

Ena Matišić

**Povezanost hematoloških parametara s
kardiovaskularnim rizikom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017. godina

Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić te je predan kao diplomski rad.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, vremenu, strpljenju, prijateljskom pristupu te velikoj pomoći pri izradi ovog rada.

Hvala i Ivani Čelap, spec. med. biokemije i laboratorijske medicine na uloženom trudu, vremenu i korisnim savjetima pri izvedbi praktičnog dijela rada te osoblju Kliničkog zavoda za kemiju. I na kraju, veliko hvala svim mojim bližnjima koji su bili uz mene tijekom ovih 5 godina studiranja.

SADRŽAJ

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1.1. | Biologija trombocita | 1 |
| 1.1.2. | Uloga trombocita u aterogenezi | 2 |
| 1.1.3. | PDW i MPV - laboratorijski pokazatelji svojstva trombocita | 4 |
| 1.1.4. | Biologija eritrocita | 5 |
| 1.1.5. | Uloga eritrocita u aterogenezi | 6 |
| 1.1.6. | RDW i MCV- laboratorijski pokazatelji svojstava eritrocita | 7 |
| 1.2. | KARDIOVASKULARNE BOLESTI | 9 |
| 1.2.1. | Uloga lipida u aterogenzi | 9 |
| 1.2.2. | Smjernice NCEP: Adult Treatment Panel (ATP) III Recommends..... | 10 |
| 1.2.3. | Esencijalna hipertenzija | 11 |
| 2. | OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. | MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. | Ispitanici..... | 15 |
| 3.2. | Priprema ispitanika za uzorkovanje i uzorkovanje | 16 |
| 3.3. | Priprema uzorka | 16 |
| 3.4. | Automatizirane metode | 16 |
| 3.5. | Statističke metode | 18 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. | Deskriptivna statistika rezultata mjerenja | 19 |
| 4.2. | Ispitivanje korelacija | 22 |
| 4.3. | Usporedba mjerenih veličina između skupina ispitanika..... | 27 |
| 4.4. | Rasprava..... | 31 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 34 |
| 6. | LITERATURA | 35 |
| 7. | SAŽETAK/SUMMARY | 41 |
| 8. | PRILOZI..... | 43 |
| 8.1. | Popis kratica..... | 43 |

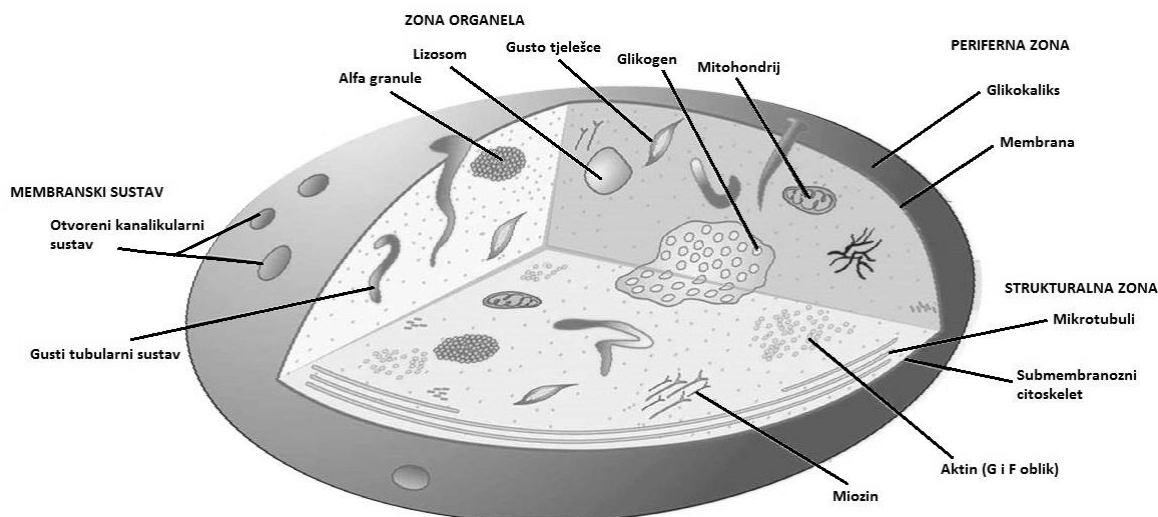
1. UVOD

1.1.1. Biologija trombocita

Trombociti su mali, anuklearni fragmenti stanica diskoidnog oblika. Imaju vrlo važnu ulogu u hemostazi, odnosno u odgovoru organizma na ozljedu krvne žile i krvarenje. Stvaraju se u koštanoj srži fragmentiranjem citoplazme zrelih megakariocita, koji nastaju iz nezrelih hematopoeznih stanica. Proces diferencijacije u megakariocite i njihovo sazrijevanje te stvaranje trombocita nazvan je megakariocitopoeza.

Najnezrelija morfološki prepoznatljiva prethodna stanica trombocitne loze jest megakarioblast. Iz megakarioblasta redom nastaju promegakariocit, granulirani megakariocit te zreli megakariocit. Zreli megakariociti nemaju sposobnost diferencijacije, ali zato imaju sposobnost povećane sinteze DNA bez diobe. Trombociti nastaju iz citoplazme zrelog megakariocita stvaranjem izduženih protruzija nazvanih protrombocitima, a iz jednog zrelog megakariocita mogu nastati 2000-4000 trombocita. Glavni humoralni faktor rasta megakariocitopoeze je trombopoetin koji je odgovoran za održavanje stalnog broja trombocita u perifernoj krvi, a koji iznosi $158-424 \times 10^9/L$ te je određen hematološkim brojačem. Duljina života trombocita u perifernoj je krvi 9-10 dana (McKenzie, 2004; Labar, 2007; Stavljenić i sur., 2007).

Struktura trombocita podijeljena je u 4 zone: periferna zona, strukturalna zona, zona organela te membranski sustav (Slika 1). Periferna zona trombocita obavijena je glikokaliksom, omotačem koji sadrži plazmatske proteine i faktore koagulacije, fibrinolize i komplementa. Strukturalnu zonu čine filamenti i mikrotubuli koji čine skelet trombocita. U unutrašnjosti trombocita, u zoni organela nalaze se alfa-granule, guste granule, lizosomi, mitohondriji i glikogen. Alfa-granule sadrže adhezivne proteine (fibrinogen, vWF), faktore rasta (PDGF, TGF-beta, PF4, trombospondin) i faktore koagulacije (faktor V, HMWK, fibrinogen, faktor XI, protein S, PAI-1). Guste granule sadrže ADP, ATP, serotonin te kalcij. Ispod glikokaliksa nalazi se negativno nabijena membrana, sastavljena od konglomerata lipidnih i proteinskih molekula. Glavni dijelovi membranskog sustava su otvoreni kanalikularni sustav i gusti tubularni sustav. Invaginacijom plazmatske membrane u trombocitu stvara se otvoreni kanalikularni sustav pri čemu nastaje velika površina preko koje se adsorbiraju specifični faktori zgrušavanja, a sadržaj trombocitnih granula ima bolju vezu s okolicom. Gusti tubularni sustav trombocita, kojeg čine ostatci endoplazmatskog retikula, sadrži određenu količinu kolagena i mjesto je sinteze prostaglandina i tromboksana A_2 (McKenzie, 2004).



Slika 1. Ultrastruktura trombocita (preuzeto i prilagođeno prema McKenzie, 2004)

Temeljna funkcija trombocita je stvaranje mehaničkog, privremenog ugruška tijekom hemostatskog odgovora na ozljedu krvne žile. Ova je reakcija posljedica sposobnosti trombocita da adheriraju i čvrsto se međusobno povezuju te luče aktivne tvari, osobito tvari s prokoagulatnim aktivnostima. Trombociti se odmah nakon ozljede sljepljuju (adheriraju) na slobodno vezivno subendotelno tkivo. U procesu sljepljivanja i fuzije trombocita aktivno sudjeluje i von Willebrandov faktor. Istodobno, u kontaktu s kolagenom trombociti oslobađaju ili luče niz aktivnih metabolita kao što su ADP, serotonin, lizosomski enzimi, fibrinogen, beta-tromboglobulin, PF4, trombocitni faktor A₂ i trombocitni fosfolipidi. S jedne strane, navedeni metaboliti pojačavaju agregaciju trombocita, a s druge dovode do vazokonstrukcije ozlijeđene krvne žile i sudjeluju u aktivaciji sustava zgrušavanja (Čepelak i sur., 2004).

1.1.2. Uloga trombocita u aterogenezi

U fiziološkim uvjetima trombociti cirkuliraju vaskularnim sustavom bez značajnih interakcija sa stijenkom krvnih žila. Štoviše, adheziju odnosno aktivaciju trombocita sprječava endotel koji luči nekoliko lokalnih antitrombotičkih i vazoaktivnih tvari kao što su prostaciklini i dušični oksid (NO). Međutim, niz rizičnih čimbenika kao što su pušenje, dijabetes, visok krvni tlak, niske razine HDL-kolesterola, povišene razine modificiranog LDL-kolesterola mogu uzrokovati endotelnu disfunkciju (Fuster i sur., 2005).

Endotelna disfunkcija jedna je od početnih meta i okidača događaja odgovornih za formiranje aterosklerotskih lezija i akutnih aterotrombotičkih komplikacija. Na mjestu endotelne disfunkcije nakupljaju se cirkulirajući monociti, plazmatski lipidi te trombociti. Oštećene

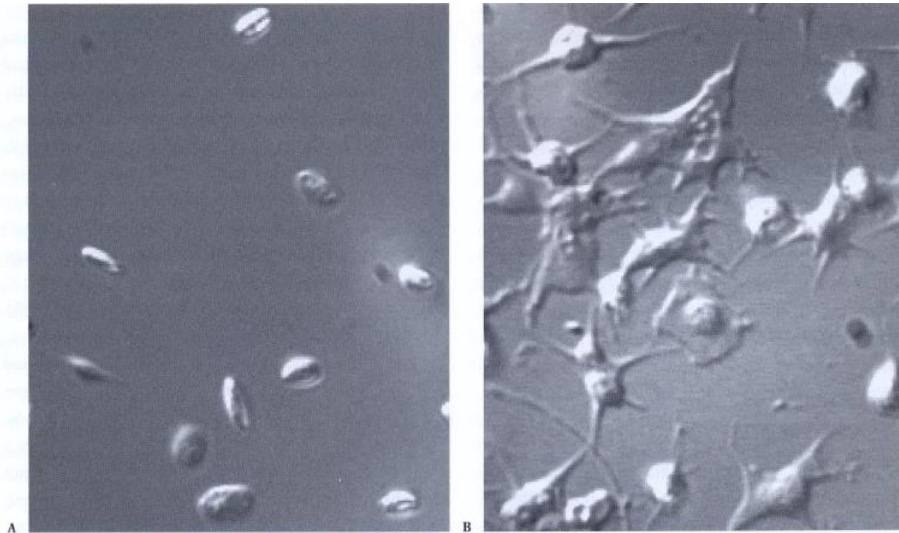
endotelne stanice, monociti i agregirani trombociti otpuštaju razne faktore koji potiču migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Proliferacija glatkih mišićnih stanica, povećana receptorima posredovana akumulacija lipida te povećana sinteza vezivnog tkiva zajedno dovode do tvorbe tipičnog ateromatoznog plaka. Cikličko ponavljanje ovih događaja u konačnici rezultira hiperplazijom intime krvne žile i razvojem aterosklerotskog plaka.

Trombociti vrlo brzo dolaze u područje vaskularne ozljede gdje direktno adheriraju na oštećeni endotel ili izloženi kolagen i/ili makrofage. Histološka istraživanja trombocita pokazala su prisustvo trombocita i trombocitnih antigena u aterosklerotskim lezijama u skoro svima fazama aterosklerotske bolesti (Faggiotto i sur., 1984).

Molekularni mehanizmi odgovorni za aktivaciju trombocita na početku aterosklerotskog procesa još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavlja se da aterosklerotskom procesu mogu pridonijeti poremećena antitrombotička funkcija endotela, oslobađanje reaktivnih kisikovih spojeva te značajan porast protrombotičkih i proupalnih medijatora u cirkulaciji ili imobiliziranih na endotel (Huo Y i Ley KF, 2004). Adherirani trombociti zajedno s disfunkcionalnim endotelom otpuštaju u cirkulaciju kemotaktički aktivne tvari (RANTES, PF4) i faktore rasta (PDGF, TGF- β , epidermalni faktor rasta te fibroblastni faktor rasta) koji stimuliraju migraciju, akumulaciju i proliferaciju glatkih mišićnih stanica i leukocita u intimi arterija.

Prijašnje su studije dokazale da je "kotrljanje" trombocita po oštećenom endotelu uglavnom posredovano trombocitnim glikoproteinom Iba koji veže vWF i endotelnu adhezijsku molekulu P-selektin. P-selektin se nalazi u alfa-granulama trombocita i u Weibel-Paladeovim tjelešcima u endotelnim stanicama, a važan je biljeg aktivacije trombocita. Trombociti sudjelujući u aterosklerotskom procesu ekspimiraju više P-selektina na svojoj površini. Osim ekspresije glikoproteina Iba i P-selektina, disfunkcionalni endotel također ekspimirira i druge molekule, selektine i integrine, koji pospješuju agregaciju trombocita (Stenberg i sur., 1985).

Cirkulirajuće tvari poput adrenalina, trombina, serotoninina, tromboksana A₂, te ADP-a (lokalno oslobođenih iz eritrocita ili trombocitnih granula) aktiviraju trombocite putem specifičnih trombocitnih receptora. Jednom aktivirani, trombociti značajno mijenjaju oblik, a citosolne koncentracije kalcija rastu. Porast citosolnih koncentracija kalcija potiče degranulaciju trombocitnih granula. Degranulacijom se otpuštaju razne tvari koje potiču daljnju aktivaciju trombocita. Adhezija i daljnja aktivacija trombocita dovode do ekspresije $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptora koji olakšavaju interakciju između cirkulirajućih i adheriranih trombocita.



