

**Univerzitet u Beogradu**

**Farmaceutski fakultet**

**Tamara R. Gojković**

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA MARKERA  
SINTEZE I APSORPCIJE HOLESTEROLA  
KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I  
PACIJENATA SA ISHEMIJSKOM  
BOLEŠĆU SRCA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2018.**

**University of Belgrade**

**Faculty of Pharmacy**

**Tamara R. Gojkovic**

**THE IMPORTANCE OF CHOLESTEROL  
SYNTHESIS AND ABSORPTION  
MARKERS DETERMINATION IN  
HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS  
WITH ISCHEMIC HEART DISEASE**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2018.**

***Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:***

---

***Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović, mentor***  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

***Prof. dr Slađana Šobajić***  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

***Prof. dr Dimitra Oštrić-Kalimanovska***  
*Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

***Prof. dr Aleksandra Zeljković***  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

---

***Prof. dr Jelena Vekić***  
*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

*Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Zorane Jelić-Ivanović. Disertacija predstavlja deo istraživanja u okviru naučnoistraživačkog projekta “Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri”, čiji je rukovodilac prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska. Uzoroci su sakupljeni na Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Zorani Jelić-Ivanović, koja me je primila na projekat i time ukazala poverenje. Zahvalna sam joj na posvećenom vremenu, izuzetnom strpljenju, originalnim idejama i savetima u toku izrade i pisanja doktorske disertacije, ali i razumevanju i pravom načinu da me motiviše i podrži u trenucima kada eksperimenti nisu uspevali. Zahvalna sam joj na slobodi u istraživačkom radu čime je pokazala da se autoritet i poštovanje stiču jedino znanjem i kolegijalnim odnosom prema kandidatu.*

*Prof. dr Slađani Šobajić dugujem zahvalnost što mi je omogućila da veliki deo eksperimenata uradim na Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta. Zhavalna sam joj na izuzetnoj saradnji, stručnim sugestijama i smernicama tokom izrade disertacije.*

*Od sveg srca se zahvaljujem prof. dr Dimitri Kalimanovskoj-Oštrić na korisnim savetima, pomoći i posvećenosti, ali i velikoj podršci da istrajem tokom izrade i pisanja disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Zeljković i prof. dr Jeleni Vekić, koje su me bezrezervno primile u svoj istraživački tim i naučile pravilnom radu u istraživačkoj laboratoriji. Zahvalna sam im na toleranciji, strpljenju, svemu što sam od njih naučila, na nesebično odvojenom vremenu u svim fazama izrade ove disertacije, a posebno na prijateljskom odnosu od prvog dana, koji mi je puno značio. Radeći sa njima postala sam predaniji istraživač i od pravih osoba sam naučila šta je intelektualno poštenje.*

*Posebno se zahvaljujem prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj, koja je svojim stalnim interesovanjem, savetima i podsticajima dala veliki doprinos u svim fazama izrade ove disertacije, kao i doprinos mom stručnom napredovanju.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Slavici Spasić na korisnim savetima i sugestijama vezanim za statističku obradu i tumačenje rezultata, a posebno za svu podršku tokom mog profesionalnog usavršavanja.*

*Neizmerno se zahvaljujem svim kolegama sa Katedre za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta, a posebnu zahvalnost dugujem kolegici doc. dr Ivani Đuričić na divnoj saradnji, razumevanju i prijateljskom odnosu koji smo izgradile tokom izrade ove disertacije.*

*Srdačno se zahvaljujem kolegici dr Jeleni Arsenijević na pruženoj pomoći i korisnim savetima, kao i svim kolegama sa Katedre za farmakognoziju Farmaceutskog fakulteta.*

*Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević i prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević što su u meni, još u studentskim danima, pobudile želju za istraživačkim radom.*

*Prof. dr Aleksandri Stefanović se zahvaljujem na podršci, kolegijalnosti i prijateljstvu.*

*Hvala Mironu, Jasmini i Jeleni na prijateljskoj atmosferi, bodrenjima i drugarstvu! Hvala mlađim kolegama na razumevanju i tehničarima, Vesni i Marini, na pomoći u laboratorijskom radu. Posebno se zahvaljujem kolegici Milici Miljković, nema reči kojima bih opisala kolegijalnost i naše prijateljstvo. Hvala ti što si uvek tu! Ogromnu zahvalnost dugujem kolegici*

*Sandri Vladimirov na neizmernoj pomoći u laboratoriji, podršci kada eksperimenti nisu uspevali, timskom duhu, prijateljskom zagrljaju i idejama tokom pisanja disertacije. Sa tobom je svaki „run“ bio brži, a svaki pik oštiji i simetričniji.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici. Mojim roditeljima, Sonji i Radosavu se zahvaljujem na tome kako su me vaspitali i usmeravali u nekim manje lepim životnim trenucima. Zahvalna sam im što su me naučili da kritički razmišljam, da verujem u sebe i svoj uspeh i pružili mi slobodu da sama donosim životne odluke. Zahvaljujem se mojoj baki koja me je uvek podržavala i tetkama koje su mi bile uzor i podrška. Mom bratu Ninoslavu sam zahvalna na neizmernoj podršci, razumevanju, na tome što je uvek bio uz mene i što je svaka životna situacija sa njim bila lakša i lepša. Ovu tezu posvećujem vama, mojim najvoljenijima!*

## Izvod

Ateroskleroza predstavlja hroničnu, fokalnu bolest intime krvnih sudova. Iako je veliki broj etioloških faktora uključen u patogenezu i progresiju ateroskleroze, dislipidemija ima ključnu ulogu u razvoju ateroma. Ateroskleroza se nalazi u osnovi većine kardiovaskularnih bolesti (KVB), uključujući i ishemijsku bolest srca (IBS). Statini predstavljaju hipolipemike izbora u primarnoj i sekundarnoj prevenciji KVB. Pored dejstva na inhibiciju sinteze holesterola, statini ostvaruju i brojne plejotropne efekte. U rutinskoj praksi za postavljanje dijagnoze dislipidemije i praćenje odgovora na terapiju statinima koriste se osnovni parametri lipidnog statusa. Međutim, za sagledavanje celokupnog metabolizma holesterola i praćenje njegove homeostaze, neophodno je odrediti efikasnost sinteze i apsorpcije holesterola, njegovu raspodelu između lipoproteinskih čestica, kao i očuvanost funkcije reverznog transporta holesterola. Homeostaza holesterola predstavlja ravnotežu između sinteze i apsorpcije holesterola. Određivanje koncentracija prekursora u sintezi holesterola (dezmosterol i latosterol) i fitosterola (kampesterol, stigmasterol i  $\beta$ -sitosterol) kao surogat-markera apsorpcije holesterola, može ukazati na rani razvoj dislipidemije i predvideti odgovor na terapiju statinima. Jednim imenom ovi markeri se nazivaju neholesterolski steroli (NHS). Relativno niske koncentracije NHS predstavljaju specifičan problem za njihovu kvantifikaciju. Ovo je dodatni razlog za opsežnu validaciju metoda za određivanje NHS, kao i za utvrđivanjem preanalitičkih i analitičkih faktora uticaja na kvantifikaciju NHS. Kako bi se doprinelo boljem razumevanju metabolizma holesterola i uticaja terapije statinima na homeostazu holesterola, ciljevi ove studije su bili: uspostavljanje i validacija metode za određivanje NHS; određivanje koncentracija NHS kod zdravih ispitanika (KG) i pacijenata sa IBS; određivanje obrazaca homeostaze holesterola i njihove povezanosti sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i raspodelom lipoproteinskih čestica male gustine (LDL) u ispitivanim grupama, i određivanje masene koncentracije fosfolipaze A2 udružene sa lipoproteinom (Lp-PLA2).

U istraživanju je učestvovala 31 zdrava osoba, 32 pacijenta sa IBS na terapiji statinima i 47 pacijenata sa IBS bez terapije hipolipemicima. Koncentracije NHS i procentualni udeli pojedinačnih masnih kiselina (MK) u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme određivani su metodom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID). Relativni udeli pojedinih subklasa lipoproteina određeni su gradijent-gel elektroforezom. Masene koncentracije Lp-PLA2 određene su *ELISA* imunohemijskom metodom.

Rezultati ove studije su pokazali da su serum i plazma adekvatni biološki materijali za određivanje NHS. Koeficijenti varijacije unutar i između serija za sve NHS su se kretali između 2,75-9,55% i 5,80-7,75% za plazmu i 3,10-5,72% i 3,05-10,92% za serum. Vrednosti *recovery* testa za ispitivane NHS su iznosile 93,4-105,7% u plazmi i 87,5-106,9% u serumu. Predstavljeni rezultati su dokazali da je za adekvatno hromatografsko razdvajanje pikova NHS neophodan proces derivatizacije uzoraka, uz izbegavanje korišćenja plastičnog laboratorijskog materijala. Nivoi dezmosterola i latosterola su bili značajno viši u obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Koncentracije dezmosterola su pokazale negativnu korelaciju sa veličinom LDL čestica u KG ( $r=-0,459$ ,  $p=0,016$ ) i u grupi pacijenata bez terapije statinima ( $r=-0,381$ ,  $p=0,012$ ). Za procenu obrazaca homeostaze holesterola, svaka grupa ispitanika je podeljena na podgrupe sa sniženom ili povišenom sintezom i sniženom ili povišenom apsorpcijom (SS/SA, SS/PA, PS/SA, PS/PA) prema medijalnim vrednostima koncentracija dezmosterola, odnosno latosterola i  $\beta$ -sitosterola. Vrednosti ukupnog holesterola u podgrupama rasle su sa porastom sinteze i/ili apsorpcije. U KG, PS/SA podgrupa imala je najviše vrednosti triglicerida i najveći udeo malih gustih LDL čestica. U grupi pacijenata na terapiji statinima, PS/SA podgrupa imala je najniže koncentracije LDL holesterola i najmanji udeo LDL IVB subklasa u odnosu na ostale grupe. Koncentracije Lp-PLA2 su bile značajno više u grupi pacijenata bez terapije statinima u odnosu na grupu pacijenata na terapiji i KG ( $p<0,01$  za oba poređenja). Uočen je trend ka višim vrednostima arahidonske kiseline i nezasićenih MK serije n-3 u grupi pacijenata na terapiji statinima u odnosu na ostale ispitivane grupe.

Na osnovu koncentracija NHS mogu da se odrede obrasci sinteze i apsorpcije holesterola i identifikuju osobe sa povišenim rizikom za nastanak i razvoj KVB. Zahvaljujući dobijenim obrascima homeostaze holesterola, pre otpočinjanja hipolipemijskog tretmana, moguće je predvideti odgovor na terapiju, a kasnije i pratiti efekte preporučene terapije. Praćenje koncentracija Lp-PLA2, daje dodatne informacije o pozitivnom efektu terapije statinima na stabilizaciju aterosklerotskog plaka.

**Ključne reči:** dislipidemija, neholesterolski steroli, homeostaza holesterola, validacija metode.

**Naučna oblast:** medicinske nauke- Farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 616.153:616.12-005.4:543.42+005.591.1(043.3)

## **Abstract**

Atherosclerosis is a chronic, focal disease of the blood vessel intima. Even though many etiological factors are involved in the pathogenesis and progression of atherosclerosis, dyslipidemia has the key role in atheroma development. Atherosclerosis is the underlying cause of the most cardiovascular diseases (CVD), including coronary artery disease (CAD). Statins represent a hypolipemics of choice in primary and secondary CAD prevention. In addition to the inhibitory effect on cholesterol synthesis, statins also have numerous pleiotropic effects. Basic lipid parameters are used for diagnosing dyslipidemia and monitoring the statin therapy response in clinical practice. However, in order to examine the overall cholesterol metabolism and monitor its homeostasis, it is necessary to examine the efficiency of cholesterol synthesis and absorption, its distribution between lipoprotein particles, and the preservation of the reverse cholesterol transport function. Cholesterol homeostasis represents the balance between cholesterol synthesis and absorption. Non-cholesterol sterols (NCSs) represent cholesterol synthesis precursors (desmosterol and lathosterol) and cholesterol absorption surrogate markers (phytosterols - campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol). These markers can indicate early development of dyslipidemia and predict response to statin therapy. Relatively low NCSs concentrations represent a specific problem for their quantification. This represents the additional reason to conduct an extensive method validation for NCSs determination, as well as to resolve pre-analytical and analytical factors of influence. In order to contribute to a better understanding of cholesterol metabolism and the statin effects on cholesterol homeostasis, the objectives of this study were: establishing and validating the method for NHSs determination; determination of NHSs concentrations in healthy subjects (CG) and CAD patients; determination of cholesterol homeostasis patterns and their association with basic lipid parameters and distribution of low-density lipoprotein subclasses (LDL) in examined groups, and determination of lipoprotein-associated phospholipase A2 concentration.

The study included 31 healthy controls (CG), 32 statin-treated patients and 47 statin-naive CAD patients. The NCSs concentrations and fatty acid (FA) profiles were determined by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). Lipoprotein subclasses were separated by gradient gel electrophoresis and lipoprotein-associated phospholipase A2 concentration has been determined by ELISA assay.

The results of this study have shown that both serum and plasma are adequate biological materials for NCSs determination. Intra- and inter-assay variabilities for all



NCSs were 2.75–9.55% and 5.80–7.75% for plasma and 3.10–5.72% and 3.05–10.92% for serum, respectively. Recovery studies showed satisfactory percentage errors for all NCSs: 93.4–105.7% in plasma and 87.5–106.9 in serum. The presented results showed that the derivatisation of samples is necessary in order to obtain adequate chromatographic NCSs separation, and that the use of plastic laboratory consumables should be avoided. The concentrations of desmosterol and lathosterol were significantly higher in both groups of patients compared to CG. Desmosterol concentrations showed a negative correlation with the LDL particle size in CG ( $r = -0.459$ ,  $p = 0.016$ ) and in a statin-naive patients ( $r = -0.381$ ,  $p = 0.012$ ). For the assessment of cholesterol homeostasis, we divided each group of participants into four subgroups with good or poor synthesis and good or poor absorption (PS/PA, PS/GA, GS/PA and GS/GA) according to desmosterol or lathosterol and  $\beta$ -sitosterol median values. Within subgroups, total cholesterol levels increased with increasing synthesis and/or absorption. In CG, the GS/PA subgroup had the highest triglyceride values and the largest proportion of small dense LDL particles. In the statin-treated patients, GS/PA subgroup had the lowest LDL-cholesterol concentration and the smallest LDL IVB subclasses distribution compared to other groups. Lp-PLA2 concentrations were significantly higher in statin-naive patients compared to the statin-treated group and CG ( $p < 0.01$  for both comparisons). There was a trend towards a higher value of arachidonic acid and unsaturated FA n-3 series in the statin-treated patients compared to the other groups of subjects.

Based on NHSs concentrations, it is possible to determinate cholesterol synthesis and absorption patterns and identify individuals at high risk for the CVD development and progression. In addition, determinations of cholesterol homeostasis patterns are potentially useful tool for predicting the individual propensity toward hypolipidemic therapy response. With determination of Lp-PLA2 values, it is possible to estimate positive effect of statin therapy and risk of atherosclerotic plaque rupture.

**Key words:** dyslipidemia, non-cholesterol sterols, cholesterol homeostasis, method validation

**Scientific field:** Medical sciences - Pharmacy

**Special topic:** Medical biochemistry

**UDC N°:** 616.153:616.12-005.4:543.42+005.591.1(043.3)

## Skraćenice u tekstu:

4S		<i>engl. Scandinavian Simvastatin Survival Study</i>
95% IP	Interval pouzdanosti od 95%	
ABCA1	ATP-vezujući kasetni transporter A1	<i>engl. ATP binding cassette transporter A1</i>
ABCG5/G8	ATP-vezujući kasetni transporteri G5/G8	<i>engl. ATP binding cassette transporter G5/G8</i>
ACAT2	Acil-KoA: holesterol aciltransferaza 2	<i>engl. Acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2</i>
acetil-KoA	Acetil-koenzim A	
AHA	Američko udruženje za srce	<i>engl. American Heart Association</i>
AIM	Akutni infarkt miokarda	
AKS	Akutni koronarni sindrom	
ANCOVA	Analiza kovarijanse	
ANOVA	Univarijantna analiza varijanse	
apoA-I	Apolipoprotein A-I	
apoA-II	Apolipoprotein AII	
apoB-100	Apolipoprotein B-100	
apoB-48	Apolipoprotein B-48	
APS	Amonijum-persulfat	
At	Antitelo	
BBP	benzil-butyl-ftalata	
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid	
C18:1 (ω-9)	Oleinska kiselina	
C18:2 (ω-6)	Linolna iselina	
C18:3 (ω-3)	α-linolenska kiselina	
C20:3 (ω-6) ili DGLA	Dihomo-γ-linlenska kiselina	
C20:4 (ω-6) ili ARA	Arahidonska iselina	
C20:5 (ω-3) ili EPA	Eikozapentaenska kiselina	
C22:6 (ω-3) ili DHA	Dokozaheksaenska kiselina	
CD36	Klaster diferencijacije 36	<i>engl. Cluster of differentiation 36</i>
CETP	Holesterol estar transferni protein	<i>engl. Cholesteryl ester transfer protein</i>
CHOD	Holesterol-oksidaža	
cIMT	Debljina intime-medije karotidnih arterija	<i>engl. Carotid intima-media thickness</i>
DBP	di-n-butyl-ftalat	
DEHP	di-(2-etilheksil)-ftalat	
DH	Derivatizovani holesterol	

DHCR24	24-dehidroholesterol reduktaza	
EAS	Evropsko udruženje za ateroskleroza	<i>engl. European Atherosclerosis Society</i>
ECLIA	Elektrohemiluminiscentna imuno metoda	<i>engl. electrochemiluminescence method</i>
EDTA	Etilendiaminotetrasirćetna kiselina	
ELISA	Enzimski imunoesej	<i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMK	Esencijalne masne kiseline	
ER	Endoplazmatski retikulum	
ESC	Evropsko udruženje za kardiologiju	<i>engl. European Society of Cardiology</i>
FDA	Uprava za hranu i lekove	<i>engl. Food and Drug Administration</i>
FGF2	Fibroblastni faktor rasta 2	<i>eng. fibroblast growth factors 2</i>
FID	Plamenojonizacioni detektor	<i>engl. Flame ionization detection</i>
GBD		<i>engl. Global Burden of Disease</i>
GC	Gasna hromatografija	<i>engl. Gas chromatography</i>
GC-FID	Gasna hromatografija sa plamenojonizacionom detekcijom	<i>engl. Gas chromatography-flame ionization detection</i>
GC-MS	Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom	<i>engl. Gas chromatography-mass spectrometry</i>
HDL	Lipoproteini visoke gustine	<i>engl. High-density lipoprotein</i>
HDL-h	Holesterol sadržan u HDL česticama	
HE	Estri holesterola	
HL	Hepatična lipaza	
HMG-KoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A	
HOMA-IR	Homeostazni model procene insulinske rezistencije	<i>engl. homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi	<i>engl. High-performance liquid chromatography</i>
HRP	Peroksidaza rena	
hsCRP	C-reaktivni protein visoke osetljivosti	<i>engl. high-sensitivity C-reactive protein</i>
hsTn-T	Troponin T visoke osetljivosti	<i>engl. high sensitivity troponin T</i>
IBS	Ishemijska bolest srca	
ICD10, MKB10	Međunarodne klasifikacije bolesti, deseta revizija	<i>engl. International Classification of Diseases, 10th revision</i>
IDMS	Izotopska diluciona masena spektrometrija	<i>engl. Isotopic dilution mass spectrometry</i>
IS	Interni standard	
ITM	Indeks telesne mase	
KFD	Korekcionni faktor derivatizacije	
KFE	Korekcionni faktor ekstrakcije	

KG	Kontrolna grupa	
KOH	Kalijum-hidroksid	
KV	Koeficijent varijacije	
KVB	Kardiovaskularne bolesti	
LC	Tečna hromatografija	<i>engl. Liquid chromatography</i>
LCAT	Lecitin-holesterol aciltransferaza	<i>engl. lecithin:cholesterol acyl transferase</i>
LDL	Lipoproteini niske gustine	<i>engl. Low-density lipoprotein</i>
LDL-h	Holesterol sadržan u LDL česticama	
LLE	Tečno-tečna ekstrakcija	<i>engl. Liquid-liquid extraction</i>
LOD	Limit detekcije	<i>engl. Limit of detection</i>
LOQ	Limit kvantifikacije	<i>engl. Limit of quantification – LOQ</i>
Lp-PLA2	Fosfolipaza A2 udružena sa lipoproteinom	<i>engl. Lipoprotein-associated phospholipase A2</i>
LXR	Jetreni X receptor	<i>engl. Liver X receptor</i>
mag-MIP	Magnetne MIP kuglice	
MDA	Malondialdehid	
MDGs	Milenijumski razvojni ciljevi Ujedinjenih Nacija	<i>engl. United Nations Millennium Development Goals</i>
MIP	Molekulski obeleženi polimeri	<i>engl. Molecularly imprinted polymers</i>
MK	Masna kiselina	
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamid	
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat	
NAP	Nestabilna angina pectoris	
NCEP ATP III		<i>engl. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
NH	Nederivatizovani kolesterol	
NHS	Neholesterolski steroli	
NIST/NBS	Nacionalni institut za standarde i tehnologiju/Nacionalni biro za standarde	<i>engl. National Institute of Standards and Technology/National Bureau of Standards</i>
NMR	Nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija	
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1 transporter	
oxLDL	Oksidativno modifikovane LDL čestice	
PA	Povišena apsorpcija	
PGI3	Prostaglandin I3	
PIK	Površina ispod krive	
PNMK	Polinezasićene masne kiseline	

PROSPER		<i>engl. PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk</i>
PS	Povišena sinteza	
PTFE	Politetrafluoroetilen	
Rf	Relativna migraciona daljina	
RI	Retencioni indeks	
RI <sub>exp</sub>	Izračunati retencioni indeks	
RTH	Reverzni transport holesterola	
S/N	Odnos signala i šuma	<i>engl. Signal-to-noise ratio</i>
SA	Snižena apsorpcija	
SAP	Stabilna angina pektoris	
Scap		<i>engl. SREBP cleavage activating protein</i>
Sd	Standardna devijacija	
SDI	Socioekonomski indeks	
sdLDL	Male guste LDL čestice	<i>engl. Small, dense low density lipoprotein</i>
SFE	Ekstrakcija superkričnim fluidima	<i>engl. Supercritical fluid extraction</i>
SH	Slobodan holesterol	
SPE	Čvrsto-tečna ekstrakcija	<i>engl. Solid-phase extraction</i>
SPME	Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	<i>engl. Solid-phase microextraction</i>
SR	Receptori hvatači	<i>engl. scavenger receptors</i>
SR-B1	Receptor hvatač klase B tip 1	<i>engl. Scavenger receptor class B type 1</i>
SRE	Sterol-regulatorni elementi	<i>engl. Sterol regulatory element</i>
SREBP	Vezujući proteini za sterol-regulatorne elemente	<i>engl. Sterol regulatory element binding protein</i>
SS	Snižena sinteza	
SZO	Svetska zdravstvena organizacija	
TBA	Tiobarbiturna kiselina	
TEMED	Tetrametilen-diamin	
TG	Trigliceridi	
THF	Tetrahidrofuran	
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin	
TMCS	Trimetilhlorosilan	
UH	Ukupan holesterol	
USDA	Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država	<i>engl. The United States Department of Agriculture</i>
VLDL	Lipoproteini veoma niske gustine	<i>engl. Very-low-density lipoprotein</i>

## Sadržaj:

1. Uvod .....	1
1.1. Klasifikacija i epidemiologija kardiovaskularnih bolesti .....	2
1.2. Etiologija i patogeneza ateroskleroze .....	5
1.3. Dislipidemija i ateroskleroza .....	8
1.4. Homeostaza holesterola .....	10
1.4.1. Sinteza holesterola.....	11
1.4.2. Apsorpcija holesterola.....	15
1.4.2.1. Fitosteroli i njihova apsorpcija .....	18
1.4.3. Uticaj lekova na homeostazu holesterola.....	20
1.4.4. Metode za određivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola.....	23
1.5. Transport holesterola kroz cirkulaciju – lipoproteinske čestice .....	26
1.5.1. LDL čestice .....	26
1.5.1.1. Oksidativna modifikacija LDL čestica .....	29
1.5.2. HDL čestice.....	30
1.6. Fosfolipaza A2 udružena sa lipoproteinom (Lp-PLA2) .....	32
1.7. Masne kiseline .....	33
1.7.1. Esencijalne uloge omega-3 i omega-6 masnih kiselina u organizmu .....	34
2. Cilj .....	37
3. Materijal i metode.....	39
3.1. Ispitanici.....	39
3.2. Metode .....	42
3.2.1. Metode za određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih parametara .....	42
3.2.1.1. Reagensi i oprema .....	42
3.2.1.2. Principi metoda za određivanje osnovnih biohemijskih parametara.....	42
3.2.2. Metoda za određivanje koncentracije malondialdehida.....	43
3.2.2.1. Hemikalije i oprema .....	43

3.2.2.2. Princip metode i postupak za određivanje koncentracije malondialdehida.	43
3.2.3. Određivanje masene koncentracije Lp-PLA2 .....	45
3.2.3.1. Reagensi i oprema .....	45
3.2.3.2. Princip metode i postupak za određivanje masene koncentracije Lp-PLA2 .....	45
3.2.4. Određivanje aktivnosti LCAT-a i CETP-a.....	47
3.2.4.1. Reagensi i oprema .....	47
3.2.3.2. Princip metode i postupak za određivanje aktivnosti LCAT i CETP.....	47
3.2.5. Određivanje procentualnog udela pojedinih masnih kiselina u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme.....	48
3.2.5.1. Hemikalije i oprema .....	48
3.2.5.2. Priprema uzorka za određivanje MK.....	49
3.2.5.3. GC-FID uslovi za hromatografsko razdvajanje MK i izračunavanje procentualnih udela ispitivanih MK u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme.....	49
3.2.6. Razdvajanje i određivanje zastupljenosti pojedinih LDL i HDL subfrakcija ....	51
3.2.6.1. Hemikalije i oprema .....	51
3.2.6.2. Izlivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova.....	52
3.2.6.3. Gradijent-gel elektroforetsko razdvajanje LDL i HDL subfrakcija .....	52
3.2.6.4. Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija .....	53
3.2.7. Određivanje koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola .....	54
3.2.7.1. Hemikalije i oprema .....	54
3.2.7.2. Postupak razvoja i optimizacije metode za kvantitativno određivanje NHS .....	56
3.2.7.2.1. Priprema staklenog laboratorijskog posuđa .....	56
3.2.7.2.2. Postupak pripreme uzoraka bez procesa derivatizacije NHS .....	56
3.2.7.2.3. Hromatografski uslovi radvanja NHS.....	57
3.2.7.2.4. Postupak pripreme uzoraka sa procesom derivatizacije NHS .....	58
3.2.7.2.5. Hromatografski uslovi razdvajanja trimetilsilil etara NHS .....	59

3.3. Validacija metode za kvantitativno određivanje NHS.....	60
3.3.1. Evaluacija preanalitičkih i analitičkih faktora uticaja na kvalitativno određivanje NHS.....	61
3.3.1.1. Procena prinosa ekstrakcije .....	61
3.3.1.2. Procena prinosa derivativizacije.....	62
3.3.1.3. Ispitivanje uticaja upotrebe plastičnog laboratorijskog potrošnog materijala na kvantifikaciju NHS .....	63
3.3.1.4. Izrada kalibracionih krivih za NHS i ispitivanje linearnosti .....	63
3.3.1.5. Određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije metode za određivanje NHS .....	69
3.3.1.6. Ispitivanje preciznosti metode .....	69
3.3.1.7. Ispitivanje tačnosti metode .....	71
3.3.1.8. Studija stabilnosti uzoraka.....	72
3.3.1.8.1. Ispitivanja stabilnosti analita od interesa skladištenjem nativnih uzoraka .....	72
3.3.1.8.2. Ispitivanja stabilnosti analita od interesa skladištenjem derivatizovanih uzoraka.....	72
3.3.1.8.3. Ispitivanje stabilnosti analita od interesa nakon ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja uzoraka .....	72
3.4. Statistička analiza .....	73
4. Rezultati.....	74
4.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika .....	74
4.2. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa .....	79
4.3. Ispitivanje aktivnosti enzima/proteina uključenih u reverzni transport holesterola .	80
4.4. Ispitivanje karakteristika LDL i HDL subfrakcija .....	82
4.4.1. Raspodela LDL fenotipova .....	82
4.4.2. Analiza relativnog udela pojedinačnih LDL subfrakcija .....	83
4.4.3. Raspodela HDL fenotipova.....	85
4.4.4. Analiza relativnog udela pojedinačnih HDL subfrakcija.....	85



4.5. Ispitivanje masene koncentracije Lp-PLA2.....	86
4.6. Ispitivanje masnokiselinskog profila .....	88
4.7. Ispitivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola .....	89
4.7.1. Optimizacija preanalitičkih i analitičkih uslova za određivanje koncentracije NHS .....	89
4.7.2. Stabilnost uzoraka .....	98
4.7.3. Validacija i verifikacija metode za kvantitativno određivanje NHS.....	100
4.7.4. Ispitivanje koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola .....	107
4.7.5. Korelaciona analiza NHS sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i karakteristikama LDL i HDL subklasa .....	109
4.7.5. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola.....	118
4.7.5.1. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola korišćenjem koncentracija latosterola i $\beta$ -sitosterola .....	119
4.7.5.2. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola korišćenjem koncentracija dezmosterola i $\beta$ -sitosterola .....	124
5. Diskusija.....	129
6. Zaključci .....	154
7. Literatura .....	157

## 1. Uvod

Brza globalizacija, urbanizacija, te povećanje prosečne starosti stanovništva, doveli su do toga da broj hroničnih nezaraznih bolesti postane sve veći, time predstavljajući izazov za savremene sisteme zdravstvene zaštite. Kardiovaskularne bolesti (KVB), pored različitih vrsta karcinoma, hronične opstruktivne bolesti pluća, kao i *Dabetes mellitus* tip I i II, nalaze se na samom vrhu ovog spiska, a zabrinjavajući podatak je taj da je sve veći broj obolelih u zemljama u razvoju [1]. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), incidenca i prevalenca KVB je sve veća i one predstavljaju vodeći uzrok morbiditeta, komorbiditeta i mortaliteta [1, 2].

U 2011. godini, Generalna skupština Ujedinjenih nacija je u delu deklaracije koji se odnosi na brigu o zdravlju čovečanstva, na prvom mestu, među hroničnim bolestima, izdvojile KVB kao pandemijski zdravstveni problem. KVB su označene i kao ozbiljan problem sa velikim društveno-ekonomskim posledicama, koji se manifestuje kroz smanjenje radne sposobnosti, porast invaliditeta, te povećanje troškova za lečenje obolelih, naročito u manje razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Ujedinjene Nacije su tada postavile ambiciozne planove kroz projekat „Milenijumski razvojni ciljevi Ujedinjenih Nacija“ (*engl. United Nations Millennium Development Goals – MDGs*) za prevenciju i smanjenje broja obolelih od KVB i poboljšanje zdravlja čovečanstva [1]. Epidemiološki podaci različitih studija i udruženja potkrepljuju ove napore usmerene ka adekvatnoj i efikasnijoj prevenciji. Američko udruženje za srce (*engl. American Heart Association – AHA*) navodi podatak da je u 2016. godini ukupan broj obolelih od ishemijske bolesti srca (IBS) iznosio 15,5 miliona osoba starijih od 20 godina u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). Takođe, projektovani trend za 2020. godinu na osnovu analize AHA, predviđa da će svake 42 sekunde jedan stanovnik SAD doživeti infarkt miokarda [3]. Navodi najpoznatije prospektivne studije, *Framingham Heart Study*, kao i vodiči koje publikuju značajna svetska udruženja iz oblasti kardiologije, kao što su Evropsko udruženje kardiologa (*engl. European Society of Cardiology – ESC*), Evropsko udruženje za aterosklerozu (*engl. European Atherosclerosis Society – EAS*) i AHA, ističu značaj prevencije KVB, sumirajući faktore rizika koji doprinose razvoju KVB. Vodiči ovih udruženja pružaju informacije o ciljevima primarne i sekundarne prevencije KVB, time dajući prioritet prevenciji i ranom prepoznavanju bolesti u odnosu na kurativu [4-6].

Prikazani podaci govore u prilog naporima usmerenim ka poboljšanju primarne i sekundarne prevencije KVB. Pažnja kliničkih studija usmerena je ka evaluaciji

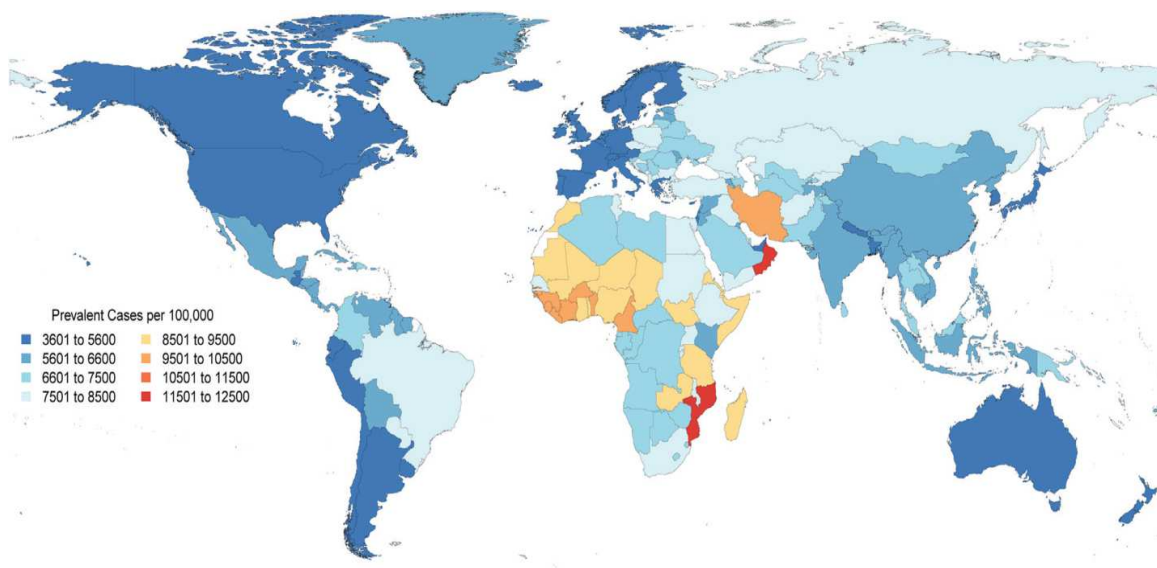
tradicionalnih faktora rizika, ali i otkrivanju novih markera koji bi doprineli ranom otkrivanju, efikasnijoj terapiji i pouzdanijoj prognozi odgovora na terapiju i proceni ishoda bolesti.

### ***1.1. Klasifikacija i epidemiologija kardiovaskularnih bolesti***

KVB predstavljaju veliku i heterogenu klasu oboljenja koje obuhvataju srce ili krvne sudove. Prema desetoj reviziji međunarodne klasifikacije bolesti (*engl. International Classification of Diseases, 10th revision – ICD10, MKB10*) one uključuju:

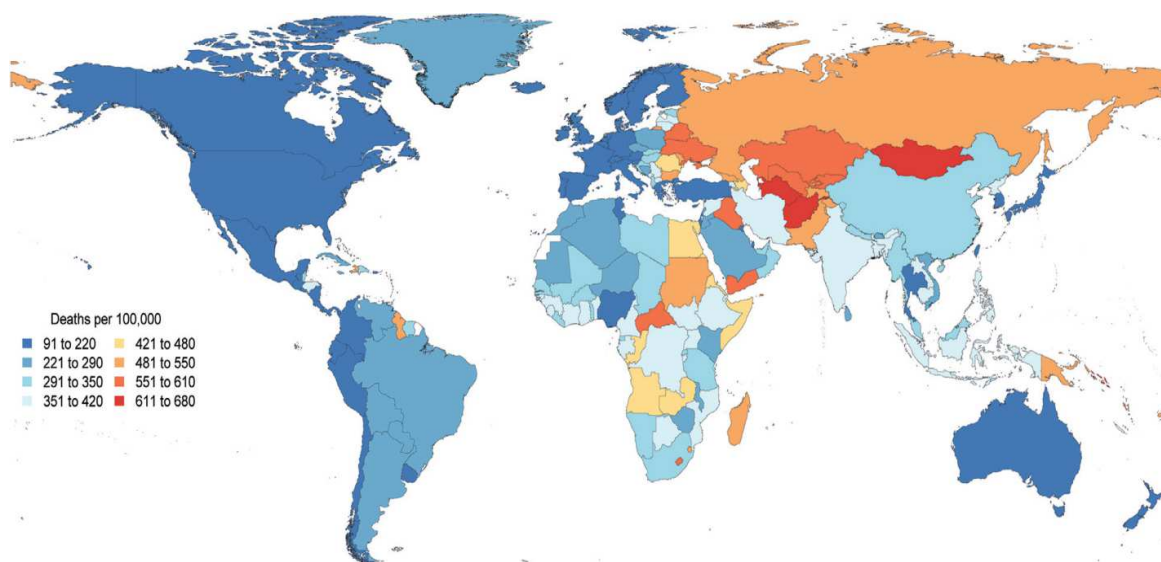
- Akutnu reumatsku groznicu;
- Hronične reumatske bolesti srca;
- Bolesti prouzrokovane povišenim krvnim pritiskom;
- Ishemijsku bolest srca (koronarnu bolest srca), sa svoja četiri oblika - anginom pektoris, akutnim infarktom miokarda, iznenadnom srčanom smrću i ishemijskom kardiomiopatijom;
- Bolesti srca plućnog porekla i bolesti krvnih sudova pluća;
- Bolesti krvnih sudova mozga;
- Bolesti arterija, malih arterija i kapilara, vena, limfnih sudova i limfnih čvorova;
- Druge i neoznačene bolesti srca i krvotoka [7].

Ishemijska bolest srca (IBS) predstavlja najčešću bolest iz ove velike grupe [7]. U okviru *Global Burden of Disease 2015* (GBD) studije koja je sproveda meta-analizu za period od 1990-2015. godine, epidemiološke karakteristike KVB procenjene su korišćenjem statističkih softvera za modelovanje i podataka iz zdravstvenih istraživanja, prospektivnih kohorta, kao i dostupnih podataka iz zdravstvenih sistema pojedinih država [8]. Rezultati ove meta-analize pokazuju da je prevalenca KVB u 2015. godini na globalnom nivou, standardizovana za starost, iznosila 422,7 miliona sa intervalom pouzdanosti od 95% (95% IP) od 415,53 do 427,87 miliona slučajeva [8]. Na slici 1 prikazana je prevalenca obolelih od KVB u svetu.



Slika 1. Globalni prikaz raspodele ukupnog broja obolelih od KVB. Preuzeto iz: Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70:1-25.

Podaci ove studije ukazuju na dramatičan porast broja smrtnih slučajeva uzrokovanih KVB u periodu od 1990. do 2015. godine. Od 1990. godine, dominira porast mortaliteta uzrokovanih komplikacijama KVB, a na listi vodećih uzročnika smrti, KVB se nalaze na prvom mestu. Podaci GBD studije beleže da je 1990. godine registrovano 12,59 miliona (95% IP: 12,38 do 12,80 miliona) smrtnih slučajeva uzrokovanih KVB, a 2015. godine čak 17,92 miliona (95% IP: 17,59 do 18,28 miliona) smrtnih slučajeva. Ovaj porast broja umrlih od KVB posledica je sve većeg broja obolelih od arterijske hipertenzije, *Diabetes mellitus*-a tip I i II i hronične bubrežne bolesti, čije prisustvo doprinosi razvoju KVB, kao i porast broja starijih osoba [8]. Na slici 2 prikazana je stopa mortaliteta uzrokovana KVB.



Slika 2. Globalni prikaz stope mortaliteta uzrokovane KVB. Preuzeto iz: Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F. *Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. J Am Coll Cardiol. 2017;70:1-25.*

Epidemiološki obrasci KVB se razlikuju ukoliko se u proračun za incidencu, prevalencu i morbiditet uračunaju prosečna starost stanovništva u datoj regiji i socioekonomski status. S tim u vezi, podaci GBD studije ukazuju na povećanu stopu smrtnosti uzrokovanu KVB među muškom populacijom u zemljama u razvoju [8].

Prema podacima Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje IBS, danas u svetu u strukturama obolevanja i umiranja od KVB, dominira incidenca i mortalitet od IBS, dok u Srbiji po stopi mortaliteta ona zauzima treće mesto [7]. Takođe, podaci vodiča navode da je u našoj populaciji veliki broj umrlih od IBS prikriven u podgrupi umrlih od ostalih KVB [7]. Učestalost IBS raste nakon 40. godine života, sa prevalencom koja se drastično povećava sa starenjem. Za nas je od posebnog značaja podatak da broj obolelih beleži najveći porast u slabije razvijenim evropskim zemljama, gde gotovo polovinu obolelih unutar populacije KVB bolesnika čine oboleli od IBS. Još alarmantniji podaci govore da je stopa smrtnosti od IBS, unutar populacije umrlih od KVB u zemljama jugoistočne Evrope najveća i iznosi preko 50% [8].

Kako u osnovi IBS leži aterosklerotski proces na koronarnim krvnim sudovima, za razumevanje ovog procesa neophodno je sagledati uticaj različitih etioloških faktora i razumeti njihovo sinergističko delovanje na molekulskom nivou.

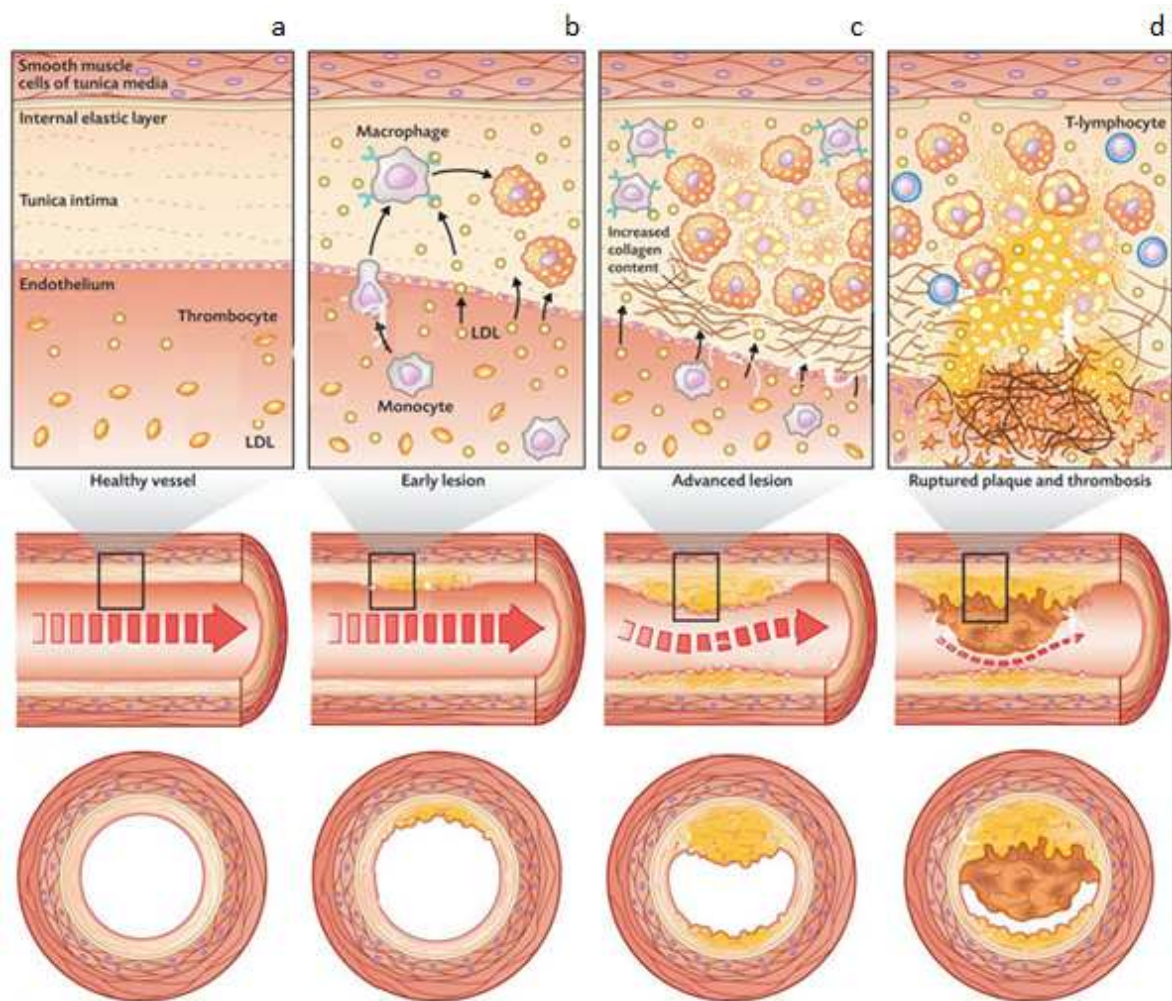
## ***1.2. Etiologija i patogeneza ateroskleroze***

Ateroskleroza predstavlja multifaktorsko, hronično oboljenje zidova velikih i srednjih arterija koje karakteriše endotelna disfunkcija, vaskularna inflamacija, akumulacija lipida i komponenti ekstracelularnog matriksa, što rezultuje formiranjem i progresijom aterosklerotskog plaka - ateroma. U patogenezi aterosklerotskih promena leži veliki broj etioloških faktora koji učestvuju u kompleksnim interakcijama na molekulskom nivou i pri tome ostvaruju jak sinergistički efekat [9]. Zahvaljujući rezultatima najveće epidemiološke longitudinalne studije - *Framingham Heart Study*, ustanovljen je veliki broj faktora rizika, među kojima se kao najznačajniji izdvajaju: uzrast, pol, pušački status, fizička aktivnost i način ishrane, prisustvo klinički manifestnih i subkliničkih infekcija, hiperfibrinogenemija, hiperhomocisteinemija, kao i prisustvo drugih patoloških stanja koja su praćena aterosklerotskim promenama na krvnim sudovima i kod kojih se kao komorbiditet najčešće javlja IBS (hipertenzija, dislipidemija, *Diabetes mellitus* tip I i II) [4, 9-19]. Shodno multifaktorskim činiocima, postavljeno je više hipoteza koje nude objašnjenja o dominantnim etiološkim faktorima i molekularnim mehanizmima nastanka i razvoja ateroskleroze. Te hipoteze su:

- Odgovor na oštećenje endotela;
- Monoklonalna hipoteza;
- Lipidna hipoteza;
- Inflamacija;
- Regresija lezije;
- Nestabilan plak [11].

