbent assay methods and $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ by the modified cadmium-reduction method. The diagnostic accuracy of markers was evaluated by the ROC curve analysis.

Results: Mean serum neopterin levels were significantly higher in patients with unstable and stable angina pectoris in comparison to control subjects ($p < 0.05$, for both patients groups). Serum $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ values were significantly elevated ($p < 0.01$) in patients with unstable angina and acute myocardial infarction. Serum iNOS were significantly elevated in patients with unstable angina pectoris in comparison to control subjects ($p < 0.05$). TNF-

α was significantly elevated in patients with acute myocardial infarction in comparison to patients with stable angina pectoris ($p < 0.001$) and the control group ($p < 0.01$). Serum ADMA values were significantly elevated ($p < 0.001$) in all patient groups. The highest concentration of hsCRP, fibrinogen and leukocytes were noted in patients with acute myocardial infarction, while ESR was significantly higher in patients with unstable angina pectoris. A strong correlation was found between LE and smoking ($p < 0.05$), and triglycerides and ESR ($p < 0.05$), neopterin and physical inactivity ($p < 0.05$), $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ and both DM ($p < 0.01$) and physical inactivity ($p < 0.05$) in stable angina pectoris patients. In unstable angina pectoris patients a significant correlation was found between smoking and hsCRP ($p < 0.05$), family history and both fibrinogen ($p < 0.05$) and LE ($p < 0.05$), neopterin and concentration of lipids ($p < 0.05$), obesity and $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($p < 0.05$). Also significant correlation was found between DM and both LE ($p < 0.05$) and hsCRP ($p < 0.01$), ADMA and both DM ($p < 0.05$) and smoking ($p < 0.05$) in patients with acute myocardial infarction.

Conclusion: The results of this study suggest that elevated baseline levels of ADMA are a strong and independent predictor of ischemic heart disease. Continuous monitoring of serum neopterin and $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ levels may indicate future plaque instability. Interdependence between inflammatory markers and cardiovascular risk factors was established.

Accepted by the Scientific Board on: 3rd september 2011.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

- 1) Prof.dr Aleksandar Djukić, full-time professor, Faculty of medical sciences Kragujevac, Department of pathophysiology, President of the Commission
- 2) Prof. dr Snežana Živančević-Simonović, full time professor, Faculty of medical sciences Kragujevac, Department of pathophysiology, member
- 3) Prof. dr Goran Koraćević, associate professor, Medical faculty Niš, Department of Internal medicine, member

9. 3. Идентификациона страница докторске дисертације

<i>I. Аутор</i>
<i>Име и презиме:</i> Сенада Д. Павловић
<i>Датум и место рођења:</i> 14. 11. 1978. год., Неготин
<i>Садашње запослење:</i> Специјална Болница за интерне болести „др Ђорић“ у Нишу
<i>II. Докторска дисертација</i>
<i>Наслов:</i> Биомаркери инфламације у исхемијској болести срца
<i>Број страница:</i> 168
<i>Број слика:</i> 27 <i>Број табела:</i> 34
<i>Број библиографских података:</i> 612
<i>Установа и место где је рад израђен:</i> Институт за кардиоваскуларне болести Нишка Бања, Центар за медицинску биохемију Клиничког центра у Нишу
<i>Научна област (УДК):</i> Клиничка и експериментална интерна медицина- модул кардиологија
<i>Ментор:</i> Проф. др Видосава Б. Ђорђевић, редовни професор Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област Биохемија
<i>III. Оцена и одбрана</i>
<i>Датум пријаве теме:</i> 26. 11. 2010. год.
<i>Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:</i> 186/9, 09.03.2011. год.
<i>Комисија за оцену подобности теме и кандидата:</i> <ol style="list-style-type: none">1) Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник2) Проф. др Снежана Живанчевић-Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан3) Проф. др Видосава Ђорђевић, редовни професор Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област Биохемија, ментор
<i>Комисија за оцену докторске дисертације:</i> <ol style="list-style-type: none">1) Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија2) Проф. др Снежана Живанчевић-Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија3) Проф. др Горан Кораћевић, ванредни професор Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина

Комисија за одбрану докторске дисертације:

- 1) Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, председник комисије
- 2) Проф. др Снежана Живанчевић-Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
- 3) Проф. др Горан Кораћевић, ванредни професор Медицинског факултета универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан

Датум одбране дисертације:

Садржај

1.	Увод.....	1
2.	Преглед литературе.....	2
2.1.	Исхемијска болест срца и атеросклероза.....	2
2.2.	Маркери инфламације у исхемијској болести срца.....	6
2.2.1.	Ц-реактивни протеин (CRP).....	6
2.2.2.	Фибриноген.....	11
2.2.3.	Неоптерин.....	15
2.2.4.	Азот-моноксид (NO).....	18
2.2.5.	Асиметрични диметиларгинин (ADMA).....	24
2.2.6.	Фактор некрозе тумора- α (TNF- α).....	28
3.	Циљ истраживања.....	31
4.	Пацијенти, материјал и методе.....	32
4.1.	Пацијенти и биолошки материјал.....	32
4.2.	Методологија рада.....	33
4.2.1.	Стандардни биохемијски параметри.....	33
4.2.2.	Липидни профил.....	34
4.2.3.	Срчани маркери.....	34
4.2.4.	Стандардни маркери инфламације.....	35
4.2.5.	Нестандардни маркери инфламације.....	36
4.2.6.	Статистичка обрада података.....	38
5.	Резултати рада.....	39
5.1.	Дистрибуција испитаника према старосној доби и према полу.....	39
5.2.	Кардиоваскуларни фактори ризика.....	39
5.3.	Терапијски профил испитаника са исхемијском болешћу срца.....	40
5.4.	Стандардни биохемијски параметри код испитаника.....	43
5.5.	Липидни статус.....	44
5.6.	Срчани маркери.....	45
5.7.	Стандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца.....	47
5.8.	Нестандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца.....	51
5.9.	Корелације стандардних и нестандардних маркера инфламације код болесника са исхемијском болешћу срца.....	56
5.10.	Корелације стандардних маркера инфламације и фактора ризика код болесника са исхемијском болешћу срца.....	60
5.11.	Корелације нестандардних маркера инфламације и фактора ризика код болесника са исхемијском болешћу срца.....	62
5.12.	ROC криве биомаркера инфламације код пацијената са исхемијском болешћу срца.....	65
6.	Дискусија.....	71
6.1.	Фактори ризика у исхемијској болести срца.....	72
6.2.	Срчани маркери у исхемијској болести срца.....	73
6.2.1.	Рани срчани маркери у исхемијској болести срца.....	75
6.2.2.	Средњи и касни срчани маркери у исхемијској болести срца.....	79
6.3.	Липидни маркери у исхемијској болести срца.....	80
6.4.	Маркери инфламације у исхемијској болести срца.....	88

6.4.1. Стандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца	88
6.4.2. Нестандардни маркери инфламације у исхемијској болести срца.....	98
7. Закључци	112
8. Литература	114
9. Прилог	161