Slika 2. Struktura trombocita u mirovanju (A) i aktivirani trombociti (B) (preuzeto i prilagođeno prema Gresele i sur., 2008)

1.1.3. PDW i MPV- laboratorijski pokazatelji svojstva trombocita

Laboratorijski pokazatelji svojstava trombocita, odnosno konstante koje ih opisuju, jesu trombokrit (PCT), prosječni volumen trombocita (MPV), te distribucija stanica trombocita prema volumenu (PDW). Trombocitni parametri potencijalni su rani dijagnostički biljezi tromboembolijskih događaja.

MPV je najčešće korišten parametar koji opisuje veličinu trombocita i potencijalni je biljeg aktivnosti trombocita. Automatski je izračunata veličina, rutinski je dostupan te se izdaje na nalazu krvnih pretraga kao dio kompletne krvne slike. Veći trombociti metabolički su i enzimski aktivniji te imaju veći protrombotički potencijal (Kamath i sur., 2001). Povišene vrijednosti MPV-a povezane su s drugim pokazateljima aktivnosti trombocita, uključujući povećanu agregaciju trombocita, sintezu tromboksana, otpuštanje β -trombomodulina i ekspresiju adhezijskih molekula (Bath i Butterworth, 1996). Nadalje, povišene vrijednosti MPV-a opažene su u pacijenata s dijabetesom, hipertenzijom, hiperkolesterolemijom, pretilošću i u pacijenata koji puše (Sansanayudh i sur., 2016).

Kao i MPV, PDW je veličina izračunata pomoću automatskih hematoloških analizatora, a ukazuje na raznolikost trombocita u veličini. Aktivirani trombociti mijenjaju oblik u sferičan te formiraju karakteristične pseudopodije (Slika 2). Tako formirani trombociti, razlikuju se u veličini, utječući na promjenu odnosno povećanje PDW-a (Vagdatli i sur., 2010).

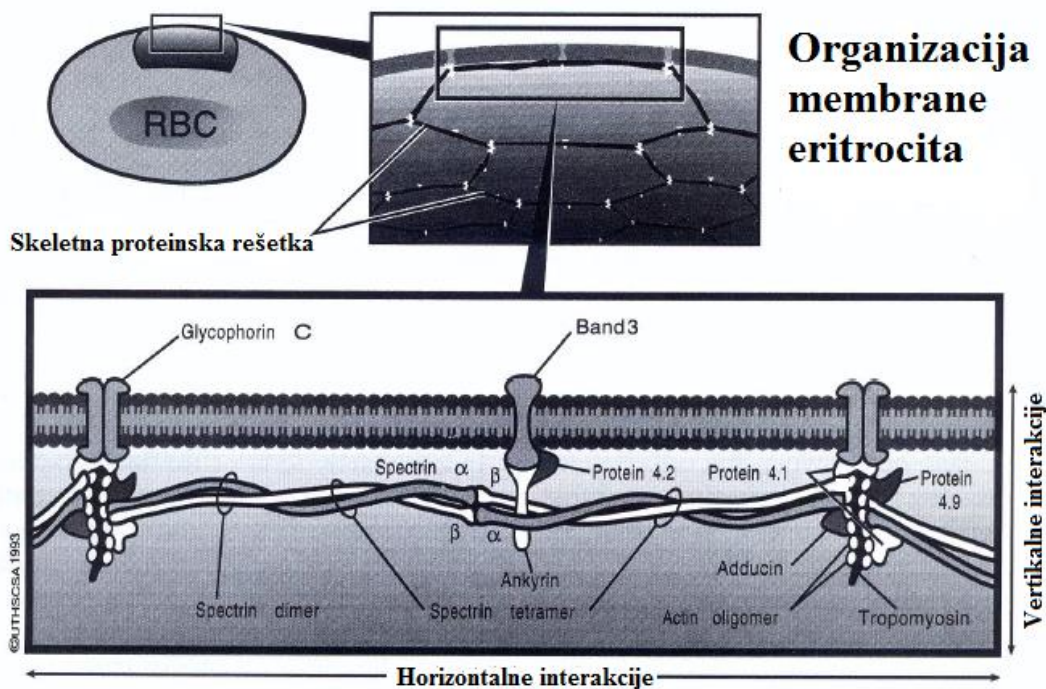
1.1.4. Biologija eritrocita

Eritrociti su najbrojnije krvne stanice, bikonveksnog oblika i bez jezgre. Svaki se dan u odrasla čovjeka stvara oko 10^{12} novih eritrocita unutar dobro kontroliranog procesa eritrocitopoeze u koštanoj srži. Morfološki najnezrelija stanica eritrocitne loze koja se može prepoznati jest proeritroblast, a nastaje diferencijacijom iz pluripotentne matične stanice. Sljedeća razvojna stanica je bazofilni eritroblast i u tom se stadiju u citoplazmi počinje stvarati hemoglobin. Iz bazofilnog eritroblasta nastaje polikromatofilni eritroblast, a nakon toga ortokromni te acidofilni eritroblast. U stadiju acidofilnog eritroblasta stanica gubi jezgru te nastaje stanica bez jezgre, retikulocit ili mladi eritrocit (McKenzie, 2004; Labar, 2007).

Proeritroblasti sazrijevaju i proliferiraju unutar koštane srži 5-7 dana do stadija retikulocita, kada počinje njihovo otpuštanje u perifernu krv. Životni vijek eritrocita je 100-120 dana. Osnovni regulator eritrocitopoeze je glikozilirani polipeptidni hormon, eritropoetin. Oko 90% hormona nastaje u bubregu, a 10% u jetri. Najjači poticaj za stvaranje eritropoetina je pad parcijalnog tlaka kisika u bubrežnom tkivu, tj. hipoksija. Eritropoetin potiče eritrocitopoezu i tako povećava opskrbu tkiva kisikom (Labar, 2007; Čepelak i sur., 2004).

Eritrociti su, kako je navedeno, bikonkavne stanice promjera 7-8 μm te veličine 80-100 fL. Bikonkavni oblik znatno povećava njihovu površinu, a time poboljšava izmjenu kisika s tkivima. Membrana eritrocita sastoji se od bipolarnog lipidnog dvosloja koji sadrži strukturne i kontraktilne proteine, te brojne enzime i površinske antigene. Proteini čine 52%, lipidi 40%, a ugljikohidrati 8% eritrocitne membrane. Normalna i intaktna membrana eritrocita neophodna je za njihovu funkciju i preživljavanje. Kemijska struktura i komponente membrane reguliraju funkcije transporta i fleksibilnosti te određuju antigenski sastav eritrocita (Slika 3). Zreli eritrociti nemaju jezgru, mitohondrije i enzime nužne za sintezu novih proteina i lipida, stoga veće oštećenje eritrocita rezultira staničnom smrću.

Neesterificirani kolesterol i fosfolipidi u podjednakim količinama čine 95% lipidnog sastava membrane, a ostatak čine slobodne masne kiseline i glikolipidi. Membranski proteini dijele se na integralne i periferne, a sintetiziraju se za vrijeme sazrijevanja eritrocita. Ugljikohidrati se nalaze isključivo na vanjskom dijelu membrane i određuju antigensku strukturu eritrocita. Jedan se dio ugljikohidrata nalazi na membranskim proteinima (glikoforini), a drugi su vezani na membranu preko njezina lipidnog dijela. S unutarnje strane membrane četiri proteina (spektrin, aktin, protein 4.1 i ankirin) tvore proteinsku rešetku i time određuju bikonkavan oblik eritrocita.



Slika 3. Organizacija eritrocitne membrane (preuzeto i prilagođeno prema McKenzie, 2004)

Metabolizam eritrocita je oskudan budući da nemaju jezgru, mitohondrije niti druge organele. Iako su vezanje, transport i otpuštanje kisika i ugljikovog dioksida pasivni procesi, koji ne zahtijevaju energiju, eritrociti su razvili nekoliko načina stvaranje energije: (1) Embden-Meyerhofov put, (2) heksoza monofosfat šant, (3) put methemoglobin reduktaze, (4) Rapoport-Luebering šant. Navedeni putevi doprinose stvaranju energije potrebne za održavanje volumena, oblika i fleksibilnosti eritrocita te za održavanje hemoglobina i glutationa u reduciranom obliku.

Temeljna funkcija eritrocita je prijenos kisika iz pluća u tkiva i ugljikova dioksida iz tkiva natrag u pluća. Za prijenos kisika odgovoran je hemoglobin. Svaki eritrocit sadržava oko 640 milijuna molekula hemoglobina. Svaka se molekula adultnog (odraslog, zrelog) hemoglobina sastoji od 4 polipeptidna lanca. Svaki od tih lanaca sadržava po jednu hem skupinu, a na svaku hem skupinu veže se po jedna molekula kisika (McKenzie, 2004; Labar, 2007).

1.1.5. Uloga eritrocita u aterogenezi

Ateroskleroza je kronična, upalna bolest. Brojna su istraživanja provedena u svrhu objašnjenja biokemijskih puteva nastanka i razvoja aterosklerotskog plaka. Također, dokazano je da su komponente periferne krvi važni medijatori formiranja i progresije aterosklerotskih lezija. Međutim, dosadašnja istraživanja fokusirala su se uglavnom na doprinos leukocita i trombocita aterosklerotskom procesu. Eritrociti su donedavno smatrani pasivnim

"promatračima" i samo su se poneka istraživanja bavila njihovom ulogom i važnošću u progresiji i destabilizaciji aterosklerotskog plaka.

Roberts i Virmani prvi su 1983. godine ukazali na prisutnost hemoliziranih eritrocita i željeza u koronarnom aterosklerotskom plaku, a kasnije su pokazali da je količina hemoliziranih eritrocita i željeza unutar plaka proporcionalna veličini koronarnog aterosklerotskog plaka. Istraživanja koja su uslijedila dokazala su eritrocitne membrane u aterosklerotskim plakovima izvan koronarne cirkulacije te u nekrotizirajućoj jezgri uznapređovalog koronarnog ateroma, a čija je količina korelirala s veličinom nekrotizirajuće jezgre (Kolodgie i sur., 2003; Arbustini i sur., 2002). Navedena su istraživanja dala naslutiti da kolesterol pohranjen u membranama eritrocita, zarobljen unutar aterosklerotskog plaka, pridonosi rastu nekrotizirajuće jezgre.

Međutim, mehanizmi kojim eritrociti sudjeluju u stvaranju i napredovanju aterosklerotskog plaka još uvijek nisu potpuno jasni. Apostolakis i suradnici su 2011. godine na eritrocitima otkrili receptore za kemokine koji posjeduju visok afinitet za određene kemokine, a poznato je da su kemokini jedni od najvažnijih medijatora u nastanku i progresiji aterosklerotske bolesti. Otkrili su moguću povezanost upalne kaskade regulirane kemokinima unutar aterosklerotskog plaka s progresijom bolesti.

Najnovija istraživanja upućuju na snažan doprinos kolesterola iz membrana eritrocita "zaglavljениh" u aterosklerotskom plaku, a to potvrđuje i nalaz prethodnih istraživanja koja upućuju da količina kolesterola iz membrana eritrocita u aterosklerotskoj leziji pozitivno korelira s težinom ateroskleroze. Eritrociti bogatiji kolesterolom, rigidniji su i skloniji lizi. Nakon njihova prsnuća dolazi do oslobađanja hemoglobina te posljedičnog stvaranja i nakupljanja reaktivnih kisikovih spojeva na mjestu aterosklerotske lezije (da Silva Garrote-Filho i sur., 2017).

1.1.6. RDW i MCV- laboratorijski pokazatelji svojstava eritrocita

Laboratorijski pokazatelji svojstava eritrocita, tj. konstante koje ih opisuju jesu prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (MCHC) te distribucija stanica eritrocita prema volumenu (RDW).

MCV je prosječni volumen jednog eritrocita izražen u femtolitrima (fL), a izdaje se na nalazu kao dio kompletne krvne slike. Obično se koristi za razvrstavanje eritrocita na normocite (80-100 fL), mikrocite (<80 fL) ili makrocite (>100 fL), odnosno u klasifikaciji anemija. Postoje istraživanja koja upućuju da bi MCV mogao imati prognostičku ulogu u komplikaciji ateroskleroze jer je dokazano da bolesnici s makrocitima, nakon perkutane koronarne

intervencije (koronarne angioplastike) imaju veći rizik od komplikacije bolesti (Myoyo i sur., 2012).

RDW je mjera varijabilnosti u veličini cirkulirajućih eritrocita, te je kao i MCV, parametar koji je rutinski dosputan kao dio kompletne krvne slike. Baziran je na krivulji raspodjele eritrocita po veličini, a više vrijednosti znače i veću varijabilnost te je ekvivalent anizocitoze promatrane u razmazu periferne krvi. RDW je tipično povišen u pacijenata s deficitnom proizvodnjom eritrocita (nedostatak željeza, B12 vitamina, folata, hemoglobinopatije), s hemolizama (povećano uništavanje eritrocita) i u pacijenata koji su primili transfuzije krvi. Proteklih godina pojavio se povećan broj radova u kojima se istraživala povezanost RDW-a s kardiovaskularnim bolestima. Većina njih predlaže povezanost između povišenog RDW-a i neželjenih kardiovaskularnih događaja među nizom patologija kao što su srčano zatajenje, metabolički sindrom, stabilna koronarna arterijska bolest bez disfunkcije lijevog ventrikula, moždani udar, infarkt miokarda, periferna arterijska bolest i plućna hipertenzija (Tziakas, 2012). Nađena je i povezanost RDW-a sa zadebljanjem intime krvnih žila u pacijenata s aterosklerozom karotidne arterije (Soderholm i sur., 2015; Wen, 2010) te povećanom incidencijom srčanog i moždanog udara (Wonnerth i sur., 2016).

Lippi i suradnici su 2009. predložili inhibiciju eritrocitopoeze kao jedan od mehanizama kojim eritrociti u aterosklerotskom plaku utječu na povišene vrijednosti RDW-a. Eritrocitopoeza u upalnom procesu, kao što je ateroskleroza, može biti inhibirana direktno putem citokina koji pojačavaju rezistenciju eritropoetina te indirektno, smanjenim razinama željeza u krvi što znači da je manje željeza raspoloživo za proizvodnju novih eritrocita u koštanoj srži.