Najrasprostranjenija hipoteza jeste ona zasnovana na odgovoru na oštećenje endotela, koja je i najodrživija, jer u određenim fazama patogeneze obuhvata sve ostale hipoteze [11, 20]. Prema ovoj teoriji, nastanak aterosklerotske lezije prolazi kroz 3 faze koje su prikazane na slici 3:

- Inicijalna faza u razvoju ateroskleroze;
- Progresija lezije;
- Ruptura plaka i tromboza.



Slika 3. Faze u razvoju aterosklerotske lezije. Preuzeto sa: <https://emilyspiersbiology.weebly.com/alevel-biology-blog/atherosclerosis>, 11. 6. 2018.

Na slici 3 (a) prikazani su poprečni i uzdužni preseki zdrave arterije i njene histološke karakteristike. U zidu arterije razlikujemo tri sloja: unutrašnji omotač (*lat. tunica intima*), srednji omotač (*lat. tunica media*) i spoljašnji omotač (*lat. tunica adventitia*). Unutrašnji omotač obložen je endotelom sastavljenim od jednog sloja ćelija koje su u direktnom kontaktu sa strujom cirkulišuće krvi i koje naležu na bazalnu membranu. U okviru ovog sloja nalazi se i subendotelni prostor, unutrašnja elastična lamina i rezidualne glatkomišićne ćelije, čije je prisustvo karakteristično za humani organizam. Srednji omotač se sastoji od glatkomišićnih ćelija, ekstracelularnog matriksa sačinjenog od elastina i kolagena i elastične lamine koja ovaj sloj odvaja od adventicije. Spoljašnji omotač se sastoji od rastresitog vezivnog tkiva sa kolagenim vlaknima, mrežom elastičnih vlakana, fibroblastima i makrofagama, krvnim sudovima (*lat. vasa vasorum*) i nervnim završecima [20, 21].

U delu slike 3 (b) prikazana je inicijalna faza u patogenezi aterosklerotske lezije. Kao odgovor na povredu endotela, razvija se vaskularna inflamacija i proliferacija vezivnog tkiva. Pod uticajem različitih agenasa dolazi do oštećenja endotela. Odgovor na oštećenje obuhvata hemotaksu, adheziju leukocita iz krvi na aktivirani jednoslojni endotel, te usmerenu migraciju adheriranih leukocita ka intimi. Nakon prodora monocita u subendotelni prostor, dolazi do njihove diferencijacije u tkivne makrofage i kasnijeg preuzimanja lipidnih komponenti. Upravo, centralnim događajem u nastanku ranih aterosklerotskih lezija smatra se prolazak čestica lipoproteina niske gustine (*engl. low-density lipoprotein* – LDL) u zid arterija i njihovo preuzimanje od strane makrofaga. U tom smislu, pored postojanja brojnih etioloških faktora, dislipidemija igra centralnu ulogu u razvoju ateroma. U stanjima očuvanog integriteta endotela, pod fiziološkim uslovima, LDL čestice se iz subendotela transportuju kroz intimu i mediju do *vasa vasorum* i limfnih sudova adventicije. Usled aktivacije endotela, te smanjenog antioksidativnog kapaciteta subendotela, LDL čestice podležu oksidativnoj, ali i enzimskim modifikacijama i glikozilaciji. Oksidovano modifikovane LDL čestice (oxLDL) lako postaju dostupne receptorima hvatačima (*engl. scavenger receptors* – SR) na površini makrofaga, koji nekontrolisanim putem preuzimaju holesterol i uzrokuju njegovu akumulaciju u citoplazmi. Ovo narušavanje intracelularne homeostaze holesterola dovodi do formiranja posebnog histološkog entiteta karakterističnog za ranu fazu formiranja ateroma – penastih ćelija [20, 22, 23].

Dalja progresija lezije uključuje oslobađanje faktora rasta od strane monocita, trombocita i endotelnih ćelija, te migraciju glatkomišićnih ćelija iz medije u intimu, proliferaciju rezidualnih i glatkomišićnih ćelija iz medije, kao i povećanu sintezu makromolekula ekstracelularnog matriksa, kao što su kolagen, elastin i proteoglikani (slika 3 (c)). Na ovom nivou, aterosklerotski proces je još uvek reverzibilan [23]. Premda penaste ćelije poseduju manje proinflamatoran fenotip od makrofaga, sintezom hemoatraktanata i različitih citokina dovode do dalje progresije aterosklerotskog plaka [20, 23].

Penaste ćelije, zajedno sa glatkomišićnim ćelijama čine osnovu aterosklerotskog plaka. Kako lezija napreduje, dolazi do apoptoze ovih ćelija i formiranja nekrotičnog jezgra unutar plaka. Oslobođene lipidne komponente se akumuliraju u ekstracelularnom prostoru subintime u vidu kristala holesterola, formirajući lipidno nekrotično jezgro. Kako aterosklerotski plak napreduje, dolazi do proliferacije *vasa vasorum* od adventicije ka plaku (slika 3 (d)), ali sa napredovanjem procesa, posledično, i do razvoja kolateralne cirkulacije različitog stepena u ishemičnom tkivu distalno od okluzije [20, 24-26]. Ovo



omogućava dalje nagomilavanje makrofaga, T limfocita i eritrocita. Studija Acar i saradnika navodi da je upravo odnos trombocita i limfocita nezavisan pokazatelj stepena aktivacije, razvoja i uvećanja kolateralne cirkulacije [25]. Sa progresijom lezije, može doći do potpunog narušavanja integriteta endotela, te kontakta tkivnog faktora sa faktorima koagulacione kaskade i aktivacije procesa koagulacije, što za posledicu ima taloženje i aktivaciju trombocita na mestu oštećenja, čime se inicira stvaranje tromba [20, 21, 23, 24]. Upravo proces tromboze, kao i posledično formiranje tromba i eventualnih embolusa, predstavljaju krajnju, manifestnu komplikaciju ateroskleroze, praćenu kliničkim, subjektivnim i objektivnim znacima ishemijske bolesti. Opisani su različiti mehanizmi koji konvertuju stabilan u vulnerabilan plak [27]. Za razliku od vulnerabilnog, stabilan plak sadrži manje inflamatornih ćelija, ima manje nekrotično jezgro, veći sadržaj glatkomišićnih ćelija i komponenti ekstracelularnog matriksa, ali i jaku fibroznu kapu koja mu obezbeđuje stabilnost, te je manja verovatnoća da dođe do tromboze i embolije. Tokom destabilizacije plaka primećena je značajna apoptoza glatkomišićnih ćelija prisutnih u fibroznoj kapi plaka, što uzrokuje smanjenu proizvodnju proteina ekstracelularnog matriksa koji takođe doprinose stabilnosti plaka. Apoptotične mase uvećavaju nekrotično jezgro i podstiču inflamatorni proces, te progresiju plaka iz stabilnog ka vulnerabilnom [20, 23, 27].

Dakle, ateroskleroza predstavlja hroničan proces, sa složenim ćelijskim i molekularnim interakcijama. Od ključnog značaja u predviđanju komplikacija bolesti i pravilnom lečenju jeste neophodnost sagledavanja i razumevanja progresije, ali i moguće stagnacije i reverzibilnosti samog procesa. Kako se smatra da je prodor LDL čestica u subendotelni prostor i njihovo preuzimanje od strane makrofaga bitan preduslov za formiranje penastih ćelija, dislipidemija predstavlja vodeći uzrok progresije ateroskleroze. Razumevanjem nastanka dislipidemije, ali i mehanizama njenog delovanja na razvoj ateroskleroze, moguće je zaustaviti progresiju reverzibilnog ka ireverzibilnom aterosklerotskom procesu.

### ***1.3. Dislipidemija i ateroskleroza***

Očigledna je uloga lipidnih komponenti, pre svega holesterola sadržanog u LDL lipoproteinskim česticama (LDL-h), u nastanku i progresiji aterosklerotske lezije [11, 20, 22, 23, 28]. Kako holesterol ulazi u sastav svih lipoproteinskih čestica, metabolizam holesterola usko je povezan sa metabolizmom svih lipoproteina. Metabolizam pojedinih

klasa lipoproteina je uzajamno uslovljen i povezan, zbog čega se njihova uloga u aterogenezi mora sagledati kroz njihov lipidni i proteinski sastav.

Iako je LDL čestica nosilac gotovo 60-70% ukupnog holesterola u plazmi [29], nedvosmisleno je dokazano da aterogeni lipidni profil pored povišenih vrednosti LDL-h podrazumeva i povišene vrednosti ukupnog holesterola (UH) i triglicerida (TG), kao i nizak nivo holesterola sadržanog u lipoproteinima visoke gustine (*engl. high-density lipoprotein* – HDL) (HDL-h). Ovi lipidni parametri predstavljaju tradicionalne lipidne faktore rizika za nastanak IBS [29]. Smernice našeg Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca, kao i međunarodnog vodiča, *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) koji se koriste u praksi, upravo preporučuju određivanje, ovih, osnovnih parametara lipidnog statusa za procenu rizika, postavljanje dijagnoze i praćenje terapije IBS. Takođe, uz lipidne, preporučuje se i određivanje koncentracije proteinskih komponenata lipoproteina, apolipoproteina B-100 (apoB-100) i apolipoproteina AI (apoA-I) [7, 29]. Tri najčešće promene u lipidnom profilu koje se sreću kod pacijenata sa aterosklerozom su povišena koncentracija TG, smanjena koncentracija HDL-h i prisustvo malih gustih LDL čestica (*engl. small, dense low density lipoprotein* – sdLDL). Ove promene u vrednostima lipidnih parametara označavaju se kao „lipidna trijada“. Noviji pristupi u prevenciji i lečenju dislipidemija smatraju nedovoljnim određivanje osnovnih parametara lipidnog statusa za sveobuhvatnu procenu rizika. U prilog ovim tvrdnjama govore prethodno navedeni, zabrinjavajući epidemiološki podaci o porastu stope smrtnosti uzrokovane IBS, ali i rezultati velikog broja studija, koje opisuju složene mehanizme nastanka dislipidemije [1-3, 8, 30]. Upravo, za bolje razumevanje kompleksnih mehanizama nastanka dislipidemije, pažnja savremenih bazičnih, ali i kliničkih istraživanja premeštena je sa tradicionalnih na novije faktore rizika. S tim u vezi, neophodno je sagledati proces homeostaze holesterola i mehanizme njene regulacije uzimajući u obzir relevantne fiziološke procese kao što su sinteza i apsorpcija holesterola [30]. Zatim, novija istraživanja navode da je važno ustanoviti distribuciju holesterola na nivou lipoproteinskih čestica, njihov kvalitet i kvantitet, kao i proniknuti u biohemijsku osnovu stabilnosti aterosklerotskog plaka [23, 24, 28, 31-33]. Takođe, određivanjem masnokiselinskog profila plazme, moguće je dobiti detaljniji uvid u njihovu raspodelu unutar TG, estara holesterola i slobodne frakcije, kao i nutritivni status organizma [34, 35]. Time se dobija potpunija biohemijska slika, koja omogućava bolju identifikaciju individualnih razlika u metabolizmu lipida, efikasniju prevenciju i protokole lečenja [29, 30].

## ***1.4. Homeostaza holesterola***

Uprkos brojnim istraživanjima, metabolizam holesterola, kao i njegova povezanost sa strukturom i sastavom lipoproteinskih čestica i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. U novijoj literaturi navodi se da je neophodno sagledati metabolizam holesterola kroz razmatranje svih relevantnih fizioloških procesa koji uključuju ovaj biomolekul [30, 36-38]. Metabolički putevi koji određuju količinu holesterola prisutnu u organizmu su procesi njegove sinteze i apsorpcije. Homeostaza holesterola predstavlja ravnotežu između ovih procesa [30, 36, 38]. Biosinteza i apsorpcija holesterola su regulisani mehanizmima negativne povratne sprege. Povećanje apsorpcije holesterola dovodi do suprimiranja sinteze i obrnuto [30, 36]. Smatra se da je serumska koncentracija holesterola odraz funkcionalnosti i međusobne uslovljenosti ovih procesa. U zavisnosti od kapaciteta i efikasnosti ovih procesa, kao i njihove međusobne povezanosti, prisutni su različiti obrasci sinteze i apsorpcije, odnosno različiti obrasci homeostaze holesterola [30].

Zahvaljujući savremenim hromatografskim tehnikama, identifikacijom i kvantifikacijom markera sinteze i apsorpcije holesterola, moguće je proceniti očuvanost njegove homeostaze. Dezmosterol i latosterol su intermedijeri u putevima sinteze holesterola, te se smatraju surogat-markerima efikasnosti procesa sinteze. Poznato je da se fitosteroli u enterocitima apsorbuju na isti način kao i holesterol. Upravo je ova činjenica omogućila korišćenje biljnih sterola (kampesterola, stigmasterola i  $\beta$ -sitosterola) kao surogat-markera efikasnosti apsorpcije holesterola. Jednim imenom markeri sinteze i apsorpcije holesterola označavaju se kao neholesterolski steroli (NHS) [30, 39]. Studija koja se bavila određivanjem cirkulišućih markera homeostaze holesterola, došla je do zaključka da u različitim fiziološkim i patološkim stanjima postoje različiti obrasci homeostaze holesterola [36]. Kod pacijenata sa KVB nivoi markera sinteze i apsorpcije su izmenjeni u poređenju sa zdravom populacijom, što ukazuje na poremećaj homeostaze holesterola koji je prisutan u ovoj patološkoj grupi. Smatra se da je ovaj disbalans u homeostazi jedan od činilaca koji uzrokuje dislipidemiju, progresiju ateroskleroze, te posledično razvoj kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti [30]. Takođe, primećeno je da poremećaji homeostaze holesterola doprinose razvoju gojaznosti, metaboličkog sindroma, dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti [38-43]. Nedavne studije sugerišu da ključ razumevanja homeostaze holesterola leži u sagledavanju efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije holesterola, sa posebnom pažnjom usmerenom ka njihovom balansu [43-45].

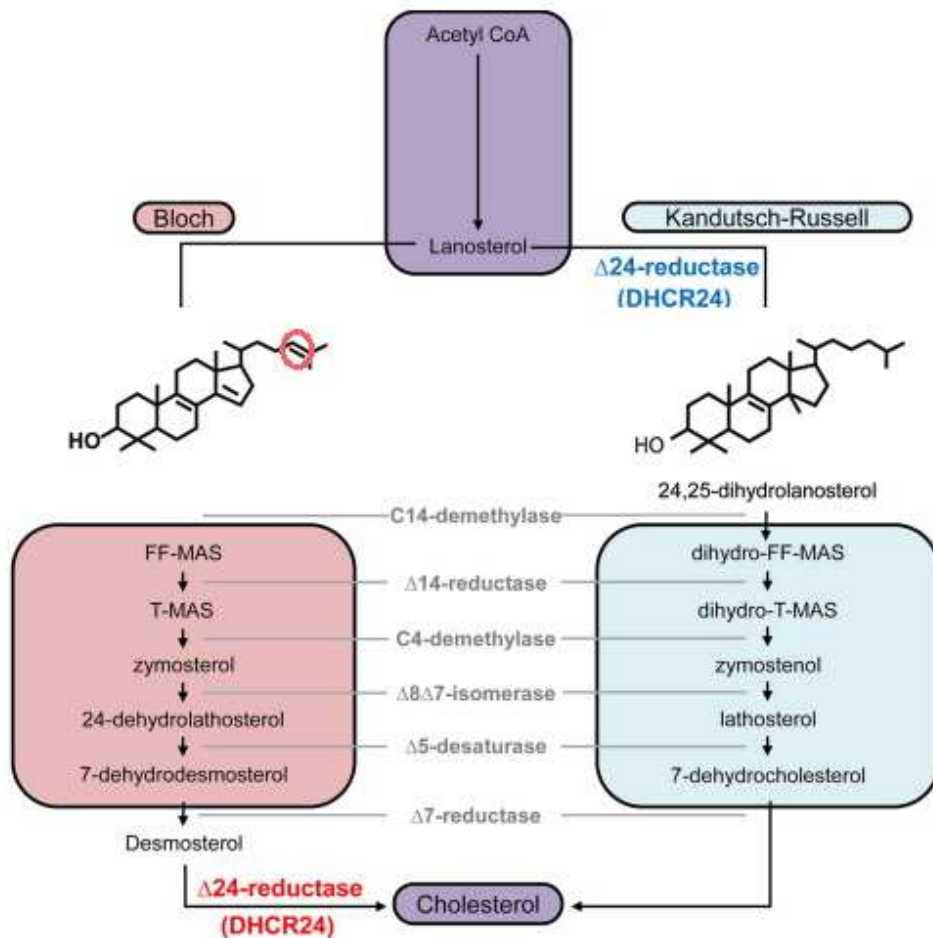
Različiti egzogeni faktori, kao što su način ishrane i upotreba lekova (hipolipemika), utiču na regulaciju homeostaze holesterola [30]. Biljni steroli kompetitivnim mehanizmima apsorpcije sa dijetarnim i biljnim holesterolom dovode do smanjenja njihove apsorpcije, te smanjenja koncentracije holesterola u krvi i održavanja homeostaze [30, 39]. Takođe, homeostaza holesterola se tokom terapije statinima ponovo uspostavlja smanjenjem procesa sinteze i povećanjem procesa apsorpcije. Međutim, nekoliko prospektivnih i interventnih studija je pokazalo da u grupi pacijenata sa IBS perzistira podgrupa kod koje se homeostaza holesterola ne uspostavlja tokom terapije statinima. Ti pacijenti su u toku terapije statinima doživeli neki kardiovaskularni događaj, ili iznenadnu srčanu smrt. Smatra se da je kod ovih pacijenata primarni poremećaj na nivou apsorpcije doveo do dinamičke disregulacije homeostaze [36, 46, 47]. Klinički, odgovor na terapiju statinima se posmatra kroz očekivano smanjenje LDL-h, koje je u ovoj podgrupi pacijenata neznatno. Nameće se pretpostavka da se kod ovih pacijenata suprimiranjem sinteze holesterola dodatno podstiče apsorpcija, što dovodi do perzistiranja hiperholesterolemije [36, 48]. Iako se prema ATP III kriterijumima u tretmanu dislipidemija, te za primarnu i sekundarnu prevenciju IBS, preporučuje uvođenje statina kao leka izbora [29], mnogi naučnici su mišljenja da je pre otpočinjanja terapije ključno odrediti markere sinteze i apsorpcije holesterola. Na ovaj način moguće je ustanoviti na kom nivou je došlo do poremećaja homeostaze i blagovremeno primeniti adekvatan tretman [36, 39, 46-48].

#### ***1.4.1. Sinteza holesterola***

Sinteza holesterola se odvija u gotovo svim humanim ćelijama, sa najvećim kapacitetom *de novo* sinteze u hepatocitima. Pored sinteze holesterola, uloga hepatocita se ogleda i kroz sintezu apolipoproteina, metabolizam lipoproteina i sintezu i ekskreciju žučnih kiselina, te se jetra smatra glavnim regulatorom homeostaze holesterola. Prekursor u sintezi holesterola je molekul acetil-koenzima A (acetil-KoA). Ukupno osamnaest acetil-KoA jedinica, koje sadrže 36 atoma ugljenika se koristi za sintezu jednog molekula holesterola. Holesterol se sastoji od planarnog tetracikličnog jezgra i fleksibilnog, izo-oktilnog bočnog lanca koji se nalazi na poziciji C17. Sinteza iz acetil-KoA prolazi kroz složenu seriju više od 30 enzimskih reakcija koje su grupisane u četiri glavna procesa: kondenzacija acetata u izopren, polimerizacija izoprena u skvalen, ciklizacija skvalena u lanosterol i poslednji niz reakcija koje prevode lanosterol u holesterol. Nakon sinteze

lanosterola, sinteza holesterola se dalje grana na dva, potpuno odvojena i najverovatnije različito kontrolisana sintetska puta (slika 4) [37, 49, 50]. Glavni sintetski put je *Kandutsch-Russel*-ov put, koji ide preko lanosterola i doprinosi u neto sintezi holesterola sa 80%. Ostalih 20% *de novo* sinteze odvija se u *Bloch*-ovom putu sinteze, preko dezmosterola kao prekursora [30, 37]. U zavisnosti od tkiva, doprinos ovih puteva u biosintezi holesterola je različit. U *Bloch*-ovom putu sinteze holesterola, poslednju reakciju katalizuje 24-dehidroholesterol reduktaza (DHCR24), pri čemu se iz dezmosterola sintetiše holesterol. Sintaza holesterola u ovom putu podrazumeva seriju intermedijera sa nezasićenim bočnim lancem u položaju 24. U *Kandutsch-Russel*-ovom putu dvostruka veza lanosterola u položaju C24 se redukuje u prvoj reakciji ovog sintetskog puta pomoću DHCR24. Prevođenje dihidrolanosterola u holesterol ide preko 7-dehidroholesterol, uz pomoć istih enzima kao u *Bloch*-ovom sintetskom putu. Bočni lanac intermedijera koji prolaze kroz ovaj sintetski put je zasićen (slika 4). Sintaza holesterola iz lanosterola prolazi kroz niz enzimski katalizovanih reakcija. Ove reakcije obuhvataju uklanjanje metil-grupa u položajima C4,  $\beta$ C4 i C14, što za posledicu ima sintezu molekula koji ima 27 C atoma, u odnosu na prekursor koji sadrži 30 C atoma. U toku procesa sinteze dolazi do izomerizacije  $\Delta$ 8 dvostruke veze na položaj  $\Delta$ 7, zatim redukcije dvostrukih veza u položajima  $\Delta$ 7,  $\Delta$ 14 i  $\Delta$ 24 i reakcije desaturacije koja uvodi dvostruku vezu u položaj  $\Delta$ 5 [51].

Strukturne karakteristike intermedijera uključenih u sintetske puteve holesterola, kao i enzimi koji katalizuju reakcije sinteze, dobro su ispitani, ali je još uvek nepoznata metabolička uloga i fiziološki značaj pojedinih intermedijera. Poznato je da intermedijeri dva puta pokazuju različite efekte na homeostazu holesterola i sintezu masnih kiselina [52]. Prekursori holesterola sa nezasićenom vezom u položaju C24, kao što su zimosterol i dezmosterol, ostvaruju snažan efekat delujući na transkripcioni faktor SREBP (*engl. sterol regulatory element binding protein*) i jetreni X receptor (*engl. Liver X receptor – LXR*) [52, 53].

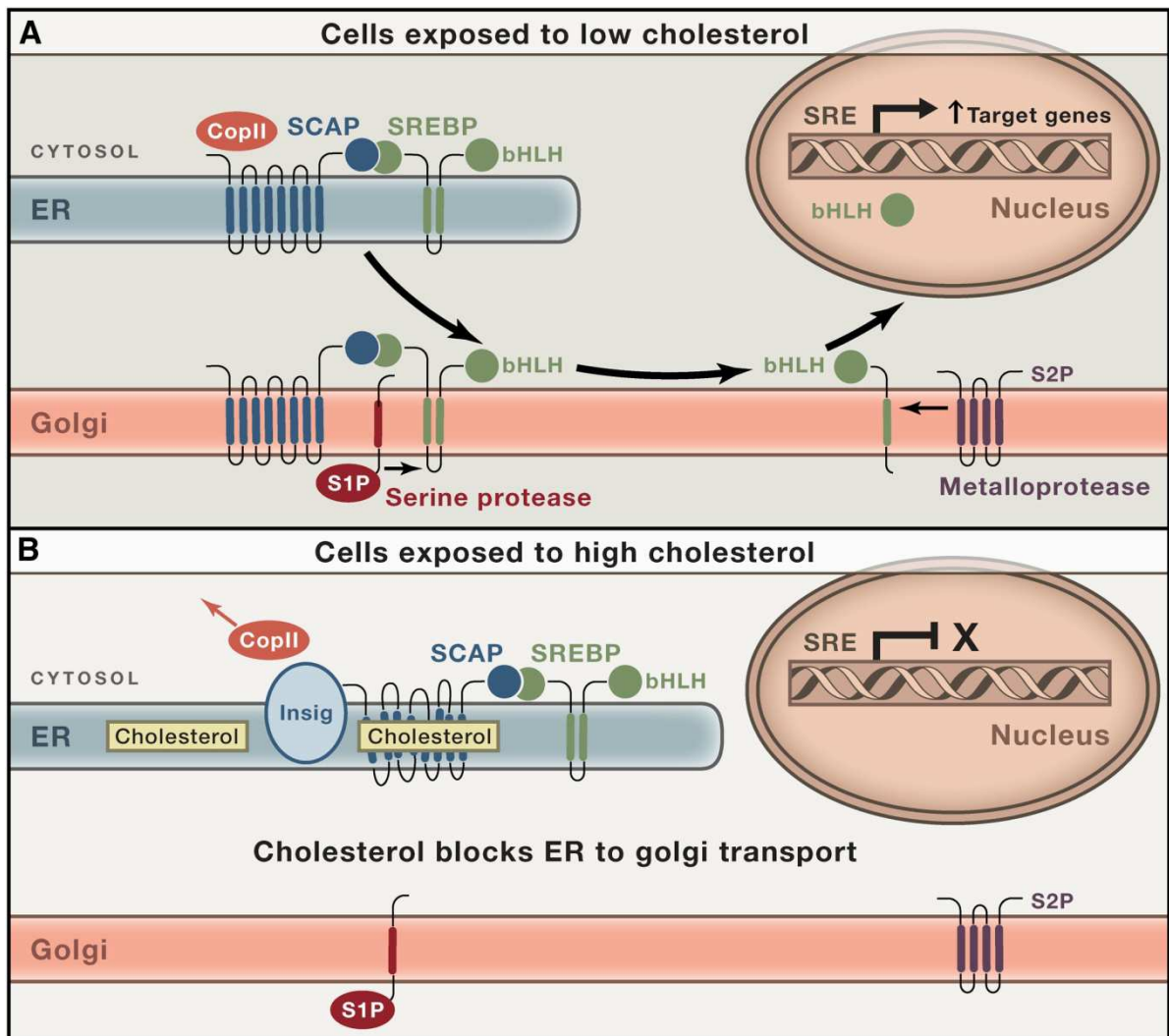


Slika 4. Šematski prikaz metaboličkih puteva sinteze holesterola. Preuzeto iz: *Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. Progress in lipid research. 2013;52:666-80. (FF-MAS - 14-demetil-14-dehidrolanosterol; T-MAS - 14-demeil-lanosterol).*

Iako je preko 30 enzima uključeno u sintezu holesterola, jedino je 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktaza enzim koji ograničava brzinu ovog procesa [30]. Nedavno je predloženo da je druga moguća kontrolna tačka u sintezi holesterola aktivnost skvalen epoksidaze, enzima koji katalizuje oksidaciju skvalena i prvu reakciju njegove ciklizacije [54].

Brzina sinteze holesterola je strogo regulisana i zavisi od nivoa holesterola u ćelijama. Mehanizmom povratne sprege kontroliše se aktivnost, ali i sinteza HMG-KoA reduktaze (slika 5). Brzinu sinteze mRNA za HMG-KoA reduktazu kontroliše transkripcioni faktor SREBP. SREBP se vezuje na 5'-kraju kratke sekvence gena koji

kodira HMG-KoA reduktazu, označene kao SRE (*engl. sterol regulatory element*). Kada je koncentracija holesterola u ćelijama niska SREBP se veže za SRE, nakon čega se ubrzava transkripcija gena. U neaktivnom obliku SREBP se nalazi kao integralni protein membrane endoplazmatičnog retikuluma (ER) gde je povezan sa Scap (*engl. SREBP cleavage activating protein*). Citosolni NH<sub>2</sub>-terminalni segment SREBP (relativne molekulska mase oko 60.000) sadrži heliks-petlja-heliks leucinski rajsferšlus, sekvencu pomoću koje se protein vezuje za DNK i aktivira transkripciju gena. Sledeći region je takozvani „ukosnica“ region (od 50 aminokiselina), koji sadrži dva heliksa, pomoću kojih je protein vezan za membranu ER. Na COOH-terminusu nalazi se regulatorni deo (relativne molekulske mase od oko 65.000) koja se projektuje u citosol. Scap vezan za SREBP predstavlja senzor za holesterol. Kada je u citoplazmi koja okružuje ER nivo holesterola veći od 5% ukupnog sadržaja lipida, kompleks SREBP-Scap ostaje vezan za membranu ER. Smanjenje nivoa holesterola ispod kritičnih 5%, dovodi do transporta kompleksa SREBP-Scap do Goldžijevog aparata gde se delovanjem dve proteaze oslobađa SREBP. Zatim dolazi do translokacije SREBP u nukleus, gde se vezuje za SRE gena za HMG-KoA reduktazu, ali i za neke druge gene koji sudeluju u biosintezi holesterola [55]. Goldstein i Brown su pokazali da se na isti način reguliše sinteza i količina prisutnih LDL receptora na plazma-membrani ćelije [55]. Na ovaj način, mehanizmom negativne povratne sprege, reguliše se biosinteza holesterola.



Slika 5. Mehanizam regulacije sinteze holesterola pomoću SREBP-Scap puta; A – Mehanizam u prisustvu niske koncentracije holesterola; B – Mehanizam u prisustvu visoke koncentracije holesterola. Preuzeto iz: *Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. Cell. 2015;161:161-72.*

Premda se smatralo da jetra predstavlja glavni izvor holesterola u krvi, utvrđeno je da tanko crevo predstavlja značajan izvor holesterola kroz procese enterohepatične cirkulacije, apsorpcije i *de novo* sinteze holesterola u enterocitima [56].

### 1.4.2. Apsorpcija holesterola

Holesterol prisutan u lumenu tankog creva potiče iz nekoliko izvora, uključujući holesterol dijetarnog porekla, zatim poreklom iz žuči i holesterol oslobođen deskvamacijom epitelnih ćelija. Pri tzv. “zapadnom” tipu ishrane koji je uobičajen i na

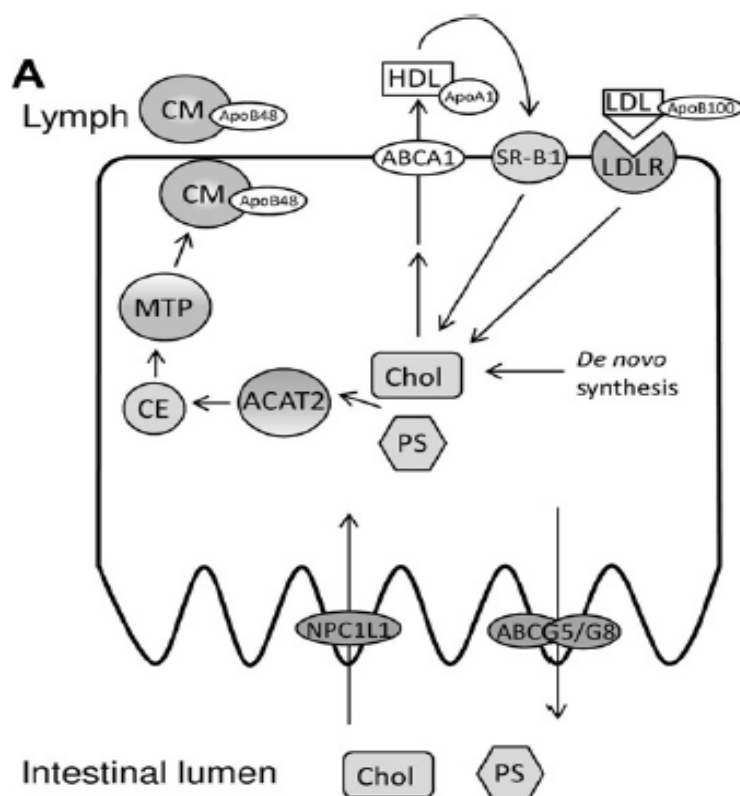


našim prostorima, dnevno putem hrane se unese od 300-500 mg holesterola, dok je dnevni doprinos bilijarnog holesterola negde oko 800-1200 mg [30]. Kod zdravih osoba, oko 50% holesterola prisutnog u crevu se apsorbira [44, 48, 57]. Holesterol je amfipatičan molekul sa hidrofobnim steroidnim jezgrom i polarnom hidroksilnom grupom. Njegova intestinalna apsorpcija zahteva emulgovanje, hidrolizu estara, zatim micelarnu solubilizaciju i na kraju preuzimanje od strane enterocita. Dalje, u enterocitima dolazi do delimične reesterifikacije holesterola i konačno njegove isporuke u limfu ili cirkulaciju putem hilomikrona i HDL čestica. Micelarna solubilizacija holesterola je važna za adekvatnu apsorpciju. Holesterol bilijarnog porekla je slobodan, neesterifikovan, dok je holesterol poreklom iz namirnica delimično esterifikovan. Zbog toga je za normalan transport esterifikovanog holesterola kroz apikalnu membranu enterocita neophodna hidroliza estara pomoću enzima holesterol esteraze. Mnogi naučnici smatraju da delovanje holesterol esteraze na estere holesterola nije kritični korak u samoj apsorpciji holesterola, imajući u vidu da su količine esterifikovanog holesterola prisutnog u lumenu creva znatno manje od količine slobodnog holesterola. Sa druge strane, kritična uloga fosfolipaza se ogleda u hidrolizi fosfolipida, naročito fosfatidilholina, što je neophodno za formiranje micela odgovarajuće veličine [30, 58]. Takođe, primećeno je da enterociti mogu da preuzmu endocitozom pankreasnu lipazu, te da je ona u citoplazmi enterocita odgovorna za usmeravanje holesterola ka daljem pakovanju u lipoproteinske čestice, ili njegovom efluksu kroz apikalnu membranu i ponovnom vraćanju u lumen tankog creva [30, 59]. Kao relevantno, nameće se pitanje razlike u stepenu apsorpcije holesterola poreklom iz žuči i holesterola poreklom iz namirnica, budući da je micelarizovani bilijarni holesterol odmah dostupan za enterohepatičnu cirkulaciju. Sa druge strane, da bi holesterol i fitosteroli iz namirnica postali dostupni za apsorpciju, treba da se oslobode iz biljnih ulja ili ćelijskih membrana, a zatim i iz estara sa masnim kiselinama [60]. Studije koje su koristile izotopski obeležen esterifikovan holesterol, pokazale su da jedino dramatično povećanje unosa namirnica bogatih estrima holesterola može dovesti do smanjene apsorpcije dijetarnog holesterola. Pri uslovima normalne ishrane, nivoi apsorpcije bilijarnog i dijetarnog holesterola su gotovo identični [58, 61, 62]. Ova činjenica je veoma važna zbog sveopšte prihvaćenog načina opisivanja brzine i efikasnosti apsorpcije holesterola, merenjem dijetarnih fitosterola u plazmi.

Nakon micelarne solubilizacije, preuzimanje holesterola i biljnih sterola od strane enterocita omogućeno je *Niemann-Pick C1 Like 1* (NPC1L1) transporterom koji se nalazi na membrani četkastog pokrova enterocita (slika 6). Karakteristično je da se NPC1L1

transporter nalazi na enterocitima proksimalnog dela tankog creva, ali ne i na enterocitima distalnog dela [30]. U studijama koje su sprovedeli Altmann i Davis, *knockout* miševi za NPC1L1 gen su pokazali smanjenje u apsorpciji holesterola za 70-90% u poređenju sa kontrolnom grupom miševa [63, 64]. Pored toga, primećeno je da kod ovih miševa dolazi do ušodne regulacije u sintetskim putevima holesterola, te pojačane ekspresije gena za HMG-KoA reduktazu u hepatocitima i enterocitima [65]. Studije u kojima su predloženi alternativni kandidati koji učestvuju u apsorpciji holesterola, kao što su receptor hvatač klase B tip 1 (*engl. Scavenger receptor class B type 1 – SR-B1*), klaster diferencijacije 36 (*eng. cluster of differentiation 36 – CD36*) i kaveolin-1, pokazale su da ovi receptori nemaju značajan uticaj na kontrolu i brzinu apsorpcije holesterola i biljnih sterola i stanola [66-70]. Ovim je nedvosmisleno pokazano da glavni put apsorpcije holesterola vodi preko NPC1L1 transportera.

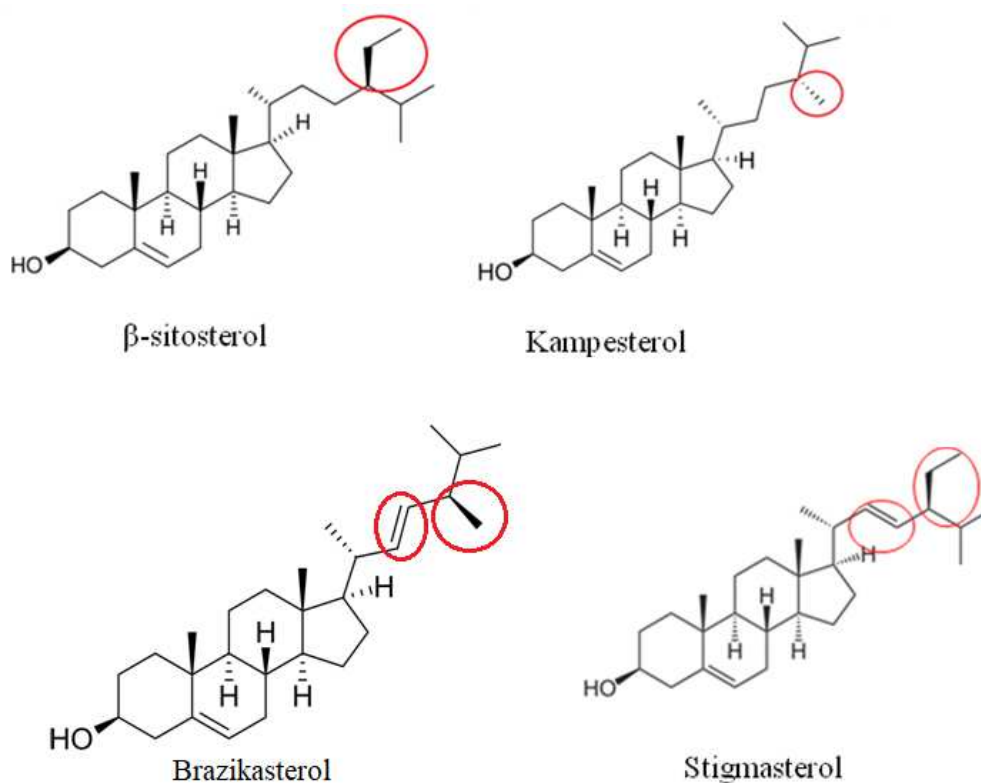
U proksimalnom delu tankog creva (i apikalnoj membrani hepatocita), uz NPC1L1 su kolokalizovani ATP-vezujući kasetni transporteri (*engl. ATP binding cassette transporter – ABC*) G5/G8 (ABCG5 i ABCG8) (slika 6). Upravo su ovi transporteri odgovorni za recirkulaciju holesterola između lumena tankog creva i citoplazme enterocita. Oni omogućavaju efluks slobodnog holesterola i biljnih sterola nazad u lumen tankog creva. Pored toga, slobodan holesterol može da se transportuje do bazolateralne membrane enterocita i da se pomoću ATP-vezujućeg kasetnog transportera A1 (*engl. ATP binding cassette transporterA1 – ABCA1*) prebaci na apoA-I, glavni apolipoprotein HDL čestice [71]. Intracelularni holesterol koji se nije uključio u jedan od ova dva procesa, putuje do ER gde dolazi do njegove esterifikacije pomoću acil-KoA: holesterol aciltransferaze 2 (*engl. acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 – ACAT2*). Esterifikovani holesterol se integriše u hilomikrone zajedno sa TG, fosfolipidima i apolipoproteinom B-48 (apoB-48) i transportuje do limfe. Formiranje hilomikrona predstavlja dominantan put transporta intracelularno prisutnog holesterola, odnosno njegovih estara [30, 39, 44]. Celokupan proces apsorpcije holesterola šematski je prikazan na slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz procesa apsorpcije holesterola u proksimalnom delu tankog creva. Preuzeto iz: van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;368:1-6. (ABCA1 – ATP-vezujući kasetni transporter A1, ABCG5/G8 – ATP-vezujući kasetni transporter G5/G8, ACAT2 – acilKoA: holesterol aciltransferaza 2, CM – hilomikroni, LDLR – LDL receptor, MTP - mikrozomalni transferni protein triglicerida, NPC1L1 – Niemann-Pick C1 like receptor 1, SR-B1 – receptor hvatač klase B tip 1, CE – holesterol estar, PS – fitosteroli i stanoli).

#### 1.4.2.1. Fitosteroli i njihova apsorpcija

Pored holesterola, tipični "zapadni" način ishrane sadrži i fitosterole koji su strukturno slični holesterolu i koji su u namirnicama zastupljeni u gotovo istoj količini kao i holesterol [48]. U fitosterole spadaju steroli i stanoli, a njihov odnos u namirnicama biljnog porekla iznosi 95:5 u korist sterola [30]. Glavni dijetarni fitosteroli su brazikasterol, kampesterol,  $\beta$ -sitosterol i stigmasterol. Na slici 7 su prikazane njihove strukturne formule sa obeleženim strukturnim razlikama u odnosu na molekul holesterola.



Slika 7. Formule markera apsorpcije sa obeleženim strukturnim razlikama u odnosu na molekul holesterola.

Fitosteroli se apsorbuju na isti način kao i holesterol, pomoću NPC1L1 transportera. Step en apsorpcije biljnih sterola je značajno manji u odnosu na holesterol, te se njihove koncentracije kreću u procentualnom udelu od 0,4-3,5% biljnih sterola, odnosno 0,02-0,3% biljnih stanola u odnosu na koncentraciju holesterola [48, 72]. Ap sorpcija različitih biljnih sterola i stanola varira u zavisnosti od dužine njihovog bočnog lanca [30]. Iako u potpunosti nije razjašnjeno na koji način fitosteroli smanjuju koncentraciju cirkulišućeg holesterola, smatra se da inhibitorni efekat ostvaruju kompetitivnim mehanizmom, takmičeći se sa holesterolom za isti transporter na apikalnoj membrani enterocita [48]. Međutim, novije studije navode da je za uticaj fitosterola na smanjenu apsorpciju holesterola ključno njihovo prisustvo u micelama. Naime, kapacitet solubilizacije sterola u micelama je ograničen, te tako prisutni biljni steroli u micelama smanjuju solubilizaciju holesterola [58]. Uloga ABCG5/G8 u efikasnosti efluksa biljnih sterola i stanola donekle je razjašnjena. *In vitro* studije su pokazale uporedivu efikasnost efluksa biljnih sterola i holesterola preko ABCG5/G8 [73]. Međutim, kod *knockout* miševa za ABCG5/G8 primećeno je da dolazi do pojačane apsorpcije biljnih sterola i stanola, ali ne i holesterola, te posledično do razvoja sitosterolemije. U humano j populaciji

sitosterolemija se javlja ukoliko postoji mutacija ABCG5/G8 gena na oba alela, dok su koncentracije biljnih sterola u plazmi kod heterozigota u granicama normale [48]. Dakle, ABCG5/G8 većim kapacitetom vrši efluks biljnih sterola i stanola u odnosu na holesterol. Za razliku od holesterola, biljni steroli i stanoli su lošiji supstrati za ACAT2, što je izgleda ograničavajući faktor za njihovo pakovanje u lipoproteinske čestice [30, 39, 45, 48].

Steroli su najviše zastupljeni u namirnicama kao što su orašasti plodovi, žitarice celog zrna, brokoli, karfiol, kikiriki, avokado i nerafinisana biljna ulja (maslinovo, kukuruzno, ulje uljane repice i sojino) [74, 75]. Sa druge strane, dokazano je da je njihova apsorpcija proporcionalna apsorpciji holesterola, tako da njihove koncentracije u plazmi govore o nivou i efikasnosti apsorpcije holesterola [30, 36, 43-48]. Zbog povoljnog uticaja biljnih sterola na nivo holesterola u organizmu, danas se vrši fortifikacija namirnica kao što su margarini, jogurt, sokovi itd [75].

Celokupna količina fitosterola u organizmu potiče isključivo iz hrane. Ipak, male promene u ishrani nemaju značajan uticaj na njihov nivo u plazmi, pa je tako potrebno 100 puta povećati unos fitosterola da bi se plazmatska koncentracija  $\beta$ -sitosterola povećala dva puta [47, 48, 76].

### ***1.4.3. Uticaj lekova na homeostazu holesterola***

Do sada je objašnjeno više mehanizama pomoću kojih biljni steroli snižavaju koncentraciju holesterola u plazmi, a korist od njihove primene se ogleda u prevenciji nastanka i razvoja dislipidemije. U lečenju dislipidemija i prevenciji KVB danas se primenjuju dve velike grupe lekova, statini (inhibitori HMG-KoA reduktaze) i ezetimib i njegovi analozi (inhibitori apsorpcije holesterola). Prema ESC/EAS preporukama, statini predstavljaju lek izbora, a ciljevi terapije za smanjenje nivoa LDL-h su prikazani u tabeli 1 [77].

Tabela 1. Ciljne koncentracije LDL-h za tri grupe rizika. Preuzeto iz: *Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. Eur Heart J. 2016;37:2999-3058.*

<i>Nivo rizika</i>	<i>Ciljevi u nivoima LDL-h</i>
<i>KVB i ekvivalenti KVB</i>	<2,58 mmol/L (100 mg/L)
<i>Višestruki faktori rizika (2 i više faktora)</i>	<3,36 mmol/L (130 mg/L)
<i>0-1 faktor rizika</i>	<4,12 mmol/L (160 mg/L)

Nedvosmisleno je dokazano da statini smanjuju nivo holesterola u plazmi za 30 do 50% što je povezano sa smanjenom incidencom KVB [30, 46, 47, 76, 78]. Najpoznatija sponzorirana studija koja je pratila efekat simvastatina na osnovne parametre lipidnog statusa bila je *Scandinavian Simvastatin Survival Study* (4S studija). U studiji je učestvovalo 4444 pacijenata sa anginom pektorisa i/ili preležanim infarktomiokarda, te vrednostima UH između 5,5-8 mmol/L. Nakon 5,4 godina primene simvastatina, koncentracije UH su se smanjile za 25%, LDL-h za 35%, dok su se vrednosti HDL-h povećale za 8%, a stopa preživljavanja u odnosu na placebo bila je značajno veća [46]. Uspeh ove studije omogućio je široku upotrebu statina [30, 45]. Kasnije, mnoge studije su potvrdile ove rezultate, ali i pomak ka boljim efektima terapije u vidu porasta nivoa HDL-h i sniženja koncentracije TG u kombinaciji sa nijacinom i antioksidansima [76]. *PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk* – PROSPER studija je pokazala uticaj pravastatina na markere sinteze i apsorpcije holesterola [47]. U ovu studiju bili su uključeni pacijenti sa visokim rizikom za KVB koji su činili kontrolnu grupu i pacijenti koji su preživeli neki kardiovaskularni događaj. Rezultati studije su pokazali da tokom terapije statinima u trajanju od 6 meseci, dolazi do značajnog smanjenja vrednosti markera sinteze i povećanja koncentracija markera apsorpcije holesterola. Na ovaj način dolazi do uspostavljanja homeostaze holesterola koja je bila narušena. Povećanje apsorpcije do kojeg dolazi tokom terapije statinima je blago i nikada ne dostiže nivoe kojima bi se vrednosti holesterola vratile na one pre terapije. Međutim, obrasci odgovora na terapiju bili su slični u obe grupe pacijenata, te nije bilo moguće objasniti razlike u ishodima i pojavu kardiovaskularnih događaja u jednoj grupi ispitanika [47]. Rezultati studije koju su sprovedli Gylling i Miettinen ukazali su na postojanje različitih obrazaca homeostaze

holesterola, te na podgrupu pacijenata koja ne odgovara adekvatno na terapiju statinima [45]. U ovoj studiji je primećeno da pacijenti koji pre početka tretmana imaju više vrednosti markera apsorpcije lošije odgovaraju na terapiju statinima. Interesantno je da su ovi pacijenti pokazali bolji odgovor na terapiju statinima ukoliko su uz terapiju svakodnevno konzumirali margarin fortifikovan fitosterolima. Ova studija pokrenula je niz daljih istraživanja, koja su za cilj imala šire razumevanje obrazaca homeostaze holesterola. Danas se zna da je klinički odgovor na terapiju statinima veoma varijabilan i procenjuje se da trećina lečenih pacijenata ne ostvaruje adekvatne ciljeve terapije [79]. Nejasno je da li ovi pacijenti iz genetičkih razloga ne mogu adekvatno da odgovore na terapiju statinima, ili jednostavno zato što uzrok dislipidemije ne leži u povećanoj sintezi, već u povećanoj apsorpciji holesterola [79]. Rezultati studije Trompeta i saradnika [79], koja je ispitivala moguće uzroke individualnih odgovora na terapiju statinima, pokazali su da na tretman lošije odgovara podgrupa mlađih osoba, pušača, koji konzumiraju alkohol, koja je imala malu prevalencu hipertenzije i niže vrednosti holesterola. Ova studija je potvrdila rezultate prethodnih studija o multifaktorijalnosti koja se nalazi u osnovi ateroskleroze, te da pored dislipidemije, ostali etiološki faktori i njihov sinergizam takođe mogu da dovedu do nastanka aterosklerotskih promena [79]. Takođe, treba napomenuti da statini pored hipolipemijskog efekta, pokazuju i niz plejotropnih dejstava, među kojima se izdvajaju inhibicija inflamacije, povećanje stabilnosti plaka i antioksidativna svojstva [80].

Specifična inhibicija apsorpcije holesterola, bilo bilijarnog ili dijetarnog porekla, postiže se nakon vezivanja ezetimiba za NPC1L1 transporter [81]. NPC1L1 je takođe prisutan i na humanim hepatocitima. S obzirom na kritičnu ulogu NPC1L1 u intestinalnoj apsorpciji holesterola, pretpostavlja se da hepatični NPC1L1 sprečava preveliki gubitak holesterola preko ABCG5/G8 transportera koji su takođe prisutni na hepatocitima. Studije su dokazale da kod ljudi hepatični NPC1L1 nema značajnu ulogu u preuzimanju bilijarnog holesterola, inače bi se kao neželjeno dejstvo ezetimiba javljali bilijarni kalkulusi. Ovo neželjeno dejstvo do sada nikad nije prijavljeno [82, 83]. Kod ljudi, ezetimib smanjuje apsorpciju holesterola za 54% i nivo LDL-h za 19% [30]. Smatra se da jedino kombinovani tretman sa statinima može biti veoma efikasan [84]. Međutim, studije koje su ispitivale aditivne i/ili sinergističke efekte kombinovane terapije zaključile su da se ezetimib može preporučiti kod bolesnika koji pokazuju netoleranciju na statine ili kod kojih je terapija statinima neadekvatna, zbog osnovnog poremećaja na nivou apsorpcije [85-88]. I pored različitih farmakoloških mogućnosti, smatra se da je mogućnost procene

odgovora na terapiju hipolipemicima, te pravilan odabir adekvatne terapije, jedino moguće ukoliko se pre tretmana odrede koncentracije NHS u plazmi [36, 47].

#### ***1.4.4. Metode za određivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola***

Uprkos priznatom kliničkom i dijagnostičkom potencijalu NHS, za njihovu analizu nedostaju standardizovani postupci pripreme uzoraka, validirane metode i harmonizacija postupaka i načina kvantifikacije, kako bi se obezbedili precizni i tačni rezultati. Koncentracije NHS u plazmi su 200-1000 puta niže u poređenju sa nivoima holesterola [89, 90], te samo dovoljno osetljive, savremene hromatografske tehnike mogu da obezbede njihovu pouzdanu kvantifikaciju. Metode koje su u upotrebi za kvantifikaciju NHS su izotopska diluciona masena spektrometrija (*engl. Isotopic dilution mass spectrometry - IDMS*), elektrohemijske i hromatografske metode kao što su gasna hromatografija (*engl. Gas chromatography – GC*), tečna hromatografija (*engl. Liquid chromatography – LC*) i tečna hromatografija visokih performansi (*engl. High-performance liquid chromatography – HPLC*). GC je ekonomičnija u odnosu na HPLC, jer nema utroška velikih zapremina skupih organskih rastvarača HPLC čistoće, a može biti i efikasnija kada su analizirana jedinjenja termostabilna i lako isparljiva. Separacija sterola GC tehnikom je brža i efikasnija od LC metode i ujedno predstavlja jedinu validiranu metodu za kvantifikaciju NHS. Plameno-jonizacioni detektor (*engl. flame ionization detection – FID*) ima širok linearni dinamički opseg, odličnu stabilnost i ne zahteva veliko iskustvo analitičara. GC-FID je pouzdana u oblasti koncentracija iznad limita detekcije za analizu markera sinteze i apsorpcije holesterola u bromatološkim ispitivanjima namirnica, ali i u medicinskim i farmakološkim studijama. GC-FID je metoda izbora za identifikaciju i kvantifikaciju NHS u kliničkoj praksi [89-91]. Adekvatno razdvajanje pikova NHS u hromatografskom sistemu zahteva korišćenje multilinearog programiranja temperature, jer je dokazano da se primenom izotermalnih uslova ne postiže zadovoljavajuće razdvajanje pikova ispitivanih komponenti [36]. GC-FID i GC sa masenom spektrometrijom (*engl. gas chromatography-mass spectrometry – GC-MS*) predstavljaju izazove u separaciji i kvantifikaciji NHS, jer, kako navode autori više studija, pored pravilnog odabira uzoraka, važan je i način skladištenja i pripreme uzoraka, te postavljanje adekvatnih hromatografskih uslova za separaciju pikova od interesa [89, 90, 92].

U protekloj deceniji, primećen je pozitivan trend u smanjenju laboratorijskih grešaka vezana za metode određivanja, ali preanalitička faza i dalje predstavlja kritično



područje koje najčešće dovodi do izdavanja pogrešnih rezultata. O preanalitičkim greškama u oblasti kvantifikacije NHS, prema našim najboljim saznanjima, gotovo i da nema publikovanih studija. S obzirom na sličnost hemijske strukture holesterola sa strukturama NHS, a time i sa njihovim hemijskim osobinama, priprema uzorka je značajan faktor uticaja na efikasnost razdvajanja ovih komponenti [93]. Priprema uzoraka za određivanje NHS je zametna i zahteva više koraka. Uz saponifikaciju i ekstrakciju, mnogi autori navode potrebu za derivatizacijom, dok drugi pokušavaju da izbegnu ovu proceduru zbog njene složenosti, ali i potrebe za optimizacijom postupka shodno uslovima u laboratoriji [89, 93]. Konvencionalna priprema uzoraka podrazumeva tečno-tečnu ekstrakciju (*engl. liquid-liquid extraction* – LLE) sterola iz biološkog materijala. U poslednje dve decenije sve se više koristi čvrsto-tečna ekstrakcija (*engl. solid-phase extraction* – SPE) zbog većeg prinosa ekstrakcije, manjeg utroška organskih rastvarača i mogućnosti automatizacije. U upotrebi su i ekstrakcija superkritičnim fluidima (*engl. supercritical fluid extraction* – SFE) kao i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (*engl. solid-phase microextraction* – SPME). Prednost SPME je ušteda rastvarača, ali je problem ograničen kapacitet i selektivnost ekstrakcije sterola iz biološkog materijala. Savremene tehnike koje bi se mogle koristiti za efikasnu pripremu uzoraka uključuju molekulske obeležene polimere (*engl. molecularly imprinted polymers* – MIPs), magnetne polimerne kuglice (*engl. magnetic polymer beads*) i njihovu kombinaciju – magnetne MIP kuglice (mag-MIP). Pored toga što mogu biti pakovani u diskove ili špriceve kao za SPE, MIP se mogu pakovati i u klasične hromatografske kolone, tako da se uzorci mogu direktno injektovati u hromatografski sistem [90]. Uprkos brojnim novim tehnikama za ekstrakciju sterola, LLE i dalje ostaje dominantan način za pripremu uzoraka u kliničkoj praksi zahvaljujući svojoj jednostavnosti i ekonomičnosti.

Generalno, postupak derivatizacije se najčešće koristi prilikom upotrebe GC-FID metoda. U nekim slučajevima, derivatizacija je neophodna prilikom korišćenja LC-MS tehnika, dok HPLC metode ne zahtevaju postupak derivatizacije [90]. U slučaju sterola, prisustvo aktivnog vodonikovog atoma u hidroksilnoj grupi na položaju C3, omogućava da se za njihovu derivatizaciju koriste reakcije acetilovanja ili silanizacije [91]. U savremenoj literaturi navodi se korišćenje trimetilsilil reagenasa za derivatizaciju, dok je anhidrid sirćetne kiseline alternativni reagens. Najčešće korišćeni reagensi su N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA) i heksametildisilazan u kombinaciji sa trimetilhlorosilanom (TMCS) koji služi kao katalizator [94].

Priprema uzoraka sa derivatizacijom je vremenski zahtevnija i komplikovanija za izvođenje od same LLE, jer reagensi za silanizaciju u kontaktu sa vodom mogu lako da proizvedu silanol i tako smanje prinos derivatizacije sterola. Zato je neophodno ukloniti ostatke vode posle LLE sušenjem ekstrakta u struji azota i izbegavati rad u uslovima povećane vlažnosti [36, 89]. S druge strane, derivatizacija donosi brojne pogodnosti za rutinsku analizu ispitivanih markera i njome se prevazilaze prethodno navedeni nedostaci. Derivatizacijom se steroli prevode u stabilna, manje polarna i isparljivija jedinjenja, čime se postižu pravilniji oblici pikova od interesa na dobijenim hromatogramima, bolja rezolucija i osetljivost [90]. Ovaj dodatni korak u pripremi uzoraka daje mogućnost pouzdane identifikacije i kvantifikacije pikova analiziranih markera. Takođe, za pripremu uzoraka sa derivatizacijom koriste se male zapremine uzoraka, čak 10 puta manje od onih potrebnih za pripremu bez derivatizacije. Utrošak malih zapremina biološkog materijala ovaj proces čini naročito pogodnim za analizu markera sinteze i apsorpcije holesterola kod osetljivih populacija kao što su trudnice i deca [89].

Nedavna studija Mackaya i saradnika pokazala je da temperatura i sadržaj vlage prisutan u atmosferi prilikom pripreme uzoraka, utiču na kvantifikaciju NHS [89]. Međutim, mali broj studija se bavio ispitivanjem atmosferskih laboratorijskih uslova na kvantifikaciju NHS, što može biti značajan preanalitički faktor uticaja. Plastična laboratorijska oprema i potrošni materijal se danas široko koriste u rutinskom laboratorijskom radu. Poznato je da u kontaktu sa različitim supstancama može doći do razlaganja plastičnih materija i otpuštanja sadržaja koji može da ometa dalju analizu i kvantifikaciju [95, 96]. I pored zabrinutosti zbog velike upotrebe plastičnog laboratorijskog materijala, naročito prilikom korišćenja organskih rastvarača u postupcima ekstrakcije i derivatizacije, malo je literaturnih podataka koji ukazuju na konkretne uzroke i posledice.

Steroidne strukture NHS su podložne oksidativnim modifikacijama, pa je dugotrajna priprema uzoraka poseban problem. Proces oksidacije mogu da potenciraju metalni joni iz različitog laboratorijskog posuđa (npr. metalni zatvarači za epruvete), te njihovo korišćenje treba izbegavati [97, 98]. Tokom primene savremenih analitičkih tehnika kao što su hromatografske tehnike sa visokoosetljivom detekcijom, svaka strukturna promena analita može uticati na kvantifikaciju.

Veliki broj različitih mogućnosti u pripremi uzoraka, različite separacione tehnike i uslovi razdvajanja, te nepostojanje referentne metode za određivanje NHS, ostavljaju analitičarima mogućnost izbora i prilagođavanja metodologije rada uslovima sopstvene laboratorije. Međutim, sve ovo može dovesti do grešaka prilikom kvantifikacije analita od

interesa, te se proces validacije postavljene metode nameće kao neophodan. Takođe, ne treba zanemariti ni veliki broj preanalitičkih faktora uticaja, koji se javljaju u savremenim laboratorijama, te sve ovo zahteva ozbiljan pristup prilikom uzorkovanja, skladištenja i pripreme biološkog materijala. Metoda koja bi se koristila za simultanu analizu markera sinteze i apsorpcije holesterola u kliničkoj praksi morala bi da omogući brzu pripremu uzorka, adekvatnu separaciju analita u kombinaciji sa pouzdanom identifikacijom i kvantifikacijom odgovarajućih markera [90]. Validacijom metode ne možemo predvideti sve preanalitičke i analitičke probleme koji se mogu javiti, ali njeni postupci mogu da nam ukažu na one najčešće. Validacijom analitičke metode se osiguravaju tačni, precizni i reproducibilni rezultati tokom dužeg vremena korišćenja metode.

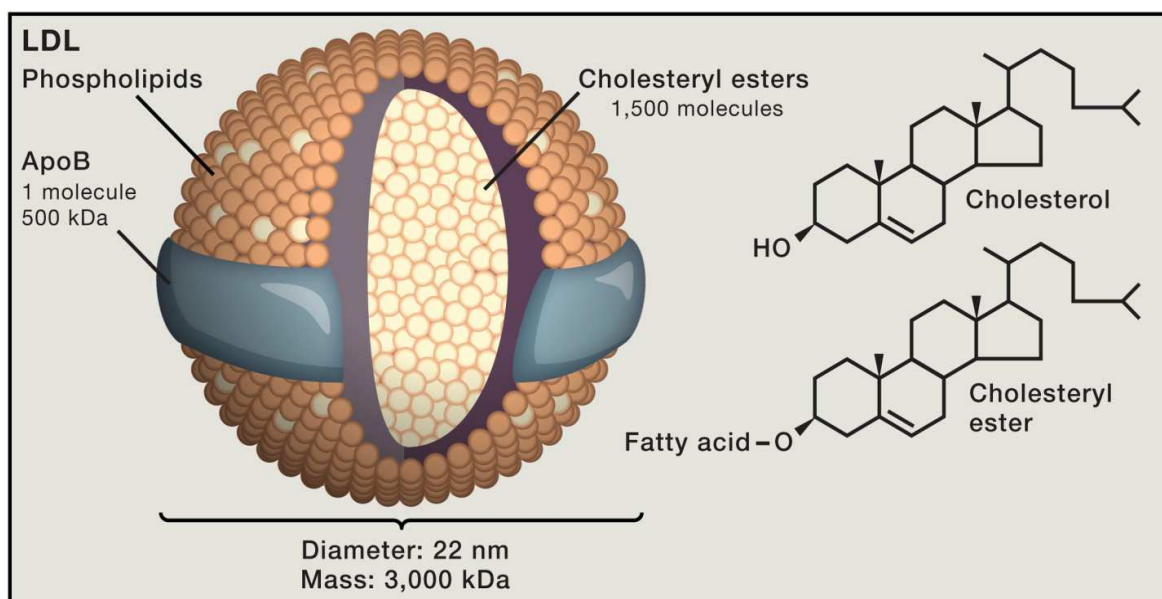
## ***1.5. Transport holesterola kroz cirkulaciju – lipoproteinske čestice***

Za potpuno sagledavanje homeostaze holesterola, neophodno je razumeti njegovu distribuciju između lipoproteina, ali i heterogenost u pogledu sastava i veličine ovih čestica. LDL i HDL čestice, pored holesterola transportuju i NHS, ali je njihova međusobna povezanost još uvek nedovoljno istražena. Nije poznat uzajamni odnos obrazaca homeostaze holesterola procenjenih na osnovu koncentracije NHS i distribucije lipoproteinskih čestica, posebno LDL čestica, kao obeležja povećanog rizika za KVB.

### ***1.5.1. LDL čestice***

LDL čestica nastaje kao proizvod katabolizma lipoproteina veoma niske gustine (*engl. Very-low-density lipoprotein – VLDL*) i nosilac je 60-70% ukupnog holesterola u organizmu. LDL populacija u cirkulaciji predstavlja heterogenu smešu čestica, koje se prvenstveno razlikuju po veličini i gustini. Gustinu, odnosno veličinu ovih čestica određuje odnos lipida i proteina, kao i sam sastav lipida [29]. Studije su pokazale da je istovremeno prisutno više LDL subfrakcija kod svake individue, te da njihov odnos varira pod uticajem genetskih, ali i mnogobrojnih faktora sredine [99, 100]. Savremenim elektroforetskim tehnikama, metodama ultracentrifugiranja na gradijentu gustine, kao i metodama nuklearno-magnetno-rezonantne spektroskopije (NMR) danas je moguće izolovati do sedam LDL subfrakcija (LDL I, LDL IIa, LDL IIb, LDL IIIa, LDL IIIb, LDL IVa i LDL IVb). Kako su LDL čestice sfernog oblika, njihova veličina se izražava kao prečnik sfere i kreće se između 22 do 29 nm. Prihvaćeno je da se velikim česticama smatraju one sa

prečnikom  $> 25,5$  nm, odnosno malim one sa prečnikom  $\leq 25,5$  nm [99]. Na slici 8 prikazana je struktura i sastav LDL čestice.

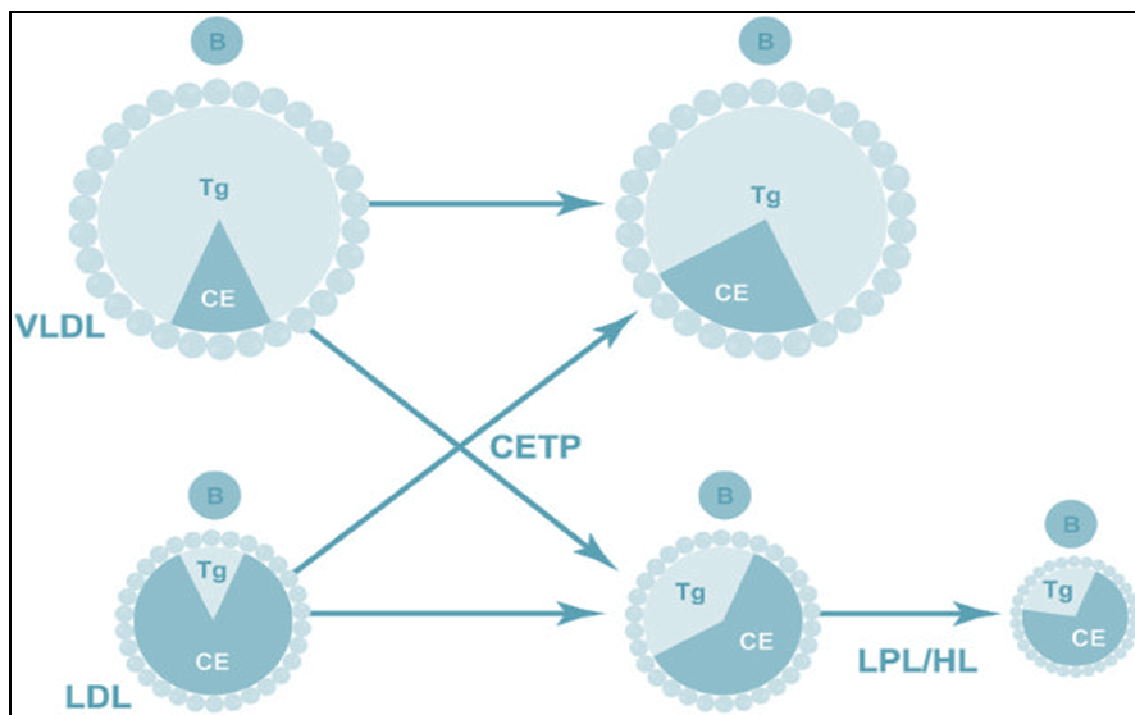


Slika 8. Struktura i sastav LDL lipoproteinske čestice. Preuzeto iz: *Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. Cell. 2015;161:161-72.*

Kao što je prikazano na slici 8, jezgro LDL čestice uglavnom čini esterifikovani holesterol i manjim delom TG, dok površinski omotač čine slobodan holesterol, fosfolipidi i apoB-100 [60]. Svaka LDL čestica sadrži jedan apoB-100 molekul, te se određivanjem koncentracije apoB-100 posredno može proceniti broj LDL čestica. Klirens LDL čestica iz krvotoka vrši se pomoću LDL receptora (receptor-zavisnim putem) u kojem jetra ima glavnu ulogu i doprinosi sa 80-90% u receptorskom preuzimanju [55]. Takođe, deo LDL se iz cirkulacije uklanja i receptor-nezavisnim mehanizmom [55].

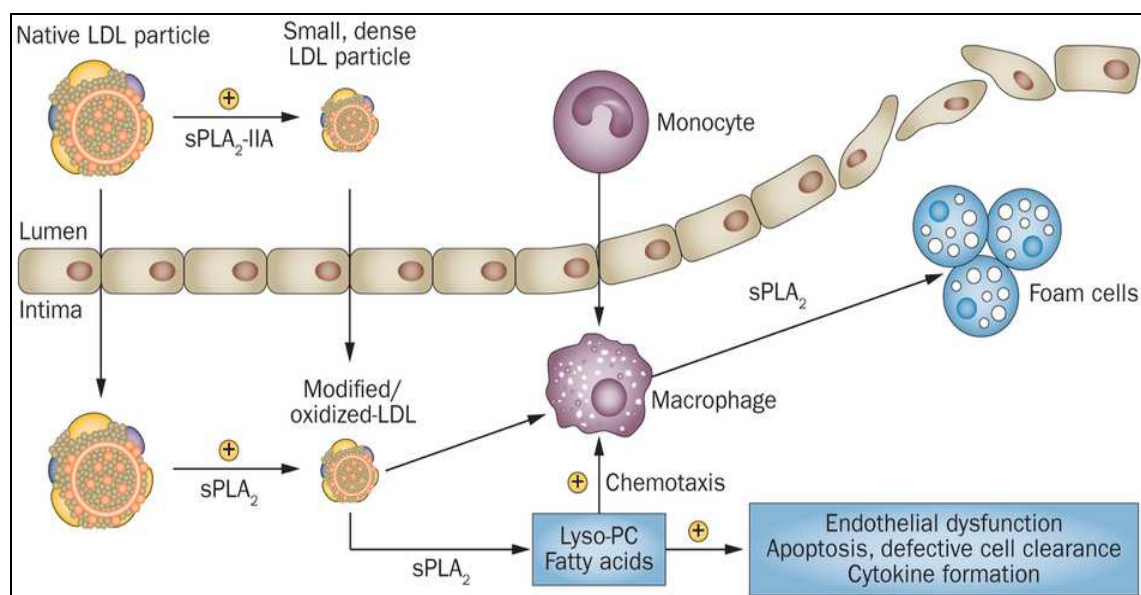
Veliki broj dokaza dobijenih iz bazičnih, kliničkih i epidemioloških studija ukazuje na značajnu ulogu sdLDL čestica u procesu aterogeneze. U svom sastavu, ova čestica, sadrži više TG, a manje slobodnog i esterifikovanog holesterola za razliku od populacije većih LDL čestica. Nastanak sdLDL čestica može biti posredovan različitim mehanizmima, ali se pretpostavlja da dominira mehanizam koji se temelji na promenama nastalim usled povišene aktivnosti holesterol estar transfernog proteina (*engl. Cholesteryl ester transfer protein – CETP*) i hepatične lipaze (HL). Svojom povišenom aktivnošću, CETP doprinosi transferu TG na LDL čestice, a HL omogućava hidrolizu lipida, time

doprinoseći stvaranju sdLDL čestica (slika 9). Na ovaj način dolazi do metabolički uslovljenog remodelovanja LDL čestica [101].



Slika 9. Mehanizam nastanka malih gustih LDL čestica. Preuzeto iz: *Suh S, Lee MK. Small Dense Low-density Lipoprotein and Cardiovascular Disease. J Lipid Atheroscler. 2012;1:1-9*

SdLDL čestice predstavljaju najaterogenije lipoproteine. Zbog smanjenog afiniteta prema LDL receptorima smanjen je klirens sdLDL čestica čime se produžava njihovo prisustvo u plazmi. Zbog manje veličine, sdLDL čestice lakše prodiru u subendotelni prostor u kojem, zbog smanjenog sadržaja antioksidanasa, lakše podležu oksidativnoj modifikaciji. Ovako modifikovane sdLDL čestice imaju veliki afinitet ka vezivanju za receptore hvatače na makrofagama, što predstavlja ključni korak u formiranju penastih ćelija, te posledično i ateroma (slika 10) [31, 102-104].



Slika 10. Proaterogena svojstva malih, gustih LDL čestica. Preuzeto iz: *O'Donoghue ML. Acute coronary syndromes: Targeting inflammation—what has the VISTA-16 trial taught us? Nat Rev Cardiol. 2014;11:130-132.*

### 1.5.1.1. Oksidativna modifikacija LDL čestica

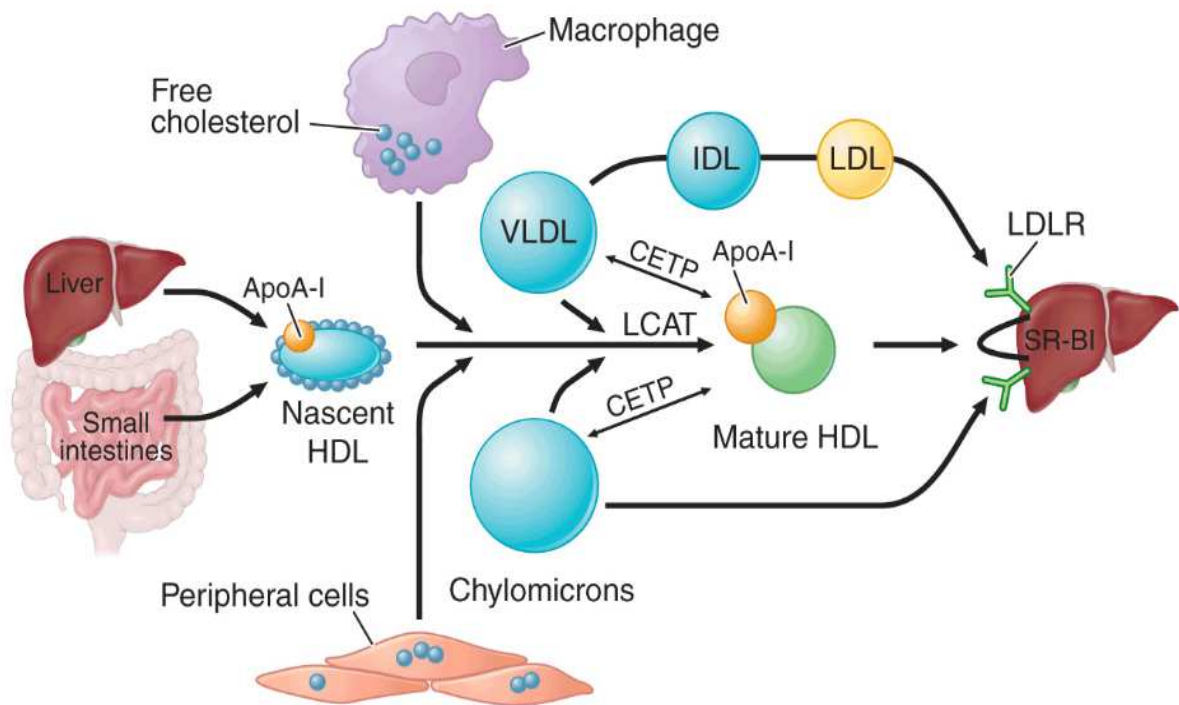
Male guste LDL čestice, za razliku od ostalih LDL čestica intenzivnije podležu hemijskim modifikacijama, kao što su acilovanje i oksidacija, ali i fizičkoj agregaciji [105, 106], što povećava njihova aterogena svojstva. Pored dislipidemije, poznato je da je u patogenezi ateroskleroze uključen i oksidativni stres. Hemijska modifikacija LDL čestice u reakciji sa malondialdehidom (MDA) je najistraženija oksidativna modifikacija LDL-a i predstavlja meru delovanja oksidativnog stresa na lipidne parametre. MDA nastaje kao krajnji proizvod peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, ali kako učestvuje u oksidativnim modifikacijama proteina, treba ga posmatrati u širem kontekstu, a ne samo kao pokazatelja lipidne peroksidacije. Njegova reaktivnost, a time i toksičnost, ogleda se kroz reakcije sa apoB-100, te modifikacije LDL čestica. MDA stvara adukte i sa kolagenom, pri čemu dolazi do modifikacije strukture glavnog proteina ekstracelularnog matriksa. S obzirom na to da kolagen obezbeđuje elastičnost krvnih sudova, nameće se dodatni mehanizam kojim MDA može da dovede do progresije aterosklerotskih promena. U stanjima povećanog oksidativnog stresa dolazi do ubrzanog nastanka oksidovanih formi LDL čestica, te njihovo prisustvo u cirkulaciji odražava progresiju ateroskleroze i može se smatrati biohemijskim markerom rizika za IBS [32].

Brojne tehnike se koriste za određivanje masene koncentracije oxLDL čestica, kao nezavisnog faktora rizika za nastanak KVB. Međutim, zbog zametnih imunohemijskih tehnika za određivanje oxLDL, danas se rutinski u laboratorijama koncentracija MDA određuje spektrofotometrijski (sa tiobarbiturnom kiselinom), kao i savremenim HPLC metodama [107, 108].

### ***1.5.2. HDL čestice***

Rezultati *Framingham Heart Study* koji dokazuju povezanost sniženih koncentracija HDL-h sa povećanim rizikom za KVB su dosledni i potvrđeni rezultatima velikog broja epidemioloških i kliničkih studija [109, 110]. HDL je najmanja i najgušća lipoproteinska čestica, zbog visokog sadržaja proteina. Više od 50% ukupnog sadržaja HDL čestice čine proteini, među kojima je najzastupljeniji apoA-I (čini 70% sadržaja proteina). Oko 20% sadržaja proteina čini apolipoprotein A-II (apoA-II), a ostalih 10% čine apoE, apoA-IV, apoA-V, apoJ, apoC-I, apoC-II i apoC-III [111]. Sa druge strane, sadržaj lipida HDL čestice određuje njen oblik. Diskoidne HDL čestice uglavnom sadrže slobodan holesterol i fosfolipide, dok su sferne čestice veće i imaju formirano jezgro od esterifikovanog holesterola i TG, te se dijametar HDL partikula kreće između 7 i 12 nm [111, 112]. Elektroforetskim tehnikama moguće je razdvojiti grupu malih HDL čestica (HDL 3a, 3b i 3c subfrakcije) i grupu velikih, HDL 2b i 2a subfrakcija. Generalno, u male HDL čestice ubrajaju se one sa dijametrom  $\leq 8,8$  nm [112].

U sastav HDL čestice ulazi i više enzima koji učestvuju u metabolizmu lipida, ali i onih koji ostvaruju antiinflamatorno, antioksidativno, antitrombotsko, antiapoptotičko, vazodilatatorno i antiinfektivno dejstvo [111, 113]. Najznačajniju ulogu HDL ostvaruje uključivanjem u reverzni transport holesterola (RTH) od perifernih tkiva ka jetri (slika 11). U toku RTH dolazi do remodelovanja HDL čestica, pri čemu diskoidne forme sazrevaju i prelaze u sferne čestice. Nascentni, diskoidni HDL se sintetiše u jetri i intestinumu i sadrži isključivo apoA-I. ApoA-I putuje do perifernih tkiva gde se vezuje za ABCA1 transporter na membrani ćelija. Ovaj transporter omogućava prelazak holesterola i fosfolipida na malu nascentnu HDL česticu. Preuzeti holesterol se esterifikuje pod dejstvom lecitin-holesterol acil transferaze (*engl. lecithin:cholesterol acyl transferase* – LCAT), enzima koji se nalazi na HDL čestici i omogućava sazrevanje čestice stvarajući HDL 3, a zatim i velike, zrele HDL 2 forme sa lipidnim jezgrom. Svoj lipidni sadržaj zrele HDL čestice isporučuju jetri. Na ovaj način, posredstvom RTH, ostvaruje se glavni put klirensa holesterola.



Slika 11. Intravaskularno remodelovanje i metabolizam HDL čestica. Preuzeto sa: <https://thoracickey.com/disorders-of-lipoprotein-metabolism/> 17.6.2018.

Za dalje remodelovanje HDL čestice u cirkulaciji posebno je značajan uticaj CETP enzima/proteina. CETP dovodi da transfera estara holesterola iz HDL čestice na hilomikrone i VLDL česticu u zamenu za TG. Ovaj proces smanjenja sadržaja holesterola u HDL česticama, ubrzano se odvija u uslovima hipertrigliceridemije, koja je česta kod pacijenata sa aterosklerotskim promenama na krvnim sudovima [114]. Dalje, pod dejstvom HL može doći do hidrolize TG i smanjenja veličine HDL čestice [115]. Antiaterogena, antiinflamatorna i antioksidativna uloga ovih malih HDL čestica je predmet rasprave velikog broja studija [111]. Imajući u vidu da se remodelovanjem HDL čestica, u koje je uključen CETP, ne uklanja holesterol sa periferije, već da se zadržava u cirkulaciji sadržan u hilomikronima i VLDL česticama, smatra se da je ovo glavni put smanjenja ateroprotektivnih svojstava ovih čestica. Danas kliničke studije sve veću pažnju polažu na primenu CETP inhibitora. Primećeno je da se inhibicijom CETP povećava nivo HDL holesterola. Novi CETP inhibitor (anacetrapib) i CETP modulator (dalcetrapib) za sada daju obećavajuće rezultate, jer nisu primećena neželjena dejstva koja su se javljala u toku primene starijih inhibitora, kao što je torcetrapib. Posebna pažnja je usmerena na CETP modulatore, jer se smatra da je za porast koncentracija HDL holesterola ključna modulacija, a ne inhibicija aktivnosti CETP [30].



## ***1.6. Fosfolipaza A2 udružena sa lipoproteinom (Lp-PLA2)***

Dokazano je da histološke karakteristike nestabilnog aterosklerotskog plaka leže u osnovi IBS i njenih kliničkih manifestacija. U etiopatogenezi ateroskleroze, kao multifaktorijalne bolesti, pored dislipidemije i oksidativnog stresa, važno mesto zauzima i inflamacija. Lp-PLA2 je enzim koji hidrolizuje estarske veze na Sn-2 poziciji oksidovanih fosfolipida u LDL česticama, pri čemu se stvaraju lizofosfatidilholin i oksidovana masna kiselina. Produkti ove reakcije poseduju proinflamatorne i citotoksične osobine i uključeni su u razvoj endotelne disfunkcije, inflamacije plaka i formiranja nekrotičnog jezgra unutar plaka. Kao što je prethodno objašnjeno, daljom peroksidacijom oksidovanih masnih kiselina nastaje MDA, koji pokazuje izuzetno aterogeno dejstvo reagujući sa apoB-100 na LDL česticama [32, 116]. Lp-PLA2 se nalazi u aterosklerotskim plakovima i njena koncentracija korelira sa prisustvom inflamatornih ćelija i histološkim karakteristikama nestabilnog plaka, te sa progresijom aterosklerotske ploče i debljinom kompleksa intime i medije kod osoba sa subkliničkom aterosklerozom [116-119]. Ovi podaci sugerišu da Lp-PLA2 igra važnu ulogu u patogenezi ateroskleroze, te da se može predložiti kao jedan od markera za ranu prevenciju KVB [120, 121]. S tim u vezi, mnoge studije svrstavaju Lp-PLA2 u novi, visokospecifični marker vaskularne inflamacije, povezan sa povećanim rizikom za rupturu plaka [116, 120, 121]. Kod ljudi, Lp-PLA2 se nalazi dominantno vezana za LDL čestice (oko 80%), te se na taj način objašnjava njihova pozitivna korelacija [122, 123]. Prethodna istraživanja su pokazala pozitivnu vezu između koncentracija i aktivnosti Lp-PLA2 sa prisustvom sdLDL kod pacijenata sa dislipidemijom, odnosno *Diabetes mellitus*-om tipa 2 [116, 124]. Studija Rui-Xia Xu [122] i saradnika je pokazala povezanost između koncentracije Lp-PLA2 i prisustva manjih LDL i HDL subfrakcija. U ovoj studiji, snažna pozitivna korelacija između pomenutih parametara je primećena kod pacijenata sa IBS koji nisu uzimali hipolipemijsku terapiju. Interesantno je to da ovi rezultati nisu dobijeni i kod zdravih ispitanika. Mnoge studije pokazale su povezanost povišenih nivoa cirkulišuće Lp-PLA2 sa razvojem IBS i kasnijim rizikom za razvoj fatalnog koronarnog događaja. Sposobnost Lp-PLA2 u predikciji fatalnih i nefatalnih kardiovaskularnih događaja je takođe potvrđena kod pacijenata sa dijagnozom neke od KVB [116-124].

Na osnovu ovih dokaza, smernice nekoliko vodećih međunarodnih udruženja, uključujući ESC i AHA, preporučuju merenje aktivnosti Lp-PLA2 kao biomarkera za procenu rizika kod asimptomatskih osoba [2].

## ***1.7. Masne kiseline***

Utjecaj ishrane na metabolizam lipida, kao i neophodnost prisustva masnih kiselina (MK) u ishrani postali su važan predmet istraživanja početkom dvadesetog veka. Pre 1920. godine verovalo se da masti ne igraju esencijalnu dijetarnu ulogu, već da je za normalan rast i razvoj organizma neophodan izbalansiran unos vitamina i minerala. Međutim, 1927. godine, Evans i Burr su pokazali da su životinje hranjene poluprečišćenom, bezmasnom ishranom, imale poremećaje rasta i reproduktivnih sposobnosti [125]. Ovi rezultati naveli su autore da postuliraju masnu komponentu hrane kao novu, esencijalnu supstancu, koju su nazvali vitamin F. Kada je dokazano da se radi o linolnoj MK C18:2 ( $\omega$ -6), uveden je koncept "esencijalnih" masnih kiselina (EMK). EMK predstavljaju one dijetarne MK neophodne organizmu za normalan rast i razvoj, koje organizam sisara ne može da sintetiše zbog nedostatka enzima desaturaza koje uvode dvostruku vezu na  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 položaju ugljovodoničnog lanca. Pored linolne, u EMK spada i  $\alpha$ -linolenska kiselina, C18:3 ( $\omega$ -3). Veći sadržaj  $\omega$ -3 MK dugog lanca, kao što su eikozapentaenska C20:5 ( $\omega$ -3) (EPA) i dokozaheksaenska C22:6 ( $\omega$ -3) (DHA), imaju ribe sa visokim sadržajem masti i morski sisari. Velika zastupljenost  $\omega$ -6 MK dugog lanca, kao što je arahidonska kiselina C20:4 ( $\omega$ -6) (ARA), primećena je u hrani životinjskog porekla, uključujući meso. Za sintezu MK dužih lanaca neophodna je aktivnost enzima  $\delta$ 6-desaturaze. Najveći afinitet  $\delta$ 6-desaturaza pokazuje prema C18:3 ( $\omega$ -3), pa zatim C18:2 ( $\omega$ -6) i najmanji ka oleinskoj kiselini C18:1 ( $\omega$ -9). Zbog svega navedenoga, različitim masnokiselinskim sastavom konzumiranih namirnica, kompetitivnim mehanizmima, afinitet  $\delta$ 6-desaturaze može biti promenjen. Konzumiranjem namirnica bogatih  $\omega$ -6 MK može doći do supresije desaturacije i elongacije C18:3 ( $\omega$ -3) do C20:5 ( $\omega$ -3) i C22:6 ( $\omega$ -3) [125-127].

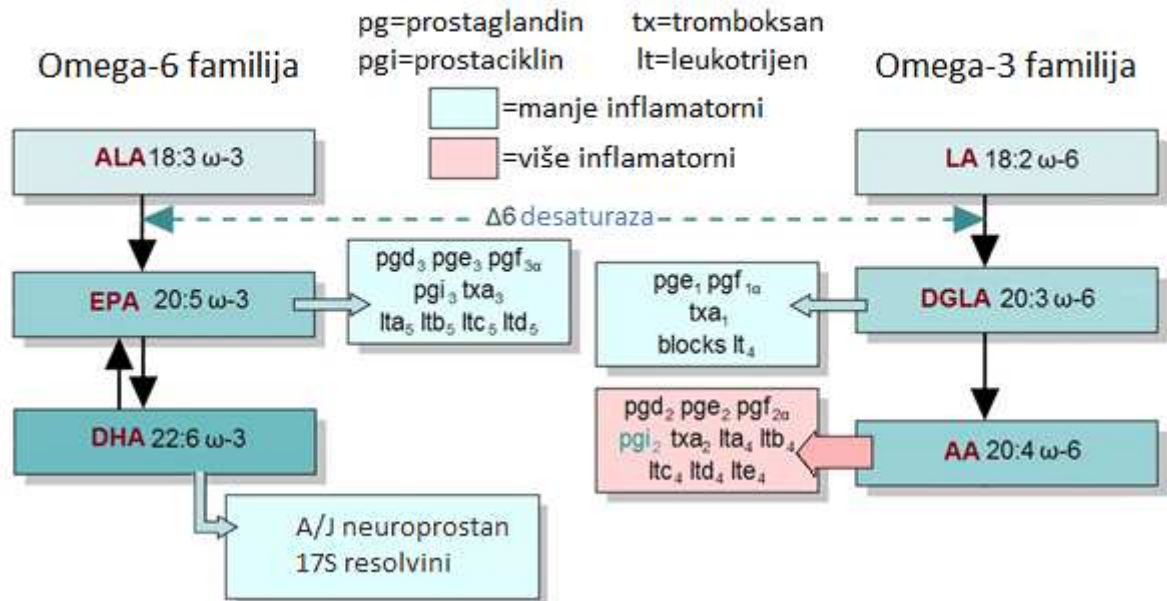
Nakon ovih otkrića usledio je veliki broj studija čiji su rezultati potvrdili potrebu unosa MK za normalan rast i razvoj organizma. Krajem 20. veka potvrđena je sposobnost dijetarnih lipida da modulišu nekoliko ključnih metaboličkih puteva. Tako na primer, od sastava MK u ishrani zavisi sastav membranskih fosfolipida, koji utiče na funkcije membrane. Slično tome, sastav dijetarnih MK značajno menja masnokiselinski sastav masnog tkiva [128]. Dijetarne MK takođe modulišu celularnu sintezu eikozanoida, koji utiču na niz fizioloških odgovora. Dokazana je veza između konzumiranja različitih lipidnih komponenti u ishrani i njihovog pozitivnog, odnosno negativnog uticaja na rizik za nastanak određenih bolesti, pre svega KVB [126-130].

### ***1.7.1. Esencijalne uloge omega-3 i omega-6 masnih kiselina u organizmu***

Eikozanoidi predstavljaju signalne molekule koji nastaju oksidacijom EMK koje sadrže niz od dvadeset ugljenika (*grč. eikos - dvadeset*). Eikozanoidi nastali iz  $\omega$ -6 EMK su uglavnom proinflamatorni, dok oni nastali iz  $\omega$ -3 EMK imaju ili antiinflamatornu ili u mnogo manjoj meri proinflamatornu ulogu. Kako je količina organizmu dostupnih EMK kontrolisana isključivo njihovim dijetarnim unosom, količina i balans ovih MK u ishrani ima uticaja na produkciju eikozanoida, te posledično i na telesne funkcije kontrolisane eikozanoidima. Takođe, ove molekule imaju uticaja na rad sistema organa, kao što su kardiovaskularni sistem, utičući na vazokonstrikciju i vazodilataciju, kao i na agregaciju trombocita [125].

U ćelijama ne postoje depoi eikozanoida, te se njihova sinteza odvija po potrebi. Proces sinteze eikozanoida počinje oslobađanjem ARA nakon dejstva fosfolipaze A2 na fosfolipide membrane, pre svega fosfatidilinozitol u čijem se sastavu nalazi ARA u položaju Sn-2. Svi fosfolipidi membrane služe kao supstrati za PLA2, te MK koje nastaju prilikom ove hidrolize, mogu da se koriste kao supstrati u sintezi eikozanoida. Pored ARA, koja spada u  $\omega$ -6 familiju polinezasićenih MK, kao supstrati se mogu koristiti i dihomog- $\gamma$ -linolenska kiselina C20:3 ( $\omega$ -6) (DGLA), ali i MK  $\omega$ -3 familije, kao što je EPA, pri čemu nastaju različite serije eikozanoida. Ova hidroliza predstavlja reakciju koja određuje brzinu stvaranja eikozanoida, a oslobođena MK predstavlja direktni supstrat za dalju sintezu eikozanoida. Serije eikozanoida nastale iz ARA imaju inflamatorno dejstvo, dok eikozanoidi poreklom od EPA i DGLA imaju uglavnom manje inflamatornu, a neki čak i antiinflamatornu ulogu. Glavni putevi za sintezu eikozanoida prikazani su na slici 12, kao i serije eikozanoida koje nastaju u datim metaboličkim putevima [125].