1.2. KARDIOVASKULARNE BOLESTI

Bolesti srca i krvnih žila najčešće su uzrokovane aterosklerozom, a vodeći su uzrok smrtnosti i velik javnozdravstveni problem u brojnim zemljama zapadne civilizacije. Stoga, mnoge zemlje uspostavljaju nacionalne programe prevencije kardiovaskularnih bolesti. U Hrvatskoj je prema statističkim podacima iz 2010. godine od kardiovaskularnih bolesti ukupno umrla 25 631 osoba, a opća stopa smrtnosti od ovih bolesti je iznosila 580,2/100.000 što znači da od ovih bolesti umire svaki drugi stanovnik Hrvatske. Vodeće dijagnostičke podskupine s najvećim mortalitetom u skupini kardiovaskularnih bolesti (KVB) ishemijske (koronarne) su bolesti srca i cerebrovaskularne bolesti, zatim srčana insuficijencija te hipertenzija. Dobno-specifične stope smrtnosti za KVB povećavaju se s dobi i više su u muškaraca nego u žena u svim dobnim skupinama. Intenzivnije povećanje smrtnosti počinje u dobi od iznad 50 godina (Štraus, 2009).

1.2.1. Uloga lipida u aterogenzi

Veliko značenje i primjenu u kliničkoj praksi imaju lipoproteini zbog uloge u nastanku koronarne srčane bolesti. Promjene metabolizma lipoproteina i lipida (sinteza, transport, katabolizam) rezultiraju bolestima koje se nazivaju dislipidemije ili dislipoproteinemije. Lipoproteini su kompleksne biomolekule odgovorne za transport kolesterola, kolesterol estera, triglicerida i fosfolipida u krvi. Dijele se na hilomikrone, lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL), lipoproteine niske gustoće (LDL), lipoproteine visoke gustoće (HDL) te lipoproteine srednje gustoće (IDL).

Kardiovaskularni bolesnici zahtijevaju praćenje lipidnog profila s obzirom na njihovu poznatu ulogu u nastanku i progresiji aterosklerotske bolesti. Lipidni profil obuhvaća sljedeće pretrage: ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol te trigliceride. HDL-kolesterol i LDL-kolesterol najvažniji su laboratorijski pokazatelji rizika KVB-a.

Povećane koncentracije triglicerida djeluju kao akcelerator aterogenze, mijenjajući fizikalne karakteristike lipoproteinskih čestica putem CETP-a (engl. *cholesterol ester transfer protein*), koji omogućuje brz prijenos triglicerida i kolesterol estera između subklasa lipoproteina.

Koncentracije HDL-kolesterola u krvi obrnuto su proporcionalne riziku od kardiovaskularnih bolesti, a snižene vrijednosti HDL-kolesterola neovisan su čimbenik rizika KVB-a. HDL-kolesterol djeluje pozitivno na metabolizam lipida te funkciju endotela zbog toga što prenosi kolesterol iz tkiva u jetru, posjeduje protuupalna i protuoksidacijska svojstva te protutrombotska i protuapoptotska svojstva. Međutim, u određenim stanjima i pod određenim

uvjetima dolazi do promjene HDL-čestica koje gube svoju primarnu funkciju, štoviše modificirane HDL-čestice postanu aterogene.

LDL-kolesterol jedan je od uzročnika koronarne srčane bolesti, a brojna klinička i epidemiološka ispitivanja potvrđuju njegova aterogena svojstva. Od svih lipoproteina pokazuje najsnažniju povezanost s kardiovaskularnim bolestima, a istovremeno povišene koncentracije LDL-kolesterola i triglicerida ukazuju na posebno velik rizik. Promijenjene, oksidirane LDL-čestice teže prepoznaju LDL-receptori pa dulje ostaju u cirkulaciji, a budući da su manje brže penetriraju u intimu arterija. Makrofagi fagocitiraju velike količine oksidiranog kolesterola. Takvi se makrofagi nazivaju pjenastim stanicama (engl. *foam cells*) koje se smatraju najranijom komponentom aterosklerotske lezije (Tietz, 2012).

1.2.2. Smjernice NCEP: Adult Treatment Panel (ATP) III Recommends

U Sjedinjenim Američkim Državama je 1985. godine osnovan Nacionalni program za edukaciju o kolesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program*, NCEP), koji je 1988. godine donio prve preporuke o detekciji, evaluaciji i tretmanu visokih vrijednosti kolesterola u krvi odraslih osoba (engl. *Adult Treatment Panel I*, ATP I) (Čepelak i sur., 2004). S nekim izmjenama, 1993. godine donesen je novi ATP (ATP II), a 2002. godine NCEP je izdao treće izvješće s novim preporukama koje vrijede i danas. Prema ovim preporukama, u tablici ispod prikazane su vrijednosti lipida za procjenu kardiovaskularnih bolesti.

Tablica 1. Klasifikacija vrijednosti lipida u serumu odraslih osoba prema ATP preporukama

| | Poželjno/optimalno | Gotovo optimalno | Granično | Povišeno | Jako povišeno |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|-----------|-----------|---------------|
| Ukupni kolesterol (mmol/L) | <5,7 | - | 5,7-6,18 | >6,2 | |
| LDL-kolesterol (mmol/L) | <2,58 | 2,58–3,33 | 3,36–4,11 | 4,13–4,88 | >4,91 |
| Trigliceridi (mmol/L) | <1,69 | - | 1,70–2,25 | 2,26–5,64 | ≥5,65 |

Poželjne vrijednosti HDL-kolesterola su one veće od 1,5 mmol/L, a vrijednosti manje od 1,03 mmol/L ukazuju na visok rizik za kardiovaskularne bolesti.

Najnovije su preporuke uzele u obzir nova znanja o aterogenom riziku pojedinih vrsta lipida. Uvođenjem novih preporuka odijelio se puno veći broj bolesnika kojima je potreban terapijski tretman. Promjene su ukazale i na potrebu točnijeg, direktnog i standardiziranog određivanja koncentracija lipoproteina. Preporuke su u prvom redu usmjerene na obaranje povišenih koncentracija LDL-kolesterola, potom na suzbijanje visokih koncentracija triglicerida te niskih koncentracija HDL-kolesterola i metaboličkog sindroma. Potrebno je također utvrditi glavne rizične čimbenike kardiovaskularnih bolesti. U tablici ispod navedeni su glavni rizični čimbenici za KVB, izuzev LDL-kolesterola.

Tablica 2. Glavni rizični čimbenici kardiovaskularnih bolesti (KVB), izuzev LDL-K

| |
|---|
| Pušenje cigareta |
| Arterijska hipertenzija (RR \geq140/90 mmHg ili na antihipertenzivnoj terapiji) |
| Nizak HDL-kolesterol (\leq1,03 mmol/L) |
| Obiteljska anamneza rane kardiovaskularne bolesti (u prvih rođaka: <55 godina za muškarce, <65 godina za žene) |
| Dob (muškarci \geq45, žene \geq55 god.) |

* Koncentracije HDL-kolesterola veće od 1,5 mmol/L smatraju se "negativnim" rizičnim čimbenikom, te se od ukupnog zbroja rizičnih čimbenika oduzima jedan

1.2.3. Esencijalna hipertenzija

Učestalost hipertenzije te uska povezanost razine arterijskog tlaka s kardiovaskularnim bolestima, određuje hipertenziju kao jedan od najrelevantnijih rizičnih čimbenika u nastanku kardiovaskularnih bolesti (Tietz, 2012).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, arterijska hipertenzija je definirana kao trajno povišeni sistolički tlak veći od 140 mmHg (18,6 kPa) i dijastolički tlak veći od 90 mmHg (12 kPa). Vrijednosti sistoličkog tlaka između 140 i 160 mmHg te dijastoličkog između 90 i 95 mmHg smatraju se graničnom hipertenzijom, koja uglavnom ne zahtijeva terapiju već pojačan liječnički nadzor. Prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju i Europskog kardiološkog društva iz 2007. godine (Mancia i sur., 2007) u tablici ispod prikazana je definicija i klasifikacija arterijskog tlaka.

Tablica 3. Definicija i klasifikacija arterijskog tlaka

| Kategorija arterijskog tlaka | Sistolički tlak (mmHg) | Dijastolički tlak (mmHg) |
|--|------------------------|--------------------------|
| Optimalan | <120 | <80 |
| Normalan | 120-129 | 60-80 |
| Visoko normalan | 130-139 | 85-89 |
| Hipertenzija | | |
| Stupanj 1 | 140-159 | 90-99 |
| Stupanj 2 | 160-179 | 100-109 |
| Stupanj 3 | ≥180 | ≥110 |
| Izolirana sistolička hipertenzija | ≥140 | <90 |

Procjenjuje se da 15-20 % odraslih boluje od nekog oblika arterijske hipertenzije. U većini razvijenih zemalja arterijski se tlak u populaciji povisuje s dobi. Sistolički tlak povisuje se za oko 2 mmHg sa svakom godinom života, dok dijastolički ima sporiju tendenciju i povisuje se za oko 0,5-1 mmHg. Muškarci imaju više vrijednosti arterijskog tlaka od žena do dobi od oko 60 godina, kada se ta razlika gubi. Arterijska se hipertenzija prema etiologiji dijeli na primarnu ili esencijalnu hipertenziju te na simptomatsku ili sekundarnu hipertenziju.

Primarna, esencijalna ili idiopatska hipertenzija prisutna je u više od 90% bolesnika, a mehanizam nastajanja nije još potpuno jasan. Esencijalna hipertenzija je izrazito heterogeni poremećaj što ukazuje na multifaktorijalnu etiologiju i poligenske varijabilnosti. Genske varijacije mogu učiniti osobu osjetljivom na određene faktore iz okoliša. Utvrđen je velik broj mutacija gena odgovornih za glavne mehanizme regulacije arterijskog tlaka, ali njihova uloga u patogenezi esencijalne hipertenzije još uvijek nije razjašnjena. Može se reći da je u bolesnika s esencijalnom hipertenzijom istodobno prisutno više mutacija, a iste kombinacije mutacija ne moraju nužno biti prisutne u svih osoba, što pridonosi raznolikosti kliničke slike i tijeka bolesti. Genski poremećaj, nesumljivo, neke osobe snažno predodređuje za hipertoničare, no fenotipska slika uvelike ovisi o brojnim vanjskim čimbenicima, od kojih je najveća pozornost usmjerena na unos kuhinjske soli. Sekundarna hipertenzija može nastati zbog bolesti bubrega, endokrinoloških poremećaja, u trudnoći, akutnom stresu ili zbog povećanog intravaskularnog volumena.

Težina arterijske hipertenzije procjenjuje se prema vrijednostima krvnog tlaka i prisutnosti promjena na ciljnim organima. Rano otkrivanje i liječenje hipertenzije vrlo je važno budući da se liječenjem hipertenzije uvelike smanjuje mortalitet od koronarne bolesti i moždanog udara (Vrhovac i sur., 2008).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolesti srca i krvnih žila glavni su uzrok smrti i razlog bolničkog liječenja u Hrvatskoj. Od njih umire skoro svaki drugi stanovnik zemlje. Nebrojene studije pokazale su povezanost trombocita i hiperlipidemije s inicijacijom i komplikacijom aterosklerotičnih lezija. Prve studije koje su se pojavile prije desetak godina povezuju i svojstva eritrocita s kardiovaskularnim rizikom. Istraživanja koja su usljedila istaknula su RDW kao rizični čimbenik za kardiovaskularne bolesti i snažan prognostički pokazatelj nepovoljnog ishoda u bolesnika s različitim spektrom bolesti, a osobito u bolesnika s bolestima koronarnih arterija i akutnim koronarnim sindromom,

Cilj diplomskog rada:

Ispitati povezanost koncentracije lipida u krvi sa svojstvima trombocita i eritrocita te procijeniti jesu li njihove uloge rizičnih čimbenika neovisne. Odabrana je skupina ispitanika s esencijalnom hipertenzijom i heterogena skupina slučajno odabranih ispitanika s različitim dijagnozama.

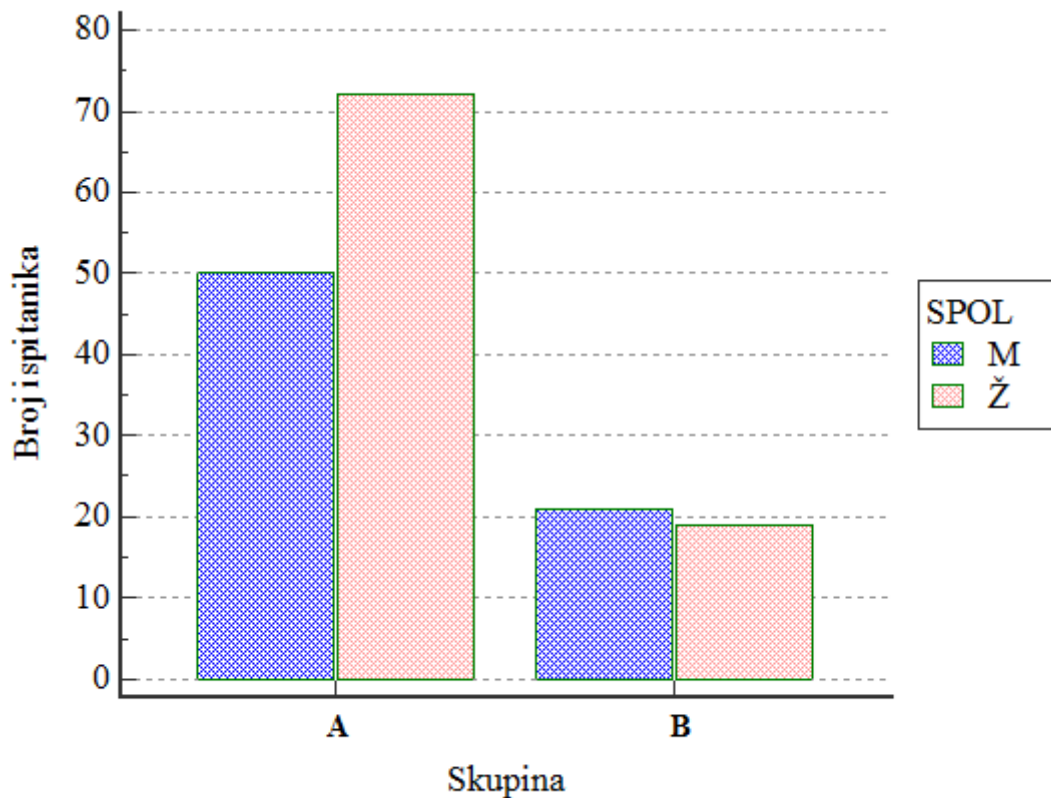
Specificični ciljevi:

1. Izmjeriti u krvi svih ispitanika koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i HDL-kolesterola
2. Izmjeriti u krvi svih ispitanika hematološke parametre za eritrocite i trombocite
3. Povezati hematološke s lipidnim parametrima
4. Usporediti nalaze između dviju skupina ispitanika
5. Procijeniti hematološke i lipidne parametre kao moguće ovisne ili neovisne čimbenike rizika za progresiju ateroskleroze i pojavu kardiovaskularnih bolesti

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju su bile uključene dvije skupine ispitanika. Prvu skupinu ispitanika činila su 122 uzastopna pacijenta različitih dijagnoza zaprimljena u ambulantu Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u razdoblju od 06.02.-04.04.2017. Drugu skupinu ispitanika činila su 39 pacijenta s dijagnosticiranom esencijalnom hipertenzijom, a kojima se uzorkovala krv u Nefrološkoj poliklinici u razdoblju od 14.3.2016.-16.8.2017. Svim je ispitanicima stručno medicinsko osoblje uzorkovalo krv te su naručene pretrage kompletne krvne slike i lipidnog statusa. Uključeni su ispitanici različite životne dobe (14-96 godina), a pripadnost po spolu nije bila isključni kriterij te nije ujednačena (Slika 4).