## Eikozanoidi



Slika 12. Glavni putevi sinteze eikozanoida iz različitih MK. Preuzeto uz izmene na srpski jezik iz: Erdman Jr, John W., Ian A. MacDonald, and Steven H. Zeisel, eds. *Present knowledge in nutrition*. John Wiley & Sons, 2012.

Različite aktivnosti serija eikozanoida u znatnoj meri objašnjavaju zdravstvene efekte ω-3 i ω-6 MK. Konzumiranje namirnica bogatih ω-3 MK povećava njihovu ugradnju u fosfolipide membrane. Nakon delovanja PLA2, kompetitivno ulaze u reakcije sa ARA, time smanjujući mogućnost sinteze inflamatornih eikozanoida. Uticaj hrane bogate ω-3 MK najbolje je primećen kod Inuita, gde su riba i proizvodi od ribe najzastupljeniji u piramidi ishrane. U ovoj populaciji primećeno je pomeranje sinteze eikozanoida iz ω-6 ka ω-3 prekursorima, te povećanje sinteze prostaglandina I3 (PGI3) iz EPA [125-127, 129]. Prema preporukama SZO preporučeni dnevni unos masti ne treba da prelazi 30% ukupnog unosa hranjivih materija [131]. Dnevne preporuke Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (*engl. The United States Department of Agriculture – USDA*) za unos ω-3 MK su 1,6 g/d za muškarce i 1,1 g/d za žene, odnosno preporuke za ω-6 MK su 17 g/d za muškarce i 12 g/d za žene [132]. Industrijalizacijom i promenama u pripremi namirnica, nivoi linolne kiseline su rasli u odnosu na nivo α-linolenske kiseline [133]. Trenutne procene su da se u zavisnosti od tipa ishrane, odnosi ω-6 i ω-3 MK kreću od 9,8:1, pa preko 15:1, sve do 30:1, iako su preporučeni odnosi od 5:1

do 10:1 [131, 134, 135]. Dakle, pored fokusa na kalorijsku vrednost konzumirane hrane, u pogledu unosa masti, veoma je važno obratiti pažnju na vrstu unetih MK i njihov međusobni odnos. Neki autori, kao novi faktor rizika za nastanak IBS, navode zbir EPA i DHA [136]. U svojim istraživanjima, Harris i saradnici [136] navode nivoe rizika za razvoj IBS u zavisnosti od sadržaja EPA + DHA u eritrocitima. Ukoliko je sadržaj <4%, osobe se svrstavaju u grupu visokog rizika, ukoliko se zbir kreće između 4% i 8%, osobe imaju umereni rizik za nastanak IBS, dok vrednosti veće od 8% imaju kardioprotektivni efekat. U pomenutoj studiji sadržaj MK ispitivan je u eritrocitima zbog manjih intraindividualnih varijacija u odnosu na plazmu [136].

Ukupni sadržaj MK obuhvata slobodne MK i MK sadržane u svim lipidnim frakcijama plazme. Određivanje koncentracije pojedinih MK u punoj krvi se teško izvodi, usled delovanja različitih faktora. Najznačajniji faktor je hematokrit, jer se koncentracije pojedinih MK razlikuju u plazmi i eritrocitima. Danas se preporučuje određivanje procentualnog sadržaja pojedinih MK u odnosu na ukupan sadržaj MK u plazmi. Ovako se mogu odrediti sve MK koje se u plazmi nalaze kao slobodne, ali i u sastavu estara holesterola, fosfolipida i TG, a to nam može pomoći da uočimo njihove međusobne promene u ukupnom udelu u plazmi [137].

## 2. Cilj

Iako je poznat veliki broj etioloških faktora koji doprinose patogenezi i progresiji aterosklerotskih promena, aktuelni vodiči za prevenciju i tretman IBS preporučuju određivanje osnovnih parametra lipidnog statusa. Međutim, multifaktorijalnost u etipatoogenezi ateroskleroze i sinergističko delovanje etioloških faktora, sve češće ukazuju na potrebu sagledavanja šire slike, uzimajući u obzir veći broj parametara, sa posebnim osvrtom ka individualnoj proceni rizika i pristupu lečenja. Pored individualnog izlaganja različitim faktorima rizika, veoma je važna i individualna procena odgovora na tretman hipolipemicima. Iako je poznato da „lipidna trijada“ igra centralnu ulogu u procesu ateroskleroze, javila se potreba za sveobuhvatnim razumevanjem homeostaze holesterola, kroz procese njegove sinteze i apsorpcije. Veliki broj sprovedenih istraživanja imao je za cilj da otkrije nove markere za procenu homeostaze holesterola i predviđenje odgovora na terapiju. Kako metabolizam holesterola pored sinteze i apsorpcije, predstavlja i njegovu distribuciju u različitim lipoproteinskim česticama, važno je sagledati njihov sastav i funkcionalnost. Pored dislipidemije, oksidativni stres, inflamacija, kao i procena stabilnosti plaka mogu da ukažu na rizik za razvoj bolesti, kao i praćenje uspešnosti terapije. Međutim, veoma mali broj studija se bavio procenom homeostaze holesterola i njenom međusobnom povezanošću sa različitim faktorima rizika. Takođe, nema dovoljno podataka o validnosti metoda koje se koriste za procenu homeostaze holesterola. Na osnovu svega navedenog ciljevi ovog rada su bili:

- Postaviti GC-FID metodu za određivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola u uzorcima biološkog materijala;
- Validirati postavljenu metodu (pravilan odabir biološkog materijala i optimizacija uslova čuvanja uzoraka, adekvatna kvantifikacija analita od interesa, provera stabilnosti uzoraka kao i preciznosti i tačnosti metode);
- Odrediti koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola kod pacijenata sa IBS na terapiji i bez terapije statinima, utvrditi razlike između ove dve grupe ispitanika, i izvršiti poređenje sa zdravim ispitanicima;
- Na osnovu koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola, ispitati da li postoje različiti obrasci metabolizma holesterola u zavisnosti od patološkog stanja i farmakološkog tretmana;

- Utvrditi da li efikasnost sinteze i apsorpcije holesterola kao i distribucija osnovnih parametara lipidnog statusa i masenih koncentracija apoA-I i apoB-100 mogu da izdvoje subpopulaciju zdravih osoba sa povećanim rizikom za nastanak i razvoj KVB;
- Ispitati distribuciju subklasa HDL i LDL lipoproteina u sve tri grupe ispitanika;
- Utvrditi korelaciju između koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i karakteristikama LDL i HDL čestica;
- Utvrditi da li efikasnost sinteze i apsorpcije holesterola kao i distribucija malih, gustih LDL čestica, može da identifikuje osobe sa povećanim rizikom za razvoj ateroskleroze i KVB;
- Ispitati potencijal korišćenja markera sinteze i apsorpcije holesterola za optimizaciju tretmana kardiovaskularnih bolesti;
- Ispitati aktivnost LCAT i CETP enzima, kao i koncentraciju MDA u sve tri grupe ispitanika;
- Utvrditi razlike u koncentraciji Lp-PLA2 kao i razlike u masnokiselinskim profilima plazme između sve tri grupe ispitanika;
- Ispitati moguće plejotropne efekte terapije statinima na masnokiselinski sastav plazme.

### **3. Materijal i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

Ova studija dizajnirana je kao opservaciona i uključivala je 110 ispitanika. Grupu pacijenata obolelih od IBS činilo je 79 osoba (38 muškaraca i 41 žena), starosti od 32 do 82 godine, koji su u periodu od 2012-2013. godine hospitalizovani u Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije. U toku hospitalizacije podvrgnuti su selektivnoj koronarnoj angiografiji na osnovu koje je procenjena težina koronarnog oboljenja. Indikacije za dijagnostički postupak selektivne koronarne angiografije bile su: stabilna angina pectoris, nestabilna angina pectoris, infarkt miokarda ili atipičan bol u grudima sa pozitivnom istorijom KVB u porodici, sumnja na ishemiju posle revaskularizacije miokarda i procena stanja nakon akutnog infarkta miokarda (AIM). Ovim dijagnostičkim postupkom utvrđen je stepen stenozе koronarnih arterija na osnovu maksimalnog suženja lumena krvnog suda procenjenog vizuelnom analizom. Klinički značajnom stenozom smatrano je suženje lumena više od 50% i to u glavnom stablu leve koronarne arterije (*lat. arteria coronaria sinistra*), i njenim granama (*lat. ramus interventricularis anteriori i ramus circumflexus*), i/ili u desnoj koronarnoj arteriji (*lat. arteria coronaria dextra*) [7]. Na osnovu angiografskih snimaka dva iskusna kardiologa su bez prethodnog znanja o stanju pacijenta procenjivali nalaz, a konačna odluka se donosila konsenzusom.

Dijagnoza stabilne angine pectoris (SAP) uključivala je sledeće kriterijume: prisustvo hronične stabilne angine u trajanju od tri meseca indukovane fizičkim naporom, čiji simptomi prolaze nakon sublingvalne primene nitroglicerina (tokom testa opterećenja - osećaj ograničavajuće angine i depresija ST-segmenta od 0,1 mV u poređenju sa stanjem u mirovanju) [7]. AIM je okarakterisan bolom u grudima praćenim povišenim koncentracijama visokoosetljivog troponina T (hsTn-T) u krvi, sa ili bez elevacije ST segmenta. Dijagnoza nestabilne angine pectoris (NAP) je postavljena ukoliko su pacijenti primljeni sa anginom koja se pogoršava, sa akutnom anginom posle vežbanja koja se javljala u toku tri nedelje ili sa ponovljenim napadima angine u mirovanju u toku tri nedelje, bez dokaza o akutnom infarktu miokarda potvrđenom sa nalazima EKG-a i srčanim biomarkerima [7]. Dijagnoza akutnog koronarnog sindroma (AKS) je postavljena u periodu od dve nedelje pre vađenja krvi. Pacijenti sa *Diabetes mellitus*-om i hroničnom bubrežnom insuficijencijom su isključeni iz ove studije.



Nakon uključivanja u studiju, pacijenti su anketirani u cilju prikupljanja svih potrebnih demografskih podataka koji su uključivali uzrast, pol, kao i osnovne antropometrijske mere: telesnu visinu, telesnu masu, obim kuka i obim struka. Indeks telesne mase je izračunat prema obrascu:  $ITM = \text{telesna masa (kg)} / \text{kvadrat telesne visine (m}^2\text{)}$ . Kao mera centralne gojaznosti izračunat je odnos struka i kuka. Prikupljene su i druge značajne informacije o arterijskom krvnom pritisku, prethodnim bolestima, porodičnoj anamnezi i životnim navikama ispitanika, kao što su podaci o načinu ishrane, pušački status, te podaci o terapiji. Važan anamnestički podatak za ovu studiju bio je primena i dužina tretmana hipolipidemicima. U cilju analize povezanosti ispitivanih parametara sa odgovorom na terapiju statinima i mogućim predviđanjem odgovora na terapiju statinima svi ispitanici sa IBS su podeljeni u dve grupe: grupu od 47 pacijenata koja nije bila na terapiji statinima u toku uzorkovanja krvi (59,5%) i grupu od 32 pacijenta (40,5%) koja je bila na terapiji statinima, duže od tri meseca.

Prvobitno, grupu zdravih ispitanika (kontrolnu grupu – KG) činile su 62 osobe. Demografski podaci pacijenata koji obuhvataju starost, telesnu masu, visinu, pušački status, konzumiranje alkohola, stepen fizičke aktivnosti, krvni pritisak, kao i podaci o terapiji i porodičnoj anamnezi za KVB prikupljeni su anketiranjem ispitanika. Za ovu studiju, važan anamnestički podatak prikupljen anketiranjem bio je način ishrane ispitanika. Kako je koronarna angiografija invazivna procedura koja se ne preporučuje kao dijagnostički postupak za osobe bez simptoma srčanih bolesti, kod ove grupe ispitanika nije izvršena. Međutim, za dobijanje detaljnijih informacija o njihovom kardiovaskularnom statusu, ispitanici su bili podvrgnuti ultrazvučnom merenju debljine kompleksa intime i medije obe karotidne arterije, čime se omogućava otkrivanje ranih aterosklerotskih oštećenja arterija kod osoba bez simptoma bolesti. Merenje debljine intime-medije karotidnih arterija (*engl. Carotid intima-media thickness – cIMT*), kao markera rane, subkliničke ateroskleroze, vršeno je ultrasonografski. Lekar koji je izvodio ovu dijagnostičku proceduru nije bio upoznat sa dijagnozom, terapijskim režimom i laboratorijskim rezultatima ispitanika. Sva merenja izvedena su na standardizovan način dok se pacijent nalazio u supinom položaju sa glavom okrenutom kontralateralno. Merenje je vršeno 10 mm ispod bifurkacije na zajedničkim karotidnim arterijama, u nivou bifurkacije i 10 mm iznad bifurkacije na unutrašnjim karotidnim arterijama. cIMT predstavlja rastojanje od ivice dodirne površine između lumena i intime do ivice dodirne površine između medije i adventicije. Sva merenja su vršena na uređaju Siemens ACUSON Antares uz korišćenje softvera za određivanje cIMT (AHP - Arterial Health

Package Siemens Software). Snimci su beleženi na kraju diastole, a nakon snimanja vršeno je izračunavanje cIMT. Ukupni koeficijent varijacije za ponovljena određivanja bio je < 4%.

Nakon detaljnog ispitivanja njihovog zdravstvenog stanja, određivanja cIMT i ispitivanja porodične anamneze za postojanje KVB kod srodnika prvog stepena, kriterijumi za isključivanje prilikom formiranja kontrolne grupe bili su prisustvo KVB, zatim potvrda pozitivne porodične anamneze za KVB, bilo koje druge sistemske inflamatorne ili metaboličke bolesti, bolesti jetre ili bubrega, cIMT u najmanje jednoj karotidnoj arteriji >1 mm; hipertenzija (dijastolni krvni pritisak  $\geq 90$  mmHg i/ili sistolni krvni pritisak  $\geq 140$  mmHg) ili upotreba antihipertenzivnih lekova. Isključujući kriterijum je bio i nepovoljni lipidni profil definisan prema *Adult Treatment Panel III* preporukama [29] koji je podrazumevao koncentraciju UH u plazmi >5,16 mmol/L, LDL-h >3,35 mmol/L, HDL-h <1,03 mmol/L, koncentraciju TG u plazmi >1,70 mmol/L i/ili upotreba lekova iz grupe hipolipidemika, prisustvo *Dijabetes mellitus*-a i koncentracija glukoze u plazmi natašte >6,1 mmol/L, kao i prisustvo gojaznosti koje je definisano kao ITM >30 kg/m<sup>2</sup>. Konačna kontrolna grupa se sastojala od 31 ispitanika (13 muškaraca i 18 žena), starosti od 23 do 61 godine.

Uzorci seruma i plazme dobijeni od 10 zdravih ispitanika su spojeni tako da formiraju *pool* koji je korišćen za eksperimente u procesu validacije metode.

Učesnici u studiji nisu bili vegeterijanci ili vegani, a u toku našeg istraživanja u Srbiji nije bilo proizvoda fortifikovanih biljnim sterolima i/ili stanolima.

Studija je planirana i sprovedena prema etičkim principima u skladu sa Deklaracijom iz Helsinkija, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja: 728/2) i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja: 29/11-15). Svi ispitanici su dali pisani pristanak za učestvovanje u istraživanju. Ispitanici su detaljno upoznati sa ciljevima studije i nakon potpisivanja pristanka, uključeni su u istraživanje.

Uzorci venske krvi svih ispitanika dobijeni su venepunkcijom prednje kubitalne vene nakon dvanaestočasovnog noćnog gladovanja. Venepunkcija je izvedena dok su ispitanici bili u sedećem položaju. EDTA je korišćen kao antikoagulans za dobijanje plazme, a za dobijanje seruma korišćene su epruvete bez aditiva. Derivati krvi su izdvojeni nakon centrifugiranja na 1500 rcf u trajanju od 10 minuta za plazmu, odnosno 15 minuta za serum, i to u roku od jednog sata od vađenja krvi. Nakon alikvotiranja, uzorci su čuvani na temperaturi od -80°C do izvođenja analiza.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Metode za određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih parametara**

#### **3.2.1.1. Reagensi i oprema**

Za rutinske, automatizovane biohemijske i imunoheмиjske analize korišćeni su reagensi firme Biosystems (Biosystems, Barcelona, Španija), kao i reagensi firme Roche (Roche, Basel, Švajcarska). Biohemijske metode bile su izvedene na sledećim biohemijskim i imunoheмиjskim analizatorima: Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, SAD), COBAS<sup>®</sup> c6000-Roche Diagnostics (Roche, Basel, Švajcarska) i COBAS<sup>®</sup> INTEGRA 400 plus-Roche Diagnostics (Roche, Basel, Švajcarska).

#### **3.2.1.2. Principi metoda za određivanje osnovnih biohemijskih parametara**

Određivanje koncentracije UH, TG, LDL-h, HDL-h, glukoze i kreatinina vršeno je na biohemijskom analizatoru Ilab 300+ korišćenjem testova proizvođača Biosystems. Koncentracija UH je određena enzimskom CHOD-PAP metodom, koncentracija TG enzimskom GPO-PAP metodom, te koncentracija glukoze enzimskom GOD-PAP metodom. Za određivanje koncentracija HDL-h korišćena je direktna metoda sa deterđžentom i kuplovanim enzimskim reakcijama. Koncentracija LDL-h je takođe određena direktnim testom. Koncentracije mokraćne kiseline i uree određene su enzimskim metodama, korišćenjem testa proizvođača Biosystems. Koncentracija albumina određena je metodom čiji se princip zasniva na reakciji sa bromkrezol zelenim, a korišćen je test proizvođača Biosystems. Koncentracije apoA-I i apoB-100 su takođe određene reagensima firme Biosystems. Princip metode za određivanje koncentracija apoA-I i apoB-100 se zasniva na turbidimetrijskom merenju reakcije antigen/antitelo (Ag/At) sa monoklonskim anti-apoA-I i anti-apoB-100 At. Određivanje koncentracije hsCRP izvršeno je na biohemijskom analizatoru COBAS<sup>®</sup> c6000-Roche Diagnostics imunoturbidimetrijskom metodom korišćenjem testa proizvođača Roche. Na biohemijskom analizatoru COBAS<sup>®</sup> INTEGRA 400 plus-Roche Diagnostics određena je koncentracija insulina elektrohemiluminiscentnom imunoheмиjskom metodom (*engl. electrochemiluminescence method* – ECLIA) korišćenjem testa proizvođača Roche. Pomoću HOMA-IR indeksa procenjen je nivo insulinske rezistencije prema sledećem obrascu:

$$HOMA - IR = \frac{(\text{koncentracija insulina natašte } (\mu\text{U/mL}) \times \text{koncentracija glukoze natašte } (\text{mmol/L}))}{22,5}$$

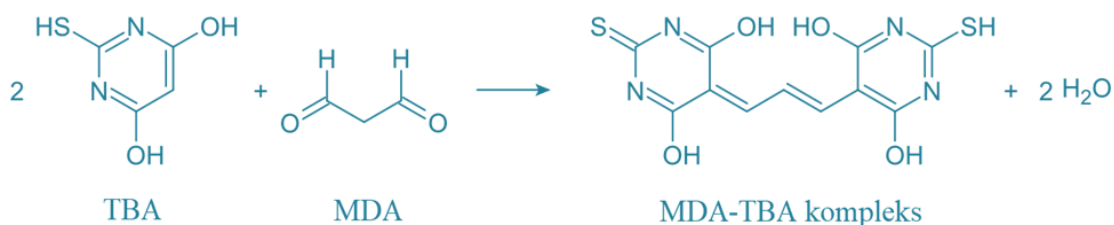
### 3.2.2. Metoda za određivanje koncentracije malondialdehida

#### 3.2.2.1. Hemikalije i oprema

Hemikalije neophodne za pripremu reagensa za određivanje koncentracije MDA su: standard 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Acros Organic, Geel, Belgija); Tris(hidroksimetil)aminometan proizvođača Fisher Chemical (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD); hlorovodonična kiselina (HCl), trihlorsirćetna kiselina  $\geq 99,0\%$  i 2-tiobarbiturna kiselina proizvođača Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Od opreme korišćeni su: centrifuga model 5417R, proizvođača Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i spektrofotometar Beckman Coulter DU-64 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD).

#### 3.2.2.2. Princip metode i postupak za određivanje koncentracije malondialdehida

Koncentracija MDA je određena spektrofotometrijski sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Princip metode se zasniva na stvaranju obojenog kompleksa MDA sa TBA, čija se apsorpcija meri na 535 nm. Molarna apsorptivnost nastalog kompleksa na navedenoj talasnoj dužini iznosi  $1,57 \times 10^5$  L/mol/cm [138], a reakcija MDA i TBA je prikazana na slici 13.



Slika 13. Reakcija MDA sa TBA

Postupak za određivanje koncentracije MDA prikazan je u tabeli 2.

Tabela 2. Postupak izvođenja metode za određivanje koncentracije MDA.

<i>U epruvete pipetirati (μL) :</i>			
	<i>Slepa proba</i>	<i>Standard</i>	<i>Analiza</i>
<i>Plazma</i>	-	-	300
<i>TRIS-Cl pufer</i>	300	-	-
<i>Standard</i>	-	300	-
<i>TBA reagens</i>	600	600	600

Promešati i inkubirati na 100°C, u vodenom kupatilu 5 minuta. Ohladiti, centrifugirati na 10000 g, 10 minuta na +4°C i očitati apsorbanciju supernatanta na 535nm.

*TRIS-Cl – Tris(hidroksimetil)aminometan i hlorovodonična kiselina; TBA – 2-tiobarbiturna kiselina.*

Kao što je prikazano u tabeli 2, u epruvete se dodaju uzorci plazme u kojima se određuje koncentracija MDA, dok se za slepu probu reagensa odmeri ista zapremina 0,05 mol/L TRIS-Cl pufera, pH=7,4. Zatim se doda TBA reagens (0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina; 2,6 mol/L 2-tiobarbiturna kiselina; 0,25 mol/L HCl), reakciona smeša se promeša na vorteks-mešalici i inkubira 5 minuta na 100 °C. Nakon inkubiranja reakcija se zaustavlja hlađenjem reakcione smeše na ledu, nakon čega se izvrši centrifugiranje na 10000 rcf, 10 minuta na +4°C. Apsorbancija dobijenog supernatanta se meri prema slepoj probi reagensa na 535 nm. Za izračunavanje koncentracije MDA korišćena je kalibraciona kriva koja je konstruisana upotrebom serije razblaženja primarnog standarda malonaldehid bis(diethyl-acetala) koncentracije 1 mmol/L. Koncentracija sekundarnih standarda se kretala u rasponu od 1-10 μmol/L, a korišćena je kalibraciona kriva koja je zadovoljila određene kriterijume (koeficijent korelacije (r) >0,99; odsečak a na y-osi se statistički značajno ne razlikuje od nule).

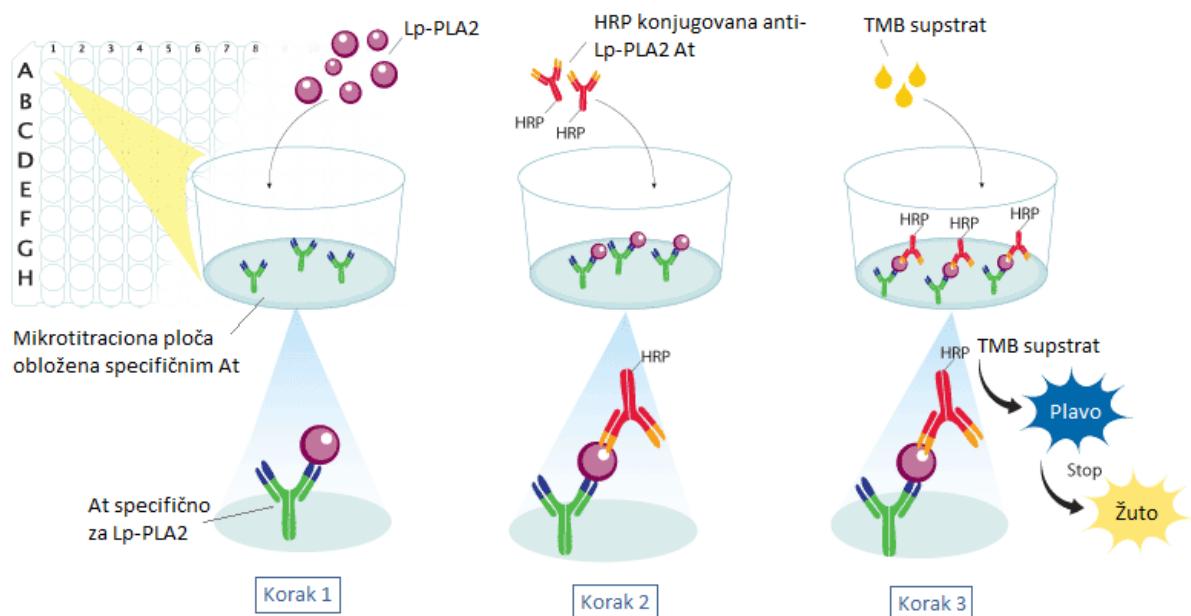
### **3.2.3. Određivanje masene koncentracije Lp-PLA2**

#### **3.2.3.1. Reagensi i oprema**

Masena koncentracija Lp-PLA2 određena je kvantitativnom tehnikom „sendvič“ imunoeseja (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) korišćenjem Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA2 Quantikine® ELISA Kit (R&D, Minneapolis, MN, SAD). U sastavu kita nalaze se svi neophodni reagensi i liofilizati antitela. Za merenje apsorbancija na talasnoj dužini od 450 nm, korišćen je ELISA čitač proizvođača LKB (LKB Vertriebs GmbH, Wien, Austrija).

#### **3.2.3.2. Princip metode i postupak za određivanje masene koncentracije Lp-PLA2**

Princip metode za određivanje masene koncentracije Lp-PLA2 zasniva se na vezivanju dva monoklonska antitela za različite epitope na Lp-PLA2. Bazeni mikroploče su obloženi monoklonskim antitelom specifičnim za jedan epitop na humani Lp-PLA2 protein. U bazene ploče se nanosi 50 µL slepe probe, standarda i razblaženih uzoraka seruma koji se inkubiraju dva sata na sobnoj temperaturi, na tamnom, uz konstantno mešanje. Nakon inkubacije sledi faza ispiranja, pri čemu se uklanjaju sve nevezane supstance, a za antitela ostaje vezana Lp-PLA2. U sledećem koraku se dodaju sekundarna monoklonska antitela, obeležena peroksidazom, a koja se vezuju za drugi epitop na Lp-PLA2. Nakon dvočasovne inkubacije, na sobnoj temperaturi i na tamnom, uz konstantno mešanje, sledi faza ispiranja u kojoj se uklanjaju sva nevezana sekundarna antitela. Potom sledi enzimska reakcija koju katalizuje peroksidaza rena vezana za sekundarno antitelo, a kao supstrat se koriste vodonik peroksid i 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin. Enzimska reakcija u kojoj nastaje obojeni hromogen zasniva se na oksidaciji 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina do plavo obojenog 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin diimina u prisustvu vodonik peroksida, pri čemu je intenzitet nastale boje proporcionalan koncentraciji Lp-PLA2. Reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline (koncentracije 1 mol/L), pri čemu se inhibira enzimska aktivnost, a obojeni hromogen u kiseljoj sredini menja boju iz plave u žutu. Intenzitet nastale boje se meri na 450 nm. Šematski prikaz principa „sendvič“ ELISA metode za određivanje masene koncentracije Lp-PLA2 prikazan je na slici 14.



Slika 14. Šematski prikaz principa ELISA metode za određivanje masene koncentracije Lp-PLA2. Preuzeto uz izmene na srpski jezik sa:

<https://www.rndsystems.com/products/quantikine-elisa-kit-measuring-high-molecular-weight-adiponectin>; 18.2.2018. (*Lp-PLA2 – fosfolipaza A2 udružena sa lipoproteinom; At – Antitelo; HRP – peroksidaza rena; TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin*).

Kao slepa proba koristi se komercijalni reagens diluent. Uzorci se prema uputstvu proizvođača razblažuju u odnosu 1:20 (10 $\mu$ L uzorka i 190  $\mu$ L reagens diluenta), neposredno pre izvođenja testa. Liofilizovani komercijalni standard je rekonstituisan odgovarajućim reagensom i korišćen je kao primarni standard za izradu kalibracione krive. Koncentracija primarnog standarda iznosila je 50  $\mu$ g/L. Prema uputstvu proizvođača, napravljena je serija razblaženja primarnog standarda, pri čemu je dobijeno 6 sekundarnih standarda. Za potrebe izrade kalibracione krive korišćeno je svih 7 standardnih rastvora u duplikatu, a korišćena kriva zadovoljavala je kriterijume da su vrednosti  $r > 0,99$  i da se odsečak  $a$  na y-osi statistički nije razlikovao od nule.

Masena koncentracija Lp-PLA2 u serumu ispitanika izračunata je iz dobijenih jednačina kalibracione krive uzimajući u obzir početno razblaženje uzorka. Dobijeni rezultati izraženi su u  $\mu$ g/L.

### 3.2.4. *Određivanje aktivnosti LCAT-a i CETP-a*

#### 3.2.4.1. *Reagensi i oprema*

Za određivanje aktivnosti LCAT i CETP korišćeni su reagensi za određivanje koncentracije ukupnog i slobodnog holesterola firme Bioanalytica (Bioanalytica, Beograd, Srbija) i HDL precipitirajući reagens firme Biosystems (Biosystems, Barcelona, Španija). Analize su izvođene na biohemijskom analizatoru Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, SAD).

#### 3.2.3.2. *Princip metode i postupak za određivanje aktivnosti LCAT i CETP*

Određivanje aktivnosti LCAT i CETP izvršeno je prema metodi koje su predložili Asztalos i Fielding [139, 140]. Ova metoda omogućava određivanje obe aktivnosti. Kako LCAT jedini katalizuje reakciju esterifikacije slobodnog holesterola (SH) u holesterol-estre (HE) u plazmi, njegova aktivnost se određuje izračunavanjem razlike između koncentracija SH pre i nakon inkubacije uzorka tokom 2h na 37°C.

Uzorci u kojima je izmerena koncentracija SH pre inkubacije (LCAT SH inicijalno), inkubirani su 2 sata na 37 °C, a zatim je i u njima izmerena koncentracija SH nakon inkubacije (LCAT SH finalno). Razlika u koncentracijama SH pre i posle inkubacije je proporcionalna aktivnosti enzima i računa se prema navedenoj formuli:

$$LCAT [\mu\text{mol/L/h}] = (\text{SH}_{\text{pre inkubacije}} - \text{SH}_{\text{posle inkubacije}}) \times 1000/2$$

CETP katalizuje razmenu HE i TG između svih klasa lipoproteina. S obzirom na to da količina prisutnih HE zavisi od aktivnosti LCAT i da su uglavnom prisutni u jezgru HDL čestice [141], aktivnost CETP-a se procenjuje na osnovu brzine prenosa HE između HDL-a, i VLDL-a i LDL-a u funkciji vremena. CETP posredovan transfer HE je određivan kao razlika između brzine smanjenja koncentracije SH u plazmi i promenama u koncentracijama HE u HDL frakciji pre i nakon inkubacije uzoraka tokom 2h na 37°C. Promene u koncentracijama HE računane su tako što se od koncentracije UH oduzme koncentracija SH u istom uzorku.



Kako je za određivanje aktivnosti CETP neophodno odrediti koncentracije SH i UH u HDL česticama, HDL frakcija je izdvojena metodom selektivne precipitacije. Princip metode za izdvajanje HDL frakcije zasniva se na taloženju VLDL i LDL čestica fosfovolframovom kiselinom i jonima  $Mg^{2+}$ . Koncentracije SH i UH određene su enzimskim metodama u frakciji inicijalnog uzorka koja sadrži samo HDL čestice. Uzorci su potom inkubirani 2 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, izdvojena je HDL frakcija u kojoj se ponovo određuju koncentracije SH i UH. Aktivnost CETP-a određuje se prema navedenoj formuli:

$$\text{Molarna CETP aktivnost } [\mu\text{mol/L/h}] = \frac{[(\text{inicijalni plazma SH} - \text{finalni plazma SH}) - (\text{finalni HDL-UH} - \text{finalni HDL-SH}) - (\text{inicijalni HDL-UH} - \text{inicijalni HDL-SH})] \times 1000}{2}$$

Ukupna aktivnost CETP-a predstavljena je kao apsolutna vrednost.

### ***3.2.5. Određivanje procentualnog udela pojedinih masnih kiselina u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme***

#### ***3.2.5.1. Hemikalije i oprema***

Za pripremu uzoraka za određivanje procentualnog udela pojedinih MK u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme, od hemikalija su korišćeni metanol i n-heksan HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i hlorovodonična kiselina GC čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Priprema metil estara MK je izvršena 3 mol/L metanolnim rastvorom HCl, a ekstrakti su razdvajani centrifugiranjem na Eppendorf centrifugi model 5702 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Azot 3.5 čistoće je korišćen za uparavanje organskih ekstrakata tokom pripreme uzoraka, dok je helijum 5.0 čistoće korišćen kao noseći gas prilikom razdvajanja MK na gasnom hromatografu. Gasovi su nabavljeni od Messer Group (Messer Group, Bad Soden, Nemačka). Za hromatografsko razdvajanje korišćen je gasni hromatograf sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID) model 7890A, proizvođača Agilent Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kolona na kojoj je vršeno hromatografsko razdvajanje MK je polarna kapilarna kolona HP-88 ((88% cijanopropil) aril-polisiloksan), dimenzija 100m×0,25mm×0,20μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Za identifikaciju pojedinih MK korišćena

je komercijalno dostupna smeša standarda MK Supelco FAME Mix (Supelco, Bellefonte, PA, SAD).

### **3.2.5.2. Priprema uzorka za određivanje MK**

Priprema uzoraka za određivanje masenog udela MK vršena je prema modifikovanom postupku, koji su predložili Koletzko i saradnici [137]. U borosilikatne staklene epruvete je dodato 200 $\mu$ L uzorka plazme, a zatim 2 mL metanolnog rastvora HCl (koncentracije 3 mol/L). Sadržaj epruvete je promešan na vorteks-mešalici u trajanju od 30 sekundi, a nakon toga je vršena kisela hidroliza estara masnih kiselina, njihovo oslobađanje i prevođenje u metil- derivate na temperaturi od 85 °C, tokom 45 minuta. Nakon hlađenja uzorka, izvršena je ekstrakcija lipidne frakcije sa 2 mL n-heksana, uz centrifugiranje na 1500 *rev* 5 minuta. Gornji, heksanski sloj je prebačen u posebnu, borosilikatnu staklenu epruvetu i uparen do suva u struji azota čistoće 3.5. Proces ekstrakcije i uparavanja je ponovljen dva puta uz dodavanje svakog narednog heksanskog sloja u istu epruvetu. Uzorci su pre injektovanja na kolonu gasnog hromatografa rekonstituisani u 75  $\mu$ L n-heksana.

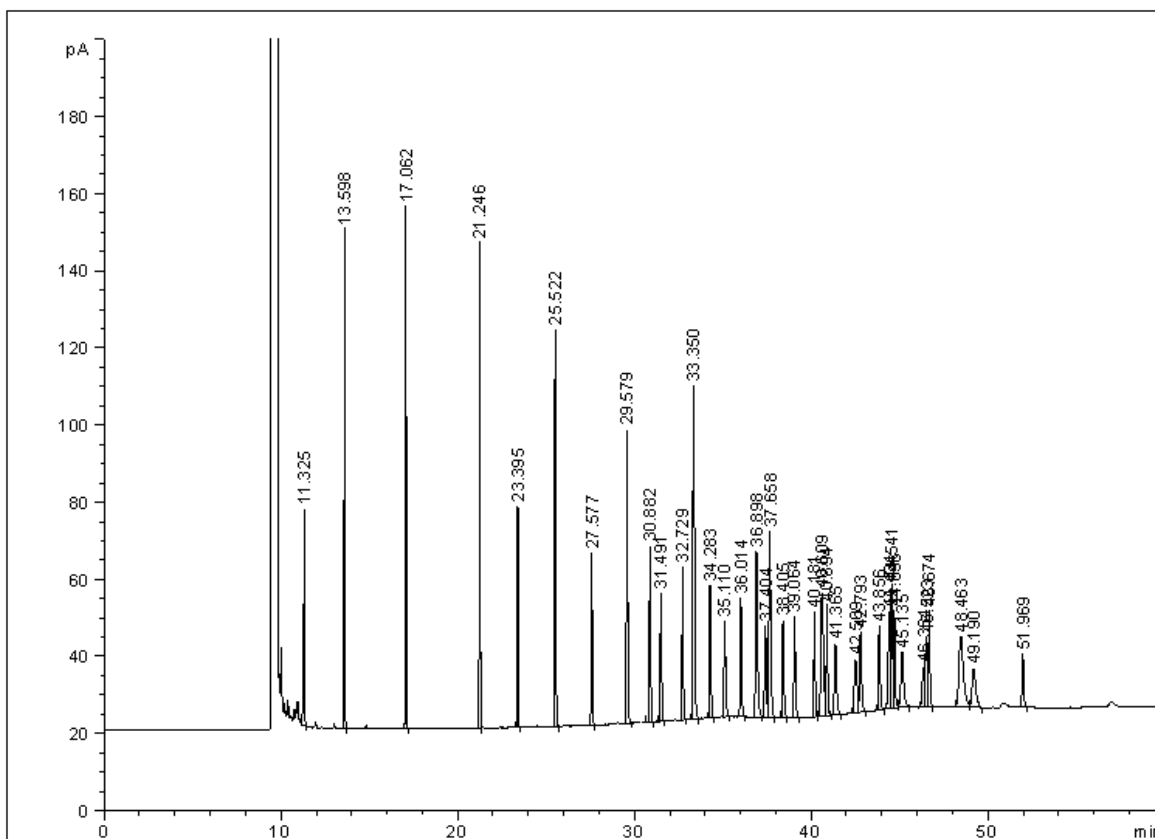
### **3.2.5.3. GC-FID uslovi za hromatografsko razdvajanje MK i izračunavanje procentualnih udela ispitivanih MK u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme**

Sastav MK u lipidnom ekstraktu određen je nakon hromatografskog razdvajanja metil-estara masnih kiselina metodom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom, korišćenjem kapilarne kolone HP-88 (100 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.2  $\mu$ m). Kao noseći gas korišćen je helijum čistoće 5.0 sa protokom od 105 mL/min. Uzorci su injektovani korišćenjem *split* režima na injektoru (100:1), pri temperaturi injektora od 250 °C. Početna temperatura kolone iznosila je 175 °C, a zatim se temperatura kolone povećavala za 5 °C/min do 220 °C. Temperatura detektora iznosila je 280 °C. U tabeli 3 prikazano je multilinearano programiranje temperature kolone na GC-FID hromatografu za razdvajanje metil estara masnih kiselina.

Tabela 3. Multilinearno programiran temperaturni režim kolone na GC-FID hromatografu za razdvajanje metil estara MK.

	<i>Brzina povećanja temperature [°C/min]</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Vreme zadržavanja [min]</i>	<i>Vreme trajanja analize [min]</i>
<i>Početak</i>	-	175	10	10
<i>Prvo povećanje</i>	5	220	41	60

MK su identifikovane na osnovu retencionih vremena MK iz standardne smeše. Na slici 15 prikazan je hromatogram standardne smeše MK.



Slika 15. Hromatogram standardne smeše masnih kiselina.

Kako su rezultati prikazani kao procentualni udeo pojedinačnih MK u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme, na svakom hromatogramu integraljen je isti broj

MK, odnosno isti masnokiselinski profil. MK čiji je procentualni udeo bio manji od 0,5% nisu integraljene.

### **3.2.6. Razdvajanje i određivanje zastupljenosti pojedinih LDL i HDL subfrakcija**

#### **3.2.6.1. Hemikalije i oprema**

Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija je izvršeno vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gradijent gelu. Gustinski gradijent poliakrilamida pripreman je mešanjem 3% i 31% monomera akrilamida i N,N'-metilen-bisakrilamida proizvođača GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija). Monomeri akrilamida su rastvoreni u Tris puferu, pH 8,3, pripremanom od tris(hidroksimetil)aminometana, borne kiseline i Na<sub>2</sub>EDTA (90 mmol/L Tris, 80 mmol/L borna kiselina i 2,5 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA), proizvođača Fisher Chemical (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Priprema poliakrilamidnog gela izvršena je korišćenjem redoks inicijatora, tetramilen-diamina (TEMED) i amonijum-persulfata (APS), nabavljenih od proizvođača GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija). Da bi se postigla dodatna gustina 31% rastvora akrilamida, korišćen je 70% rastvor glicerola, proizvođača Avantor-Macron (Macron, Center Valley, PA, SAD). Gelovi su izlivani koristeći sistem *Hoefler SE 675* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austrija) uz pomoć dve peristaltičke pumpe *Masterflex L/S* (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills, IL, SAD). Elektroforetsko razdvajanje je izvođeno u kadi za vertikalnu elektroforezu *Hoefler SE 600 Ruby* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austrija), pri čemu je korišćen Tris pufer, pH 8,35, proizvođača Fisher Chemical (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD), sledećeg sastava: Tris 90 mmol/L, borna kiselina 80 mmol/L i 2,7 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA). Od istog proizvođača nabavljena je boja bromfenol-plavo, pri čemu je pripreman 0,1% rastvor ove boje u 40% rastvoru saharoze proizvođača Acros Organic (Acros Organic, Geel, Belgija). Kao kalibratori za veličinu HDL i LDL čestica korišćeni su proteinski standardi velike molekulske mase (HMW Native Marker Kit), proizvođača Amersham Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austrija), zatim karboksilovane polistirenske čestice (mikrosfere) dijametra 40 nm (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, SAD) i standardizovana humana plazma koja sadrži dve LDL subfrakcije, a čija je standardizacija izvedena u Laboratoriji za genetiku lipoproteina, Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX, SAD. Za fiksiranje razdvojenih lipoproteinskih frakcija

korišćen je 10% rastvor trihlorsirćetne kiseline (Acros Organic, Geel, Belgija), a za ispiranje 45% rastvor etanola (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Bojenje lipoproteinskih frakcija vršeno je Sudan black B bojom (Merck, Darmstadt, Nemačka) (5 g/L u 45% etanolu). Bojenje proteinskih frakcija standarda vršeno je 0,75% rastvorom boje Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma, St. Louis, MO, SAD) u smeši etanola, sirćetne kiseline (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD) i vode (3:1:8, v/v). Densitometrijska analiza gelova je izvršena na skeneru visoke rezolucije *Image Scanner III* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austrija) sa procesorom (MaxData GmbH, Marl, Nemačka).

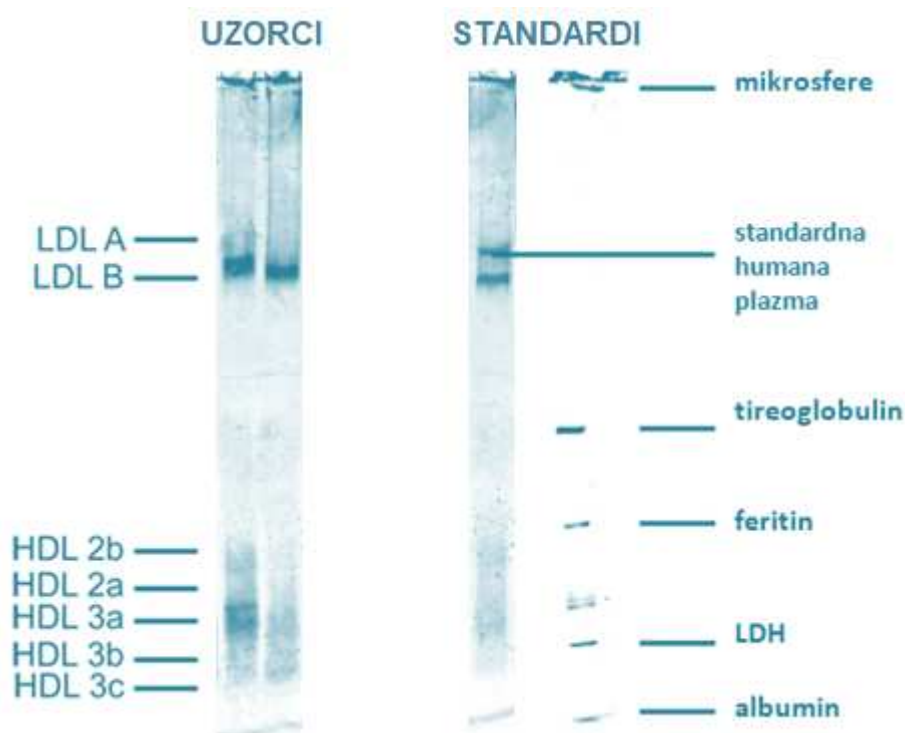
### **3.2.6.2. Izlivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova**

Kompozitni gradijent (3-31%) gelovi, debljine 1,5 mm sa 15 mesta za nanošenje uzoraka su pripremani korišćenjem sistema za izlivanje *Hoefler SE 675*. Potreban koncentracioni gradijent postiže se mešanjem dva monomerna rastvora različitih koncentracija akrilamida u Tris puferu (pH 8,3) pomoću dve peristaltičke pumpe *Masterflex L/S*. Rad pumpi kontroliše softver *Masterflex Linkable Instrument Control Software (WinLIN)*. Mešanjem monomera formira se gradijent poliakrilamida od 12 segmenata. Trinaesti segment sadrži samo 31% poliakrilamid. Na kraju, na dno komore se upumpava rastvor 70% glicerola, kako bi se postiglo podizanje gradijenta. Proces polimerizacije se odvija preko noći na sobnoj temperaturi. Pripremljeni gelovi se konzervišu i čuvaju na 4°C u Tris puferu, pH 8,3 u koji je dodat Na-azid (20 mg/L).

### **3.2.6.3. Gradijent-gel elektroforetsko razdvajanje LDL i HDL subfrakcija**

Elektroforetsko razdvajanje LDL i HDL čestica na gradijentu gustine postiže se pod dejstvom jednosmerne struje, pri konstantnom naponu. Tehnike izlivanja gelova i elektroforetskog razdvajanja zasnovane su na metodi Rainwatera i saradnika [143]. Elektroforetsko razdvajanje se izvodi u vertikalnoj kadi *Hoefler SE 600 Ruby* na temperaturi od 8°C, u Tris puferu, pH 8,35. Na gel se nanosi 25 µL smeše plazme i 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. Istovremeno, u posebne trake na gelu se postavljaju standardi. Elektroforetsko razdvajanje se izvodi pri konstantnom naponu u ukupnom trajanju od 20 časova i 33 minuta. Kalibracija gelova se vrši upotrebom proteinskih standarda velike molekulske mase, standardizovanom humanom plazmom koja sadrži dve LDL subfrakcije i karboksilovanim polistirenskim česticama (mikrosfere).