Slika 4. Raspodjela ispitanika A i B skupine prema spolu (A-heterogena skupina; B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)

3.2. Priprema ispitanika za uzorkovanje i uzorkovanje

Za pretrage kompletne krvne slike (KKS) i lipidnog statusa, ispitanici su se morali pridržavati pravila opće pripreme pacijenata za uzorkovanje krvi te pravila pripreme pacijenata za određivanje lipidnog statusa. Ispitanici su se radi pretraga lipidnog statusa dva tjedna prije uzimanja krvi morali hraniti uobičajno, izbjegavajući značajne fluktuacije tjelesne težine. Dva dana (48 sati) prije uzimanja krvi zabranjena im je naporna fizička aktivnost, uzimanje alkohola te interferirajućih lijekova. Dan (24 sata) prije uzimanja krvi morali su izbjegavati pretjeran unos kalorija, a 12 sati prije uzimanje krvi započeti post preko noći. Neposredno prije uzimanje krvi, sjedili su 15 minuta, a krv je oduzimana uz kratku vensku stazu u trajanju manjem od 1 minute (staza od 1 minute može povećati koncentraciju ukupnog kolesterola čak za 5 do 10%) te je odmah dostavljena u laboratorij.

Uzorci venske krvi za pretrage KKS-a uzeti su u epruvete s ljubičastom bojom čepa koje sadrže K₃EDTA-a kao antikoagulans, a u epruvete s crvenom bojom čepa koje ne sadrže antikoagulans, a sadrže aktivator zgrušavanja uzeta je krv za pretrage lipidnog profila.

Odmah nakon venepunkcije epruvete bez antikoagulansa bilo je potrebno inverzno promješati 5-6 puta, a epruvete s antikoagulansom 8-10 puta.

3.3. Priprema uzorka

Nakon uzorkovanja uzorci su upisani u laboratorijski informacijski sustav (LIS) kako bi im se dodijelio jedinstveni barkod kojim se označava epruveta. Na taj se način smanjuje mogućnost zamjene uzorka te omogućava sigurna identifikacija uzorka tijekom analize.

Analitički uzorak za kompletnu krvnu sliku je puna krv. Uzorci su dostavljeni u Odjel za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju gdje je analiza učinjena unutar zadanog vremena koje za kompletnu krvnu sliku iznosi do 6 sati.

Analitički uzorak za pretrage lipidnog statusa je serum. Nakon uzorkovanja, uzorci su dostavljeni u Odjel za medicinsku biokemiju i analitičku toksikologiju. Uzorci su centrifugirani, a analiza je učinjena unutar zadanog vremena koje za pretrage lipidnog statusa iznosi do 6 sati.

3.4. Automatizirane metode

Pretrage kompletne krvne slike izvedene su na hematološkom analizatoru Beckman–Coulter, sustav DxH. Beckman-Coulter DxH je hematološki sustav za *in vitro* dijagnostiku u kliničkim

hematološkim laboratorijima. Analitički sustav određuje 26 hematoloških parametra pri čemu se broj leukocita (WBC), broj eritrocita (RBC), koncentracija hemoglobina (HGB), broj trombocita (PLT), srednji volumen eritrocita (MCV), srednji volumen trombocita (MPV), postotak retikulocita (Rtc), postotak eritroblasta (NRBC) direktno mjere. Ostali parametri: HCT, MCH, MCHC, RDW, PCT, PDW, IRF (udjel nezrelih retikulocita) kao i apsolutni broj leukocitnih populacija izračunavaju se iz podataka o izmjenjenim veličinama. Analitička jedinica koristi Coulterovu metodu po načelu impedancije i volumetrijskog brojenja krvnih stanica. Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom kroz strujni krug izaziva promjene otpora koji izazivaju promjene napona što se bilježi detektorima, a nastali signali se prevode u električne impulse koji se broje. Količina volumena izotonične elektrolitne otopine (diluenta) koju stanice istisnu svojim prolaskom, analogna je veličini električnog impulsa proporcionalnog staničnom volumenu.

Ukupni kolesterol, HDL-kolesterol te trigliceridi određeni su direktnim metodama na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c8000.

Ukupni kolesterol određen je enzimskom metodom s kolesterol esterazom. Kolesterol esteraza enzimski hidrolizira kolesterol estere do kolesterola i slobodnih masnih kiselina. Slobodni je kolesterol potom oksidiran kolestrol oksidazom do kolest-4-en-3-ona i vodikovog peroksida. Vodikov peroksid potom u reakciji s hidroksibenzojevom kiselinom i 4-aminoantipirinom formira kinoniminsku boju (kromofor) koja se kvantificira fotometrijski na valnoj duljini 500 nm. Intenzitet svjetlost razmjernan je količini kolesterola.

HDL-kolesterol određen je homogenom enzimskom metodom u dva koraka. U prvom koraku sav neesterificirani kolesterol, izuzev HDL-kolesterola, podliježe enzimskoj reakciji te je naposljetku preveden u bezbojan produkt. U drugom koraku solibilizirajući detergent, kolesterol esteraza i kromogeni supstrat reagiraju s HDL-kolesterolom dajući obojeni spoj koji se fotometrijski kvantificira kao i ukupni kolestrol.

Trigliceridi se određuju enzimskom metodom s glicerol-fosfat oksidazom. Najprije lipaza hidrolizira trigliceride na slobodne masne kiseline i glicerol. Glicerol je fosforiliran u reakciji s ATP-om i glicerol-kinazom. Glicerol-3-fosfat je potom oksidiran do dihidroksiaceton-fosfata u reakciji koju katalizira glicerol-fosfat oksidaza, a kao produkt nastaje i vodikov peroksid. Vodikov peroksid potom reagira s 4-aminoantipirinom i 4-klorfenolom u reakciji koju katalizira peroksidaza dajući obojeni spoj. Apsorbancija nastalog spoja proporcionalna je koncentraciji triglicerida u uzorku.

Koncentracija LDL-kolesterola dobivena je računski pomoću Friedwaldove jednadžbe:

$LDL\text{-kolesterol} = \text{kolesterol} - \text{trigliceridi}/2,2 - HDL\text{-kolesterol}.$

3.5. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel 2013 (© Microsoft Corporation) i MedCalc v.17.4 (© 1993-2017 MedCalc Software). Korištenjem deskriptivne statistike dobiveni su podaci o aritmetičkoj sredini, njezinom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, standardnoj devijaciji, medijanu i njegovom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, minimumu i maksimumu te interkvartilnom rasponu (25-75 P). Normalna distribucija podataka ispitivana je D'Agostino-Pearsonovim testom, na temelju kojeg se opredjeljujemo za parametrijske ili neparametrijske testove za uspoređivanje skupova podataka. Svi su rezultati interpretirani s razinom značajnosti $P < 0,05$.

Za grafički prikaz rezultata koristili su se dijagrami rasprostiranja (Slike 5-13) te box and whisker dijagrami (Slike 14-20). U *box and whisker* dijagramu centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartila, a središnja zelena linija u kvadratu predstavlja medijan. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene „outside“ vrijednosti, koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona, te far out vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona. Narančasti kružić označava medijan, a plava linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za medijan.

Za usporedbu varijabli između A i B skupine ispitanika korišten je neparametrijski Mann-Whitneyjev test. Ovim testom ispituje se postoji li statistički značajna razlika između medijana dviju ispitivanih skupina, a koristimo ga kada imamo podatke koji nemaju normalnu distribuciju (raspodjelu).

Za ispitivanje korelacije između varijabli koje su normalno distribuirane računao se Pearsonov koeficijent korelacije i njegova neparametrijska verzija, Spearmanov koeficijent korelacije ranga s pridruženom statističkom značajnosti P. Koeficijent korelacije može poprimiti vrijednost između -1 i 1, a što je ona bliža nuli, to je korelacija slabija. Ako se jedna varijabla povećava povećavanjem druge, korelacija će biti pozitivna, a ako se jedna varijabla smanjuje dok se druga povećava, korelacija će biti negativna. Koeficijent korelacije tumačen je prema Coltonu (Tablica 4).

Tablica 4. Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu

| Koeficijent korelacije | Povezanost |
|--------------------------|------------------------------|
| 0 do $\pm 0,25$ | Nema povezanosti |
| $\pm 0,26$ do $\pm 0,50$ | Slaba povezanost |
| $\pm 0,51$ do $\pm 0,75$ | Umjerena do dobra povezanost |
| $\pm 0,76$ do ± 1 | Dobra do izvrsna povezanost |

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Deskriptivna statistika rezultata mjerenja

Statistički obrađeni rezultati mjerenja za prvu, heterogenu skupinu ispitanika (A) i drugu skupinu ispitanika (B) s esencijalnom hipertenzijom, prikazani su u tablicama 5 i 6. Opisani su parametri statističkog skupa koji obuhvaćaju mjere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijan, raspon između 25. i 75. percentila) te mjere rasipanja (varijanca, standardna devijacija). Nadalje, opisan je 95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti varijabli te P- vrijednosti dobivene D'Agostino-Pearsonovim testom. Ispitana je normalnost raspodjele za sve varijable na temelju čega se opredjeljujemo za parametrijsku ili neparametrijsku statistiku. D'Agostino-Pearsonov test normalnosti raspodjele izračunava iskošenost (engl. *skewness*) i spljoštenost (engl. *kurtosis*), kako bi izrazio koliko su podaci udaljeni od normalne raspodjele po pitanju asimetrije i oblika. Nadalje, on izračunava koliko se svaka od tih vrijednosti razlikuje od vrijednosti koja je očekivana u slučaju normalne raspodjele, te računa P vrijednost iz zbroja tih odstupanja. Kod rezultata P-vrijednosti većih od 0,05, odnosno većih od zadane razine značajnosti, pretpostavljamo da varijable slijede Gaussovu normalnu razdiobu. Varijable za koje P-vrijednost iznosi manje od razine značajnosti (0,05) nisu normalno distribuirane.

Dob ispitanika skupine A ne slijedi normalnu raspodjelu jer je D'Agostino-Pearsonovim testom dobivena P-vrijednost od 0,0001. Raspon godina je od 14 do 96, a medijan iznosi 65. Dob ispitanika skupine B slijedi normalnu raspodjelu jer je D'Agostino-Pearsonovim testom dobivena P-vrijednost od 0,2706. Raspon godina je od 21 do 57, a aritmetička sredina iznosi 39.