Nakon završenog elektroforetskog razdvajanja gelovi se fiksiraju sat vremena u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline. Odsečeni deo gela sa uzorcima i standardizovanom humanom plazmom se ispira sat vremena u 45% rastvoru etanola, nakon čega sledi bojenje u rastvoru Sudan black B (5 g/L u 45% etanolu) i odbojavanje u 45% etanolu preko noći. Deo gela sa proteinskim standardima se nakon fiksiranja ispira sat vremena u destilovanoj vodi i boji 5 sati sa 0,75% rastvorom boje Coomassie brilliant blue G-250. Višak boje se uklanja pomoću smeše etanola, sirćetne kiseline i vode (3:1:8, v/v). Na slici 16 su prikazane lipoproteinske subfrakcije i standardi nakon sprovedene gore opisane procedure.



Slika 16. Vizualizacija lipoproteinskih subfrakcija uzoraka i standarda nakon elektroforetskog razdvajanja i bojenja gela. (Prikazan je deo gela sa razdvojenim lipoproteinskim subfrakcijama dva uzorka i deo gela sa standardima).

#### 3.2.6.4. Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija

Denzitometriranje gelova rađeno je na skeneru Image Scanner III uz primenu programa Magic Scan software (version 4,6;1999; UMAX Data Systems, Inc). Analiza gelova se vrši u programu Image Quant software (version 5.2;1999; Molecular Dynamics). Kalibraciona kriva za LDL subfrakcije sačinjena je od mikrosfera (40,0 nm), dve standardizovane LDL subfrakcije (26,99 i 25,52 nm) i tireoglobulina (17,0 nm). Za

kalibraciju HDL subfrakcija korišćeni su tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12,2 nm), laktat dehidrogenaza (8,4 nm) i albumin (7,1 nm).

Nakon elektroforetskog razdvajanja, analizirane su karakteristike LDL i HDL subfrakcija, što je podrazumevalo: određivanje dominantnog LDL i HDL dijametra, identifikaciju LDL i HDL fenotipova i određivanje udela pojedinačnih LDL i HDL subfrakcija. LDL fenotip A je okarakterisan dominantnim dijametrom LDL čestica  $>25,5$  nm, dok je kod LDL fenotipa B dominantni dijametar LDL čestica  $\leq 25,5$  nm. HDL fenotip 2 karakteriše prisustvo dominantnog dijametra čestica  $>8,8$  nm, a HDL fenotip 3 dijametar  $\leq 8,8$  nm. Karakteristike gelova omogućavale su razdvajanje i identifikaciju 7 LDL (LDL I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA i IVB) i 5 HDL (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) subfrakcija. Na osnovu površina pikova dobijenih denzitometriranjem, određivan je relativni udeo (%) svake pojedinačne subfrakcije u ukupnom LDL ili HDL profilu ispitanika. Relativni udeo sdLDL čestica predstavlja zbir relativnih udela LDL III i IV subfrakcija, dok relativni udeo malih HDL čestica predstavlja zbir relativnih udela HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija u ispitivanom uzorku.

### ***3.2.7. Određivanje koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola***

#### ***3.2.7.1. Hemikalije i oprema***

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju NHS korišćen je GC-FID proizvođača Agilent Technology, model A7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) i nepolarna kapilarna kolona HP-5 ((5%-fenil)-metilpolisiloksan), dimenzija  $30\text{m}\times 0,32\text{mm}\times 0,25\mu\text{m}$ , istog proizvođača. Pored ove kolone, u procesu postavljanja metode, korišćene su i DB-17MS ((50%-fenil)-metilpolisiloksan) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) kapilarna kolona, dimenzija  $30\text{m}\times 0,25\text{mm}\times 0,25\mu\text{m}$ , kao i kolona ZB-5MS (5%-fenil-arilen, 95%-dimetilpolisiloksan) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD), dimenzija  $30\text{m}\times 0,25\text{mm}\times 0,25\mu\text{m}$ . ZB-5MS kolona korišćena je i za kvalitativnu potvrdu pikova od interesa na GC-MS-u proizvođača Agilent Technology, model 6890N/5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Identifikacija i kvantifikacija pikova markera sinteze i apsorpcije holesterola, odnosno dezmosterola, latosterola, kampesterola, stigmasterola i  $\beta$ -sitosterola, izvršena je pomoću autentičnih standarda GC čistoće (Supelco, Bellefonte, PA, SAD). Kao interni standard (IS) korišćen je  $5\alpha$ -holestan GC čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) za izračunavanje prinosa ekstrakcije, a od

istog proizvođača nabavljen je i komercijalni metanolni rastvor kalijum-hidroksida (KOH), koncentracije 0,5 mol/L, koji je korišćen za pripremu uzoraka bez procesa derivatizacije. IS je korišćen u koncentraciji 1 mg/mL, rastvoren u hloroformu (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Za tečno-tečnu ekstrakciju, prilikom pripreme uzoraka bez procesa derivatizacije, upotrebljen je petroletar (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD).

U postupku pripreme uzoraka, koji je uključivao i proces derivatizacije, kao IS takođe je korišćen 5 $\alpha$ -holestan u koncentraciji 1 mg/mL, ali rastvoren u n-heksanu HPLC čistoće (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Za pripremu uzoraka korišćeni su 8,9 mol/L vodeni rastvor KOH (POCH, Center Valley, PA, SAD) i etanol HPLC čistoće (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Silanizacija alkoholne grupe sterola izvršena je pomoću komercijalnog reagensa Sylon™ HTP koji se sastojao iz 1,1,1,3,3,3-heksametildisiloksan + trimetilhlorsilan + piridin (HMDS + TMCS+ Pyridine) (3:1:9, v/v) (Supelco, Bellefonte, PA, SAD). Za procenu prinosa derivatizacije na osnovu procentualnog odnosa nederivatizovanog i derivatizovanog holesterola, primenjen je standard holesterola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Postupak pripreme standarda i uzoraka sproveden je u borosilikatnim staklenim epruvetama od 15 mL sa poklopcima od inertnog politetrafluoroetilena (PTFE) proizvođača Cole-Parmer (Cole-Parmer, Chicago, IL, SAD). U procesu pripreme uzoraka, za adekvatno razdvajanje slojeva prilikom postupka LLE, korišćena je Eppendorf centrifuga model 5702 (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). U procesu ispitivanja stabilnosti uzoraka, kao antioksidans, upotrebljen je komercijalno dostupan, u vodi rastvoran, analog vitamina E, Trolox® (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), proizvođača Acros Organics (Acros Organic, Geel, Belgija).

Priprema staklenog laboratorijskog posuđa izvršena je pranjem hromsumpornom kiselinom i acetonom proizvođača Zorka Pharma (Zorka farma, Šabac, Srbija), a zatim i n-heksanom HPLC čistoće. Za ispitivanje interferencije plastičnog laboratorijskog posuđa korišćene su Pasterove pipete zapremine 3 mL (LLG, Meckenheim, Nemačka).

Proces pripreme uzoraka za dokazivanje ftalata u organskim ekstraktima uključivao je primenu ekstrakcije tetrahidrofuranom i n-heksanom, kao i rekonstituisanje u acetonitrilu. Svi rastvarači su bili HPLC čistoće, nabavljeni od firme Fisher Chemical (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, SAD). Hromatografska analiza je sprovedena na Agilent 1200 HPLC/DAD systemu (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), uz linearni gradijent mobilnih faza (acetonitril:voda, HPLC čistoće).



Kvalitativna potvrda pikova od interesa izvršena je na osnovu izračunavanja retencionih indeksa korišćenjem C8-C40 mešavine serije alkana kao homologih internih standarda (Supelco, Bellefonte, PA, SAD).

Helijum (5.0 čistoće), sintetički vazduh bez prisutnih ugljovodonika (5.0), vodonik (5.0) i azot (3.5, i 5.0) isporučeni su od strane Messer Grupe (Messer Group, Bad Soden, Nemačka).

### ***3.2.7.2. Postupak razvoja i optimizacije metode za kvantitativno određivanje NHS***

#### ***3.2.7.2.1. Priprema staklenog laboratorijskog posuđa***

Borosilikatno staklo (epruvete, čaše, pipete, volumetrijski normalni sudovi, itd.) i laboratorijsko plastično posuđe izrađeno od polietilena visoke gustine (nastavci za pipete, Pasterove pipete, itd.) su korišćeni za rukovanje standardima i uzorcima tokom čitavog preanalitičkog i analitičkog procesa. Da bi se izbegle moguće interferencije, sprovedena je rigorozna procedura pranja stakla koja je podrazumevala pranje posuđa anjonskim deterdžentom, pijaćom vodom i destilovanom vodom, a zatim uranjanje staklenog posuđa preko noći u hromsumpornu kiselinu, ispiranje u destilovanoj vodi i sušenje na 100 °C. Stakleno posuđe je dva puta ispirano acetonom, a zatim n-heksanom HPLC čistoće. Izostavili smo preanalitički proces silanizacije staklenih epruveta koje su korišćene za pripremu uzoraka, a koji neki autori navode kao neophodan [93]. Naša preliminarna studija procene prinosa derivatizacije pokazala je da ovaj korak nije neophodan za dobijanje zadovoljavajućeg prinosa derivatizacije.

#### ***3.2.7.2.2. Postupak pripreme uzoraka bez procesa derivatizacije NHS***

U početku smo testirali postupak pripreme uzorka koji je obuhvatao proces alkalne hidrolize i ekstrakciju neosapunjive frakcije lipida, ali bez njihovog prevođenja u trimetilsilil etarske derivate. Prema protokolu Matthana i saradnika [76], 150 mL IS (5- $\alpha$ -holestana) rastvorenog u hloroformu, koncentracije 1 mg/mL dodato je u epruvete od borosilikatnog stakla sa PTFE zatvaračima i upareno do suva u struji azota (čistoće 3.5). U tako pripremljene epruvete dodat je 1 mL EDTA plazme, a zatim 5 mL 0,5 mol/L metanolnog rastvora KOH. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na 100 °C. Nakon završenog procesa inkubacije, epruvete su ohlađene do sobne temperature i proces tečno-tečne ekstrakcije je izvršen dodavanjem 2,5 mL destilovane vode i 3 mL petroletra uz

mešanje slojeva na vorteks-mešalici. NHS, kao neosapunjiva lipidna frakcija, ekstrahovani su u gornjem, petroletarskom sloju nakon centrifugiranja epruveta na 1500 rcf tokom 15 min. Petroletarski sloj je potom prenet u čiste staklene epruvete, a postupak ekstrakcije je ponovljen još dva puta. Sakupljeni ekstrakti su osušeni u struji azota i neposredno pre GC-FID analize, rekonstituisani u 1 mL hloroforma [76].

### 3.2.7.2.3. Hromatografski uslovi radvavanja NHS

Parametri na GC-FID aparatu su inicijalno optimizovani na Agilent Technology HP-5 koloni. Na početku, korišćen je izotermalni režim rada, pri čemu je injektovano 5 µL rekonstituisanog ekstrakta, korišćenjem *split* režima na injektoru (9:1). Temperatura injektora je bila 300 °C, kolone 280 °C, a detektora 310 °C. Razdvajanje je vršeno pod konstantnim pritiskom od 9,26 psi i protokom helijuma od 0,78 mL/min. Ukupno vreme trajanja hromatografske analize iznosilo je 35 minuta. Optimizacijom su uspostavljeni sledeći instrumentalni uslovi koji su podrazumevali zapreminu injektovanja od 5 µL, primenom *split* režima 9:1 i temperaturu injektora od 280 °C. Temperaturne promene na koloni su multilinearano programirane na sledeći način: inicijalna temperatura je iznosila 150 °C, sa zadržavanjem od 3 min; porast temperature do 280 °C brzinom od 30 °C/min, uz zadržavanje od 28 minuta; porast temperature do 295 °C brzinom od 10 °C/min, uz održavanje temperature 10 minuta. Temperatura detektora je iznosila 300 °C, a kao noseći gas je korišćen helijum (čistoće 5.0), pri konstantnom pritisku od 9,26 psi i protoku od 1,23 mL/min. Ukupno vreme trajanja analize iznosilo je 47 min. U tabeli 4 prikazano je multilinearano programiranje temperature (*engl. multi-ramp*).

Tabela 4. Multilinearano programiranje temperature (*engl. multi-ramp*).

	<i>Brzina povećanja temperature [°C/min]</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Vreme zadržavanja [min]</i>	<i>Vreme trajanja analize [min]</i>
<i>Početak</i>	-	150	3	3
<i>Prvo povećanje</i>	30	280	28	35,33
<i>Drugo povećanje</i>	10	295	10	46,83

Pod istim hromatografskim uslovima testirano je razdvajanje na još dve GC kolone različite debljine filma i polarnosti u cilju postizanja zadovoljavajućeg razdvajanja analita

od interesa. Korišćene su Agilentova DB-17MS i Phenomenex ZB-5MS kolone. U cilju daljeg poboljšanja hromatografskih performansi, pored helijuma, testiran je i azot (čistoće 5.0) kao noseći gas. Pikovi od interesa su identifikovani upoređivanjem sa pikovima standardnih rastvora sterola, kao i pomoću Kovačevih retencionih indeksa [144], korišćenjem C8-C40 mešavine serije n-alkana.

Postupak pripreme uzoraka bez procesa derivatizacije, kao i hromatografski uslovi opisani u ovom poglavlju, nisu dali adekvatno hromatografsko razdvajanje pikova od interesa.

#### *3.2.7.2.4. Postupak pripreme uzoraka sa procesom derivatizacije NHS*

Priprema uzoraka koja je uključivala proces derivatizacije sprovedena je prema modifikovanoj proceduri koju su predložili Wu i saradnici [36]. Ovim postupkom testirali smo uticaj procesa derivatizacije (prevođenja NHS u trimetilsilil etre), uz korišćenje manje zapremine uzoraka, na postizanje boljih hromatografskih karakteristika. U borosilikatne staklene epruvete sa PTFE zatvaračima ispipetirano je 100  $\mu$ L rastvora internog standarda (5- $\alpha$ -holestana), rastvorenog u n-heksanu, koncentracije 1 mg/mL. Nakon toga, IS je u struji azota uparen do suva. U tako pripremljene epruvete, dodato je 100  $\mu$ L EDTA plazme, a zatim 1 mL apsolutnog etanola i 960  $\mu$ L rastvora KOH koncentracije 8,9 mol/L. Smeša je promešana 15 s na vorteks-mešalici i saponifikacija je izvršena na temperaturi od 67°C u trajanju od jednog sata. Nakon inkubacije, epruvete su ohlađene do sobne temperature i izvršena je tečno-tečna ekstrakcija NHS, sa dodatkom 1 mL destilovane vode i 2 mL n-heksana. Sadržaj u epruvetama je promešan, a zatim centrifugiran na 1500 rcf u trajanju od 5 minuta. Proces ekstrakcije ponovljen je još dva puta, a gornja, organska faza, pažljivo je prenetu staklenom pipetom u čistu staklenu epruvetu. Kako bi prinos ekstrakcije bio što bolji, ista staklena pipeta je korišćena za transfer organskog sloja nakon sva tri procesa ekstrakcije. U sledećem koraku, 4 mL dejonizovane vode je dodato u sakupljeni ekstrakt, promešano na vorteks-mešalici, a zatim centrifugirano 5 min na 1500 rcf. Ova procedura desalinizacije ponovljena je dva puta, a gornji sloj je ponovo sakupljan i prebačen staklenom pipetom u čistu staklenu epruvetu. Dobijeni ekstrakti upareni su do suva u struji azota na sobnoj temperaturi, pre dodavanja derivatizujućeg reagensa. Prevođenja NHS u trimetilsilil etre izvršeno je dodavanjem 220  $\mu$ L komercijalnog derivatizujućeg reagensa Sylon™ HTP, u trajanju od sat vremena na temperaturi od 67 °C.

Na slici 17 prikazana je reakcija prevođenja holesterola u trimetilsilil etarski derivat holesterola.



Slika 17. Reakcija holesterola sa trimetilsilil reagensom. (X – halogeni element)

Nakon završenog procesa derivatizacije, epruvete su ohlađene do sobne temperature, sadržaj je kratko promešan, a zatim su derivatizovani ekstrakti osušeni u struji azota pod strogo kontrolisanim uslovima vlažnosti atmosfere u kojoj se vršilo uparavanje. Rekonstituisanje uparenih derivatizovanih ekstrakata izvršeno je sa 300  $\mu$ L n-heksana (HPLC čistoće), neposredno pre izvođenja hromatografske analize.

#### 3.2.7.2.5. Hromatografski uslovi razdvajanja trimetilsilil etara NHS

Hromatografsko razdvajanje i kvantitativno određivanje derivata NHS postignuto je korišćenjem Agilent HP-5 nepolarne kapilarne kolone. Za injektovanje 1  $\mu$ L rekonstituisanog derivatizovanog ekstrakta na kolonu, korišćen je *splitless* režim injektovanja. Uspostavljeno je multilinearano programiranje temperaturnih promena na koloni, sa početnom temperaturom od 150  $^{\circ}$ C koja je održavana 3 min. Zatim je primenjeno linearno povećanje temperature do 250  $^{\circ}$ C, brzinom od 30  $^{\circ}$ C/min, nakon čega je usledilo još jedno linearno povećanje temperature kolone brzinom od 5  $^{\circ}$ C/min do temperature od 270  $^{\circ}$ C, koja je bila održavana 30 minuta. Kao gas nosač najpre je korišćen azot čistoće 5.0 sa protokom od 2,73 mL/min i konstantnim pritiskom od 15 psi. Optimalno razdvajanje pikova od interesa postignuto je korišćenjem helijuma (čistoće 5.0) kao nosećeg gasa. Konstantni pritisak od 15 psi i protok od 2,28 mL/min su primenjivani tokom celog procesa hromatografskog razdvajanja. Temperature injektora i detektora su iznosile 290  $^{\circ}$ C, a ukupno vreme hromatografskog razdvajanja iznosilo je 40.33 min. U tabeli 5 prikazano je multilinearano programiranje temperature (*engl. multi-ramp*).

Tabela 5. Multilinearno programiranje temperature (*engl. multi-ramp*).

	<i>Brzina povećanja temperature [°C/min]</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Vreme zadržavanja [min]</i>	<i>Vreme trajanja analize [min]</i>
<i>Početak</i>	-	150	3	3
<i>Prvo povećanje</i>	30	250	0	6,33
<i>Drugo povećanje</i>	5	270	30	40,33

Pikovi od interesa su identifikovani upoređivanjem sa pikovima standardnih rastvora derivatizovanih sterola. Za identifikaciju su korišćeni redukovano retenciono vreme ( $t_r$ ) i relativno retenciono vreme ( $r$ ) NHS. Redukovano retenciono vreme je vreme koje ispitivana supstanca provede u stacionarnoj fazi i računa se prema formuli  $t_r = t_r - t_0$ , pri čemu  $t_0$  predstavlja retenciono vreme n-heksana. Relativno retenciono vreme predstavlja odnos redukovanih retencionih vremena odgovarajućeg sterola i internog standarda. Takođe, pod istim hromatografskim uslovima, na analitičkoj koloni istih dimenzija i istog sastava mobilne faze (ZB5-MS), na GC-MS hromatografu, analizirani su standardni rastvori NHS i derivatizovani uzorci seruma i plazme. Pojedinačni pikovi od interesa su identifikovani pomoću *National Institute of Standards and Technology/National Bureau of Standards* (NIST/NBS) i *Wiley MS* spektralnih biblioteka, upoređivanjem dobijenog masenog spektra sa dostupnim podacima kao i poređenjem njihovih retencionih indeksa (RI) sa podacima iz literature [145]. RI su izračunati pomoću linearne interpolacije, u odnosu na homolognu seriju n-alkana (C8-C40) analiziranih pod istim uslovima [144].

Postupak pripreme uzoraka koji je uključivao proces prevođenja NHS u njihove trimetilsilil derivate, kao i gore opisani hromatografski uslovi, dali su optimalne proceduralne i instrumentalne uslove za razdvajanje pikova od interesa.

### ***3.3. Validacija metode za kvantitativno određivanje NHS***

Nakon uspostavljanja analitičkih uslova koji su obezbedili dobro razdvajanje svih pet NHS, protokol za validaciju metode, a prema preporukama Američke Uprave za hranu i lekove (*Food and Drug Administration – FDA*) [146], obuhvatao je sledeće korake:

- ✓ Ispitivanje preanalitičkih faktora uticaja na kvantitativnu analizu NHS;
- ✓ Ispitivanje linearnosti metode;

- ✓ Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije metode;
- ✓ Ispitivanje preciznosti metode;
- ✓ Ispitivanje tečnosti metode (*Recovery test*);
- ✓ Ispitivanje stabilnosti uzoraka;
- ✓ Klinička verifikacija limita detekcije i limita kvantifikacije;

### ***3.3.1. Evaluacija preanalitičkih i analitičkih faktora uticaja na kvalitativno određivanje NHS***

U ovom eksperimentu testirali smo različite preanalitičke i analitičke faktore uticaja na kvantitativno određivanje NHS, adekvatan odabir biološkog materijala, kao i uticaj uslova i dužine skladištenja uzoraka u kojima se određuju NHS. U ovu svrhu korišćeni su *pool*-ovi seruma i plazme dobijeni od 10 zdravih ispitanika. Procedura pripreme uzoraka uključivala je proces derivatizacije (v. poglavlje 3.2.7.2.4.) i primenjeni su hromatografski uslovi za razdvajanje pikova od interesa, opisani u poglavlju 3.2.7.2.3.

#### ***3.3.1.1. Procena prinosa ekstrakcije***

Operativni uslovi i sama tehnika LLE imaju uticaj na prinos, kinetiku i sastav vodeno-heksanskih ekstrakata biološkog materijala. Za kvantifikaciju NHS, neophodno je uračunati i njihov sadržaj izgubljen u procesu tečno-tečne ekstrakcije. Zbog toga je bilo neophodno uključiti prinos ekstrakcije u proračun za kvantitativni sadržaj NHS. U tu svrhu korišćena je serija od 10 epruveta sa IS, pripremljenih za određivanje NHS. Epruvete su sadržale 100  $\mu$ L rastvora IS u n-heksanu, koncentracije 1 mg/mL, koji je u struji azota uparen do suva. Sadržaj epruveta je neposredno pre izvođenja hromatografske analize rekonstituisan u 300  $\mu$ L n-heksana HPLC čistoće, što je zapremina u kojoj se rekonstituišu finalni uzorci nakon procesa derivatizacije. Srednja vrednost površine pika IS dobijena tokom ovih 10 analiza (PIK IS) je korišćena kao apsolutna vrednost sadržaja IS u epruvetama spremljenim za dalji postupak pripreme uzoraka. Ta vrednost korišćena je za poređenje sa vrednostima površine pikova IS dobijenih nakon hromatografske analize pripremljenih uzoraka (PIK IS<sub>uzorka</sub>), te za izračunavanje prinosa ekstrakcije tokom pripreme uzorka. Odnos srednje vrednosti površina pikova IS dobijene nakon 10 hromatografskih analiza IS (PIK IS) i površine pika IS dobijene nakon hromatografske analize uzorka (PIK IS<sub>uzorka</sub>) predstavlja korekcionni faktor ekstrakcije (KFE):

$$KFE = PIK IS / PIK IS_{uzorka}$$

Vrednosti površina pikova NHS su pomnožene sa vrednošću KFE za dati uzorak, kako bi se izvršila korekcija za prinos ekstrakcije.

### 3.3.1.2. Procena prinosa derivatizacije

Očekivano je da u modernim laboratorijskim uslovima reakcija prevođenja NHS u njihove trimetilsilil derivate bude ponovljiva i pouzdana. Međutim, iako su za derivatizaciju korišćeni komercijalni reagensi, koji obezbeđuju veliki prinos reakcije, za kvantifikaciju NHS važno je uračunati svaki gubitak analita. Zbog toga je važno proceniti prinos derivatizacije. Za procenu prinosa derivatizacije, korišćena je procentualna zastupljenost derivatizovanog holesterola (DH), odnosno nederivatizovanog (NH) u odnosu na ukupan holesterol prisutan u uzorku, koji predstavlja zbir NH i DH. Kako se hemijski prinos reakcije izražava kao procenat od ukupne teorijske količine produkata, u tu svrhu smo za procenu prinosa derivatizacije koristili međusobnu procentualnu zastupljenost DH i NH. Kako u reakciji prevođenja sterola u trimetilsilil etre, iz jednog mola sterola nastaje jedan mol odgovarajućeg trimetilsilil derivata, korišćenjem jednog od dva izraza za korekcionu faktor derivatizacije (KFD) moguće je korigovati gubitka analita tokom procesa derivatizacije:

$$KFD = \frac{100}{DH}$$

$$KFD = \frac{100}{100 - NH}$$

Nakon korekcije za prinos ekstrakcije, množenjem dobijene vrednosti sa KFD vrednošću za dati uzorak, izvršena je i korekcija za prinos derivatizacije.

Da bismo utvrdili kolika je optimalna vrednost zapremine derivatizujućeg reagensa, sa kojom se postiže zadovoljavajući prinos derivatizacije, u kvintuplikatu smo titrirali uzorke seruma i plazme sa različitim zapreminama derivatizujućeg reagensa (120, 150, 180, 200 i 220  $\mu$ L). Zahvaljujući ovome dobili smo različite vrednosti prinosa derivatizacije. Na ovaj način je utvrđena granična vrednost za prinos derivatizacije koja

nakon korekcije za KFD može da da tačan rezultat. Nakon odabira adekvatne zapremine derivatizujućeg reagensa, testirali smo i optimalne uslove inkubacije reakcione smeše. Na temperaturi od 67 °C, u kvintuplikatu je testiran optimalni vremenski period trajanja procesa inkubacije od 30, 60 i 80 min sa adekvatnom zapreminom derivatizujućeg reagensa.

### ***3.3.1.3. Ispitivanje uticaja upotrebe plastičnog laboratorijskog potrošnog materijala na kvantifikaciju NHS***

U toku procesa ekstrakcije, za izdvajanje heksanskog sloja prvobitno su korišćene Pasterove pipete zapremine 3 mL. Heksan, koji je korišćen kao nepolarni organski rastvarač u procesu tečno-tečne ekstrakcije, deluje na polietilenske polimere niske gustine, od kojih su pipete sačinjene, pri čemu dolazi do degradacije polimera i oslobađanja njihovog sadržaja. Ispitivanje interferencije oslobođenog materijala na prinos derivatizacije i kvantifikaciju NHS sprovedeno je tako što je 1 mL n-heksana, ostavljen u Pasterovoj pipeti 30 minuta na sobnoj temperaturi (prosečno vreme izvođenja ekstrakcije i kontakta organskog rastvarača sa plastikom). Sadržaj koji se oslobodio iz plastike u organski rastvarač analiziran je pomoću GC-MS spektralne analize, gde su pojedinačne komponente identifikovane pomoću *National Institute of Standards and Technology/National Bureau of Standards* (NIST/NBS) i *Wiley MS* spektralnih biblioteka, kao i poređenjem njihovih retencionih indeksa (RI) sa podacima iz literature [145]. RI su izračunati pomoću linearne interpolacije, u odnosu na homolognu seriju n-alkana (C8-C40) analiziranih pod istim uslovima [144].

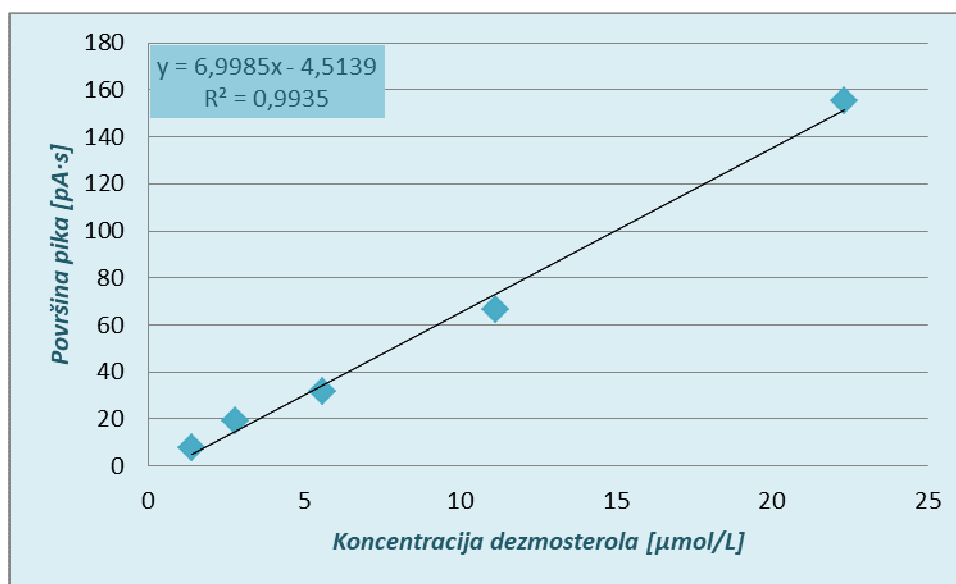
Prisustvo ftalata analizirano je validiranom HPLC/UV metodom, koja se rutinski koristi u Institutu za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" [147]. Ftalati su ekstrahovani korišćenjem THF/n-heksana, a zatim upareni u struji azota čistoće 3.5. Upareni ekstrakti su neposredno pred hromatografsku analizu rekonstituisani u acetonitrilu, a hromatografsko razdvajanje je izvršeno pomoću linearnog gradijenta mobilnih faza acetonitril:voda od 90:10 do 100:0.

### ***3.3.1.4. Izrada kalibracionih krivih za NHS i ispitivanje linearnosti***

Da bi se iz površina pikova odredile koncentracije pojedinih NHS, pripremane su kalibracione krive (x-osa: koncentracije standarda; y-osa: površine pikova). Standardi iz kojih su konstruisane kalibracione krive dobijeni su serijom razblaženja primarnog



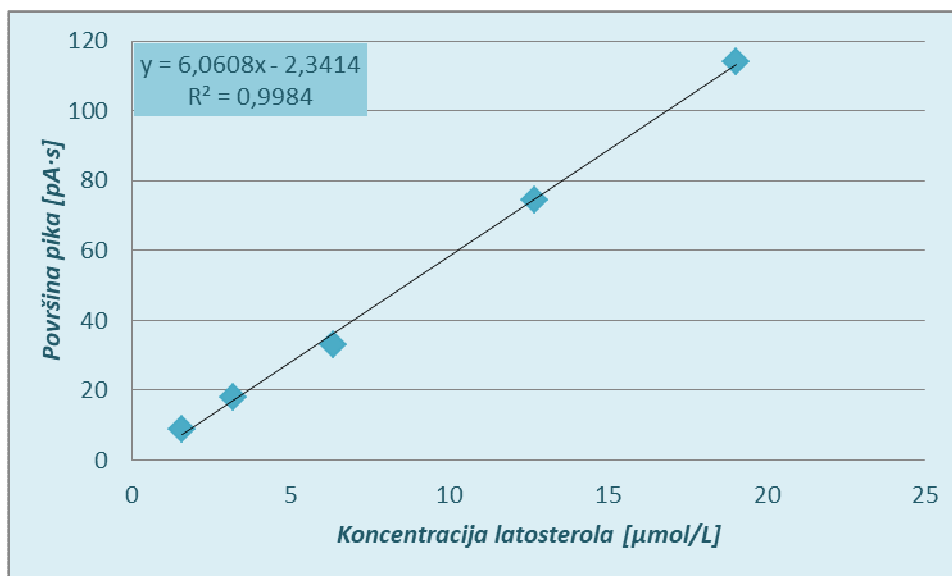
standarda i uključivale su po pet različitih koncentracija. Pripremljeni standardi su derivatizovani i analizirani korišćenjem optimizovane metode. Za izradu kalibracione krive za dezmosterol, korišćen je raspon koncentracija od 1,39 do 22,30  $\mu\text{mol/L}$ , dok je za latosterol korišćen raspon koncentracija od 1,59 do 19,05  $\mu\text{mol/L}$ . Za izradu kalibracione krive za kampesterol korišćena je serija standarda u koncentracionom opsegu od 1,85 do 44,31  $\mu\text{mol/L}$ , za stigmasterol u opsegu od 0,98 do 15,69  $\mu\text{mol/L}$ , dok je za  $\beta$ -sitosterol korišćen raspon koncentracija od 1,67 do 26,79  $\mu\text{mol/L}$ . Na slici 18 prikazana je kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive prema kojoj je izračunata vrednost koncentracija dezmosterola kod svih ispitanika.



Slika 18. Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive za izračunavanje koncentracija dezmosterola.

Nakon provere dobijene kalibracione krive statističkom metodom linearne regresione analize dobijeni su sledeći parametri: koeficijent korelacije ( $r$ ) = 0,997; jednačina prave  $y = 6,9985x + 4,5139$ ;  $t_a = -1,196 < t_t = 2,776$  (odsečak  $a$  na  $y$ -osi nije statistički značajno različit od nule). Zaključeno je da je kalibraciona kriva zadovoljila postavljene kriterijume i da može da se koristi za očitavanje koncentracija dezmosterola u uzorcima.

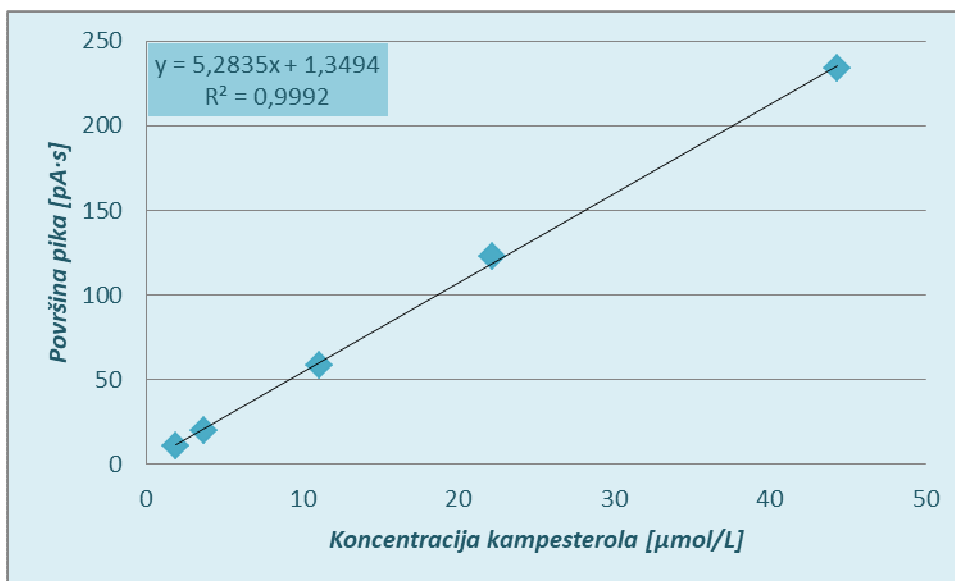
Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive prema kojoj su izračunate vrednosti koncentracija latosterola kod svih ispitanika, prikazana je na slici 19.



Slika 19. Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive za izračunavanje koncentracija latosterola.

Dobijena kalibraciona kriva je proverena statističkom metodom linearne regresione analize pri čemu su dobijeni sledeći parametri: koeficijent korelacije ( $r$ ) = 0,9992; jednačina prave  $y = 6,0608x + 2,3414$ ;  $t_a = -1,551 < t_t = 2,776$  (odsečak  $a$  na  $y$ -osi nije statistički značajno različit od nule). Iz ovoga smo zaključili da dobijena kalibraciona kriva zadovoljava postavljene kriterijume i da može da se koristi za očitavanje koncentracija latosterola u uzorcima.

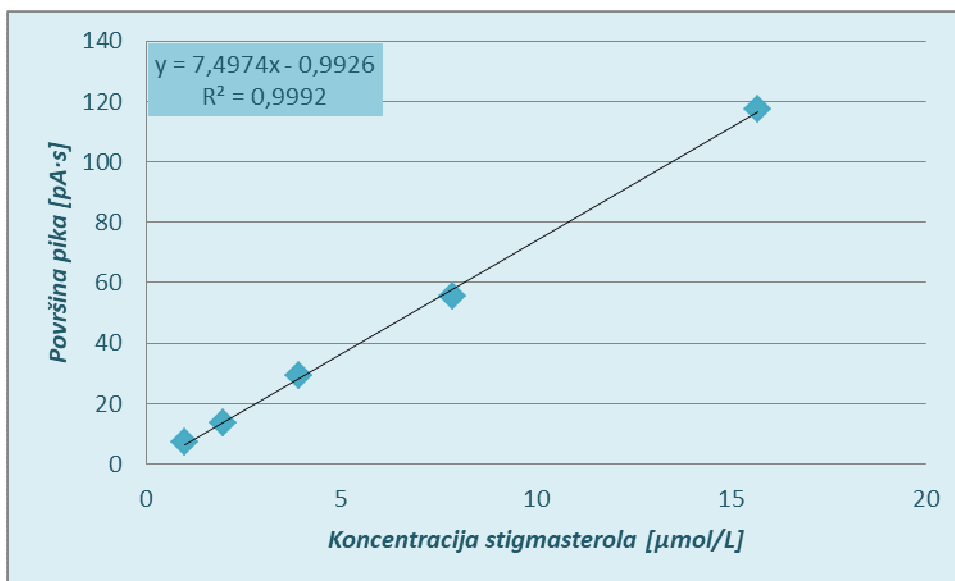
Koncentracije kampesterola za sve ispitanike izračunate su iz kalibracione krive i jednačine krive prikazane na slici 20.



Slika 20. Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive za izračunavanje koncentracija kampesterola.

Linearnom regresionom analizom dobijeni su sledeći parametri: koeficijent korelacije ( $r$ ) = 0,9996 ; jednačina prave  $y = 5,2835x + 1,3494$ ;  $t_a = 0,693 < t_t = 2,776$  (odsečak  $a$  na  $y$ -osi nije statistički značajno različit od nule). Postavljeni kriterijumi su zadovoljeni, te je kriva korišćena za očitavanje koncentracija kampesterola u uzorcima.

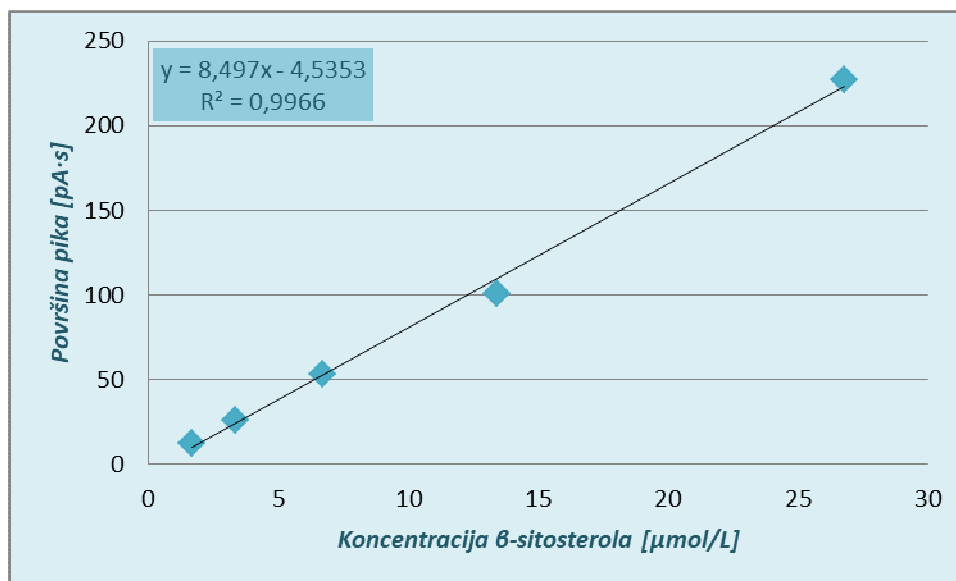
Koncentracije stigmasterola za sve ispitanike izračunate su iz kalibracione krive i jednačine krive prikazane na slici 21.



Slika 21. Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive za izračunavanje koncentracija stigmasterola.

Dobijena kalibraciona kriva je analizirana statističkom metodom linearne regresije, pri čemu su dobijeni sledeći parametri: koeficijent korelacije ( $r$ ) = 0,9996; jednačina prave  $y = 7,4974x - 0,9926$ ;  $t_a = -0,989 < t_t = 2,776$  (odsečak  $a$  na  $y$ -osi nije statistički značajno različit od nule). Na osnovu dobijenih rezultata zaključili smo da kalibraciona kriva zadovoljava postavljene kriterijume i da se može koristiti za očitavanje koncentracija stigmasterola u uzorcima.

Na slici 22 prikazana je kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive prema kojoj je izračunata koncentracija  $\beta$ -sitosterola kod svih ispitanika.



Slika 22. Kalibraciona kriva i jednačina kalibracione krive za izračunavanje koncentracija  $\beta$ -sitosterola.

Dobijena kalibraciona kriva je proverena statističkom metodom linearne regresione analize pri čemu su dobijeni sledeći parametri: koeficijent korelacije ( $r$ ) = 0,9983; jednačina prave  $y = 8,497x - 4,5353$ ;  $t_a = -1,137 < t_t = 2,776$  (odsečak  $a$  na  $y$ -osi nije statistički značajno različit od nule). Iz ovoga smo zaključili da dobijena kalibraciona kriva zadovoljava postavljene kriterijume i da može da se koristi za očitavanje koncentracija  $\beta$ -sitosterola u uzorcima.

Pre izračunavanja koncentracija NHS, pikovi analita od interesa su korigovani korekcionim faktorima (KFE i KFD). Dobijene korigovane vrednosti površina pikova su uvedene u jednačine kalibracionih krivih i korišćene su za izračunavanje koncentracija NHS u ispitivanim uzorcima.

Koncentracije NHS su prikazane kao apsolutne vrednosti i kao relativne (apsolutne vrednosti podeljene sa vrednošću ukupnog holesterola).

### **3.3.1.5. *Određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije metode za određivanje NHS***

Limit detekcije (*engl. Limit of detection – LOD*) ili kako se još naziva granica detekcije predstavlja najnižu koncentraciju analita od interesa koja se može detektovati u uzorku, ali ne i kvantitativno odrediti. Postoji nekoliko načina za određivanje LOD vrednosti, ali preporuka FDA vodiča za validaciju metoda je da se kod hromatografskih tehnika ova vrednost dobija eksperimentalno, na osnovu odnosa signala i šuma bazne linije (*engl. Signal to noise ratio – S/N*) [146]. Prilikom validacije ove metode, za LOD odabrana je ona koncentracija koja daje  $S/N = 3$ . Za dobijanje vrednosti LOD, standardni rastvori za svaki analit od interesa razblaživani su do one koncentracije koja na aparatu, prilikom hromatografskog razdvajanja pod strogo kontrolisanim uslovima, daje odnos signala i šuma jednak 3. Za svaki analit od interesa, razblaženi uzorci standardnih rastvora su analizirani u kvintuplikatu, pri čemu LOD predstavlja srednju vrednost ovih određivanja.

Limit kvantifikacije (*engl. Limit of quantification – LOQ*) ili kako se još naziva granica kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita od interesa u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Određuje se analogno određivanju vrednosti LOD, korišćenjem odnosa  $S/N = 10$  [146]. Postupak dobijanja LOQ vrednosti, tokom procesa validacije metode, sproveden je na isti način kao i postupak za dobijanje LOD vrednosti za svaki NHS.

Vrednosti LOD i LOQ ranije određene pomoću standarda, zbog uticaja matriksa su ispitivane i u realnim uzorcima. U tu svrhu korišćen je sakupljeni *pool* plazme. Vrednosti LOD i LOQ su potvrđene razblaženjem gore navedenih uzoraka u odgovarajućim odnosima  $S/N$  (oko 3 i 10, sukcesivno). Preciznost unutar serije za LOD i LOQ nivoa određena je u kvintuplikatu za svaki sterol u istom danu. Pored toga, preciznost između serije je procenjena merenjem koncentracije na LOD i LOQ nivoima tokom 10 dana.

### **3.3.1.6. *Ispitivanje preciznosti metode***

Preciznost je parametar čije je određivanje neophodno prilikom procesa validacije metode. Definiše se kao slaganje između numeričkih vrednosti dobijenih prilikom više merenja izvedenih na isti način. Ispitivanje preciznosti vrši se na homogenom autentičnom uzorku, dok se postupak merenja izvodi najmanje pet puta [146]. Ovaj korak validacije

daje uvid u preciznost rezultata ispitivanja istog uzorka koji se analizira pod istim uslovima, u istoj laboratoriji, na istoj opremi u kratkom vremenskom periodu. Za potrebe ispitivanja preciznosti metode za kvantitativno određivanje NHS sakupljeni su *pool*-ovi uzoraka seruma i plazme deset zdravih dobrovoljaca. Iz sveže pripremljenih *pool*-ova seruma i plazme, u istom danu pripremljeno je i urađeno 10 analiza za testiranje preciznosti unutar serije. Ostatak *pool*-a je podeljen u alikvote i čuvan na -80 °C. Za određivanje preciznosti između serija, alikvoti uzoraka su u kvintuplikatu analizirani 10 puta u periodu od 12 dana, i to 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 i 12 dana. Preciznost je prikazana kao koeficijent varijacije (KV) između vrednosti analita dobijenih unutar serije i između serije, te se dobijene KV vrednosti označavaju kao  $KV_{\text{unutar serije}}$  i  $KV_{\text{između serije}}$ . Vrednost KV se izražava u procentima i računa iz srednje vrednosti i standardne devijacije po izrazu:

$$KV [\%] = \frac{Sd}{\bar{x}} \cdot 100$$

Gde je:

- $\bar{x}$  – aritmetička srednja vrednost
- Sd – standardna devijacija

Standardna devijacija se računa prema formuli:

$$Sd = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Gde je:

- N – broj određivanja
- $\bar{x}$  – aritmetička srednja vrednost
- $x_i$  – vrednost pojedinačnog merenja ( $i = 1, 2, \dots, N$ )

### 3.3.1.7. Ispitivanje tačnosti metode

Tačnost analitičke metode predstavlja stepen slaganja između stvarne i vrednosti dobijene primenom analitičkog postupka određeni broj puta. U praksi se najčešće tačnost analitičke metode proverava određivanjem procenta prinosa, odnosno *Recovery* testom [146]. Za utvrđivanje tačnosti analitičke metode određivan je procenat prinosa ili tzv. „*recovery*” vrednost tako što smo uzorke *pool*-a plazme i seruma obogaćivali sa pet različitih koncentracija standardnih rastvora sterola i merili porast analitičkog signala. Standardni rastvori različitih koncentracija pripremani su u n-heksanu. U epruветama u kojima se nalazio upareni IS, dodato je 100  $\mu$ L smeše standardnih rastvora svih ispitivanih sterola. Uzorak za šestu, nultu tačku pripreman je tako što je u epruветu sa IS dodato 100  $\mu$ L n-heksana. Pre dodavanja uzoraka seruma i plazme, standardni rastvori i n-heksan su upareni do suva. Dalje procedure pripreme uzoraka i hromatografskog razdvajanja sprovedene su prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.7.2.4. i 3.2.7.2.5. U tabeli 6 se nalaze koncentracije standardnih rastvora kojima su obogaćivani uzorci seruma i plazme.

Tabela 6. Koncentracije NHS korišćene u *Recovery* testu.

<i>Dodate koncentracije NHS, [<math>\mu</math>mol/L]</i>					
<i>Nivoi koncentracija</i>	<i>Dezmosterol</i>	<i>Latosterol</i>	<i>Kampesterol</i>	<i>Stigmasterol</i>	<i><math>\beta</math>-sitosterol</i>
<b>0</b>	0	0	0	0	0
<b>1</b>	32,4	57,9	27,4	27,5	16,2
<b>2</b>	48,7	87,0	41,1	41,3	24,1
<b>3</b>	64,9	116,0	54,7	55,1	32,1
<b>4</b>	81,1	144,9	68,5	68,9	40,0
<b>5</b>	97,3	173,9	82,2	82,7	48,2



### **3.3.1.8. Studija stabilnosti uzoraka**

Studija stabilnosti uzoraka sprovedena je sa ciljem da se ispituju uticaji uslova čuvanja uzoraka na koncentraciju NHS. U tu svrhu sprovedena su tri eksperimenta koja su obuhvatala: ispitivanje stabilnosti analita od interesa čuvanjem nativnih uzoraka na -80 °C, čuvanjem pripremljenih i derivatizovanih uzoraka na -20 °C i ispitivanje uticaja ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka na stabilnost analita. Kao uzorci u ovim eksperimentima korišćeni su *pool*-ovi seruma i plazme dobijeni od 10 zdravih dobrovoljaca. Uslovi koji su ispitivani u ovim eksperimentima predstavljaju standardne uslove čuvanja i manipulacije uzorcima u našoj laboratoriji.

#### *3.3.1.8.1. Ispitivanja stabilnosti analita od interesa skladištenjem nativnih uzoraka*

Ovaj eksperiment osmišljen je tako da se ispita uticaj skladištenja seruma i plazme na -80 °C na koncentraciju analita od interesa. Bazalni nivoi NHS su bili utvrđeni iz svežih uzoraka, uzorkovanih u prvom danu ispitivanja, dok su ostali alikvoti *pool*-ova seruma i plazme čuvani na -80 °C za dalja testiranja. Uzorci su dalje odmrzavani i ispitivani u toku 60 dana čuvanja i to 2, 7, 15, 30 i 60 dana čuvanja. U svim tačkama ispitivanja, uzorci *pool*-a seruma i plazme su analizirani u kvintuplikatu.

#### *3.3.1.8.2. Ispitivanja stabilnosti analita od interesa skladištenjem derivatizovanih uzoraka*

Ispitivanje uticaja skladištenja pripremljenih uzoraka plazme na -20 °C je sprovedeno tako što su bazalni nivoi NHS bili određeni u svežim uzorcima uzorkovanim i pripremljenim u prvom danu ispitivanja, dok su ostali uzorci pripremljeni istog dana i skladišteni na -20 °C za dalja testiranja. Derivatizovani uzorci *pool*-a plazme su pripremani u kvintuplikatu i ispitivani nakon 2, 7, 15 i 20 danu čuvanja.

#### *3.3.1.8.3. Ispitivanje stabilnosti analita od interesa nakon ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja uzoraka*

Uticaj zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka na koncentraciju analita od interesa, testiran je tako što su bazalni nivoi NHS bili utvrđeni iz svežih uzoraka plazme, uzorkovanih i pripremljenih u prvom danu ispitivanja, dok su ostali uzorci podeljeni u dva alikvota, nativni i alikvot obogaćen antioksidansom i skladišteni na -80 °C za dalja testiranja. Uzorke smo obogaćivali antioksidansom kako bismo sprečili moguću oksidaciju

analita od interesa tokom procesa odmrzavanja i zamrzavanja. Alikvoti plazme obogaćeni antioksidansom su pripremani tako što je 1,5 mg komercijalnog antioksidansa (u vodi rastvoran analog vitamina E – Trolox<sup>®</sup>) rastvoreno u 6 mL *pool-a* plazme, kako bi se dobila konačna koncentracija od 1 mmol/L [148]. Prilikom svakog ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja, oba alikvota su prolazila istu proceduru. Alikvoti su izvađeni u istom trenutku, odležani su u periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi, izdvojena je zapremina za dalju pripremu uzoraka za određivanje NHS, a ostatak alikvota je prvo vraćen na -20 °C u trajanju od dva sata, a zatim su prebačeni na -80 °C do sledećeg ciklusa. Ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja su ponovljeni 5 puta. Uzorci u svim tačkama ispitivanja su analizirani u kvintuplikatu.

### **3.4. Statistička analiza**

Provera distribucija podataka vršena je *Shapiro-Wilk*-ovim testom. Podaci koji su pratili normalnu raspodelu prikazani su kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama, dok su podaci koji su nakon log-transformacije pratili normalnu raspodelu prikazani kao geometrijske sredine sa interkvartilnim rasponima. Grupe su poređene univarijantnom analizom varijanse (ANOVA), te *Tukey* i *Least Significant Difference post hoc* testovima. Analizom kovarijanse (ANCOVA) izvršeno je i korigovanje vrednosti parametara za godine starosti kao kovarijablu. Za procenu međusobne povezanosti parametara korišćena je *Pearson*-ova korelaciona analiza. Podaci koji nisu pratili normalnu raspodelu prikazani su kao medijane sa interkvartilnim rasponima i testirani su neparametarskim *Kruskal-Wallis* testom i *Mann-Whitney post-hoc* testom. Korigovanje vrednosti parametara koji nisu pratili normalnu raspodelu za godine starosti kao kovarijablu, izvršeno je upotrebom *Quade*-og testa. Kategoričke varijable su prikazane kao raspodele apsolutnih i relativnih frekvenci i analizirane su upotrebom  $\chi^2$  testa. P vrednost  $\leq 0,05$  je smatrana statistički značajnom. Svi podaci su analizirani pomoću *Excel* (verzija 2010; Microsoft, SAD) programa i statističkog softvera *IBM® SPSS® Statistics version 22*.

## 4. Rezultati

### 4.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika

U cilju ispitivanja uticaja terapije statinima, pacijenti sa IBS podeljeni su u dve grupe. Jednu grupu su činili pacijenti koji su bili na terapiji statinima duže od 3 meseca, a drugu oni koji u trenutku potvrde IBS nisu bili na farmakološkoj terapiji hipolipemicima. Ispitivana je razlika u proučavanim parametrima između pacijenata sa IBS na terapiji i bez terapije statinima, kao i odgovarajuće kontrolne grupe, a osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika prikazane su u tabeli 13. Obe grupe pacijenta su bile statistički značajno starije u odnosu na KG ( $p < 0,001$  za oba poređenja; podaci iz ANOVA testa), te je za ispitivanje razlike u vrednostima kontinuiranih varijabli između ispitivanih grupa, u zavisnosti od raspodele, primenjivana parametarska ANCOVA i neparametarski pandan ovom testu, *Quade*-ov test. U tabeli su prikazane nekorigovane vrednosti ispitivanih parametara, dok su vrednosti statističkih značajnosti korigovane (nakon statističkog uklanjanja uticaja starosti). Grupe su bile homogene prema polu, ali ne i prema ITM. Viši ITM je utvrđen kod pacijenata na terapiji statinima u odnosu na KG ( $p < 0,05$ ). Obe grupe pacijenata su imale značajno više vrednosti odnosa obima struka i kuka u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$  za obe grupe). Vrednosti sistolnog krvnog pritiska se nisu razlikovale između grupa, dok su vrednosti dijastolnog krvnog pritiska bile značajno niže u grupi pacijenata koja nije bila na terapiji statinima u poređenju sa KG ( $p < 0,05$ ). Koncentracije UH i LDL-h se nisu razlikovale između ispitivanih grupa, ali je utvrđena razlika u nivoima TG i HDL-h. Dok su koncentracije TG bile značajno niže u KG u odnosu na obe grupe pacijenata ( $p < 0,001$  za oba poređenja), nivoi HDL-h su bili statistički značajno viši u KG u odnosu na pacijente ( $p < 0,001$  za obe grupe pacijenata). Iako se koncentracije glukoze nisu razlikovale između ispitivanih grupa, grupe pacijenata su imale značajno više vrednosti insulina i HOMA-IR indeksa u odnosu na KG ( $p < 0,05$  za oba parametra i za oba poređenja). Koncentracije kreatinina su bile značajno više u KG u odnosu na grupu pacijenata na terapiji statinima ( $p < 0,001$ ) i u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima ( $p < 0,01$ ). Nivoi mokraćne kiseline su se razlikovali unutar grupa pacijenata. Uočene su niže koncentracije mokraćne kiseline kod pacijenata na terapiji statinima u odnosu na pacijente bez terapije ( $p < 0,01$ ), dok se vrednosti uree nisu razlikovale između ispitivanih grupa. Koncentracije albumina su bile niže u KG u odnosu na pacijente ( $p < 0,001$ , za obe grupe pacijenata). Takođe, koncentracije hsCRP-a su bile

značajno više u grupama pacijenata na terapiji i bez terapije statinima u poređenju sa KG  
( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ).

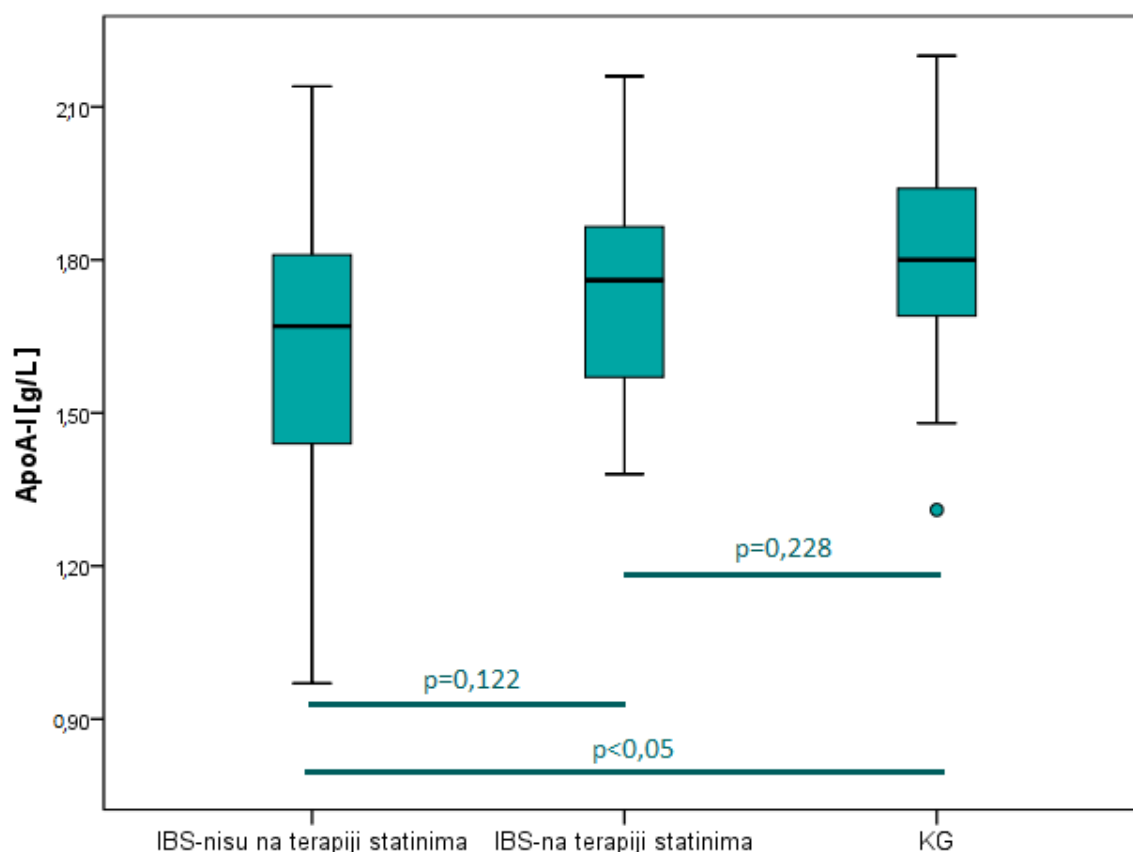
Tabela 7. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa IBS na terapiji i bez terapije statinima i kontrolne grupe.

<i>Parametri</i>	<i>Kontrolna grupa (N=31)</i>	<i>Pacijenti na terapiji statinima (N=32)</i>	<i>Pacijenti bez terapije statinima (N=47)</i>	<i>p</i>
<i>Starost, godine</i>	43,2±10,34	59,5±9,96	60,6±12,39	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,001<sup>b</sup></b> / 0,910 <sup>c</sup>
<i>Pol, m/ž*</i>	13/18	15/16	22/25	0,610 <sup>a</sup> / 0,672 <sup>b</sup> / 0,891 <sup>c</sup>
<i>ITM, kg/m<sup>2</sup></i>	24,2±4,05	27,3±3,80	25,9±3,67	<b>&lt;0,05<sup>a</sup></b> / 0,145 <sup>b</sup> / 0,137 <sup>c</sup>
<i>Odnos struka i kuka</i>	0,82±0,078	0,92±0,106	0,93±0,091	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,001<sup>b</sup></b> / 0,933 <sup>c</sup>
<i>Sistolni pritisak, mm Hg</i>	124±15,0	121±12,2	119±16,1	0,995 <sup>a</sup> / 0,577 <sup>b</sup> / 0,511 <sup>c</sup>
<i>Dijastolni pritisak, mm Hg</i>	84±13,7	80±8,5	76±11,4	0,181 <sup>a</sup> / <b>&lt;0,05<sup>b</sup></b> / 0,182 <sup>c</sup>
<i>UH, mmol/L</i>	4,6±0,63	5,0±1,09	4,9±1,59	0,217 <sup>a</sup> / 0,230 <sup>b</sup> / 0,894 <sup>c</sup>
<i>TG, mmol/L<sup>#</sup></i>	0,97 (0,83-1,14)	1,52 (1,32-1,75)	1,45 (1,26-1,68)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,001<sup>b</sup></b> / 0,702 <sup>c</sup>
<i>LDL-h, mmol/L</i>	2,7±0,49	3,0±0,96	3,1±1,25	0,260 <sup>a</sup> / 0,129 <sup>b</sup> / 0,696 <sup>c</sup>
<i>HDL-h, mmol/L</i>	1,7±0,46	1,2±0,31	1,1±0,33	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,001<sup>b</sup></b> / 0,150 <sup>c</sup>
<i>Glukoza, mmol/L</i>	5,1±0,48	5,5±0,84	5,7±1,65	0,353 <sup>a</sup> / 0,103 <sup>b</sup> / 0,427 <sup>c</sup>
<i>Insulin, μU/L<sup>#</sup></i>	7,8 (6,8-9,0)	11,5 (9,2-14,4)	10,9 (8,9-13,4)	<b>&lt;0,05<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,05<sup>b</sup></b> / 0,706 <sup>c</sup>
<i>HOMA-IR, %<sup>#</sup></i>	1,8 (1,5-2,1)	2,8 (2,1-3,7)	2,6 (2,1-3,3)	<b>&lt;0,05<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,05<sup>b</sup></b> / 0,695 <sup>c</sup>
<i>HOMA-β, %<sup>#</sup></i>	101 (84-121)	125 (100-157)	112 (85-146)	0,380 <sup>a</sup> / 0,697 <sup>b</sup> / 0,503 <sup>c</sup>
<i>Urea<sup>+</sup>, mmol/L</i>	5,7 (4,9-7,2)	5,4 (4,3-6,9)	6,1 (5,0-8,0)	0,125 <sup>a</sup> / 0,855 <sup>b</sup> / 0,241 <sup>c</sup>
<i>Kreatinin, mmol/L</i>	86,1 (82,5-91,5)	69,3 (64,0-79,2)	77,9 (72,4-87,0)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,01<sup>b</sup></b> / 0,104 <sup>c</sup>
<i>Mokraćna kiselina, μmol/L</i>	329±74,0	297±56,6	367±123,0	0,304 <sup>a</sup> / 0,165 <sup>b</sup> / <b>&lt;0,01<sup>c</sup></b>
<i>Albumin, g/L</i>	35±1,6	43±3,8	42±4,4	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,001<sup>b</sup></b> / 0,413 <sup>c</sup>
<i>hs-CRP, mg/L<sup>#</sup></i>	0,78 (0,51-1,20)	3,00 (1,89-4,76)	3,90 (2,55-5,97)	<b>&lt;0,05<sup>a</sup></b> / <b>&lt;0,01<sup>b</sup></b> / 0,440 <sup>c</sup>

ITM – indeks telesne mase; UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima male gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima velike gustine; HOMA-IR – homeostazni model procene insulinske rezistencije; hs-CRP – visoko osetljiv C reaktivni protein.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. # – Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti srednje vrednosti). + – Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti godina su poređene ANOVA testom (*post-hoc* *Tuckey* testom), a ostale kontinuirane varijable ANCOVA i *Quade*-ovim testom, korišćenjem godina kao kovarijata (*post hoc* *Least Significant Difference* i *Tuckey* testovima, sukcesivno). \*Kategoričke varijable su poređene korišćenjem  $\chi^2$  testa. a – Kontrolna grupa vs. pacijenti na terapiji statinima; b – Kontrolna grupa vs. pacijenti bez terapije statinima; c – Pacijenti na terapiji statinima vs. pacijenti bez terapije statinima.

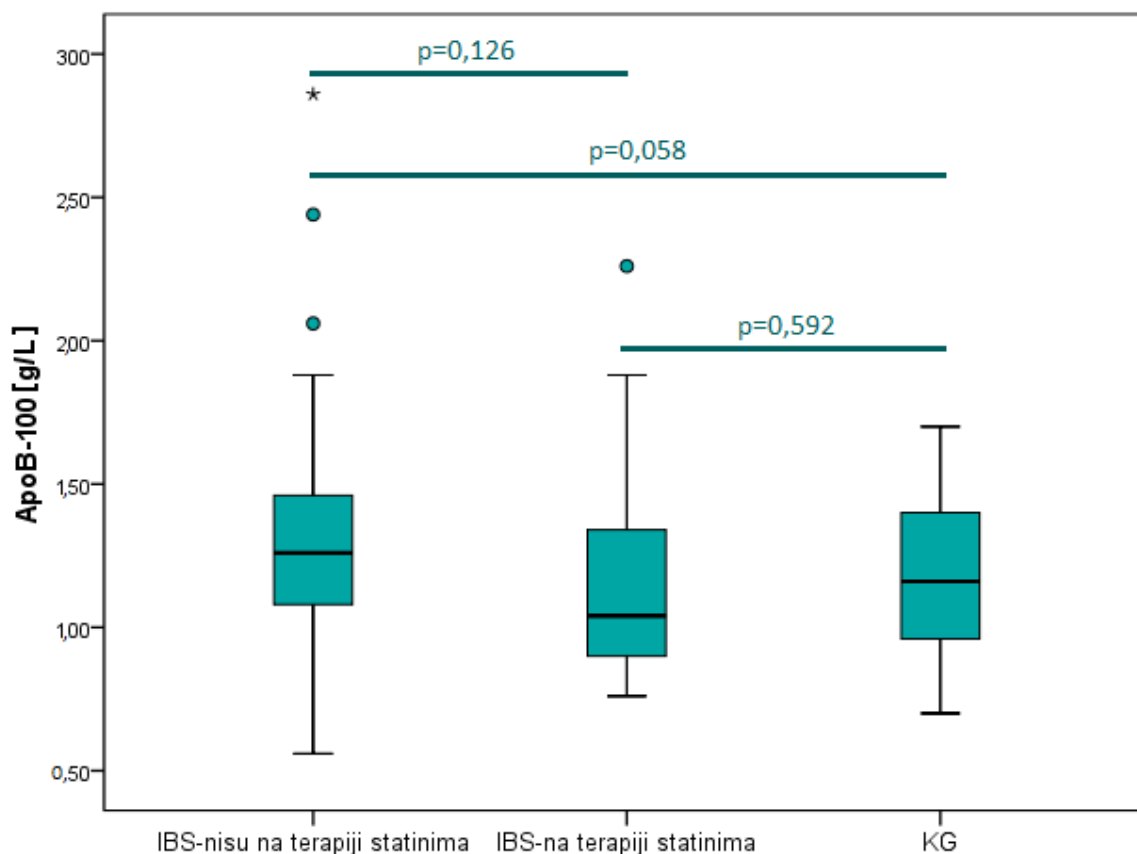
U cilju detaljnijeg ispitivanja razlika u tradicionalnim lipidnim parametrima između posmatranih grupa, kao i uticaja terapije statinima na iste, određivane su koncentracije ApoA-I i ApoB-100. Na slikama 23 i 24 prikazani su dijagrami raspodele vrednosti ovih parametara za sve tri grupe ispitanika. S obzirom na razlike u godinama starosti između obe grupe pacijenata i kontrolne grupe, poređenje je vršeno primenom ANCOVA statističkog testa nakon korekcije za godine starosti ispitanika, te su i prikazane statističke značajnosti korigovane. Kako su vrednosti apoA-I pratile normalnu raspodelu po grupama, koncentracije su izražene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Očekivano, koncentracije ApoA-I bile su najviše u grupi zdravih ispitanika i srednja vrednost ApoA-I u ovoj grupi iznosila je  $1,81 \pm 0,201$  g/L. Ova vrednost nije se značajno razlikovala od srednje vrednosti dobijene u grupi pacijenata na terapiji statinima, koj je iznosila  $1,72 \pm 0,203$  g/L ( $p=0,228$ ). Koncentracija ApoA-I bila je najniža kod pacijenata sa IBS koji nisu bili na terapiji statinima, sa srednjom vrednošću od  $1,63 \pm 0,280$  g/L koja se značajno razlikovala od srednje vrednosti dobijene u KG ( $p<0,05$ ).



Slika 23. Raspodele koncentracija apolipoproteina A-I kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe i vrednosti statističkih značajnosti.

Pravougaonici predstavljaju 50% vrednosti, sa unutrašnjom linijom koja predstavlja medijanu i linijama koje izlaze iz pravougaonika koje predstavljaju najveću i najmanju vrednost [149]. Netipične vrednosti obeležene su kružićima. P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Koncentracije za ApoB-100 su sledile normalnu raspodelu tek nakon logaritamske transformacije, te su prikazane kao geometrijske sredine sa intervalom pouzdanosti. Iako nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama ApoB-100 između posmatranih grupa, trend ka višim koncentracijama primećen je u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima 1,26 (1,19-1,45) g/L. Razlike u ovim koncentracijama su bile na granici statističke značajnosti u odnosu na koncentracije dobijene u KG 1,12 (1,05-1,26) g/L ( $p=0,058$ ). Koncentracije dobijene kod pacijenata na terapiji statinima 1,14 (1,02-1,32) g/L se nisu razlikovale u odnosu na koncentracije dobijene u KG i grupi pacijenata bez terapije statinima ( $p=0,592$  i  $p=0,126$ , sukcesivno).



Slika 24. Raspodela koncentracija apolipoproteina B-100 kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe i vrednosti statističkih značajnosti.

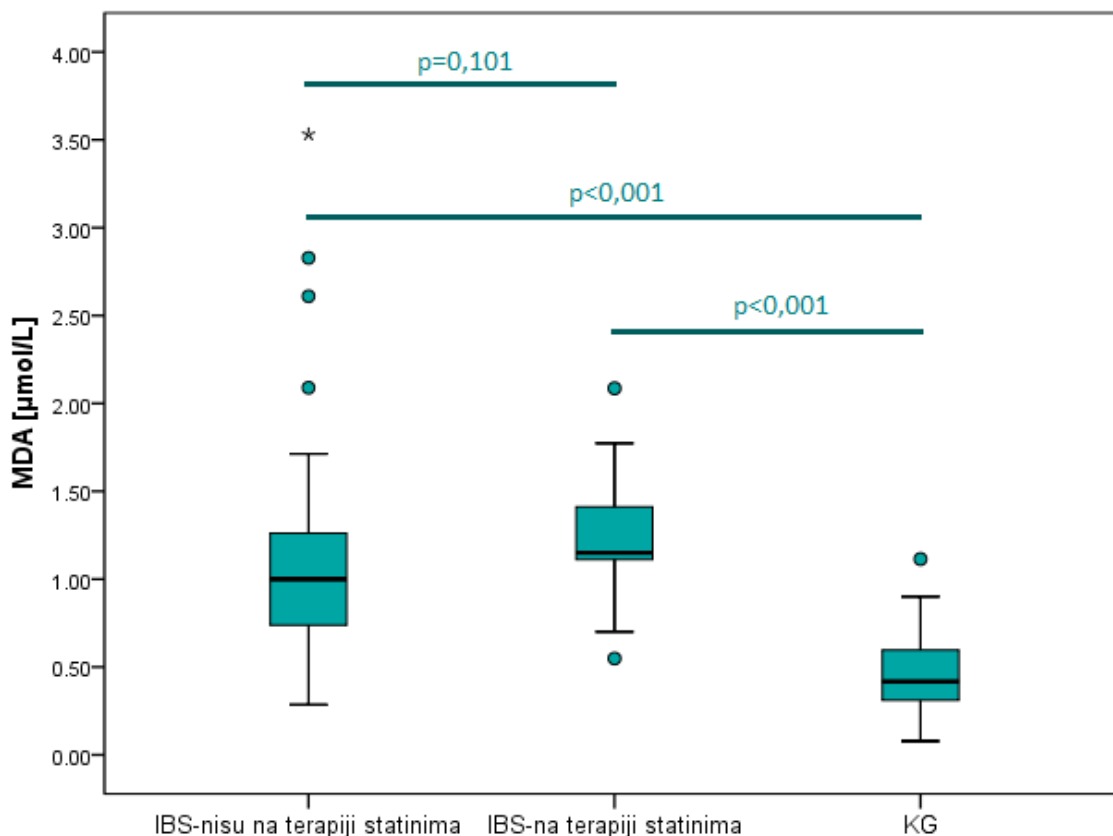
Pravougaonici predstavljaju 50% vrednosti, sa unutrašnjom linijom koja predstavlja medijanu i linijama koje izlaze iz pravougaonika i koje predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Netipične vrednosti obeležene su kružićima, dok su sa zvezdicama predstavljene ekstremne vrednosti [149]. P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

## 4.2. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa

Kao pokazatelj oksidativnog stresa izabran je MDA, krajnji produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, ali i neposredni učesnik oksidacije lipoproteinskih čestica. Kako su vrednosti MDA pratile normalnu raspodelu tek nakon logaritamske transformacije, predstavljene su kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti. Kada se uporede koncentracije MDA između sve tri grupe ispitanika, očigledno je značajno pomeranje ka višim vrednostima u obe grupe pacijenata u odnosu na KG u kojoj su vrednosti iznosile  $0,39 \mu\text{mol/L}$  (95%CI:  $0,31\text{-}0,50 \mu\text{mol/L}$ ) ( $p=0,001$  za obe grupe pacijenata). Vrednosti MDA se nisu razlikovale između pacijenata na terapiji statinima ( $1,19 \mu\text{mol/L}$ ; 95%CI:  $1,06\text{-}1,32 \mu\text{mol/L}$ ) i pacijenata sa IBS koji nisu bili na terapiji



statinima (0,96  $\mu\text{mol/L}$ ; 95%CI: 0,82-1,13  $\mu\text{mol/L}$ ) ( $p=0,101$ ). P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika. Na slici 25 prikazani su dijagrami raspodele vrednosti MDA u sve tri grupe ispitanika.



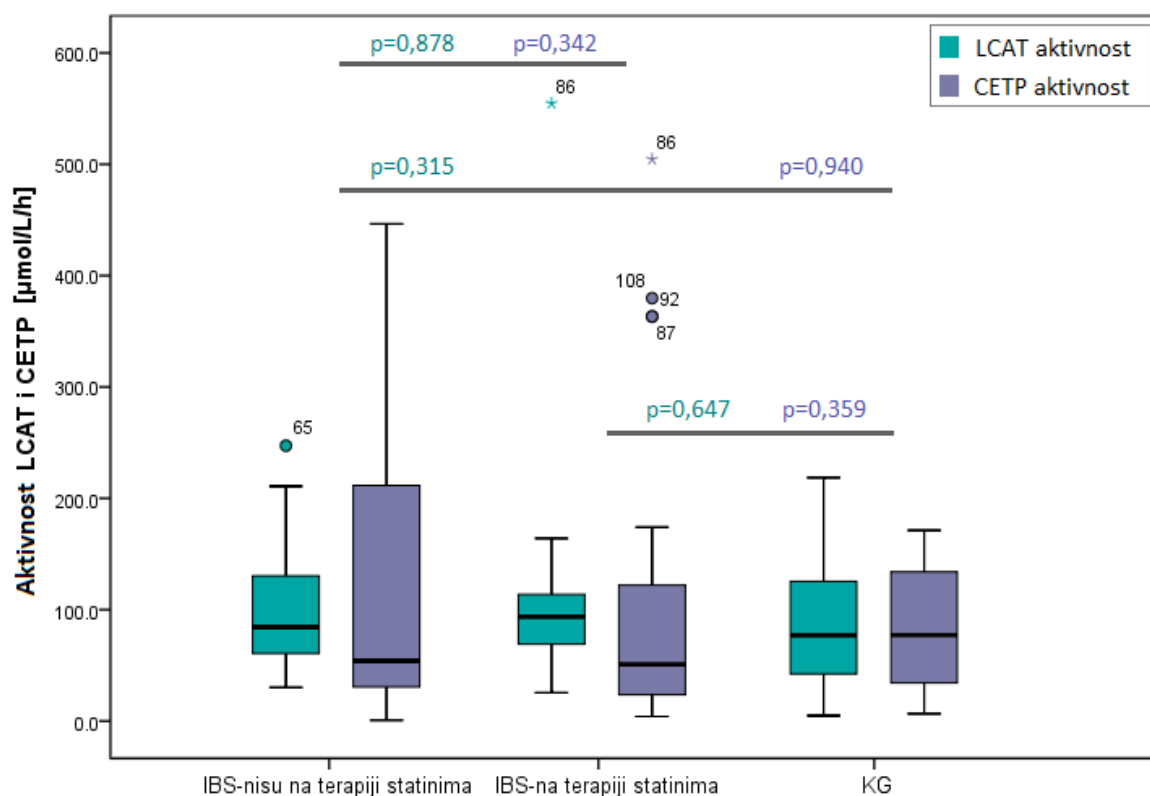
Slika 25. Raspodele koncentracija MDA kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe i vrednosti statističkih značajnosti.

Pravougaonici predstavljaju 50% vrednosti, sa unutrašnjom linijom koja predstavlja medijanu i linijama koje izlaze iz pravougaonika i koje predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Netipične vrednosti obeležene su kružićima, dok su sa zvezdicama predstavljene ekstremne vrednosti [149]. P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

### ***4.3. Ispitivanje aktivnosti enzima/proteina uključenih u reverzni transport holesterola***

Imajući u vidu značaj očuvanosti RTH, u ovoj studiji ispitivana je razlika u aktivnosti LCAT i CETP između pacijenata na terapiji i bez terapije statinima i u odgovarajućoj KG. Na slici 26 su prikazane aktivnosti LCAT i CETP kod sve tri grupe ispitanika. Raspodele njihovih aktivnosti ni u jednoj ispitivanoj grupi nisu pratile normalnu

raspodelu čak ni nakon logaritamske transformacije ( $p < 0,05$ ). S obzirom na nepodudarnosti po godinama starosti između pacijenata i KG, upoređivanje je vršeno nakon korekcije za starost upotrebom *Quade*-ovog testa, te su i statističke značajnosti izvedene nakon korekcije. Nisu nađene statistički značajne razlike između posmatranih grupa u aktivnostima LCAT i CETP. Medijalna vrednost aktivnosti LCAT u KG iznosila je 77,0  $\mu\text{mol/L/h}$  (interkvartilni raspon: 42,3-126,1  $\mu\text{mol/L/h}$ ), u grupi pacijenata na terapiji statinima 93,6  $\mu\text{mol/L/h}$  (interkvartilni raspon: 66,4-114,7  $\mu\text{mol/L/h}$ ), dok je u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima vrednost medijane iznosila 84,3  $\mu\text{mol/L/h}$  (interkvartilni raspon: 60,3-130,8  $\mu\text{mol/L/h}$ ). Iako se aktivnosti CETP nisu razlikovale između posmatranih grupa, primećen je trend ka višim vrednostima aktivnosti CETP u delu grupe pacijenata koja nije bila na terapiji statinima (medijana: 54,0 (interkvartilni raspon: 28,0-216,6)  $\mu\text{mol/L/h}$ ), dok je medijana u grupi pacijenata na terapiji iznosila 50,9 (interkvartilni raspon: 22,4-123,1)  $\mu\text{mol/L/h}$ , odnosno u grupi zdravih ispitanika 77,2 (interkvartilni raspon: 33,7-134,1)  $\mu\text{mol/L/h}$ .



Slika 26. Raspodele aktivnosti LCAT i CETP kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe i vrednosti statističkih značajnosti dobijenih poređenjem rezultata između grupa.

Pravougaonici predstavljaju 50% vrednosti, sa unutrašnjom linijom koja predstavlja medijanu i linijama koje izlaze iz pravougaonika i koje predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Netipične vrednosti obeležene su kružićima, dok su sa zvezdicama predstavljene ekstremne vrednosti [149]. P vrednosti su izvedene iz *Quade*-ovog testa uz korekciju za starost ispitanika.

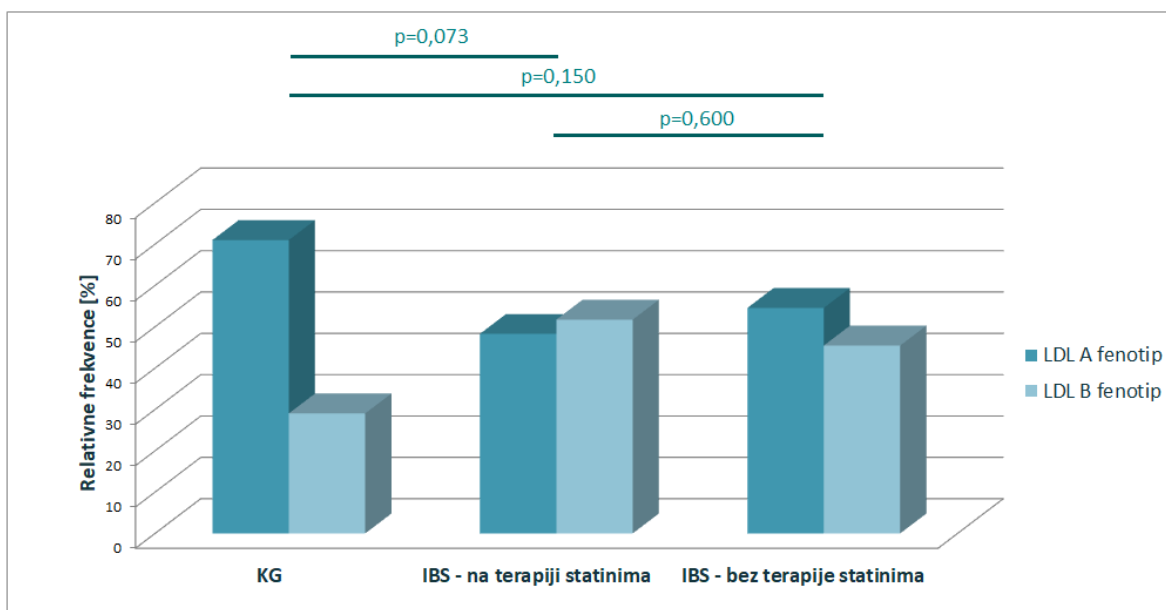
#### 4.4. Ispitivanje karakteristika LDL i HDL subfrakcija

U cilju ispitivanja karakteristika LDL i HDL subfrakcija, vršeno je određivanje dominantnog dijametra ovih lipoproteina kao i određivanje fenotipova na osnovu dobijenih dominantnih dijametara. Takođe, utvrđeni su i relativni udeli sedam LDL i pet HDL subklasa u ukupnim LDL i HDL profilima ispitanika.

##### 4.4.1. Raspodela LDL fenotipova

Svi ispitanici su podeljeni u dve grupe prema LDL fenotipovima (LDL fenotip A i LDL fenotip B), na osnovu dijametra dominantnog pika u LDL regionu. Na slici 27 su prikazane raspodele fenotipova kod sve tri grupe ispitanika. Chi-kvadrat testom je uočeno da zastupljenost LDL fenotipa A dominira kod zdravih ispitanika (71%), dok je kod

pacijenata na terapiji statinima primećena veća zastupljenost fenotipa B (52%), ali nije postojala statistički značajna razlika između zastupljenosti fenotipova u ove dve grupe ( $\chi^2=3,215$ ,  $p=0,073$ ). Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, odnos zastupljenosti fenotipova je iznosio 55:45 %, u korist fenotipa A, ali se ni ovaj odnos nije statistički značajno razlikovao u odnosu zastupljenosti LDL fenotipova u kontrolnoj i grupi pacijentima na terapiji statinima ( $\chi^2=2,068$ ,  $p=0,150$  i  $\chi^2=0,275$ ,  $p=0,600$ ).



Slika 27. Raspodela LDL fenotipova kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe.

#### ***4.4.2. Analiza relativnog udela pojedinačnih LDL subfrakcija***

Relativni udeli (%) LDL subfrakcija kod sve tri grupe ispitanika prikazani su u tabeli 8. S obzirom na nepodudarnosti po godinama starosti između ispitivanih grupa, poređenje je izvršeno nakon korekcije za starost, primenom ANCOVA statističkog testa.

Tabela 8. Relativna zastupljenost pojedinih LDL subfrakcija kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe.

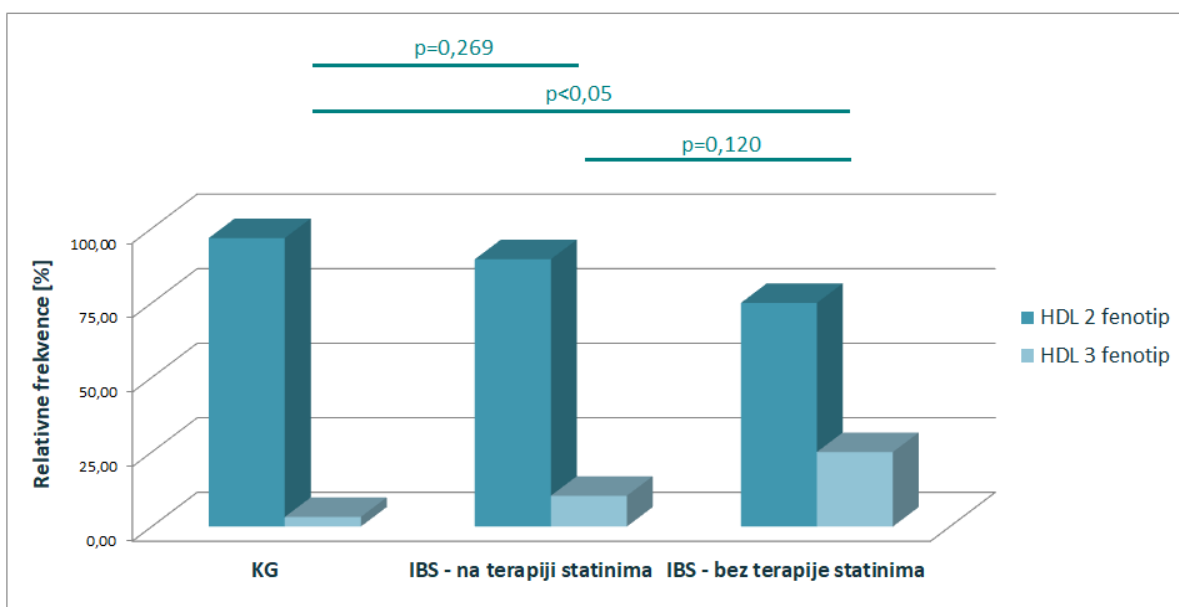
<i>LDL subfrakcije</i>	<i>Kontrolna grupa (N=31)</i>	<i>Pacijenti na terapiji statinima (N=32)</i>	<i>Pacijenti bez terapije statinima (N=47)</i>	<i>p</i>
<i>LDL I, %</i>	22,8±8,64	22,6±6,21	23,2±6,64	0,609 <sup>a</sup> 0,419 <sup>b</sup> 0,754 <sup>c</sup>
<i>LDL IIA, %</i>	12,6±2,85	11,6±2,25	11,4±2,20	0,428 <sup>a</sup> 0,264 <sup>b</sup> 0,744 <sup>c</sup>
<i>LDL IIB, %</i>	17,5±5,76	15,0±3,90	15,3±3,92	0,453 <sup>a</sup> 0,598 <sup>b</sup> 0,743 <sup>c</sup>
<i>LDL IIIA, %</i>	14,8±4,72	14,8±3,21	14,0±2,82	0,893 <sup>a</sup> 0,354 <sup>b</sup> 0,349 <sup>c</sup>
<i>LDL IIIB, %</i>	6,9±2,24	7,3±2,94	7,0±2,39	0,484 <sup>a</sup> 0,241 <sup>b</sup> 0,609 <sup>c</sup>
<i>LDL IVA, %</i>	11,4±3,14	13,8±5,23	12,4±3,04	0,327 <sup>a</sup> 0,800 <sup>b</sup> 0,123 <sup>c</sup>
<i>LDL IVB, %</i>	14,0±4,57	14,8±4,44	16,6±5,17	0,975 <sup>a</sup> 0,181 <sup>b</sup> 0,120 <sup>c</sup>
<i>LDL dijametar, nm</i>	26,5±1,66	25,7±1,45	26,0±1,67	0,448 <sup>a</sup> 0,916 <sup>b</sup> 0,401 <sup>c</sup>
<i>sdLDL, %</i>	47,1±9,60	50,7±9,85	50,0±9,12	0,863 <sup>a</sup> 0,936 <sup>b</sup> 0,753 <sup>c</sup>

LDL – Lipoproteini niske gustine; sdLDL – male guste LDL. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika. Kao *post hoc* korišćen je *Least Significant Difference* test. a – Kontrolna grupa vs. pacijenti na terapiji statinima; b – Kontrolna grupa vs. pacijenti bez terapije statinima; c – Pacijenti na terapiji statinima vs. pacijenti bez terapije statinima.

Ispitivana razlika u zastupljenosti pojedinih LDL subfrakcija između sve tri grupe ispitanika nije se pokazala značajnom. Primećen je trend ka višim vrednostima LDL IVB subklase kod obe grupe pacijenata. Najviša procentualna zastupljenost ovih čestica primećena je kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima.

### 4.4.3. Raspodela HDL fenotipova

Prema HDL fenotipovima, svi ispitanici su podeljeni u dve grupe (HDL fenotip 2 i HDL fenotip 3). Na slici 27 su prikazane raspodele fenotipova kod sve tri grupe ispitanika. Uočena je dominantna zastupljenost HDL 2 fenotipa kod sve tri grupe ispitanika. Chi-kvadrat testom je uočeno da se statistički značajno razlikuje zastupljenost HDL 2 fenotipa kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, kod kojih je udeo fenotipa iznosio 75%, u odnosu na zdrave ispitanike (97%) ( $\chi^2=6,416$ ,  $p<0,05$ ). Relativni odnos zastupljenosti pacijenata sa HDL 2 i HDL 3 fenotipom u grupi na terapiji statinima iznosio je 90:10 %. Nije postojala značajna razlika u zastupljenosti HDL fenotipova u ovoj grupi u poređenju sa KG i grupom koja nije bila na terapiji statinima ( $\chi^2=1,220$ ,  $p=0,269$  i  $\chi^2=2,422$ ,  $p=0,120$ ).



Slika 28. Raspodela HDL fenotipova kod sve tri grupe ispitanika.

### 4.4.4. Analiza relativnog udela pojedinačnih HDL subfrakcija

Relativne zastupljenosti (%) pojedinih HDL subfrakcija, za sve tri grupe ispitanika, prikazane su u tabeli 9. Kako su se grupe razlikovale po godinama starosti, poređenje je vršeno nakon korekcije za starost, primenom ANCOVA statističkog testa.

Tabela 9. Relativna zastupljenost pojedinih HDL subfrakcija kod sve tri grupe ispitanika.