Tablica 5. Deskriptivna statistika za A skupinu ispitanika

| | N | \bar{x} | 95% CI | σ^2 | SD | M | 95% CI | Min | Max | 25 - 75 P | P |
|----------------------------|----------|-----------|---------------|------------|-----------|----------|---------------|------------|------------|------------------|----------|
| Dob | 122 | 62,0 | 59,0 - 65,1 | 293,68 | 17,14 | 65,5 | 62,0 - 69,0 | 14,0 | 96,0 | 54,0 - 74,0 | 0,0001 |
| Kolesterol (mmol/L) | 122 | 5,2 | 5,0 - 5,5 | 1,57 | 1,25 | 5,4 | 5,0 - 5,6 | 2,1 | 7,8 | 4,3 - 6,1 | 0,3692 |
| HDL-K (mmol/L) | 122 | 1,3 | 1,2 - 1,4 | 0,17 | 0,41 | 1,2 | 1,1 - 1,3 | 0,1 | 2,5 | 1,0 - 1,5 | 0,2005 |
| LDL-K (mmol/L) | 122 | 3,3 | 3,1 - 3,5 | 1,06 | 1,03 | 3,4 | 3,2 - 3,6 | 1,2 | 5,6 | 2,6 - 4,0 | 0,1261 |
| TG (mmol/L) | 122 | 1,4 | 1,3 - 1,6 | 0,76 | 0,87 | 1,3 | 1,2 - 1,4 | 0,4 | 7,0 | 1,0 - 1,6 | <0,0001 |
| MCHC (g/L) | 122 | 328,6 | 327,1 - 330,3 | 81,23 | 9,01 | 329,0 | 327,0 - 331,0 | 297,0 | 363,0 | 323,0 - 334,0 | 0,0067 |
| MCV (fL) | 122 | 89,4 | 88,4 - 90,5 | 36,49 | 6,04 | 89,9 | 89,0 - 90,8 | 65,9 | 106,0 | 86,50 - 92,7 | <0,0001 |
| RDW (%) | 122 | 14,3 | 13,8 - 14,8 | 6,90 | 2,63 | 13,6 | 13,5 - 13,8 | 12,1 | 35,7 | 13,3 - 14,4 | <0,0001 |
| MPV (fL) | 122 | 9,2 | 9,0 - 9,4 | 1,09 | 1,04 | 9,0 | 8,8 - 9,2 | 7,4 | 13,9 | 8,4 - 9,9 | <0,0001 |

A-heterogena skupina ispitanika, N–broj ispitanika, \bar{x} -aritmetička sredina, 95% CI -95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan, σ^2 -varijanca, SD-standardna devijacija, M-medijan, Min-minimum, Max-maksimum, 25-75 P-raspon između 25. i 75. percentila, P-vjerojatnost normalne distribucije, HDL-K- HDL-kolesterol, LDL-K-LDL-kolesterol, TG-trigliceridi, MCHC-prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu; MCV – prosječni volumen eritrocita, RDW- distribucija stanica eritrocita prema volumenu, MPV – prosječni volumen trombocita

Tablica 6. Deskriptivna statistika za B skupinu ispitanika

| | N | \bar{x} | 95% CI | σ^2 | SD | M | 95% CI | Min | Max | 25 - 75 P | P |
|----------------------------|----|-----------|---------------|------------|------|-------|---------------|-------|-------|--------------|---------|
| Dob | 40 | 39,8 | 37,4 - 42,3 | 58,97 | 7,68 | 40,0 | 39,0 - 43,0 | 21,0 | 57,0 | 35,0 - 45,0 | 0,2706 |
| Kolesterol (mmol/L) | 40 | 5,4 | 5,1 - 5,7 | 0,79 | 0,89 | 5,4 | 5,2 - 5,6 | 3,8 | 7,6 | 4,8 - 5,7 | 0,3495 |
| HDL-K (mmol/L) | 40 | 1,2 | 1,1 - 1,3 | 0,09 | 0,30 | 1,2 | 1,0 - 1,3 | 0,7 | 1,8 | 1,0 - 1,5 | 0,1779 |
| LDL-K (mmol/L) | 40 | 3,4 | 3,2 - 3,7 | 0,56 | 0,75 | 3,4 | 3,1 - 3,6 | 2,0 | 5,5 | 2,9 - 4,0 | 0,0801 |
| TG (mmol/L) | 40 | 1,7 | 1,3 - 2,0 | 1,15 | 1,07 | 1,4 | 1,2 - 1,8 | 0,4 | 6,4 | 1,1 - 2,1 | <0,0001 |
| MCHC (g/L) | 40 | 329,0 | 326,7 - 331,3 | 50,95 | 7,14 | 328,5 | 326,0 - 331,0 | 315,0 | 347,0 | 325,0- 333,5 | 0,5948 |
| MCV (fL) | 40 | 88,8 | 87,4 - 90,2 | 19,13 | 4,37 | 89,1 | 87,7 - 90,5 | 74,0 | 95,3 | 86,4 - 92,2 | 0,0034 |
| RDW (%) | 40 | 13,7 | 13,4 - 14,0 | 0,92 | 0,96 | 13,5 | 13,2 - 13,8 | 12,3 | 18,1 | 13,2 - 13,9 | <0,0001 |
| MPV (fL) | 40 | 8,9 | 8,6 - 9,2 | 0,83 | 0,91 | 8,9 | 8,5 - 9,2 | 7,1 | 11,1 | 8,2 - 9,3 | 0,3951 |

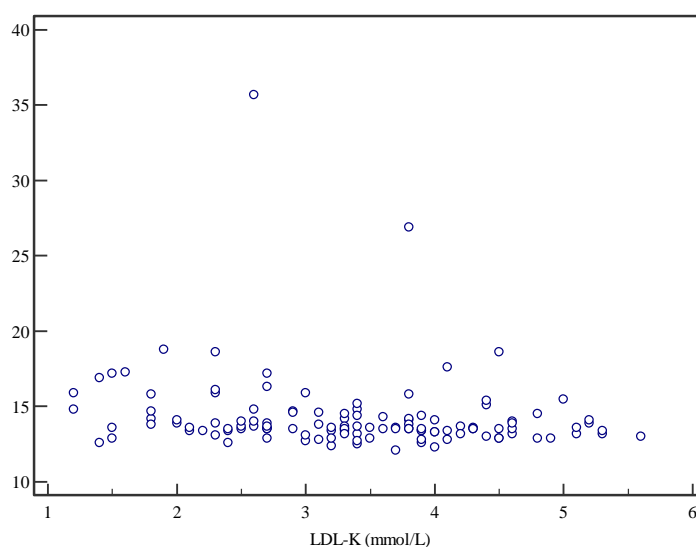
B-skupina ispitanika s esencijalnom hipertenzijom, N-broj ispitanika, \bar{x} -aritmetička sredina, 95% CI -95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan, σ^2 -varijanca, SD-standardna devijacija, M-medijan, Min-minimum, Max-maksimum, 25-75 P-raspon između 25. i 75. percentila, P-vjerojatnost normalne distribucije; HDL-K- HDL-kolesterol, LDL-K-LDL-kolesterol, TG-trigliceridi, MCHC-prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu; MCV – prosječni volumen eritrocita, RDW- distribucija stanica eritrocita prema volumenu, MPV – prosječni volumen trombocita

4.2. Ispitivanje korelacija

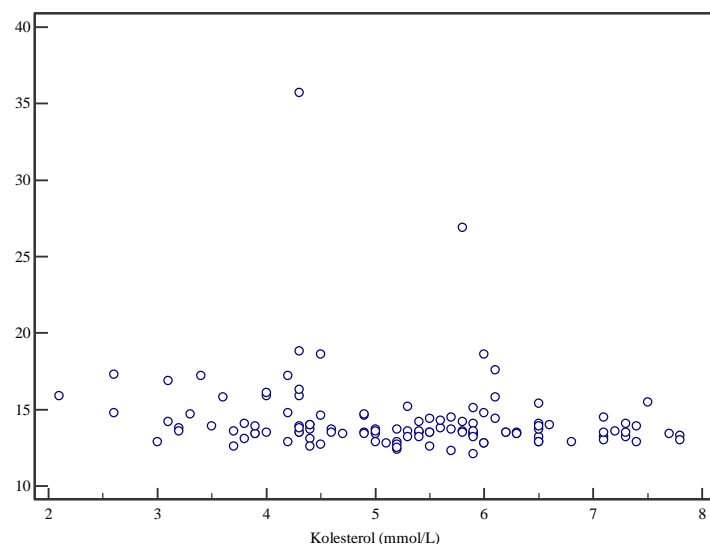
Na temelju dobivenih P-vrijednosti odabran je test za ispitivanje korelacije između varijabli. Za normalno distribuirane varijable odabrana je Pearsonova analiza korelacije dok je za ostale odabrana Spearmanova analiza korelacije kako bi otkrili postoji li povezanost između dviju varijabli.

Kada smo ispitivali povezanost između hematoloških i lipidnih varijabli za A skupinu ispitanika, utvrđeno je da za većinu ispitivanih varijabli nema značajne međusobne korelacije. Ispitivanjem korelacije između RDW-a i lipidnih parametara, pronađena je statistički značajna, ali slaba korelacija između RDW-a i LDL-kolesterola ($r=-0,251$, $P=0,0053$) te RDW-a i ukupnog kolesterola ($r=-0,231$, $P=0,0105$). Prikazana je na Slikama 5 i 6.

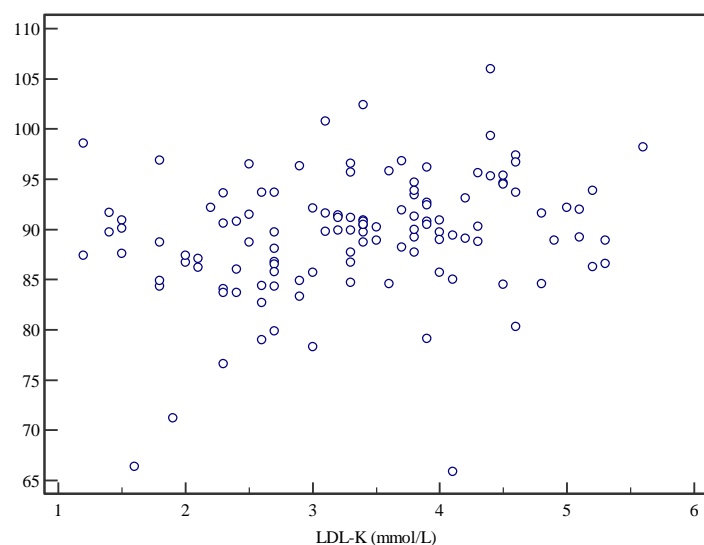
Ispitivanjem korelacije između MCV-a i lipidnih parametara, utvrđena je statistički značajna, slaba povezanost između MCV-a i LDL-kolesterola ($r=0,273$, $P=0,0023$), te MCV-a i ukupnog kolesterola ($r=0,276$, $P=0,0021$). Rezultati su prikazani i grafički pomoću dijagrama rasprostiranja (Slike 7-8).



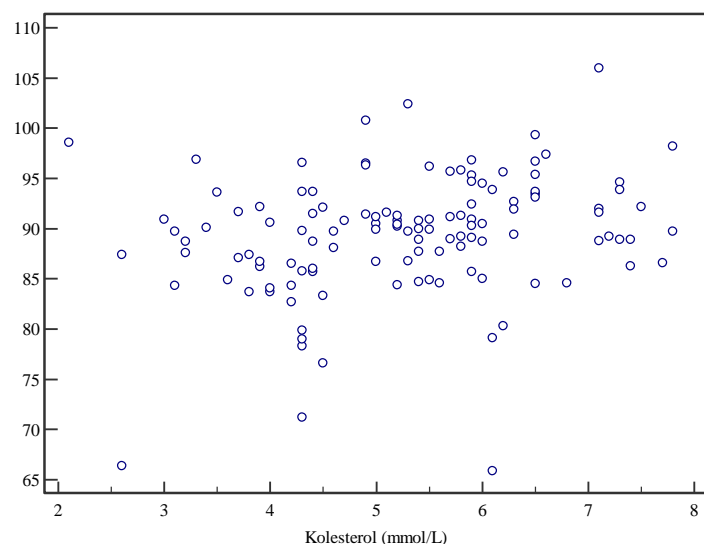
Slika 5. Korelacija između RDW-a i LDL-kolesterola (LDL-K) za A skupinu ispitanika; $r=-0,251$; $P=0,0053$ (A–heterogena skupina, RDW – raspodjela eritrocita po volumenu)



Slika 6. Korelacija između RDW-a i kolesterola za A skupinu ispitanika; $r=-0,231$; $P=0,010$
 (A–heterogena skupina, RDW – raspodjela eritrocita po volumenu)

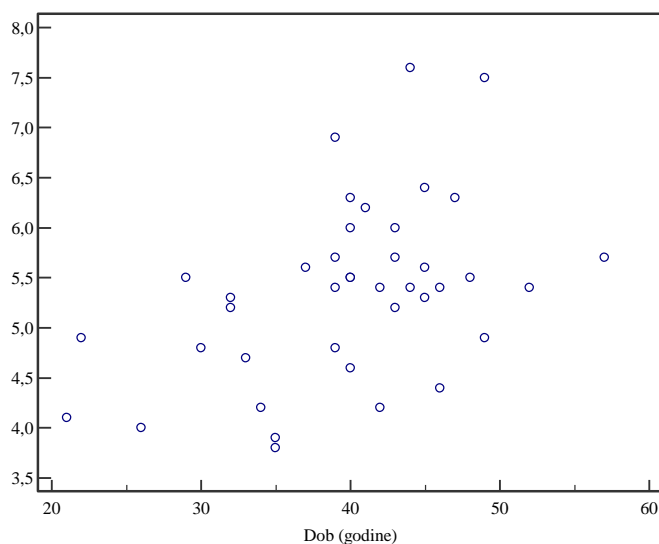


Slika 7. Korelacija između MCV-a i LDL-kolesterola (LDL-K) za A skupinu ispitanika; $r=0,273$; $P=0,0023$ (A–heterogena skupina, MCV – prosječni volumen eritrocita)

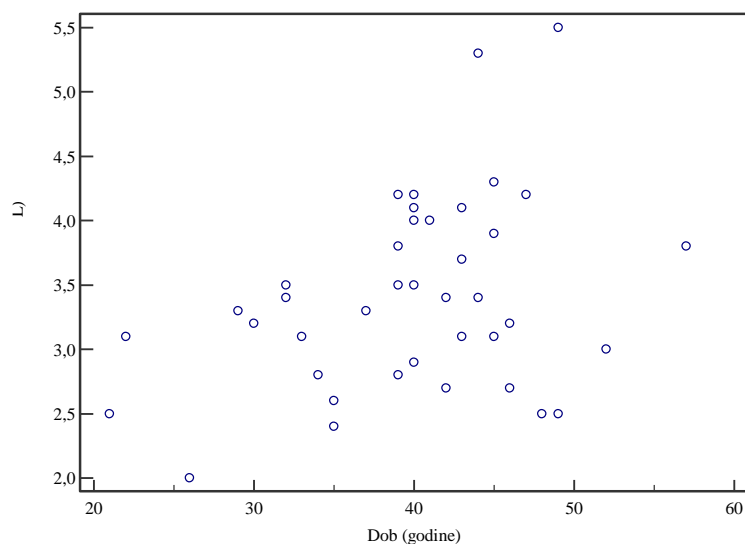


Slika 8. Korelacija između MCV-a i ukupnog kolesterola za A skupinu ispitanika; $r=0,276$; $P=0,0021$ (A–heterogena skupina, MCV – prosječni volumen eritrocita)

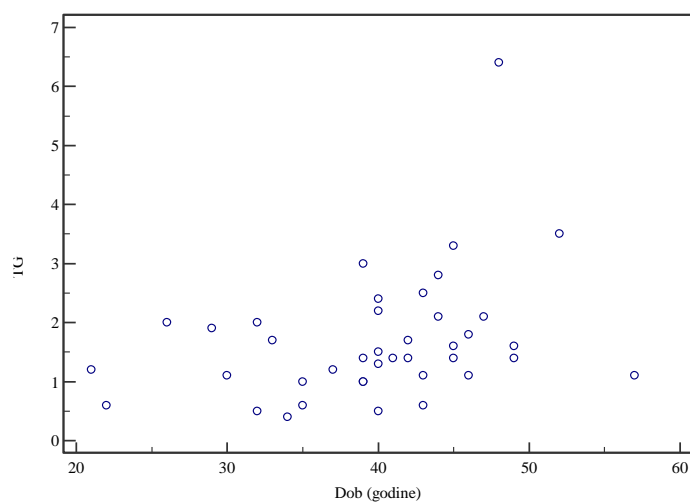
Za B skupinu ispitanika, odnosno za ispitanike s esencijalnom hipertenzije, utvrđena je povezanost između dobi i ukupnog kolesterola ($r=0,458$; $P=0,0029$), LDL-kolesterola ($r=0,353$; $P=0,0253$) te triglicerida ($r=0,362$; $P=0,0219$). Ispitivajući postoji li korelacija između hematoloških i lipidnih parametara, pronađena je slaba povezanost između MCV-a i kolesterola ($r=0,251$; $P=0,1177$) te između RDW-a i kolesterola ($r=0,273$; $P=0,0880$). Navedeni su rezultati prikazani i pomoću dijagrama rasprostiranja na slikama (Slike 9-13).