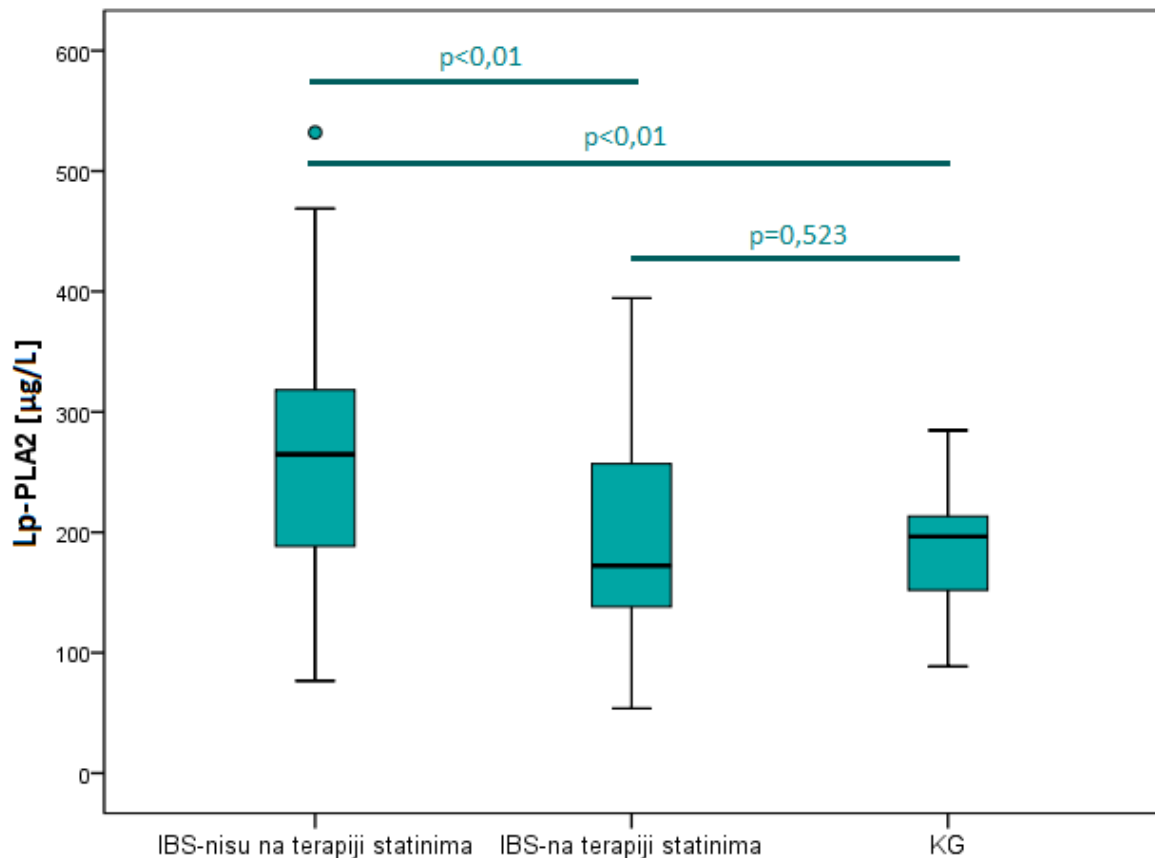
<i>HDL subfrakcije</i>	<i>Kontrolna grupa (N=31)</i>	<i>Pacijenti na terapiji statinima (N=32)</i>	<i>Pacijenti bez terapije statinima (N=47)</i>	<i>p</i>
<i>HDL 2b, %</i>	56,4±11,6	41,8±6,84	45,0±8,01	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,145 <sup>c</sup>
<i>HDL 2a, %</i>	20,4±3,46	23,6±4,04	23,6±4,34	<0,01 <sup>a</sup> <0,01 <sup>b</sup> 0,964 <sup>c</sup>
<i>HDL 3a, %</i>	13,6±8,40	17,7±4,65	15,6±5,27	<0,05 <sup>a</sup> 0,165 <sup>b</sup> 0,169 <sup>c</sup>
<i>HDL 3b, %</i>	4,6±2,18	8,3±3,49	7,8±4,23	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,560 <sup>c</sup>
<i>HDL 3c, %</i>	5,0±3,35	8,2±3,70	7,9±2,69	<0,01 <sup>a</sup> <0,01 <sup>b</sup> 0,699 <sup>c</sup>
<i>HDL dijametar, nm</i>	10,3±0,93	9,7±0,85	9,3±0,97	<0,05 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> <0,05 <sup>c</sup>
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	23,1±10,4	34,2±6,58	31,3±7,50	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,148 <sup>c</sup>

HDL – Lipoproteini velike gustine. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. P vrednosti su izvedene iz ANCOV-a testa uz korekciju za starost ispitanika. Kao *post hoc* korišćen je *Least Significant Difference* test. a – Kontrolna grupa vs. pacijenti na terapiji statinima; b – Kontrolna grupa vs. pacijenti bez terapije statinima; c – Pacijenti na terapiji statinima vs. pacijenti bez terapije statinima.

Najveći udeo HDL 2b subfrakcija utvrđen je u KG, dok obe grupe pacijenata imaju značajno veći udeo HDL 2a i malih, HDL 3b i HDL 3c subfrakcija, u odnosu na KG. Nisu primećene razlike u zastupljenosti HDL subfrakcija između grupa pacijenata (Tabela 9).

#### **4.5. Ispitivanje masene koncentracije Lp-PLA2**

Inflamacija, progresija i konačno ruptura aterosklerotskog plaka uključuju nekoliko kompleksnih mehanizama. Lp-PLA2 sudeluje u ovim procesima, te je predložena za nov, visoko specifičan biomarker vaskularne inflamacije, povezan sa vulnerabilnošću plaka [119-121]. Zbog svega navedenog, ispitivali smo vrednosti masenih koncentracija Lp-PA2 kod pacijenata sa IBS i zdravih ispitanika.



Slika 29. Raspodele masenih koncentracija Lp-PLA2 kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe.

Pravougaonici predstavljaju 50% vrednosti, sa unutrašnjom linijom koja predstavlja medijanu i linijama koje izlaze iz pravougaonika koje predstavljaju najveću i najmanju vrednost [149]. Netipične vrednosti obeležene su kružićima. P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Nakon korekcije za godine starosti korišćenjem ANCOVA statističkog testa, u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima uočene su statistički značajno više vrednosti masene koncentracije Lp-PLA2 u odnosu na pacijente koji su bili na terapiji statinima i KG ( $p < 0,01$ , za obe grupe ispitanika) (slika 28). Masene koncentracije Lp-PLA2 u ovoj grupi pacijenata su iznosile  $260 \pm 99,4 \mu\text{g/L}$ , dok su u grupi pacijenata na terapiji statinima iznosile  $197 \pm 92,0 \mu\text{g/L}$ , a u KG  $186 \pm 54,2 \mu\text{g/L}$ . Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima Lp-PLA2 između pacijenata sa IBS na terapiji statinima i KG ( $p = 0,523$ ). Vrednosti masenih koncentracija u sve tri grupe ispitanika su sledile normalnu raspodelu i prikazane su kao srednje vrednosti i standardne devijacije, dok su prikazane vrednosti statističkih značajnosti izvedene iz ANCOVA testa, nakon korekcije za starost ispitanika.



#### 4.6. Ispitivanje masnokiselinskog profila

U cilju ispitivanja masnokiselinskog profila, kod sve tri grupe ispitanika određen je procentualni udeo pojedinih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina serija  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 u ukupnom masnokiselinskom sastavu plazme. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 10. Podaci za sve masne kiseline su pratili normalnu raspodelu, izuzev vrednosti EPA, koje su pratile normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije. Vrednosti su poređene korišćenjem ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika.

Tabela 10. Procentualni udeo masnih kiselina u ukupnom masnokiselinskom sastavu plazme kod pacijenata na terapiji i bez terapije statinima i u kontrolnoj grupi.

Masna kiselina	Kontrolna grupa (N=31)	Pacijenti na terapiji statinima (N=32)	Pacijenti bez terapije statinima (N=47)	p
C16:0, %	26,1±1,40	27,4±1,29	27,6±1,52	<0,01 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,497 <sup>c</sup>
C18:0, %	12,8±1,22	13,3±1,28	12,8±1,24	0,067 <sup>a</sup> 0,723 <sup>b</sup> 0,056 <sup>c</sup>
C18:1 (n-9), %	13,8±1,76	14,2±1,41	16,0±2,28	0,541 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> <0,001 <sup>c</sup>
C18:2 (n-6), %	27,4±3,58	21,9±3,28	22,6±3,22	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,372 <sup>c</sup>
C20:4 (n-6), %	10,9±2,09	12,9±2,08	11,6±2,03	<0,001 <sup>a</sup> 0,069 <sup>b</sup> <0,05 <sup>c</sup>
C20:5 (n-3)*, %	0,36(0,28-0,48)	0,47(0,40-0,55)	0,43(0,39-0,48)	0,052 <sup>a</sup> 0,194 <sup>b</sup> 0,318 <sup>c</sup>
C22:6 (n-3), %	2,7±1,02	3,1±0,70	2,5±0,67	0,298 <sup>a</sup> 0,063 <sup>b</sup> <0,01 <sup>c</sup>

16:0 – palmitinska masna kiselina; 18:0 – stearinska masna kiselina; C18:1 (n-9) – oleinska masna kiselina; C18:2 (n-6) – linolna masna kiselina, C20:4 (n-6) – arahidonska masna kiselina, C20:5 (n-3) – eikozapentaenska masna kiselina, C22:6 (n-3) – dokozaheksaenska masna kiselina. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \* – Podaci su prikazani kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti). P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika. Kao *post hoc* korišćen je *Least Significant Difference* test. a – Kontrolna grupa vs. pacijenti na terapiji statinima; b – Kontrolna grupa vs. pacijenti bez terapije statinima; c – Pacijenti na terapiji statinima vs. pacijenti bez terapije statinima.

Utvrđeno je da je procentualni udeo palmitinske kiseline bio značajno viši kod pacijenata na terapiji i bez terapiji statinima u odnosu na KG (p<0,01, p<0,001).

Procentualni udeli stearinske kiseline se nisu razlikovali između ispitivanih grupa. Udeo oleinske kiseline je bio značajno viši u grupi pacijenata bez terapije, u odnosu na KG i grupu pacijenata na terapiji statinima ( $p < 0,001$  za oba poređenja), dok se vrednosti procentualnih udela između KG i grupe pacijenata na terapiji nisu razlikovale. Udeo linolne kiseline bio je niži u obe grupe pacijenata u odnosu na KG ( $p < 0,001$  za oba poređenja). Uočeni su interesantni rezultati raspodele udela ARA, EPA i DHA kiselina među posmatranim grupama. Relativni udeli ovih MK su pokazali trend ka višim vrednostima u grupi pacijenata koji su bili na terapiji statinima. ARA je imala značajno viši udeo kod ovih pacijenata u odnosu na KG i grupu pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). Udeo DHA se razlikovao samo između dve grupe pacijenata ( $p < 0,01$ ).

## ***4.7. Ispitivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola***

### ***4.7.1. Optimizacija preanalitičkih i analitičkih uslova za određivanje koncentracije NHS***

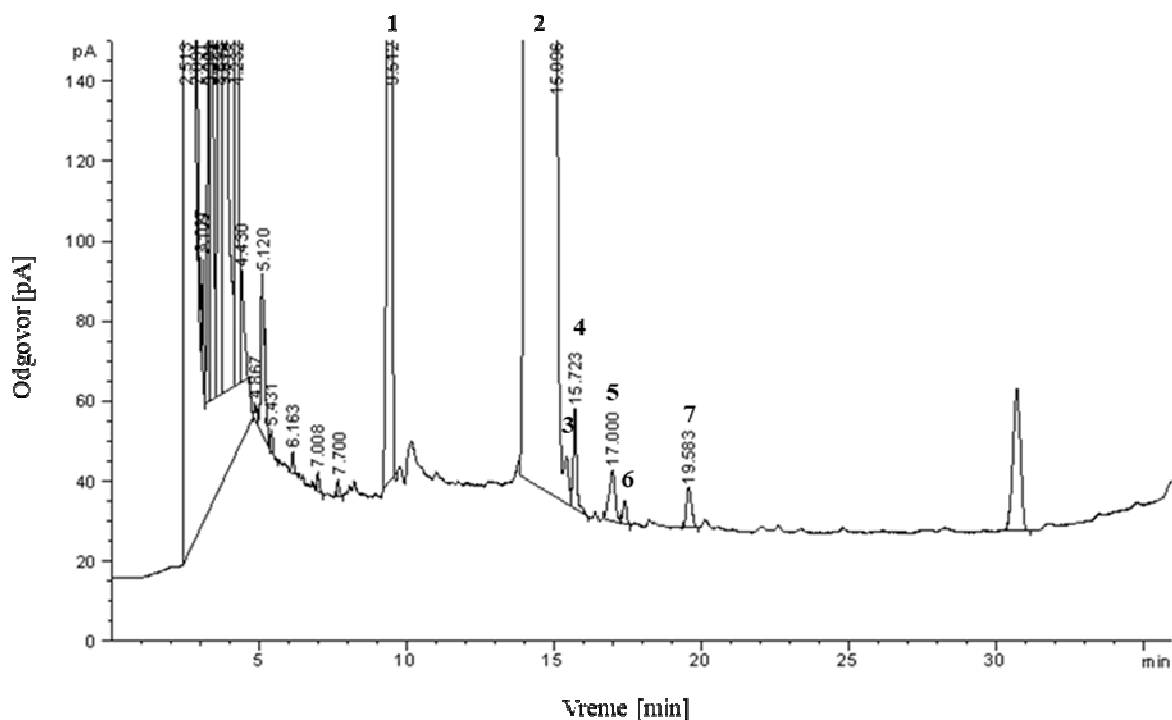
Pouzdana identifikacija i kvantifikacija markera sinteze i apsorpcije holesterola se može postići samo ukoliko su njihovi pikovi na dobijenim hromatogramima dobro razdvojeni. Za ocenu efikasnosti razdvajanja pikova u ovom radu korišćen je faktor rezolucije definisan jednačinom:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

u kojoj su  $t_{r1}$  i  $t_{r2}$  retenciona vremena dva susedna pika ( $t_{r2} > t_{r1}$ ), a  $W_{h1}$  i  $W_{h2}$  širine odgovarajućih pikova na baznoj liniji [150]. Faktor rezolucije veći od 1,5 ukazuje da su pikovi razdvojeni na baznoj liniji, ali u praksi, zadovoljavajuće razdvajanje se postiže pri  $R_s$  vrednostima većim od 1,2 [91, 150]. Imajući u vidu kompleksnost hemijskog sastava uzorka, u ovom radu je prihvaćen taj kriterijum, pa je razdvajanje susednih pikova smatrano efikasnim ako je vrednost  $R_s$  bila  $> 1,2$ .

U početnom koraku postavljanja metode, ispitivan je kvalitet razdvajanja pikova analita od interesa primenom najjednostavnijeg načina pripreme uzorka, tačno-tečnom

ekstrakcijom bez procesa derivatizacije (što je opisano u poglavlju 3.2.7.2.2.). Na slici 30. prikazan je hromatogram dobijen pripremom uzoraka bez derivatizacije i korišćenjem uslova za separaciju i detekciju koji su prikazani u poglavlju 3.2.7.2.3.

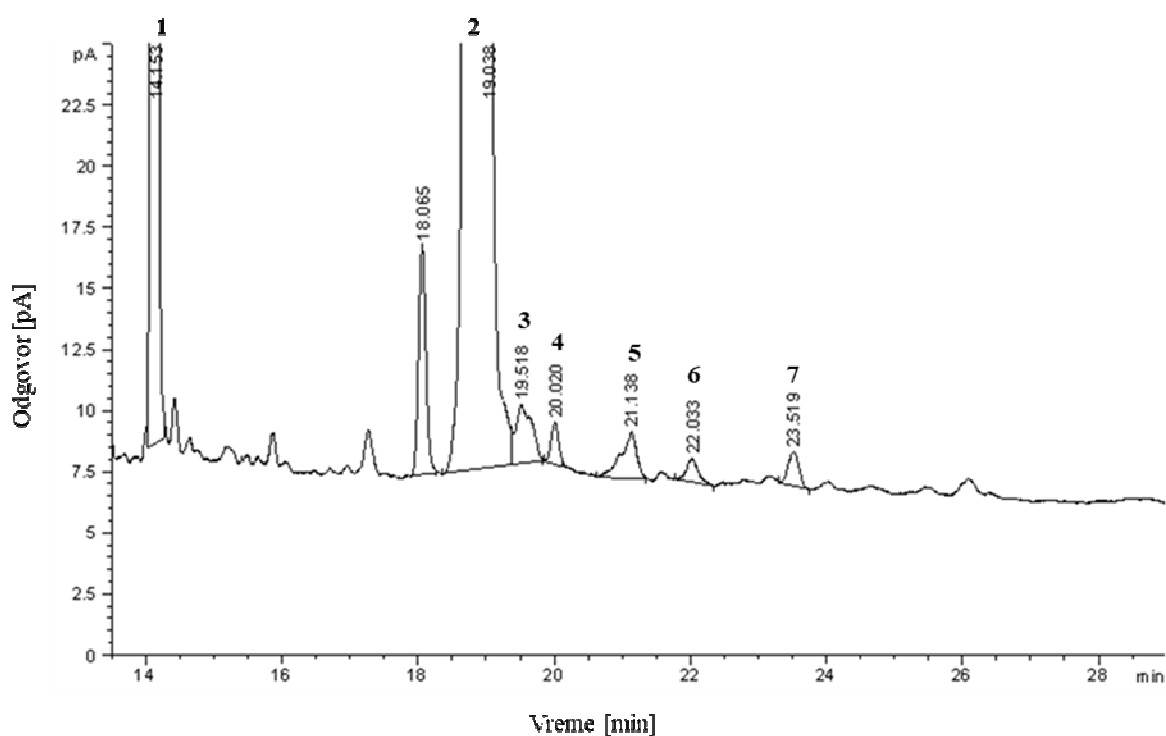


Slika 30. Hromatogram nederivatizovanog uzorka plazme: 1. 5- $\alpha$ -holestan; 2. holesterol; 3. dezmosterol; 4. latosterol; 5. kampesterol; 6. stigmasterol; 7.  $\beta$ -sitosterol

Hromatogrami standardnih rastvora sterola u toku optimizacije nisu prikazani, jer zadati uslovi nisu doveli do zadovoljavajućeg razdvajanja analita od interesa u uzorcima biološkog materijala. Hromatogram sa slike 29 pokazuje da ovaj postupak ne daje odgovarajuće razdvajanje svih pikova od interesa, jer je vrednost faktora rezolucije manja od prethodno definisane granične vrednosti za dva para pikova, dezmosterol i latosterol, kao i kampesterol i stigmasterol.

Promena hromatografskih uslova u analizi uzoraka pripremanih samo tečno-tečnom ekstrakcijom nije dala željeno razdvajanje pikova od interesa, zbog čega je dalje nastavljeno sa optimizacijom pripreme uzoraka. U nastavku optimizacije, ispitivan je kvalitet razdvajanja pikova nakon pripreme uzorka tečno-tečnom ekstrakcijom, praćen derivatizacijom analita od interesa. Nakon ekstrakcije sterola, uvedena je dodatna faza u pripremi uzoraka – derivatizacija (postupak pripreme uzoraka i analitički uslovi

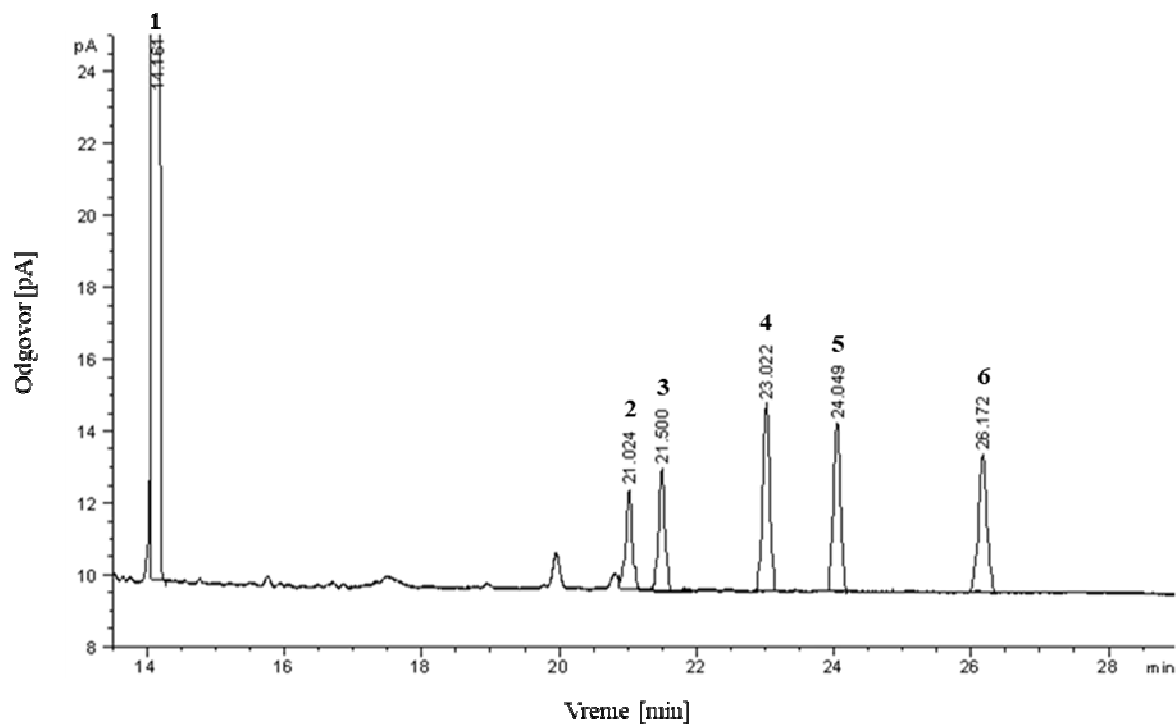
razdvajanja opisani su u poglavljima 3.2.7.2.4 i 3.2.7.2.5). Kao gas nosač najpre je korišćen azot čistoće 5.0 sa protokom od 2,73 mL/min. U samoj hromatografskoj analizi promenjen je način nanošenja uzorka na kolonu. Umesto do sada korišćenog *split*, sad je korišćen *splitless* režim injektovanja. Na hromatogramu sa slike 31 vidi se da je priprema uzoraka sa derivatizacijom dala odlično razdvajanje kampesterola i stigmasterola ( $R_s > 1,2$ ). Razdvajanje latosterola i dezmosterola je poboljšano, ali je  $R_s$  vrednost za ovaj kritičan par i dalje bila manja od 1,2.



Slika 31. Hromatogram derivatizovanog uzorka plazme sa azotom kao nosećim gasom: 1. 5- $\alpha$ -holestan; 2. holesterol; 3. dezmosterol; 4. latosterol; 5. kampesterol; 6. stigmasterol; 7.  $\beta$ -sitosterol.

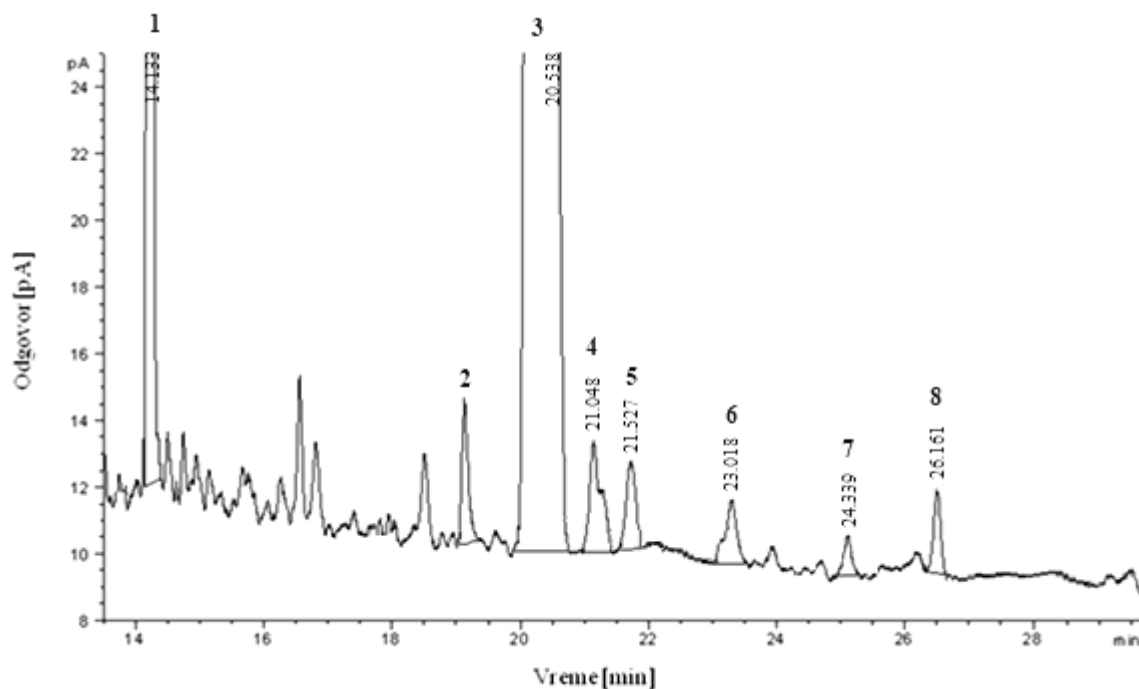
Kada je utvrđeno da azot kao noseći gas, pri prosečnoj brzini protoka od 46,5 cm/s nije dao odgovarajuće razdvajanje pikova, u daljoj optimizaciji metode se, umesto azota, koristio helijum kao noseći gas. Prosečna brzina protoka helijuma nije značajno promenjena u odnosu na azot, podešena je na  $\approx 43$  cm/s, ali se efikasnost značajno povećala. U daljoj optimizaciji, primenjen je isti postupak pripreme uzorka sa derivatizacijom uz odgovarajuće uslove razdvajanja i protokom helijuma (čistoće 5.0) od

2,28 mL/min kao nosećim gasom. Pikovi od interesa su identifikovani i kvantifikovani upoređivanjem sa pikovima standardnih rastvora derivatizovanih sterola (slika 32).



Slika 32. Hromatogram derivatizovanih standarda sterola sa helijumom kao nosećim gasom: 1. 5- $\alpha$ -holestan; 2. dezmosterol; 3. latosterol; 4. kampesterol; 5. stigmasterol; 6.  $\beta$ -sitosterol.

Na hromatogramu sa slike 33 se vidi da su svi pikovi analiziranih sterola u uzorku plazme dobro razdvojeni. Faktor rezolucije je veći od 1,2 za svaki par analiziranih pikova, uključujući i problematičan par dezmosterol i latosterol.



Slika 33. Hromatogram derivatizovanog uzorka plazme sa helijumom kao nosećim gasom: 1. 5- $\alpha$ -holestan; 2. nederivatizovani holesterol; 3. holesterol; 4. dezmosterol; 5. latosterol; 6. kampesterol; 7. stigmasterol; 8.  $\beta$ -sitosterol.

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da se najbolje razdvajanje markera sinteze i apsorpcije holesterola postiže pripremom uzoraka sa derivatizacijom. GC-FID analiza sa helijumom kao nosećim gasom pri brzini protoka od 2,28 mL/min, korišćenjem multilinearne programiranja temperature (tabela 5) sa maksimalnom temperaturom kolone od 270°C daje najbolje rezultate razdvajanja analita od interesa. Ukupno trajanje analize iznosi 40,33 minuta (postupak pripreme uzoraka i analitički uslovi razdvajanja opisani su u poglavljima 3.2.7.2.4 i 3.2.7.2.5).

Svaki analit od interesa identifikovan je u skladu sa vremenom zadržavanja odgovarajućeg derivatizovanog analitičkog standarda, relativnim vremenom zadržavanja, kao i korišćenjem GC-MS spektralne analize, gde su pojedinačne komponente identifikovane pomoću NIST/NBS i Wiley MS spektralnih biblioteka, kao i poređenjem njihovih retencionih indeksa (RI) sa podacima iz literature [145]. Vreme zadržavanja, relativno vreme zadržavanja, njihovi koeficijenti varijacije (KV%), kao i maseni spektri svakog jedinjenja od interesa prikazani su u Tabeli 11.

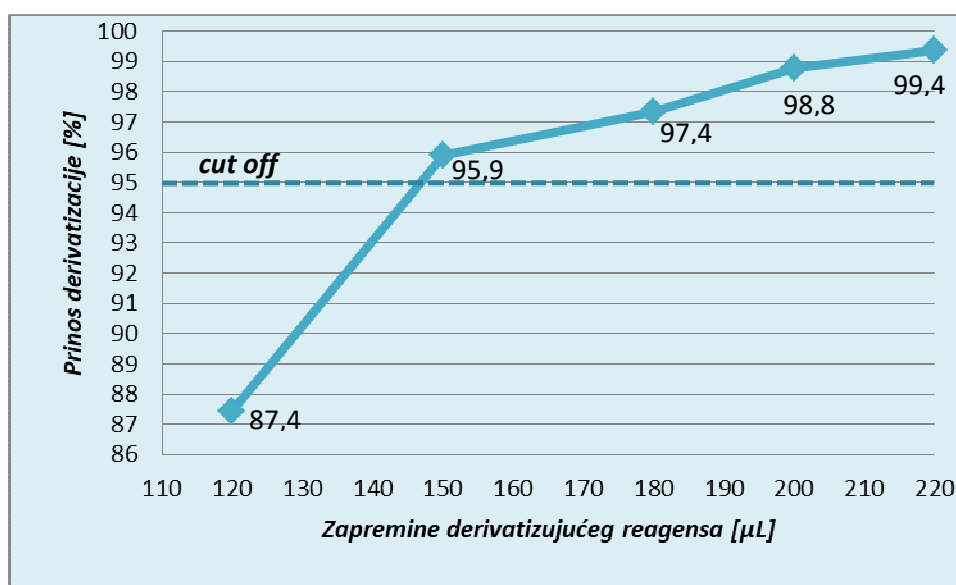
Tabela 11. Retenciona vremena, relativna retenciona vremena i maseni spektri za derivatizovane NHS i interni standard.

<i>Jedinjenje</i>	<i>Retenciono vreme, min</i>	<i>Retenciono vreme, KV% (N=10)</i>	<i>Relativno retenciono vreme</i>	<i>Relativno retenciono vreme, KV% (N=10)</i>	<i>Karakteristični joni, m/z</i>
<i>5-<math>\alpha</math> holestan</i>	14,133	0,031	1	/	372,4/357,4/217,2
<i>TMS-dezmosterol</i>	21,048	0,016	1,489	0,038	456,5/343,3/129,1
<i>TMS-latosterol</i>	21,527	0,021	1,523	0,043	458,5/353,3/255,2
<i>TMS-kampesterol</i>	23,018	0,017	1,629	0,031	472,6/382,4/343,3
<i>TMS-stigmaterol</i>	24,339	0,088	1,723	0,096	484,5/394,4/255,2
<i>TMS-<math>\beta</math>-sitosterol</i>	26,161	0,013	1,851	0,033	486,4/396,4/357,4

KV – Koeficijent varijacije, TMS – Trimetilsilil etar

Kao što je prikazano u tabeli 11, pod hromatografskim uslovima opisanim u poglavlju 3.2.7.2.5., retenciona vremena NHS su se kretala od 21,048 – 26,161 min, sa KV vrednostima od 0,013 – 0,088 % koje su dobijene iz 10 ponavljanja. Karakteristični joni masenog spektra za dato jedinjenje prikazani su kao prekursor jon i dva najzastupljenija produkt jona. Relativno retenciono vreme je izračunato u odnosu na IS, a KV vrednosti relativnih retencionih vremena NHS su se kretale u rasponu od 0,031 – 0,096.

Kako je uveden dodatni korak u pripremi uzoraka, koji je podrazumevao hemijsku reakciju prevođenja analita od interesa u njegove trimetilsilil derivate, neophodno je bilo da se taj korak optimizuje i da se moguće greške svedu na minimum. Titracijom uzoraka derivatizujućim reagensom, hteli smo da utvrdimo graničnu vrednost za prinos derivatizacije, kada je korekcijom površina pikova NHS sa KFD vrednošću, omogućena tačna i precizna kvantifikaciju NHS. Na slici 34 prikazani su odnosi zapremina derivatizujućeg reagensa (x – osa) i prinosa derivatizacije (y – osa).



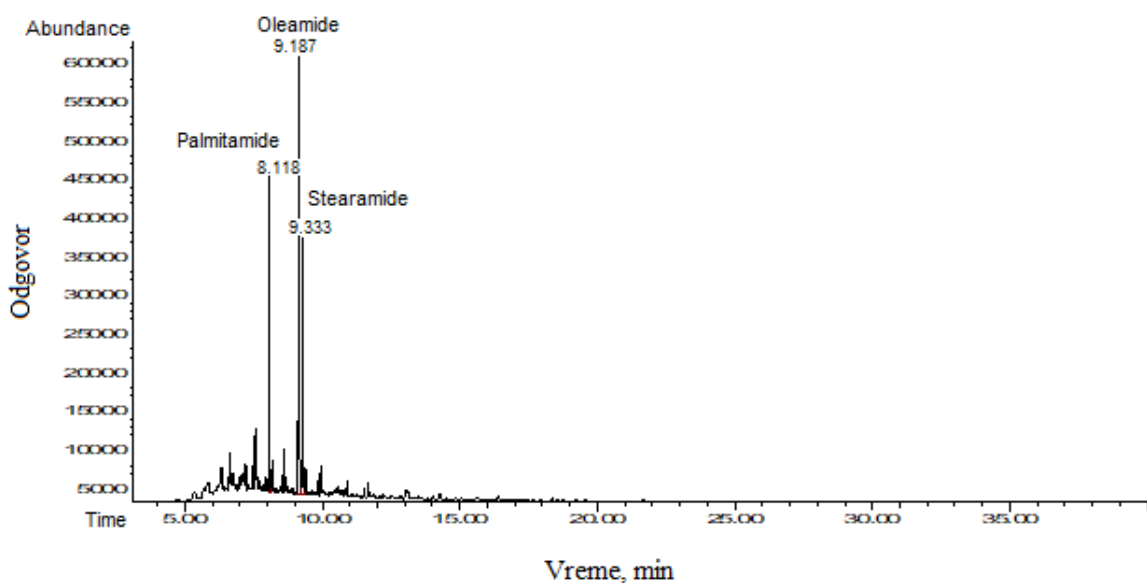
Slika 34. Odnos zapremine derivatizujućeg reagensa i prinosa derivatizacije.

Rezultati optimizacije ovog koraka su pokazali da je adekvatna zapremina derivatizujućeg reagensa (Silon™ HTP) 220 µL sa inkubacionim periodom od 60 min, pri čemu se prinos derivatizacije kreće od 99,1-99,6%. Nakon korekcije sa KFE i KFD vrednosti kampesterola ( $p < 0,05$ ) i  $\beta$ -sitosterola ( $p < 0,01$ ) bile su statistički značajno niže prilikom korišćenja 120 µL derivatizujućeg reagensa (prinos derivatizacije se kretao



između 82,1-93,8%) u odnosu na vrednosti dobijene korišćenjem 220  $\mu$ L. Koncentracije NHS se nisu razlikovale između uzoraka pripremljenih sa 150  $\mu$ L (prinos derivatizacije 95,4-96,5) i sa 220  $\mu$ L. Na ovaj način utvrdili smo da granična vrednost prinosa derivatizacije iznosi 95 %. Vrednosti prinosa derivatizacije veće od 95% omogućavaju uspešno korigovanje vrednosti NHS korišćenjem KFD.

Zbog uticaja sadržaja plastike na prinos derivatizacije, interferirajući plastifikatori su ekstrahovani i identifikovani. Zahvaljujući ovoj kvalitativnoj analizi, dokazano je prisustvo amida masnih kiselina u n-heksanskim sadržajima, koji su stajali 30 min u Pasterovim pipetama, korišćenim tokom pripreme uzoraka. Identifikacija je izvršena korišćenjem GC-MS spektralne analize, gde su pojedinačne komponente identifikovane pomoću NIST/NBS i *Wiley* MS spektralnih biblioteka, kao i poređenjem njihovih retencionih indeksa (RI) sa podacima iz literature [145]. Tri glavna pika poticala su od palmitamida, oleamida i stearamida, a hromatogram ekstrakta prikazan je na slici 35.



Slika 35. GC-FID hromatogram plastifikatora dobijenih ekstrakcijom sadržaja Pasterovih pipeta n-heksanom.

Retenciono vreme, relativno retenciono vreme i njihovi koeficijenti varijacije (KV%), kao i maseni spektar za svaki plastifikator prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Retenciona vremena, relativna retenciona vremena, izračunati retencioni indeksi i maseni spektri za identifikovane amide masnih kiselina iz ekstrakta Pasterovih pipeta.

<i>Jedinjenje</i>	<i>Retenciono vreme, min</i>	<i>Retenciono vreme, KV% (N=10)</i>	<i>Relativno retenciono vreme</i>	<i>Relativno retenciono vreme, CV% (N=10)</i>	<i>RI<sub>exp</sub></i>	<i>Karakteristični joni, m/z</i>
<i>Palmitamid</i>	8,118	0,035	0,575	0,030	2179,1	255,3/72,1/59,1
<i>Oleamid</i>	9,187	0,073	0,658	0,062	2363,0	281,3/72,1/59,1
<i>Stearamid</i>	9,333	0,060	0,665	0,051	2386,0	283,3/72,1/59,1

KV – Koeficijent varijacije, RI<sub>exp</sub> – Izračunati retencioni indeks prema seriji n-alkana na ZB-5MS koloni

Sa ciljem da se utvrdi da li su i ftalati ekstrahovani iz Pasterovih pipeta, sprovedena je kvantitativna analiza njihovog sadržaja u ekstraktima. Ova analiza pokazala je prisustvo manje od 0,01% benzil-butyl-ftalata (BBP), di-(2-etilheksil)-ftalata (DEHP) i di-n-butyl-ftalat (DBP) u ekstraktu.

Nakon što su mogući problemi prilikom procesa derivatizacije prevaziđeni analizirali smo efikasnost prinosa ekstrakcije. Efikasnost ekstrakcije kretala se u rasponu od 80–95% i uspešno je korigovana korišćenjem KFE vrednosti.

#### ***4.7.2. Stabilnost uzoraka***

Rezultati studije stabilnosti nativnih uzoraka seruma i plazme pokazali su da tokom dva meseca skladištenja uzoraka na temperaturi od -80 °C ne dolazi do značajnih promena u koncentracijama NHS u odnosu na koncentracije određene u svežim uzorcima (postupak opisan u poglavlju 3.3.1.8.1). U tabeli 13 su prikazane srednje vrednosti NHS sa standardnim devijacijama dobijenim u vremenskim razmacima u kojima je ispitivana stabilnost nativnih uzoraka čuvanih na -80 °C.

Tabela 13. Srednje vrednosti NHS dobijene u vremenskim razmacima u kojima je ispitivana stabilnost nativnih uzoraka seruma i plazme na temperaturi od -80 °C.

<i>Plazma</i>						
<i>NHS</i>	<i>1. dan</i>	<i>2. dan</i>	<i>7. dan</i>	<i>15. dan</i>	<i>30. dan</i>	<i>60. dan</i>
<i>Dezmosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	13,8±0,56	14,0±0,73	14,1±0,68	14,1±0,55	13,6±0,89	13,7±0,75
<i>Latosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	13,4±0,46	13,9±0,57	14,1±0,45	13,9±0,69	13,1±0,41	13,0±0,51
<i>Kampesterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	21,4±0,66	21,1±0,57	21,1±0,62	21,7±0,29	21,0±0,52	20,9±0,34
<i>Stigmasterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	4,4±0,42	4,7±0,36	4,3±0,44	5,1±0,49	4,8±0,34	4,6±0,42
<i><math>\beta</math>-sitosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	9,6±0,26	9,9±0,21	9,0±0,27	8,9±0,34	8,4±0,22	9,2±0,23
<i>Serum</i>						
<i>Dezmosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	12,7±0,53	14,9±0,51	14,2±0,55	15,4±0,63	14,6±0,61	14,8±0,54
<i>Latosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	10,8±0,49	10,7±0,48	11,4±0,44	11,5±0,72	10,6±0,64	11,4±0,69
<i>Kampesterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	21,7±0,93	22,4±0,72	22,3±0,85	22,9±0,71	22,5±0,62	22,7±0,64
<i>Stigmasterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	3,8±0,22	4,1±0,30	4,2±0,29	4,2±0,22	4,4±0,34	4,3±0,33
<i><math>\beta</math>-sitosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>	10,1±0,31	10,5±0,44	10,7±0,43	10,4±0,39	10,2±0,41	10,5±0,38

NHS – Neholesterolski steroli.

Rezultati studije ispitivanja stabilnosti pripremljenih (derivatizovanih) uzoraka plazme, pokazali su značajno niže koncentracije svih NHS, osim stigmasterola, nakon 15-og dana čuvanja na -20 °C ( $p < 0,01$  za dezmosterol,  $p < 0,01$  za latosterol,  $p < 0,001$  za kampesterol,  $p < 0,01$  za  $\beta$ -sitosterol). Ista studija sprovedena je i sa uzorcima seruma, u kojima se samo koncentracija dezmosterola statistički značajno smanjila nakon 15-og dana čuvanja na -20 °C ( $p < 0,01$ ).

U okviru studija stabilnosti uzoraka, sprovedena je i studija ispitivanja uticaja zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka na koncentraciju NHS. Sprovedeno je pet ciklusa

zamrzavanja/odmrzavanja nativnih i antioksidansom obogaćenih *pool*-ova plazme. Rezultati su pokazali da nakon prvog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja dolazi do značajnog smanjenja koncentracija dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola u nativnom uzorku *pool*-a ( $p < 0,05$  i  $p < 0,05$ ). U *pool*-u plazme kome je dodat antioksidans, koncentracije dezmosterola i stigmasterola su konstantne tokom četiri ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, dok u petom ciklusu dolazi do statistički značajnog smanjenja u njihovim koncentracijama ( $p < 0,05$  i  $p < 0,05$ ). Koncentracije ostalih NHS se nisu menjale tokom svih pet ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja.

#### ***4.7.3. Validacija i verifikacija metode za kvantitativno određivanje NHS***

Primenom linearne regresione analize, dobijene su kalibracione krive za sve ispitivane NHS. Rasponi koncentracija korišćeni za izradu kalibracionih kriva prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Rasponi koncentracija kalibracionih krivih, koncentracije NHS kod zdravih osoba, limiti detekcije (LOD) i limiti kvantifikacije (LOQ) za svaki NHS.

<i>Analit</i>	<i>Raspon koncentracija [μmol/L]</i>	<i>Prosečne koncentracije kod zdravih osoba (N=50) [μmol/L]*</i>	<i>LOD [μmol/L]</i>			<i>LOQ [μmol/L]</i>		
			<i>Određena iz standardnih rastvora</i>	<i>Određena iz uzoraka<sup>#</sup></i>	<i>Prosečan vrednost S/N odnosa određena u uzorcima<sup>#</sup></i>	<i>Određena iz standardnih rastvora</i>	<i>Određena iz uzoraka<sup>#</sup></i>	<i>Prosečan vrednost S/N odnosa određena u uzorcima<sup>#</sup></i>
<i>Dezmosterol</i>	1,394-22,305	10,13±2,820	0,235	0,465	3,2	1,209	1,481	10,2
<i>Latosterol</i>	1,587-19,049	8,89±3,444	0,299	0,401	2,9	1,165	1,385	10
<i>Kampesterol</i>	1,846-44,309	19,48±6,396	0,251	0,591	3	1,259	1,952	9,9
<i>Stigmasterol</i>	0,981-15,694	5,91±2,283	0,185	0,415	3	0,744	1,356	9,8
<i>β-sitosterol</i>	1,674-26,790	8,55±2,184	0,370	0,406	3,2	0,914	1,243	9,8

\* Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

S/N – Odnos signala i šuma.

<sup>#</sup> Vrednosti dobijene za svaki NHS na LOD i LOQ nivoima, određene u pentuplikatu.

Koncentracije koje su definisane kao LOD i LOQ vrednosti, dobijene su iz razblaženih standardnih rastvora, čiji su S/N odgovori iznosili 3, odnosno 10 (tabela 14). Vrednosti LOD i LOQ dobijene na ovaj način kretale su se u rasponu koncentracija od 0,185-0,370  $\mu\text{mol/L}$ , odnosno od 0,744-1,209  $\mu\text{mol/L}$ . U procesu provere uticaja matriksa biološkog materijala na LOD i LOQ, određene su vrednosti za LOD i LOQ u razblaženim uzorcima plazme (tabela 14). Pri vrednostima S/N čiji je raspon iznosio od 2,9-3,2, vrednosti LOD u razblaženim uzorcima su se kretale od 0,401-0,591  $\mu\text{mol/L}$ , dok su se pri vrednostima S/N od 9,8-10,2, vrednosti LOQ kretale od 1,243-1,952  $\mu\text{mol/L}$ . U postupku kliničke verifikacije metode, u uzorcima razblaženim do LOD i LOQ koncentracija, određene su nepreciznosti unutar i između serija, koje su iznosile manje od 20% za svaki NHS (22).

U postupku validacije metode, a prema FDA smernicama, ispitivana je preciznost metode za kvantitativno određivanje NHS [146]. Preciznost je prikazana kao KV između koncentracija analita dobijenih unutar serije i koncentracija dobijenih između serija. Za plazmu,  $KV_{\text{unutar serije}}$  kretao se u rasponu od 2,75-9,55 %, a  $KV_{\text{između serija}}$  u rasponu od 5,80-7,75%. Za serum,  $KV_{\text{unutar serije}}$  iznosio je od 3,10-5,72 %, a  $KV_{\text{između serija}}$  od 3,05-10,97%. Obe varijabilnosti za svaki NHS u oba tipa uzorka su bile prihvatljive, jer su iznosile manje od 15% [146]. Rezultati ispitivanja preciznosti prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Preciznosti unutar i između serija za vrednosti NHS u plazmi i serumu.

<i>NHS</i>	<i>Plazma</i>				<i>Serum</i>			
	<i>Unutar serije</i>		<i>Između serija</i>		<i>Unutar serije</i>		<i>Između serija</i>	
	<i>Prosečna koncentracija [μmol/L]</i>	<i>KV (%)</i>	<i>Prosečna koncentracija [μmol/L]</i>	<i>KV (%)</i>	<i>Prosečna koncentracija [μmol/L]</i>	<i>KV (%)</i>	<i>Prosečna koncentracija [μmol/L]</i>	<i>KV (%)</i>
<i>Dezmosterol</i>	13,84±0,557	4,02	13,38±1,031	7,70	12,69±0,534	4,30	14,39±1,131	7,86
<i>Latosterol</i>	13,37±0,457	3,41	14,13±0,972	6,88	10,85±0,493	4,54	13,47±1,478	10,97
<i>Kampesterol</i>	21,37±0,659	3,09	21,06±1,633	7,75	21,72±0,925	4,26	23,60±0,720	3,05
<i>Stigmasterol</i>	4,41±0,421	9,55	4,66±0,270	5,80	3,80±0,217	5,72	4,64±0,328	7,07
<i>β-sitosterol</i>	9,60±0,264	2,75	9,19±0,550	5,98	10,13±0,314	3,10	10,37±0,534	5,15

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

KV – Koeficijent varijacije; NHS – Neholesterolski steroli.



Proverom tačnosti analitičke metode utvrđen je stepen slaganja između stvarne koncentracije i vrednosti dobijene primenom analitičkog postupka. Određivan je procenat prinosa ili tzv. „*recovery*” vrednost. U tabelama 16 i 17 su prikazane koncentracije standardnih rastvora kojima su obogaćeni uzorci seruma i plazme.

Za uspostavljenu metodu, *recovery* je iznosio između 93 i 108% za plazmu i između 83 i 127% za serum, dok su prihvatljive vrednosti u opsegu od  $\pm 25\%$  prema smernicama FDA [146]. Kako su dobijeni zadovoljavajući rezultati za razliku između očekivanih i utvrđenih koncentracija za svih pet nivoa raspona koncentracija za plazmu, plazma je korišćena kao biološki materijal izbora. Vrednosti *recovery* testa za svaki nivo koncentracija za uspostavljenu metodu, koristeći plazmu i serum kao biološke materijale, prikazani su u tabelama 16 i 17. Takođe, koristeći podatke iz *recovery* testa primenom linearne regresione i korelacione analize izvršena je procena tačnosti metode, a rezultati su prikazani u tabeli 18. Stepem slaganja između dodatih i dobijenih koncentracija za svih pet NHS je bio veći od 0,9 ( $r \geq 0,9$ ), a nagib prave se statistički nije značajno razlikovao od 1 ( $b=1$ ).