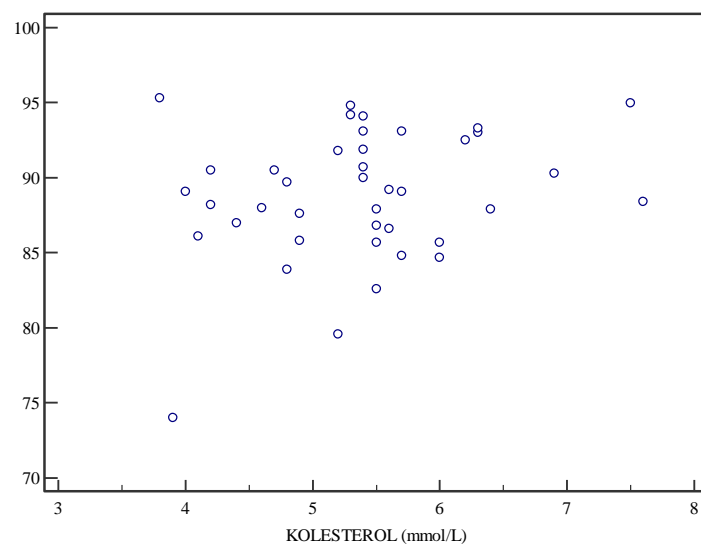
Slika 9. Korelacija između kolesterola i dobi za B skupinu ispitanika; $r=0,458$; $P=0,0029$ (B–skupina s esencijalnom hipertenzijom)



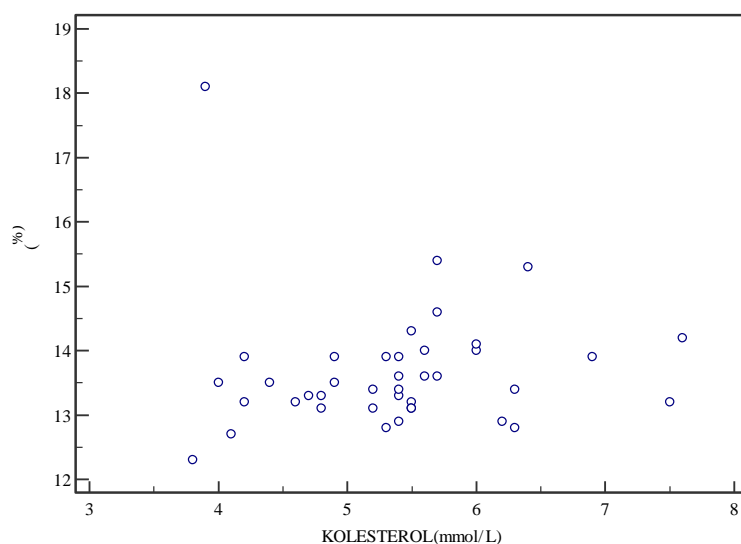
Slika 10. Korelacija između LDL-kolesterola (LDL-K) i dobi za B skupinu ispitanika;
 $r=0,353$; $P=0,0253$ (B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



Slika 11. Korelacija između TG i dobi za B skupinu ispitanika; $r=0,362$; $P=0,0219$
 (B-skupina s esencijalnom hipertenzijom, TG-trigliceridi)



Slika 112. Korelacija između MCV-a i kolesterola za B skupinu ispitanika; $r=0,251$; $P=0,1177$ (B-skupina s esencijalnom hipertenzijom, MCV–prosječni volumen eritrocita)

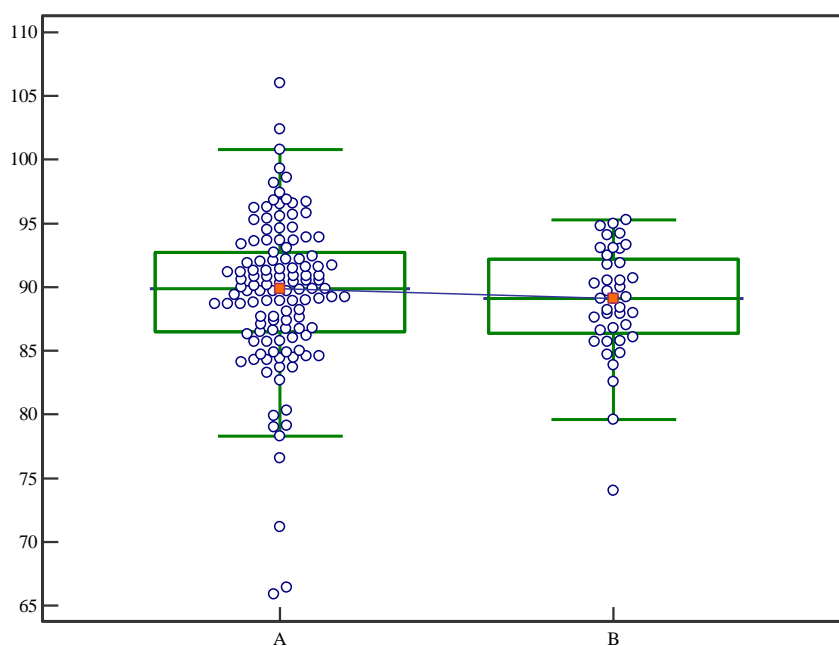


Slika 13. Korelacija između RDW-a i kolesterola za B skupinu ispitanika; $r=0,273$; $P=0,0880$ (B-skupina s esencijalnom hipertenzijom, RDW-raspodjela stanica eritrocita prema volumenu)

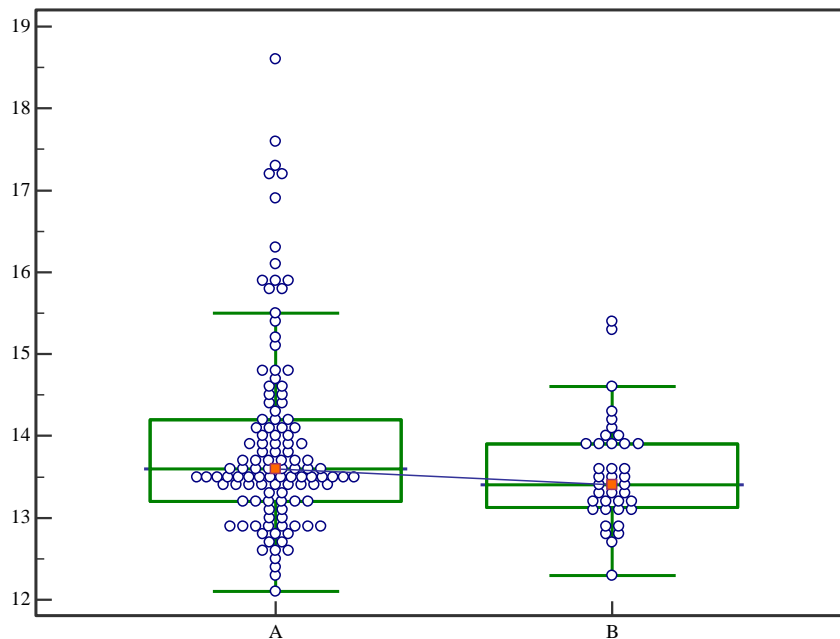
4.3. Usporedba mjerenih veličina između skupina ispitanika

Mann-Whitney test za nezavisne uzorke korišten je za usporedbu varijabli (rezultata mjerenja) između dviju skupina ispitanika (A i B). Ovim testom ispituje se postoji li statistički značajna razlika između medijana dviju ispitivanih skupina, a čije varijable ne slijede normalnu distribuciju. P-vrijednost manja od 0,05 ukazuje da postoji statistički značajna razlika između medijana varijabli dviju ispitivanih skupina.

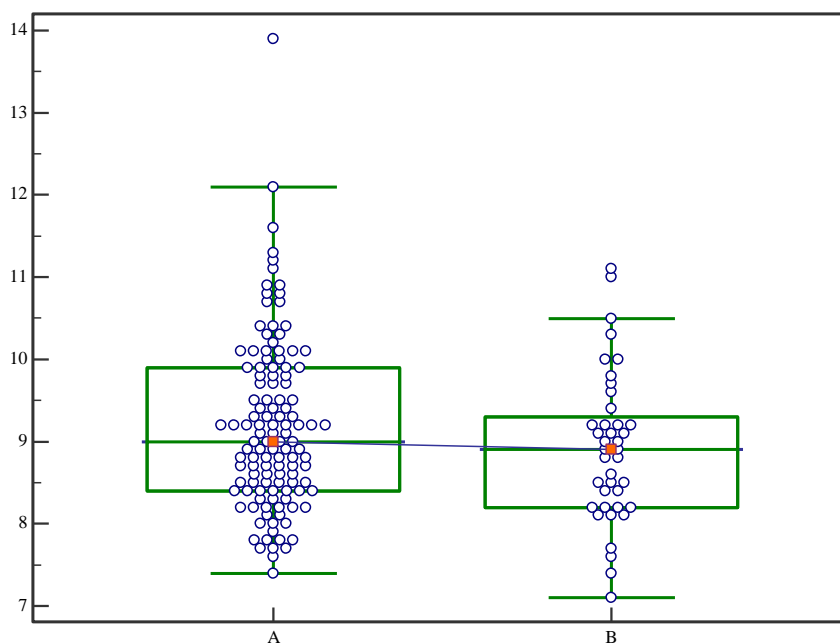
Glavni cilj bila je usporedba MCV-a, RDW-a, MPV-a s lipidima između A i B skupine ispitanika. Rezultati testa nisu pokazali statističku značajnu razliku između skupina.



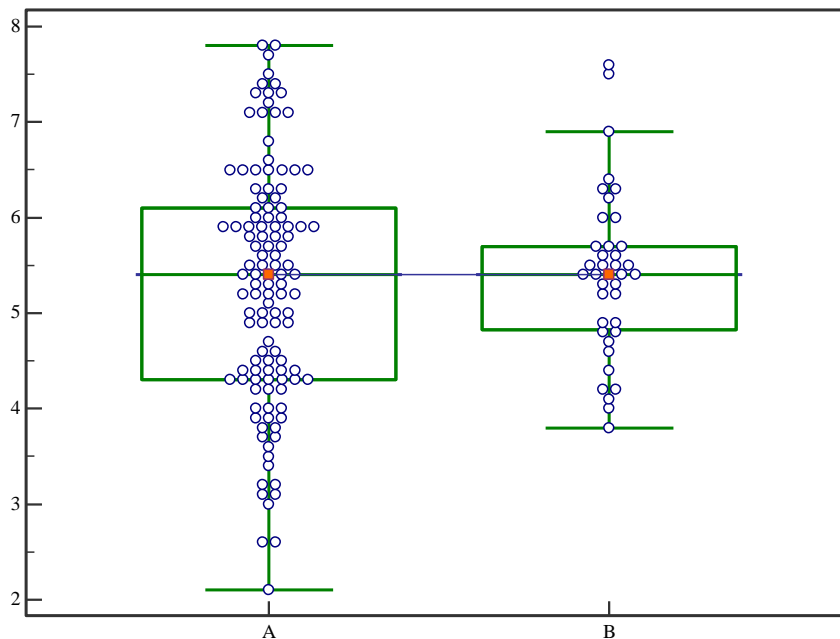
Slika 14. Usporedba MCV-a između A i B skupine ispitanika; $P=0,6183$ (MCV-prosječni volumen eritrocita, A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



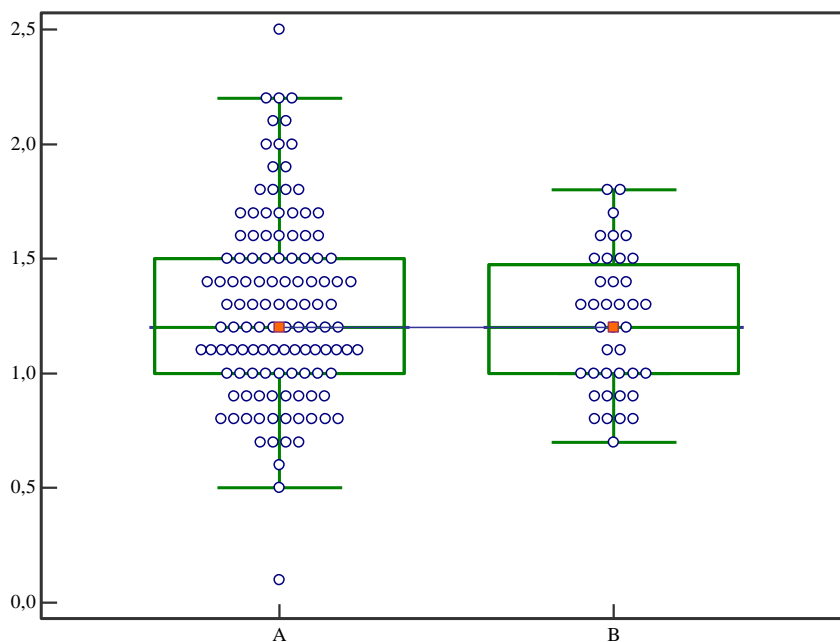
Slika 15. Usporedba RDW-a između A i B skupine ispitanika; $P=0,1186$ (RDW-raspodjela stanica eritrocita prema volumenu, A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



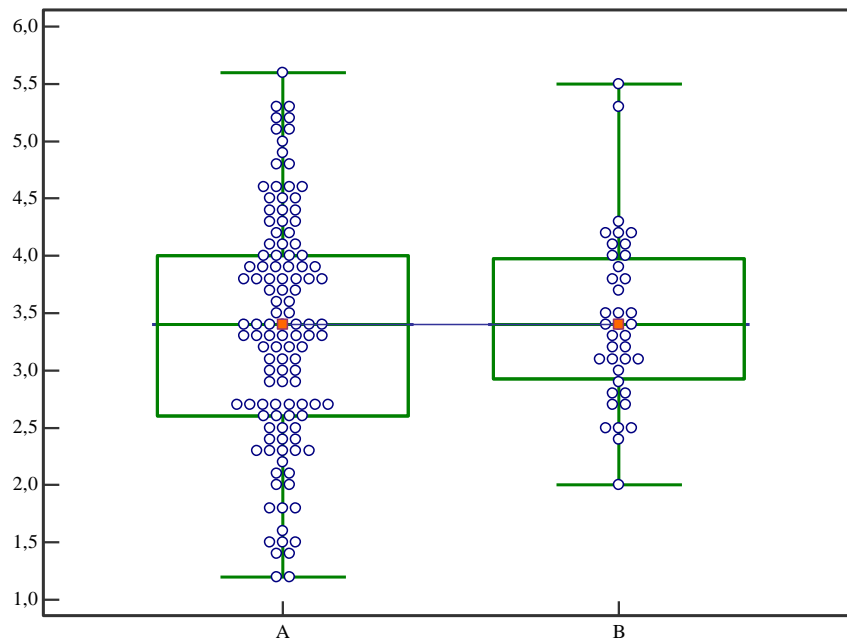
Slika 16. Usporedba MPV-a između A i B skupine ispitanika; $P=0,2539$ (MPV-prosječni volumen trombocita, A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



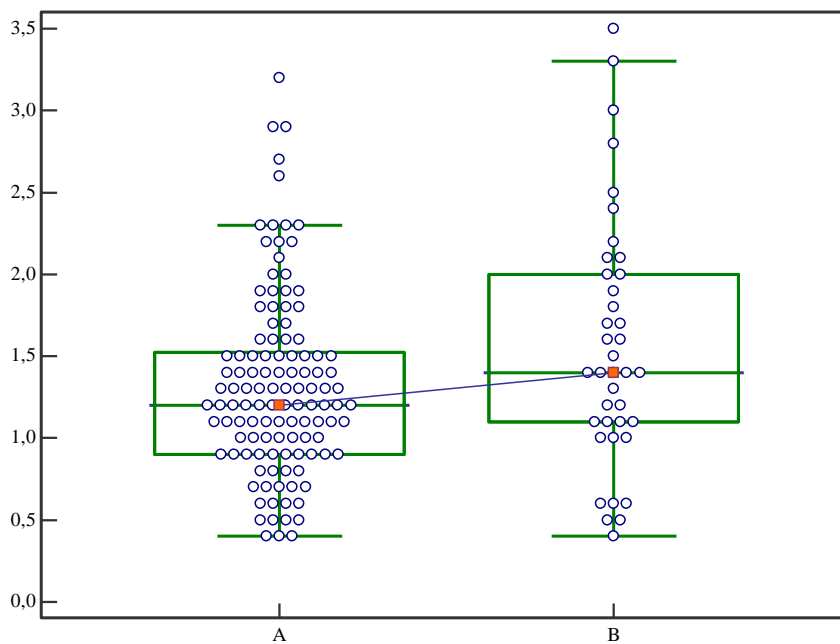
Slika 17. Usporedba kolesterola između A i B skupine ispitanika; $P=0,6559$ (A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



Slika 18. Usporedba HDL-kolesterola između A i B skupine ispitanika; $P=0,3571$ (A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



Slika 19. Usporedba LDL-kolesterola između A i B skupine ispitanika; $P=0,6151$
 (A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)



Slika 20. Usporedba triglicerida između A i B skupine ispitanika; $P=0,0794$
 (A-heterogena skupina, B-skupina s esencijalnom hipertenzijom)

4.4. Rasprava

Hipertenzija je neovisan čimbenik kardiovaskularnog rizika (MacMahon i sur., 1990). Unatoč tome što su u hipertenzivnih pacijenata krvne žile izložene povišenom krvnom tlaku, paradoksalno, komplikacije hipertenzije češće su trombotičke (srčani i moždani udar) nego hemoragijske. Aktivirani trombociti imaju ključnu ulogu u patofiziologiji trombotičkih komplikacija povezanih s hipertenzijom (Lip, 2003). Kao što je već spomenuto, aktivacijom trombocita dolazi do promjene njihova oblika, mase, veličine te dolazi do degranulacije njihova sadržaja, a posljedično do adhezije i agregacije, odnosno formiranja nakupina trombocita. Postoje dokazi da su MPV vrijednosti povišene u nekoliko kardiovaskularnih bolesti, uključujući esencijalnu hipertenziju, dijabetes melitus i moždani udar (Sansanayudh i sur., 2016). Prijašnje su studije pronašle povezanost između MPV-a i rizičnih faktora za kardiovaskularne bolesti, među kojima su najčešće bili proučavani dijabetes i metabolički sindrom. Nadalje, povišene vrijednosti MPV-a povezane su s lošijim kliničkim ishodom u bolesnika s KVB (Greisenegger i sur., 2004; Martin i sur., 1991). Međutim, rezultati ovih istraživanja nisu u potpunosti ubjedivi, a neki su čak i proturječni. Većina je istraživanja uključivala mali broj ispitanika pa su prema tome manje pouzdana. U ovom smo radu ispitali koreliraju li vrijednosti MPV-a u odabranim skupinama ispitanika s lipidnim parametrima, budući da je nepovoljan lipidni profil neovisan čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti. Za istraživanje je bilo važno da su svi uzorci pacijenata određivani na istim analizatorima i istim metodama jer su u literaturi zabilježena značajna odstupanja MPV vrijednosti mjerenih na različitim analizatorima (Qiao i sur., 2014; Van den Bossche i sur., 2002). U našim odabranim skupinama, heterogenoj skupini slučajno odabranih ispitanika (A) te u skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom (B), nismo pronašli korelaciju između MPV-a i lipida. Sansanayudh i suradnici su 2016. godine utvrdili povezanost MPV-a i hipertenzije. Otkrili su da su u hipertenzivnih ispitanika MPV vrijednosti približno 1,0169 fL veće nego u normotenzivnih ispitanika. Mi smo usporedili MPV vrijednosti u našim odabranim skupinama ispitanika, ali nismo pronašli statističku značajnu razliku (Slika 16; $P=0,2539$). Međutim, naša A skupina ispitanika uključivala je heterogenu populaciju pacijenata, bez ograničavajućih kriterija uključenja ili isključenja, što znači da je među njima moglo biti i hipertenzivnih ispitanika, premda njihova glavna dijagnoza nije bila hipertenzija.

Donedavno se smatralo da je sudjelovanje eritrocita u procesu ateroskleroze vrlo malo vjerojatno. Novije studije su ukazale da ipak nije tako. Štoviše, eritrociti imaju važnu ulogu u procesu ateroskleroze, a nekoliko je mehanizama kojim to ostvaruju. Eritrociti mogu

preuzimati kolesterol u interakciji s LDL-kolesterolom, također mogu i predati kolesterol u interakciji s HDL-kolesterolom (Quarfordt i Hilderman, 1970). Promjene lipidnog sastava membrane eritrocita dovode do promjena u fluidnosti membrane. Neznatno povećanje kolesterola u membrani eritrocita uzrokuje povećanu osmotsku rezistenciju stanice (Marks i Johnson, 1958). U zdravih ispitanika, stabilnost eritrocita direktno je povezana s koncentracijama LDL-kolesterola (de Freitas i sur., 2014; Bernardino i sur., 2013). Međutim, značajan porast kolesterola u membrani eritrocita, čini stanicu rigidnijom, odnosno manje fleksibilnom. Eritrociti s rigidnim membranama manje su stabilni i skloniji lizi tijekom prolaska kroz uske kapilare ili slezenu (Lee i sur., 2004; Hui i sur. 1980.) Lizirani eritrociti oslobađaju hemoglobin. Željezo je u hemoglobinu u reduciranom obliku, stoga molekula kisika može uzeti elektron iz željeza čime postaje visoko nestabilna i reaktivna molekula (superoksid radikal). Slobodni radikali ulaze u interakcije s polinezasićenim masnim kiselinama lipidnih membrana, uzrokujući njihovu peroksidaciju, odnosno oštećenje membrane (Cimen, 2008; Puntarulo, 2005). U eritrocitu akumulacija reaktivnih kisikovih spojeva je minimalizirana antioksidacijskim sustavima, enzimima: superoksid dismutazom, katalazom i glutation peroksidazom. Međutim nakon lize eritrocita, navedeni enzimi gube svoju funkciju, a posljedično dolazi do nakupljanja reaktivnih kisikovih spojeva. Prijašnje studije otkrile su korelaciju između povišenog RDW-a i prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva (Bujak i sur., 2015). Nakon lize eritrocita, makrofagi fagocitiraju ostatke liziranih stanica. Takvi makrofagi postaju sporiji te lakše infiltriraju u endotel krvnih žila (Melder i sur. 2000).

Veza između eritrocita i ateroskleroze ne uključuje samo sadržaj kolesterola u membranama eritrocita, već i varijabilnost u volumenima između samih eritrocita. Zadnjih godina zabilježen je rastući broj studija u vezi RDW-a i različitih patologija, među kojima se ističu kardiovaskularne bolesti. RDW je povezan sa zadebljanjem intime krvnih žila u hipertenzivnih pacijenata s aterosklerozom karotidne arterije (Soderholm i sur., 2015, Wen, 2010), ali i s učestalijom smrtnošću od srčanog i moždanog udara. Lippi i suradnici su 2013. godine dokazali da su povišene vrijednosti RDW-a povezane s nepovoljnim lipidnim profilima u studiji koja je uključivala 4 874 pacijenta iz opće populacije. Dokazali su da RDW vrijednosti koreliraju s ukupnim kolesterolom ($P < 0,01$ za muškarce, $P < 0,01$ za žene), LDL-kolesterolom ($P < 0,01$ za muškarce, $P < 0,01$ za žene), HDL-kolesterolom ($P = 0,04$ za muškarce, $P < 0,01$ za žene) te trigliceridima ($P = 0,11$ za muškarce, $P < 0,01$ za žene). U ovom radu pronašli smo povezanost, iako slabu, između RDW-a i kolesterola ($r = 0,231$, $P = 0,01$) te RDW-a i LDL-kolesterola ($r = -0,251$, $P < 0,01$) za heterogenu skupinu ispitanika. Nismo

pronašli statistički značajnu povezanost između RDW-a i HDL-kolesterola te triglicerida. U skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom našli smo povezanost između RDW-a i kolesterola ($r=0,273$; $P=0,0880$), ali ne i povezanost s ostalim lipidnim parametrima.

Prijašnje studije upućuju na više vrijednosti RDW-a u prehipertenzivnih i hipertenzivnih ispitanika u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (Tanindi i sur., 2012). U našem radu, uspoređujući vrijednosti RDW-a A i B skupine ispitanika nije nađena statistički značajna razlika ($P=0,1186$). U studiji koja je proučavala povezanost RDW-a u hipertenzivnih pacijenata ($N=100$), utvrđeno je da u tih pacijenata RDW-vrijednosti rastu s dobi (Bilal i sur., 2016). U našoj skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom ($N=40$), nismo pronašli statistički značajnu vezu između RDW-a i dobi ($P=0,0467$).

Povezanost lipidnih komponenti s životnom dobi našli smo samo u skupini B koja je imala raspon godina od 21 do 57. Nalaz odgovara u literaturi pokazanoj pozitivnoj povezanosti kolesterola i triglicerida sa životnom dobi (Anderson i sur., 2013; Carroll i sur., 2005). No, u skupini A nismo našli povezanost, a starosna je dob u rasponu od 14 do 96 godina. Budući da u skupini prevladava starija dob (medijan = 65,5 godina), a rasponi vrijednosti lipida izrazito su široki, pretpostavka je da je poremećen odnos, a uz to je moguće da dio ispitanika uzima hipolipemike.

5. ZAKLJUČCI

1. U heterogenoj skupini ispitanika u širokom rasponu životne dobi od 21 do 96 godina pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja i lipida. Odnosi se na povezanost RDW-a i LDL-kolesterola, RDW-a i ukupnog kolesterola, MCV-a i LDL-kolesterola te MCV-a i ukupnog kolesterola.
2. U skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja s ukupnim kolesterolom.
3. Nije pronađena povezanost između trombocitnih pokazatelja i lipidnih parametara ni u jednoj od skupina.
4. Nije pronađena statistički značajna razlika usporedbom hematoloških i lipidnih parametara između heterogene skupine ispitanika i skupine ispitanika s esencijalnom hipertenzijom.
5. U ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je dobra i statistički značajna pozitivna korelacija između životne dobi i lipida (ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi).
6. Pozitivna povezanost životne dobi i lipida u ispitanika s esencijalnom hipertenzijom upućuje na zaključak da su lipidi značajan i neovisan čimbenik rizika u tih bolesnika te da porast životne dobi praćene hipertenzijom pridonosi kardiovaskularnom riziku.

6. LITERATURA

Anderson TJ, Grégoire J, Hegele RA, Couture P, Mancini GB, McPherson R. et al. 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can J Cardiol*, 2013, 29:151-67.

Apostolakis S, Chalikias GK, Tziakas DN, Konstantinides S. Erythrocyte Duffy antigen receptor for chemokines (DARC): diagnostic and therapeutic implications in atherosclerotic cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(4):417-424.

Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovela F, Viganó M, Tavazzi L. Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation. *Heart*, 2002, 88(2):177-182.

Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, 7(2):157-161.

Bernardino Neto M, de Avelar EB Jr, Arantes TS, Jordão IA, da Costa Huss JC, de Souza TM, de Souza Penha VA, da Silva SC, de Souza PC, Tavares M, Penha-Silva N. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*, 2013, 50(5-6):305-320.

Bilal A, Farooq JH, Kiani I, Assad S, Ghazanfar H, Ahmed I. Importance of Mean Red Cell Distribution Width in Hypertensive Patients. *Cureus*, 2016, 29;8(11):e902.

Bujak K, Wasilewski J, Osadnik T, Jonczyk S, Kołodziejaska A, Gierlotka M, Gąsior M. The Prognostic Role of Red Blood Cell Distribution Width in Coronary Artery Disease: A Review of the Pathophysiology. *Dis Markers*, 2015, 2015:824624.

Burtis C, Ashwood E, Bruns D. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th Edition. Saunders Elsevier, 2012.

Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M. et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960–2002. *JAMA*, 2005, 294:1773-81.

Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 2008, 390(1-2):1-11.

Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Medicinska naklada, Zagreb, 2004

Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonizacija općih pretraga iz područja opće medicinske-biokemije. Medicinska naklada, Zagreb, 2007

da Silva Garrote-Filho M, Bernardino-Neto M, Penha-Silva N. Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(4):17.

de Freitas MV, Marquez-Bernardes LF, de Arvelos LR, Paraíso LF, Gonçalves E Oliveira AF, Mascarenhas Netto Rde C, Neto MB, Garrote-Filho MS, de Souza PC, Penha-Silva N. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*, 2014, 19(7):424-430.

Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, 1984, 4: 323-340.

Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 1984, 4: 341-356.

Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque:part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46: 937-954.

Greisenegger S, Endler G, Hsieh K, Tentschert S, Mannhalter C, Lalouschek W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? *Stroke*, 2004, 35(7):1688-1691.

Gresele P, Fuster V, Lopez J, Page C, Vermynen J. Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders. 1st edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008

Hui SW, Stewart CM, Carpenter MP, Stewart TP. Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 1980, 85(2):283-291.

Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14: 18-22.

Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*, 2001, 22(17):1561-1571. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*, 2003, 349(24):2316-2325.

Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*, 2003, 11;349(24):2316-25.

Labar B. Hematologija. Školska knjiga, Zagreb, 2007

Lee CY, Kim KC, Park HW, Song JH, Lee CH. Rheological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia. *Microvasc Res*, 2004, 67(2):133-138.

Lip GY. Hypertension, platelets, and the endothelium: the "thrombotic paradox" of hypertension (or "Birmingham paradox") revisited. *Hypertension*, 2003, 41(2):199-200.

Lippi G, Sanchis-Gomar F, Danese E, Montagnana M. Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. *Kardiol Pol*, 2013, 71(9):931-936.

Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(4):628-632.

MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*, 1990, 31;335(8692):765-74.

Mancia G, Backer D, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G. et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 2007, 25:1105–1187.

Marks PA, Johnson AB Relationship Between the Age of Human Erythrocytes and Their Osmotic Resistance: A Basis for Separating Young and Old Erythrocytes. *J Clin Invest*, 1958, 37(11): 1542–1548.

Martin JF, Bath PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet*, 1991, 7;338(8780):1409-11.

McKenzie SB, ed. Clinical laboratory hematology. 1st edition. Upper Sadle River, New Jersey. Prentice Hall, 2004

Melder RJ, Yuan J, Munn LL, Jain RK. Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. *Microvasc Res*, 2000, 59(2):316-22.

Myojo M, Iwata H, Kohro T, Sato H, Kiyosue A, Ando J, Sawaki D, Takahashi M, Fujita H, Hirata Y, Nagai R. Prognostic implication of macrocytosis on adverse outcomes after coronary intervention. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1):148-53.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation,

and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 2002, 106(25):3143-421.

Pasterkamp G, Virmani R, The erythrocyte: a new player in atheromatous core formation. *Heart*, 2002, 88(2): 115–116.

Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med*, 2005, 26(4-5):299-312.

Qiao R, Yang S, Yao B, Wang H, Zhang J, Shang H. Complete blood count reference intervals and age- And sex-related trends of North China han population. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(7):1025-32.

Quarfordt SH, Hilderman HL. Quantitation of the in vitro free cholesterol exchange of human red cells and lipoproteins. *J Lipid Res*, 1970, 11(6):528-535.

Sansanayudh N, Muntham D, Yamwong S, Sritara P, Akrawichien T, Thakkinstian A. The association between mean platelet volume and cardiovascular risk factors. *Eur J Intern Med*, 2016, 30:37-42.

Söderholm M, Borné Y, Hedblad B, Persson M, Engström G. Red cell distribution width in relation to incidence of stroke and carotid atherosclerosis: a population-based cohort study. *PLoS One*, 2015, 7;10(5):e0124957

Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 880-886.

Štraus B, Čvorišćec D. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009

Tanindi A, Topal FE, Topal F, Celik B. Red cell distribution width in patients with prehypertension and hypertension. *Blood Press*, 2012, 21(3):177-81.

Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentes I, Konstantinides S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2012, 51(4):243-54.

Vagdatli E, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*, 2010, 14(1):28-32.

Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neelis H, De Schouwer P. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(1):69-73.

Virmani R, Roberts WC. Extravasated erythrocytes, iron, and fibrin in atherosclerotic plaques of coronary arteries in fatal coronary heart disease and their relation to luminal thrombus: frequency and significance in 57 necropsy patients and in 2958 five mm segments of 224 major epicardial coronary arteries. *Am Heart J*, 1983, 105(5):788-97.

Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Arterijska hipertenzija i hipotenzija. Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 550-565.

Wen Y. High red blood cell distribution width is closely associated with risk of carotid artery atherosclerosis in patients with hypertension. *Exp Clin Cardiol*, 2010, 15(3):37-40.

Wonnerth A, Krychtiuk KA, Mayer FJ, Minar E, Wojta J, Schillinger M, Koppensteiner R, Hoke M. Red cell distribution width and mortality in carotid atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(2):198-204.

7. SAŽETAK

Bolesti srca i krvnih žila glavni su uzrok smrti i razlog bolničkog liječenja u Hrvatskoj. Od njih umire skoro svaki drugi stanovnik zemlje. Nbrojene studije pokazale su povezanost trombocita i hiperlipidemije s inicijacijom i komplikacijom aterosklerotičnih lezija, a novije studije ukazale su i na ulogu eritrocita u aterosklerotskom procesu.

Cilj ovog rada bio je ispitati povezanost koncentracije lipida u krvi sa svojstvima trombocita i eritrocita te procjeniti jesu li njihove uloge rizičnih čimbenika neovisne. Povezanost je ispitana u skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom te u heterogenoj skupini slučajno odabranih ispitanika, a nakon čega su uspoređeni nalazi između ovih dviju skupina.

U heterogenoj skupini ispitanika pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja i lipida. Odnosi se na povezanost RDW-a i LDL-kolesterola, RDW-a i ukupnog kolesterola, MCV-a i LDL-kolesterola te MCV-a i ukupnog kolesterola.

U skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja s ukupnim kolesterolom.

Nismo pronašli povezanost između trombocitnih pokazatelja i lipidnih parametara ni u jednoj od skupina. Nadalje, nije pronađena statistički značajna razlika usporedbom hematoloških i lipidnih parametara između ispitivanih skupina.

U ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je dobra i statistički značajna pozitivna korelacija između životne dobi i lipida (ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi) koja upućuje da su lipidi značajan i neovisan čimbenik rizika u tih bolesnika te da porast životne dobi praćen hipertenzijom pridonosi kardiovaskularnom riziku.

7. SUMMARY

Cardiovascular diseases are the main cause of death and the reason for hospital treatment in Croatia. Nearly every second resident of the country dies because of these diseases. Numerous studies have shown the association between platelets and hyperlipidemia with initiation and complication of atherosclerotic lesions and recent studies have also shown the role of erythrocytes in the atherosclerotic process.

The aim of this study was to examine the correlation between blood lipid levels with platelet and erythrocyte indices and to assess whether their roles of risk factors are independent. The correlation was tested in the group of patients with essential hypertension and in the heterogeneous group of randomly selected patients. Thereafter, findings between these two groups were compared.

In the heterogeneous group of patients, statistically significant, but poor correlation between erythrocyte indices and lipids was found. It refers to the association of RDW and LDL-cholesterol, RDW and total cholesterol, MCV and LDL-cholesterol, and MCV and total cholesterol. In the group of patients with essential hypertension, statistically significant, but poor correlation between erythrocyte indices and total cholesterol was found.

We haven't found correlation between platelet indices and lipid parameters in any of the groups. Furthermore, no statistically significant difference was found comparing hematologic and lipid parameters between the examined groups.

In patients with essential hypertension, good and statistically significant positive correlation between age and lipids (total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides) was found. This suggests that lipids are significant and independent risk factor in these patients and that increase in age in patients with hypertension contributes to the cardiovascular risk.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

ATP – engl. *Adult Treatment Panel*

ATP – adenzin-trifosfat

ADP - adenzin-difosfat

HCT – hematokrit

HDL – lipoprotein visoke gustoće

HMWK – kininogen velike molekularne mase

KKS – kompletna krvna slika

KVB – kardiovaskularne bolesti

K₃EDTA – kalijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline

LDL – lipoprotein niske gustoće

NO – dušikov oksid

MCH – prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu

MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu

MCV – prosječni volumen eritrocita

MPV – prosječni volumen trombocita

NCEP – Nacionalni program za edukaciju o kolesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program*)

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena -1

PCT – trombokrit

PDGF – trombocitni faktor rasta

PDW – distribucija stanica trombocita prema volumenu

PF4 – trombocitni faktor 4

RANTES – engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RDW – distribucija stanica eritrocita prema volumenu

TGF-beta - transformirajući faktor rasta beta

vWF – von Willebrandov faktor

HMWK – kininogen velike molekularne mase

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

POVEZANOST HEMATOLOŠKIH PARAMETARA S KARDIOVASKULARNIM RIZIKOM

Ena Matišić

SAŽETAK

Bolesti srca i krvnih žila glavni su uzrok smrti i razlog bolničkog liječenja u Hrvatskoj. Od njih umire skoro svaki drugi stanovnik zemlje. Nbrojene studije pokazale su povezanost trombocita i hiperlipidemije s inicijacijom i komplikacijom aterosklerotičnih lezija, a novije studije ukazale su i na ulogu eritrocita u aterosklerotskom procesu. Cilj ovog rada bio je ispitati povezanost koncentracije lipida u krvi sa svojstvima trombocita i eritrocita te procijeniti jesu li njihove uloge rizičnih čimbenika neovisne. Povezanost je ispitana u skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom te u heterogenoj skupini slučajno odabranih ispitanika, a nakon čega su uspoređeni nalazi između ovih dviju skupina. U heterogenoj skupini ispitanika pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja i lipida. Odnosi se na povezanost RDW-a i LDL-kolesterola, RDW-a i ukupnog kolesterola, MCV-a i LDL-kolesterola te MCV-a i ukupnog kolesterola. U skupini ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je statistički značajna, ali slaba povezanost između eritrocitnih pokazatelja s ukupnim kolesterolom. Nismo pronašli povezanost između trombocitnih pokazatelja i lipidnih parametara ni u jednoj od skupina. Nadalje, nije pronađena statistički značajna razlika usporedbom hematoloških i lipidnih parametara između ispitivanih skupina ispitanika. U ispitanika s esencijalnom hipertenzijom pronađena je dobra i statistički značajna pozitivna korelacija između životne dobi i lipida (ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi) koja upućuje da su lipidi značajan i neovisan čimbenik rizika u tih bolesnika te da porast životne dobi praćen hipertenzijom pridonosi kardiovaskularnom riziku.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranica, 20 grafičkih prikaza, 6 tablica i 52 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: eritrocitni parametri, trombocitni parametri, lipidni parametri, kardiovaskularni rizik, hipertenzija

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ASSOCIATION BETWEEN HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND CARDIOVASCULAR RISK

Ena Matišić

SUMMARY

Cardiovascular diseases are the main cause of death and the reason for hospital treatment in Croatia. Nearly every second resident of the country dies because of these diseases. Numerous studies have shown the association between platelets and hyperlipidemia with initiation and complication of atherosclerotic lesions and recent studies have also shown the role of erythrocytes in the atherosclerotic process. The aim of this study was to examine the correlation between blood lipid levels with platelet and erythrocyte indices and to assess whether their roles of risk factors are independent. The correlation was tested in the group of patients with essential hypertension and in the heterogeneous group of randomly selected patients. Thereafter, findings between these two groups were compared. In the heterogeneous group of patients, statistically significant, but poor correlation between erythrocyte indices and lipids was found. It refers to the association of RDW and LDL-cholesterol, RDW and total cholesterol, MCV and LDL-cholesterol, and MCV and total cholesterol. In the group of patients with essential hypertension, statistically significant, but poor correlation between erythrocyte indices and total cholesterol was found. We haven't found correlation between platelet indices and lipid parameters in any of the groups. Furthermore, no statistically significant difference was found by comparing hematologic and lipid parameters between the examined groups. In patients with essential hypertension, good and statistically significant positive correlation between age and lipids (total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides) was found. This suggests that lipids are significant and independent risk factor in these patients and that increase in age in patients with hypertension contributes to the cardiovascular risk.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 20 figures, 6 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: erythrocyte indices, platelet indices, lipid parameters, cardiovascular risk, hypertension

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Profesor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, Ph.D. Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2017