Tabela 16. *Recovery* test u plazmi za uspostavljenu metodu za određivanje NHS.

<i>NHS</i>	<i>Originalna koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Dodata koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Dobijena koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Recovery (%)</i>
<i>Dezmosterol</i>	13,5	18,9	38,1	103
	13,5	35,2	53,5	101
	13,5	51,4	68,6	99
	13,5	67,6	79,5	93
	13,5	83,8	97,1	95
<i>Latosterol</i>	12,9	45	70,4	113
	12,9	74,1	110,1	121
	12,9	103,1	137,4	114
	12,9	132,1	168,1	113
	12,9	161	183,1	103
<i>Kampesterol</i>	21,2	6,2	36,3	105
	21,2	19,9	52,0	108
	21,2	33,5	63,5	103
	21,2	47,3	76,5	101
	21,2	61	90,7	102
<i>Stigmasterol</i>	4,4	23,1	33,0	114
	4,4	37	47,9	112
	4,4	50,7	62,0	110
	4,4	64,5	76,2	108
	4,4	78,3	85,2	101
<i>β-sitosterol</i>	9,6	6,6	27,5	107
	9,6	14,5	37,4	111
	9,6	22,5	45,1	108
	9,6	30,7	52,8	106
	9,6	38,6	56,7	98

NHS – Neholesterolski steroli.

Tabela 17. *Recovery* test u serumu za svih pet nivoa koncentracija za NHS.

<i>NHS</i>	<i>Originalna koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Dodata koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Dobijena koncentracija (μmol/L)</i>	<i>Recovery (%)</i>
<i>Dezmosterol</i>	13,5	18,9	40,2	109
	13,5	35,2	59,4	112
	13,5	51,4	69,2	100
	13,5	67,6	83,9	98
	13,5	83,8	102,0	100
<i>Latosterol</i>	12,7	45	79,2	127
	12,7	74,1	98,4	108
	12,7	103,1	129,2	107
	12,7	132,1	164,7	110
	12,7	161	193,2	108
<i>Kampesterol</i>	22,7	6,2	37,9	108
	22,7	19,9	53,7	110
	22,7	33,5	67,3	108
	22,7	47,3	79,9	105
	22,7	61	93,5	104
<i>Stigmasterol</i>	5,8	23,1	27,1	92
	5,8	37	36,8	85
	5,8	50,7	47,1	83
	5,8	64,5	63,2	89
	5,8	78,3	74,9	88
<i>β-sitosterol</i>	10,4	6,6	16,2	108
	10,4	14,5	24,1	104
	10,4	22,5	32,1	104
	10,4	30,7	40,3	107
	10,4	38,6	48,2	104

NHS – Neholesterolski steroli.

Tabela 18. Rezultati regresione analize za *recovery* test u serumu i u plazmi.

<i>NHS</i>	<i>Plazma</i>		<i>Serum</i>	
	<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	<i>Nagib (b), %</i>	<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	<i>Nagib (b), %</i>
<i>Dezmosterol</i>	0,998	93,4	0,997	97,6
<i>Latosterol</i>	0,994	105,7	0,997	106,9
<i>Kampesterol</i>	0,999	100,9	0,999	104,4
<i>Stigmasterol</i>	0,997	102,9	0,998	87,5
<i>β-sitosterol</i>	0,994	100,5	0,999	105,5

NHS – Neholesterolski steroli

#### ***4.7.4. Ispitivanje koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola***

Vrednosti koncentracija markera sinteze i apsorpcije za sve tri grupe ispitanika prikazane su u tabeli 19. Vrednosti NHS su sledile normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije i poređene su korišćenjem ANCOVA statističkog testa uz korekciju za starost ispitanika.

Tabela 19. Apsolutne i relativne vrednosti markera sinteze i apsorpcije holesterola kod pacijenata sa IBS i kontrolne grupe.

<i>Parametar</i>	<i>Kontrolna grupa (N=31)</i>	<i>Pacijenti na terapiji statinima (N=31)</i>	<i>Pacijenti bez terapije statinima (N=47)</i>	<i>p</i>
<b><i>Apsolutne vrednosti, <math>\mu\text{mol/L}</math></i></b>				
<i>Dezmosterol</i>	9,10 (8,20-10,10)	11,26 (9,81-12,92)	13,72 (12,17-15,47)	0,057 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> <0,05 <sup>c</sup>
<i>Latosterol</i>	6,84 (5,72-8,18)	9,99 (8,84-11,29)	10,38 (9,23-11,66)	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,687 <sup>c</sup>
<i>Kampesterol</i>	17,70 (15,46-20,26)	15,07 (12,98-17,48)	15,89 (14,43-17,49)	0,151 <sup>a</sup> 0,305 <sup>b</sup> 0,524 <sup>c</sup>
<i>Stigmasterol</i>	4,13 (2,65-6,42)	2,27 (1,93-2,68)	2,20 (1,94-2,51)	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,807 <sup>c</sup>
<i><math>\beta</math>-sitosterol</i>	7,99 (7,28-8,77)	6,85 (6,17-7,60)	6,58 (6,07-7,13)	0,091 <sup>a</sup> <0,05 <sup>b</sup> 0,516 <sup>c</sup>
<b><i>Relativne vrednosti u odnosu na ukupan holesterol (UH), mmol/mol</i></b>				
<i>Dezmosterol/UH</i>	2,03 (1,84-2,25)	2,36 (2,07-2,71)	2,95 (2,56-3,39)	0,138 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> <0,05 <sup>c</sup>
<i>Latosterol/UH</i>	1,53 (1,30-1,80)	2,06 (1,74-2,43)	2,18 (1,97-2,42)	<0,01 <sup>a</sup> <0,01 <sup>b</sup> 0,540 <sup>c</sup>
<i>Kampesterol/UH</i>	3,95 (3,47-4,50)	3,12 (2,74-3,54)	3,39 (3,02-3,80)	<0,05 <sup>a</sup> 0,138 <sup>b</sup> 0,328 <sup>c</sup>
<i>Stigmasterol/UH</i>	0,89 (0,57-1,39)	0,46 (0,38-0,56)	0,47 (0,41-0,54)	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,907 <sup>c</sup>
<i><math>\beta</math>-sitosterol/UH</i>	1,78 (1,61-1,97)	1,41 (1,27-1,55)	1,40 (1,26-1,56)	<0,05 <sup>a</sup> <0,05 <sup>b</sup> 0,940 <sup>c</sup>
<b><i>Odnos markera sinteze i apsorpcije</i></b>				
<i>Dezmosterol/ <math>\beta</math>-sitosterol</i>	1,14 (1,01-1,28)	1,64 (1,38-1,96)	2,09 (1,79-2,44)	<0,05 <sup>a</sup> <0,001 <sup>a</sup> <0,05 <sup>c</sup>
<i>Latosterol/ <math>\beta</math>-sitosterol</i>	0,86 (0,68-1,07)	1,46 (1,21-1,75)	1,58 (1,37-1,81)	<0,001 <sup>a</sup> <0,001 <sup>b</sup> 0,514 <sup>c</sup>

Podaci su predstavljeni kao geometrijske sredine (95% interval pouzdanosti). P vrednosti su izvedene iz ANCOVA testa uz korekciju za starost ispitanika. Kao *post hoc* korišćen je *Least Significant Difference* test.  
a – Kontrolna grupa vs. pacijenti na terapiji statinima; b – Kontrolna grupa vs. pacijenti bez terapije statinima; c – Pacijenti na terapiji statinima vs. pacijenti bez terapije statinima.

Markeri sinteze i apsorpcije holesterola su prikazani kao apsolutne koncentracije i kao relativne vrednosti, u odnosu na holesterol. Apsolutne koncentracije dezmosterola bile su više kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u poređenju sa KG i pacijentima koji su bili na terapiji statinima ( $p < 0,001$  i  $p < 0,05$ ). Međutim, apsolutne koncentracije latosterola bile su više kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG ( $p < 0,001$  za oba poređenja), dok nije bilo značajne razlike između dveju grupa pacijenata. Poređenja relativnih vrednosti markera sinteze, prikazanih kroz odnos latosterol/UH i dezmosterol/UH, ukazala su da se statistička značajnost u odnosu na apsolutne vrednosti nije izgubila. Apsolutne koncentracije kampesterola su bile slične kod obe grupe pacijenata i u KG, međutim relativne vrednosti kampesterola pokazale su razliku između pacijenata koji su bili na terapiji statinima i KG ( $p < 0,05$ ). Među markerima apsorpcije holesterola, nivoi stigmasterola su bili značajno niži u obe grupe pacijenata u odnosu na KG ( $p < 0,001$  za oba poređenja), dok su nivoi  $\beta$ -sitosterola bili značajno niži kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u odnosu na KG ( $p < 0,05$ ). Međutim, relativne vrednosti  $\beta$ -sitosterola bile su znatno niže u obe grupe pacijenata u odnosu na KG ( $p < 0,05$  za oba poređenja). Poređenje relativnih vrednosti stigmasterola pokazalo je iste statistički značajne razlike kao poređenje apsolutnih vrednosti. Za procenu efikasnosti sinteze i apsorpcije holesterola, te procenu homeostaze, korišćeni su odnosi markera sinteze i markera apsorpcije. U ovom radu korišćena su dva odnosa, dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol i latosterol/ $\beta$ -sitosterol. Odnos latosterol/ $\beta$ -sitosterol je bio viši u obe grupe pacijenata u poređenju sa KG ( $p < 0,001$  za oba poređenja), a najviše vrednosti su imali pacijenti koji nisu bili na terapiji statinima. Odnos dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol pokazao je isti trend kao i odnos latosterol/ $\beta$ -sitosterol sa statistički značajnim razlikama između svih ispitivanih grupa. Takođe, slični rezultati su primećeni prilikom korišćenja ostalih odnosa između pojedinačnih markera sinteze i apsorpcije (podaci nisu prikazani).

#### ***4.7.5. Korelaciona analiza NHS sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i karakteristikama LDL i HDL subklasa***

U cilju sagledavanja povezanosti homeostaze holesterola sa koncentracijama osnovnih lipidnih parametara i veličinom LDL i HDL čestica, izvršena je *Pearson*-ova korelaciona analiza. Analiza je sprovedena za svaku grupu ispitanika posebno, a rezultati su prikazani u tabelama 20-25.

Tabela 20. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera sinteze holesterola u KG.

<i>Parametri</i>	<i>Dezmosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Latosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Dezmosterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Latosterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	0,308	0,119	<b>0,485</b>	<b>0,010</b>	-0,242	0,225	0,190	0,343
<i>HDL-h, mmol/L</i>	-0,079	0,694	0,009	0,963	-0,324	0,100	-0,144	0,473
<i>LDL-h, mmol/L</i>	0,242	0,224	<b>0,396</b>	<b>0,041</b>	-0,097	0,630	0,226	0,258
<i>TG, mmol/L</i>	<b>0,445</b>	<b>0,020</b>	<b>0,603</b>	<b>0,001</b>	0,259	0,192	<b>0,553</b>	<b>0,003</b>
<i>LDL dijametar, nm</i>	<b>-0,459</b>	<b>0,016</b>	-0,116	0,566	-0,367	0,059	-0,079	0,690
<i>sdLDL, %</i>	0,311	0,115	-0,183	0,361	<b>0,443</b>	<b>0,021</b>	-0,112	0,576
<i>HDL dijametar, nm</i>	-0,167	0,405	-0,095	0,639	-0,078	0,698	-0,079	0,695
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	0,150	0,455	0,143	0,476	0,177	0,377	0,171	0,395

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.

U tabeli 20 prikazani su rezultati korelacione analize u KG. Utvrđene su pozitivne korelacije između apsolutnih koncentracija latosterola i koncentracija UH, LDL-h, kao i TG. Međutim, pri poređenju relativnih vrednosti latosterola, zadržala se samo pozitivna korelacija sa koncentracijom TG. Apsolutne koncentracije dezmosterola, takođe su pokazale pozitivnu korelaciju sa koncentracijom TG, ali i negativnu sa veličinom LDL čestica. Relativne vrednosti dezmosterola su pokazale pozitivnu korelaciju sa udelom sdLDL. Nije primećena veza između markera sinteze i HDL-h i veličine HDL čestica.

U tabeli 21 prikazani su rezultati korelacione analize za apsolutne i relativne vrednosti markera apospcije u KG.

Tabela 21. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera apsorpcije holesterola u KG.

<i>Parametri</i>	<i>Kampesterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Stigmasterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Kampesterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Stigmasterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol /UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	0,291	0,141	0,116	0,681	0,148	0,462	-0,132	0,513	-0,041	0,879	<b>-0,423</b>	<b>0,028</b>
<i>HDL-h, mmol/L</i>	0,359	0,066	-0,214	0,445	0,257	0,196	0,184	0,358	-0,296	0,266	-0,006	0,975
<i>LDL-h, mmol/L</i>	0,066	0,744	0,273	0,325	-0,013	0,948	-0,200	0,316	0,234	0,384	-0,359	0,066
<i>TG, mmol/L</i>	0,011	0,958	0,134	0,634	-0,128	0,526	-0,144	0,474	-0,012	0,966	-0,317	0,107
<i>LDL dijametar, nm</i>	-0,360	0,065	-0,097	0,722	<b>-0,462</b>	<b>0,015</b>	-0,298	0,131	-0,073	0,789	-0,368	0,059
<i>sdLDL, %</i>	0,213	0,286	0,156	0,564	0,343	0,080	<b>0,382</b>	<b>0,049</b>	0,206	0,444	<b>0,463</b>	<b>0,015</b>
<i>HDL dijametar, nm</i>	0,063	0,754	-0,112	0,680	-0,262	0,187	0,161	0,421	-0,098	0,717	-0,155	0,439
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	0,114	0,571	0,052	0,849	0,109	0,587	0,120	0,550	0,027	0,921	0,134	0,506

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.



Apsolutne koncentracije  $\beta$ -sitosterola su bile u negativnoj korelaciji sa LDL dijametrom, dok su relativne vrednosti bile u negativnoj korelaciji sa UH, a u pozitivnoj korelaciji sa udelom sdLDL čestica. Takođe, relativne vrednosti kampesterola su pokazale pozitivnu korelaciju sa udelom sdLDL čestica. Nisu primećene korelacije markera apsorpcije sa koncentracijom HDL-h, veličinom HDL čestica i udelom malih HDL čestica.

Rezultati korelacione analize koji su obuhvatali apsolutne i relativne vrednosti markera sinteze, za pacijente sa IBS koji su bili na terapiji statinima, prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera sinteze holesterola u grupi pacijenata na terapiji statinima.

<i>Parametri</i>	<i>Dezmosterol,</i> <i><math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Latosterol,</i> <i><math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Dezmosterol/U,</i> <i><math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Latosterol/UH,</i> <i><math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	0,292	0,131	-0,225	0,249	-0,314	0,104	<b>-0,660</b>	<b>0,001</b>
<i>HDL-h, mmol/L</i>	-0,228	0,243	-0,058	0,768	-0,317	0,100	-0,119	0,547
<i>LDL-h, mmol/L</i>	0,253	0,193	-0,280	0,149	-0,330	0,086	<b>-0,684</b>	<b>0,001</b>
<i>TG, mmol/L</i>	<b>0,490</b>	<b>0,008</b>	0,111	0,573	0,253	0,194	-0,103	0,602
<i>LDL dijametar, nm</i>	-0,157	0,416	-0,095	0,623	0,018	0,929	-0,010	0,959
<i>sdLDL, %</i>	-0,121	0,533	0,020	0,919	-0,295	0,127	-0,039	0,844
<i>HDL dijametar, nm</i>	<b>-0,400</b>	<b>0,032</b>	0,083	0,668	-0,280	0,148	0,224	0,251
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	<b>0,414</b>	<b>0,025</b>	0,053	0,784	0,302	0,118	-0,016	0,936

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.

Uočili smo snažnu negativnu korelaciju relativnih vrednosti latosterola sa koncentracijama UH i LDL-h. Očekivano, koncentracije dezmosterola su pozitivno

korelirale sa koncentracijama TG, kao i sa udelom malih HDL čestica, dok je primećena negativna korelacija sa HDL dijametrom.

Kod pacijenata koji su bili na terapiji statinima, rezultati korelacione analize markera apsorpcije sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i veličinom dominantnih dijametara HDL i LDL čestica, kao i sa udelima sdLDL i malih HDL čestica, prikazani su u tabeli 23.

Tabela 23. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera apsorpcije holesterola u grupi pacijenata na terapiji statinima.

<i>Parametri</i>	<i>Kampesterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Stigmasterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Kampesterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Stigmasterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	<b>0,523</b>	<b>0,004</b>	-0,078	0,694	<b>0,464</b>	<b>0,013</b>	-0,009	0,964	<b>-0,487</b>	<b>0,009</b>	-0,315	0,103
<i>HDL-h, mmol/L</i>	0,250	0,199	0,127	0,518	0,312	0,106	0,204	0,298	0,047	0,811	0,218	0,264
<i>LDL-h, mmol/L</i>	<b>0,460</b>	<b>0,019</b>	-0,083	0,673	<b>0,397</b>	<b>0,036</b>	0,061	0,758	<b>-0,477</b>	<b>0,010</b>	-0,358	0,061
<i>TG, mmol/L</i>	0,180	0,360	-0,196	0,319	0,107	0,589	-0,029	0,884	-0,331	0,085	-0,200	0,308
<i>LDL dijametar, nm</i>	0,089	0,647	-0,075	0,698	0,165	0,393	0,226	0,248	0,071	0,721	0,283	0,145
<i>sdLDL, %</i>	0,073	0,705	0,283	0,137	0,132	0,496	0,003	0,987	0,262	0,178	0,082	0,678
<i>HDL dijametar, nm</i>	0,011	0,955	0,161	0,403	0,098	0,612	0,212	0,279	0,300	0,113	<b>0,392</b>	<b>0,039</b>
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	0,016	0,935	-0,134	0,488	-0,028	0,886	-0,072	0,714	-0,129	0,512	-0,111	0,574

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.

U ovoj grupi pacijenata apsolutne koncentracije kampesterola i  $\beta$ -sitosterola su pokazale pozitivnu korelaciju sa UH i LDL-h. Takođe, dobili smo negativnu asocijaciju između relativnih vrednosti stigmasterola i UH i LDL-h. Pozitivna korelacija je primećena između relativnih vrednosti  $\beta$ -sitosterola i veličine HDL čestica.

Na isti način sprovedena je i korelaciona analiza kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima. Vrednosti parametara korelacione analize koja je uključivala apsolutne i relativne vrednosti markera sinteze prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera sinteze holesterola u grupi pacijenata bez terapije statinima.

<i>Parametri</i>	<i>Dezmosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Latosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Dezmosterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Latosterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	0,193	0,209	<b>0,515</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,490</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,321</b>	<b>0,034</b>
<i>HDL-h, mmol/L</i>	0,124	0,423	<b>0,402</b>	<b>0,007</b>	<b>-0,320</b>	<b>0,034</b>	-0,134	0,385
<i>LDL-h, mmol/L</i>	0,179	0,251	<b>0,492</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,483</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,308</b>	<b>0,044</b>
<i>TG, mmol/L</i>	0,084	0,588	0,241	0,115	-0,293	0,053	-0,230	0,133
<i>LDL dijametar, nm</i>	<b>-0,381</b>	<b>0,012</b>	-0,016	0,920	<b>-0,436</b>	<b>0,004</b>	-0,169	0,285
<i>sdLDL, %</i>	0,201	0,197	-0,044	0,779	0,242	0,123	0,186	0,238
<i>HDL dijametar, nm</i>	-0,153	0,328	-0,198	0,204	0,093	0,558	0,105	0,508
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	0,155	0,320	-0,053	0,738	0,147	0,355	-0,128	0,417

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.

Apsolutne i relativne vrednosti dezmosterola pokazale su negativnu korelaciju sa LDL dijametrom, dok su apsolutne koncentracije latosterola bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama UH, HDL-h i LDL-h. Kada su vrednosti dezmosterola prevedene u

relativne vrednosti, uočena je negativna korelacija sa koncentracijama UH, HDL-h i LDL-h. Negativna korelacija je primećena i između relativnih vrednosti latosterola i koncentracija UH i LDL-h.

Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih koncentracija markera apsorpcije, za pacijente sa IBS koji nisu bili na terapiji statinima, prikazani su u tabeli 25.

Tabela 25. Rezultati korelacione analize apsolutnih i relativnih vrednosti markera apsorpcije holesterola u grupi pacijenata bez terapije statinima.

<i>Parametri</i>	<i>Kampesterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Stigmasterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol, <math>\mu\text{mol/L}</math></i>		<i>Kampesterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i>Stigmasterol/UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>		<i><math>\beta</math>-sitosterol /UH, <math>10^2 \text{ mmol/mol}</math></i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>UH, mmol/L</i>	0,285	0,061	0,226	0,140	0,239	0,119	<b>-0,566</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,441</b>	<b>0,003</b>	<b>-0,674</b>	<b>0,001</b>
<i>HDL-h, mmol/L</i>	<b>0,303</b>	<b>0,045</b>	0,129	0,403	<b>0,358</b>	<b>0,017</b>	-0,266	0,081	<b>-0,304</b>	<b>0,045</b>	-0,284	0,061
<i>LDL-h, mmol/L</i>	0,198	0,203	0,178	0,255	0,151	0,335	<b>-0,605</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,473</b>	<b>0,001</b>	<b>-0,703</b>	<b>0,001</b>
<i>TG, mmol/L</i>	0,283	0,063	0,287	0,059	0,179	0,245	-0,208	0,176	-0,096	0,536	<b>-0,340</b>	<b>0,024</b>
<i>LDL dijametar, nm</i>	-0,102	0,514	0,095	0,545	0,095	0,543	-0,197	0,212	-0,010	0,948	-0,048	0,761
<i>sdLDL, %</i>	0,182	0,242	-0,185	0,236	-0,058	0,711	0,256	0,102	-0,089	0,575	0,073	0,645
<i>HDL dijametar, nm</i>	<b>-0,309</b>	<b>0,044</b>	-0,226	0,146	-0,177	0,256	0,009	0,956	0,013	0,933	0,138	0,385
<i>Male HDL subfrakcije, %</i>	0,243	0,117	0,204	0,190	<b>0,359</b>	<b>0,018</b>	0,188	0,233	0,183	0,246	0,248	0,114

UH – ukupan holesterol; TG – trigliceridi; LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine; HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine; sdLDL – male guste LDL, r – *Pearson*-ov koeficijent korelacije. Podaci su analizirani *Pearson*-ovom korelacionom analizom. Istaknute su statistički značajne razlike.

Vrednosti markera apsorpcije, kampesterola i  $\beta$ -sitosterola, su pokazale pozitivnu korelaciju sa HDL-h. Koncentracije kampesterola su negativno korelirale sa HDL dijametrom, dok su koncentracije  $\beta$ -sitosterola pozitivno korelirale sa udelom malih HDL čestica. Što se tiče relativnih vrednosti i u ovoj grupi ispitanika su primećene negativne korelacije između relativnih vrednosti sva tri markera apsorpcije i koncentracija UH i LDL-h, zatim između relativnih koncentracija stigmasterola i koncentracija HDL-h, te između relativnih koncentracija  $\beta$ -sitosterola i koncentracija TG.

#### ***4.7.5. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola***

U ovom radu, za procenu obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola korišćena su dva markera sinteze (dezmosterol i latosterol) i jedan marker apsorpcije ( $\beta$ -sitosterol). Zbog detaljnijeg uvida u sintetske puteve holesterola, za procenu efikasnosti sinteze holesterola korišćeni su prekursori oba sintetska puta (*Kandutsch-Russel-ovog* i *Bloch-ovog*). Kako  $\beta$ -sitosterol predstavlja najzastupljeniji sterol u namirnicama biljnog porekla [48, 151], njegove koncentracije su korišćene za procenu nivoa apsorpcije holesterola.

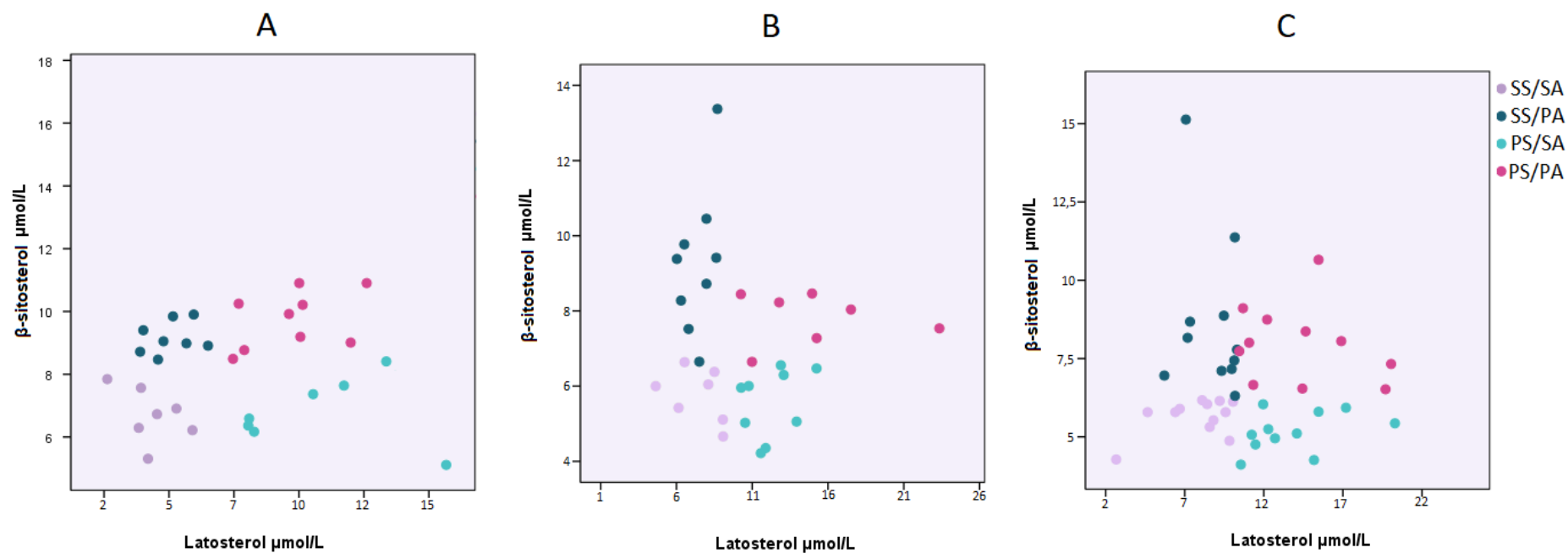
U cilju boljeg sagledavanja nivoa sinteze i apsorpcije holesterola, podela ispitanika u podgrupe izvršena je na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija latosterola i  $\beta$ -sitosterola, kao i dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola. Za svaku grupu ispitanika izračunata je medijana koncentracija ovih NHS. Medijalna vrednost koncentracije latosterola u KG iznosila je 7,21  $\mu\text{mol/L}$ , u grupi pacijenata na terapiji statinima 9,66  $\mu\text{mol/L}$ , a u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima 10,30  $\mu\text{mol/L}$ . Medijalne vrednosti dezmosterola iznosile su 8,95  $\mu\text{mol/L}$  u KG, 12,18  $\mu\text{mol/L}$  kod pacijenata na terapiji statinima i 12,70  $\mu\text{mol/L}$  kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima. Vrednosti medijana za  $\beta$ -sitosterol su iznosile 8,41  $\mu\text{mol/L}$  u kontrolnoj grupi, 6,64  $\mu\text{mol/L}$  kod pacijenata na terapiji statinima i 6,20  $\mu\text{mol/L}$  kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima. Zahvaljujući ovim podelama, u okviru svake ispitivane grupe formirane su 4 podgrupe sa različitim obrascima sinteze i apsorpcije holesterola. Podgrupa 1 se sastojala od učesnika koji su imali koncentracije markera sinteze i markera apsorpcije manje od medijalnih vrednosti i čiji obrazac sinteze i apsorpcije holesterola karakteriše snižena sinteza i snižena apsorpcija (SS/SA), odnosno oni su slabi sintetizeri i apsorberi. Podgrupu 2 predstavljaju učesnici čiji su nivoi markera sinteze bili manji od medijalne vrednosti, a koncentracije markera apsorpcije bile više od medijane za tu grupu ispitanika. Obrazac ovih ispitanika karakteriše snižena sinteza i povišena apsorpcija (SS/PA), odnosno

ispitanici su označeni kao slabi sintetizeri i dobri apsorberi. Podgrupu 3 čine učesnici sa koncentracijama markera sinteze iznad medijane, a sa koncentracijama markera apsorpcije nižim od medijane za tu grupu ispitanika. Ova podgrupa se na osnovu obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola smatra dobrim sintetizerima i slabim apsorberima, odnosno ispitanici imaju povišenu sintezu i sniženu apsorpciju (PS/SA). Ispitanici koji su imali koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola iznad medijalnih vrednosti, svrstani su u četvrtu podgrupu, te njihov obrazac karakteriše povišena sinteza i apsorpcija (PS/PA). Ovi ispitanici su označeni kao dobri sintetizeri i apsorberi.

#### ***4.7.5.1. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola korišćenjem koncentracija latosterola i $\beta$ -sitosterola***

Podjele ispitanika u podgrupe na osnovu medijalnih vrednosti za koncentracije latosterola i  $\beta$ -sitosterola grafički su prikazane na slici 36.





Slika 36. Grafički prikaz podele ispitanika u podgrupe prema obrascima sinteze i apsorpcije holesterola na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija latosterola i  $\beta$ -sitosterola (A – Kontrolna grupa, B – Pacijenti sa IBS na terapiji statinima, C – Pacijenti sa IBS bez terapije statinima, SS/SA – snižena sinteza/snižena apsorpcija, SS/PA – snižena sinteza/povišena apsorpcija, PS/SA – povišena sinteza/snižena apsorpcija, PS/PA – povišena sinteza/povišena apsorpcija).

Između dobijenih podgrupa, a u okviru jedne ispitivane grupe, poređene su vrednosti osnovnih parametara lipidnog statusa i koncentracije apoB-100 i apoA-I. U tabeli 26 su prikazani rezultati dobijeni korišćenjem ANOVA testa.

Poređenje parametara između podgrupa vrši se u okviru jedne posmatrane grupe. U KG i grupi pacijenata koji nisu na terapiji statinima, primećeno je da sa povećanjem efikasnosti sinteze i/ili apsorpcije raste koncentracija UH. U prethodno navedenim grupama, ispitanici sa najvišim stepenom sinteze i apsorpcije imali su i najviše koncentracije UH. Nivoi UH u podgrupi PS/PA su se značajno razlikovale od vrednosti dobijenih u SS/SA podgrupi kako u KG, tako i u grupi pacijenata bez terapije statinima ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). Takođe, primećeno je da se koncentracije UH razlikuju između podgrupa čiji su nivoi apsorpcije smanjeni, ali koje se razlikuju po efikasnosti sinteze. Tako, podgrupe sa višim stepenom sinteze imaju i više koncentracije UH, što je utvrđeno u KG i u grupi pacijenata bez terapije statinima ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ), ali ne i u grupi pacijenata na terapiji statinima, a u odnosu na SS/SA podgrupu. Takođe, primećen je trend ka višim koncentracijama LDL-h kako raste efikasnost sinteze i/ili apsorpcije u KG i grupi pacijenata bez terapije statinima. Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, koncentracije LDL-h u PS/PA podgrupi su bile značajno više u odnosu na vrednosti u grupama SS/SA i SS/PA ( $p < 0,01$  za oba poređenja). U ovoj grupi pacijenata, koncentracija LDL-h se razlikovala između podgrupa koje su imale sniženu apsorpciju, ali različitu efikasnost sinteze. Očekivano, vrednosti su bile više u podgrupi sa povišenom sintezom ( $p < 0,01$ , za oba poređenja). Interesantno je da je u grupi pacijenata na terapiji statinima, PS/SA podgrupa imala značajno niže koncentracije LDL-h u odnosu na SS/PA podgrupu ( $p < 0,05$ ). U KG, koncentracije HDL-h i ApoA-I bile su više u SS/PA u odnosu na SS/SA podgrupu ( $p < 0,05$  za oba poređenja). U istoj grupi, nivoi TG bili su najviši u PS/SA podgrupi i značajno su se razlikovali u odnosu na SS/PA podgrupu ( $p < 0,01$ ). U KG, podgrupe koje su imale povišenu sintezu, imale su značajno više koncentracije apoB-100 u odnosu na SS/PA podgrupu ( $p < 0,05$ ). U grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, koncentracije apoB-100 su bile značajno više u svim podgrupama koje su imale povišenu sintezu i/ili apsorpciju u odnosu na podgrupu sa smanjenom i sintezom i apsorpcijom ( $p < 0,05$ ).

Razlike u veličini LDL čestica, prisustvu sdLDL čestica, kao i u relativnim udelima pojedinih LDL subklasa nisu uočene između podgrupa unutar KG i grupe pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, kada su za formiranje podgrupa korišćene medijalne

vrednosti latosterola i  $\beta$ -sitosterola. U grupi pacijenata koja je bila na terapiji statinima, dokazane su razlike u zastupljenosti LDL IVB subklasa. Procentualni udeo LDL IVB subklasa se razlikovao između podgrupa SS/PA ( $17,5 \pm 3,30$  %) i PS/SA ( $11,5 \pm 2,28$  %) ( $p < 0,001$ ), i između PS/SA i PS/PA ( $16,9 \pm 4,35$  %) ( $p < 0,05$ ). Rezultati su dobijeni korišćenjem ANOVA testa i *Least Significant Difference post hoc* testa .

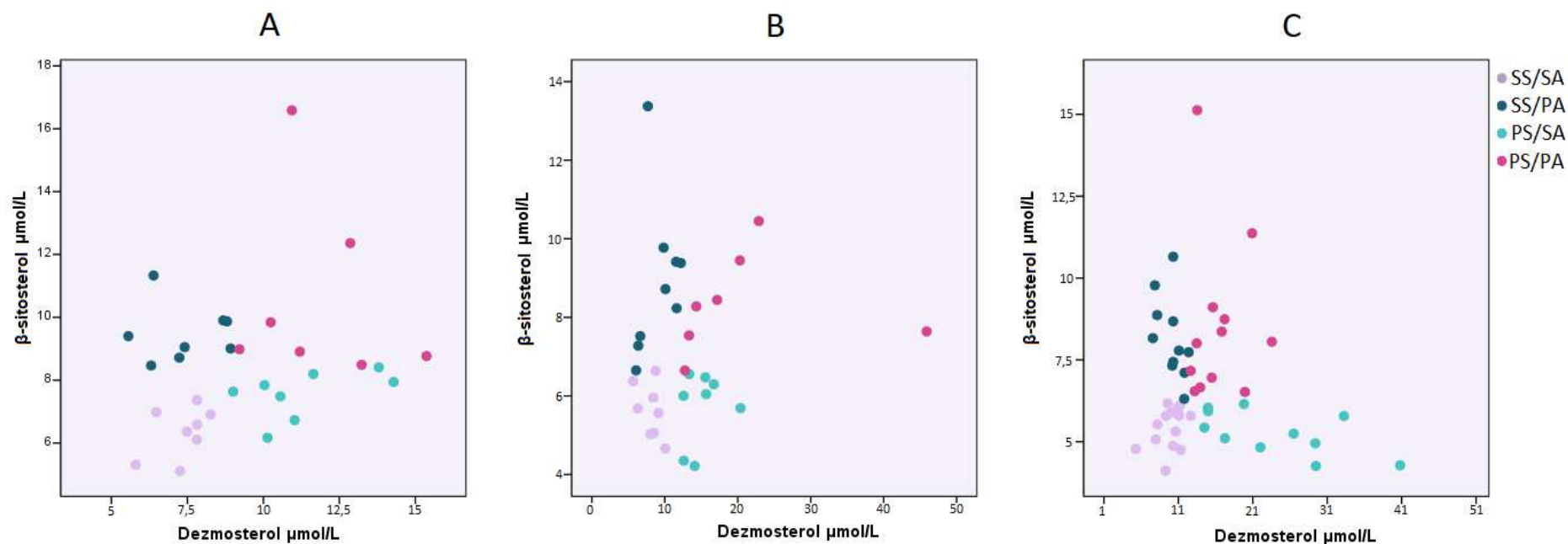
Tabela 26. Distribucija koncentracija osnovnih parametra lipidnog statusa, apoA-I i apoB-100 između podgrupa dobijenih na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija latosterola i  $\beta$ -sitosterola u okviru ispitivanih grupa.

Parametar	Kontrolna grupa				Pacijenti na terapiji statinima				Pacijenti bez terapije statinima			
	Grupa 1 SS/SA (N=7)	Grupa 2 SS/PA (N=8)	Grupa 3 PS/SA (N=9)	Grupa 4 PS/PA (N=7)	Grupa 1 SS/SA (N=7)	Grupa 2 SS/PA (N=9)	Grupa 3 PS/SA (N=9)	Grupa 4 PS/PA (N=7)	Grupa 1 SS/SA (N=12)	Grupa 2 SS/PA (N=12)	Grupa 3 PS/SA (N=12)	Grupa 4 PS/PA (N=11)
UH, mmol/L	3,9±0,46	4,4±0,57	<b>4,7±0,68</b>	<b>5,0±0,43</b>	4,7±0,94	5,5±1,00	4,6±1,35	4,8±0,36	3,8±1,16	4,7±0,91	<b>5,5±1,88</b>	<b>5,8±1,64</b>
			a*	a*							a**	a**
HDL-h, mmol/L	1,3±0,18	<b>1,9±0,33</b>	1,7±0,59	1,5±0,31	1,3±0,55	1,3±0,27	1,1±0,25	1,3±0,23	1,0±0,25	1,1±0,35	1,2±0,32	1,2±0,36
		a*										
LDL-h, mmol/L	2,4±0,27	2,5±0,51	2,8±0,49	3,0±0,46	2,8±0,49	3,6±0,87	<b>2,7±1,20</b>	2,8±0,51	2,2±0,95	2,7±0,52	<b>3,6±1,53</b>	<b>3,8±1,13</b>
							b*				a**	a,b**
TG, mmol/L	1,0±0,45	0,8±0,21	<b>1,4±0,49</b>	1,1±0,49	1,4±0,39	1,6±0,52	1,7±0,83	1,6±0,54	1,3±0,49	1,9±1,58	1,7±0,87	1,8±0,75
			b**									
ApoA-I, g/L	1,6±0,13	<b>1,9±0,14</b>	1,8±0,24	1,8±0,21	1,6±0,21	1,8±0,28	1,7±0,19	1,8±0,17	1,5±0,23	1,7±0,34	1,6±0,25	<b>1,8±0,24</b>
		a*										a**
ApoB-100, g/L	1,1±0,16	1,0±0,23	<b>1,2±0,26</b>	<b>1,4±0,26</b>	1,1±0,17	1,2±0,25	1,2±0,5	1,2±0,29	1,0±0,26	<b>1,3±0,32</b>	<b>1,4±0,56</b>	<b>1,5±0,44</b>
			b*	b*						a*	a*	a**

SS/SA – snižena sinteza/snižena apsorpcija, SS/PA – snižena sinteza/povišena apsorpcija, PS/SA – povišena sinteza/snižena apsorpcija, PS/PA – povišena sinteza/povišena apsorpcija, UH – ukupan holesterol, HDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima velike gustine, LDL-h – holesterol sadržan u lipoproteinima male gustine, TG – trigliceridi, ApoA-I – apolipoprotein A-I, ApoB-100 – apolipoprotein B-100. a– Značajno različito od SS/SA. b– Značajno različito od SS/PA. \* P<0.05; \*\* P<0.01. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Vrednosti su poređene korišćenjem analize varijansi (ANOVA) i *Least Significant Difference post hoc* testom. Medijalne vrednosti koncentracija latosterol su: 7,21  $\mu$ mol/L (KG), 9,66  $\mu$ mol/L (pacijenti na terapiji statinima) i 10,30  $\mu$ mol/L (pacijenti bez terapije statinima). Medijalne vrednosti koncentracija  $\beta$ -sitosterola su: 8,41 $\mu$ mol/L (KG), 6,64  $\mu$ mol/L (pacijenti na terapiji statinima) i 6,20  $\mu$ mol/L (pacijenti bez terapije statinima). Istaknute su statistički značajne razlike.

#### ***4.7.5.2. Ispitivanje obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola korišćenjem koncentracija dezmosterola i $\beta$ -sitosterola***

Na osnovu vrednosti koncentracija dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola formirane su 4 podgrupe (SS/SA, SS/PA, PS/SA i PS/PA). Grafički prikaz formiranih podgrupa u okviru svake grupe ispitanika prikazan je na slici 37. Rezultati analize međusobnog poređenja dijametra LDL čestice i udela pojedinih LDL subklasa između podgrupa, a u okviru pojedinih ispitivanih grupa, prikazani su u tabeli 32.



Slika 37 Grafički prikaz podele ispitanika u podgrupe prema obrascima sinteze i apsorpcije holesterola na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola (A – Kontrolna grupa, B – Pacijenti sa IBS na terapiji statinima, C – Pacijenti sa IBS bez terapije statinima, SS/SA – snižena sinteza/snižena apsorpcija, SS/PA – snižena sinteza/povišena apsorpcija, PS/SA – povišena sinteza/snižena apsorpcija, PS/PA – povišena sinteza/povišena apsorpcija).

Tabela 27. Distribucija veličine i raspodele LDL subklasa između podgrupa dobijenih na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola u okviru ispitivanih grupa.

Parametar	Kontrolna grupa				Pacijenti na terapiji statinima				Pacijenti bez terapije statinima			
	Grupa 1 SS/SA (N=8)	Grupa 2 SS/PA (N=8)	Grupa 3 PS/SA (N=8)	Grupa 4 PS/PA (N=7)	Grupa 1 SS/SA (N=8)	Grupa 2 SS/PA (N=9)	Grupa 3 PS/SA (N=8)	Grupa 4 PS/PA (N=7)	Grupa 1 SS/SA (N=13)	Grupa 2 SS/PA (N=11)	Grupa 3 PS/SA (N=11)	Grupa 4 PS/PA (N=12)
LDL dijametar, nm	27,7±0,88	26,8±1,30	25,6±1,93	26,1±2,29	25,2±1,72	26,4±1,11	25,7±1,31	24,8±1,35	26,5±1,60	26,0±1,53	24,95±1,6 3	26,2±1,73
LDL I, %	32,7±9,16	<b>19,3±5,92</b> a**	<b>19,1±6,13</b> a**	23,6±7,03	22,2±7,63	22,3±4,22	25,3±7,23	19,4±4,39	24,2±6,92	23,9±9,08	21,7±5,02	22,7±6,15
LDL IIA, %	14,8±2,36	12,1±2,10	<b>10,1±1,67</b> a**	12,9±2,38	11,1±1,97	12,0±1,32	12,2±2,78	10,9±2,73	11,3±2,41	12,4±2,70	11,1±1,96	11,1±1,79
LDL IIB, %	13,5±3,32	18,6±4,95	15,7±4,58	17,7±5,91	14,2±1,12	14,1±5,36	16,3±3,77	15,1±3,15	14,8±4,11	17,8±5,74	15,0±3,09	14,5±2,08
LDL IIIA, %	10,2±1,33	<b>15,9±4,04</b> a*	<b>17,0±5,63</b> a*	14,2±2,33	15,5±2,50	14,4±2,51	14,5±4,59	15,4±2,51	13,2±2,58	13,9±1,57	15,1±3,15	14,2±3,58
LDL IIIB, %	5,6±1,59	7,0±1,99	<b>9,1±2,83</b> a*	6,1±1,45	9,4±2,65	6,3±2,58	6,4±3,27	7,7±2,28	6,6±1,40	6,5±2,81	7,3±1,31	7,3±3,49
LDL IVA, %	10,3±2,81	11,3±0,85	13,7±4,55	10,9±3,43	14,3±3,37	13,2±3,23	13,3±8,17	14,7±4,03	12,1±3,31	11,2±3,31	13,4±2,40	12,6±3,04
LDL IVB, %	12,9±4,93	15,8±3,54	15,2±4,81	14,6±5,13	13,4±5,60	17,7±3,52	<b>11,9±2,42</b> b*	16,8±3,83	17,8±4,85	14,3±6,30	16,4±5,24	17,5±4,65
sdLDL, %	39,0±9,08	50,0±6,34	<b>55,0±8,38</b> a**	45,8±9,06	52,6±9,97	51,6±7,01	46,1±11,36	54,6±9,90	49,7±9,24	45,9±11,49	52,2±8,03	51,7±8,17

SS/SA – snižena sinteza/snižena apsorpcija, SS/PA – snižena sinteza/povišena apsorpcija, PS/SA – povišena sinteza/snižena apsorpcija, PS/PA – povišena sinteza/povišena apsorpcija, LDL – Lipoproteini male gustine, sdLDL – male guste LDL. <sup>a</sup> – Značajno različito od SS/SA. <sup>b</sup> – Značajno različito od SS/PA. \* P<0.05; \*\* P<0.01. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Vrednosti su poredene korišćenjem analize varijansi (ANOVA) i *Tukey post hoc* testom. Medijalne vrednosti koncentracija dezmosterola su: 8,95  $\mu$ mol/L (KG), 12,18  $\mu$ mol/L (pacijenti na terapiji statinima) i 12,70  $\mu$ mol/L (pacijenti bez terapije statinima). Medijalne vrednosti koncentracija  $\beta$ -sitosterola su: 8,41  $\mu$ mol/L (KG), 6,64  $\mu$ mol/L (pacijenti na terapiji statinima) i 6,20  $\mu$ mol/L (pacijenti bez terapije statinima). Istaknute su statistički značajne razlike.

Poređenje parametara između podgrupa vrši se u okviru jedne posmatrane grupe. Kod sve tri ispitivane grupe, LDL dijametri se nisu razlikovali između podgrupa, ali su primećene razlike u zastupljenosti pojedinih LDL subklasa. Relativni udeo LDL I subklase, u kojoj se nalaze LDL čestice sa najvećim dijametrom, razlikovao se između podgrupa u okviru KG. Vrednosti udela LDL I subklase bile su značajno više kod zdravih osoba koje imaju niži stepen sinteze i apsorpcije holesterola (SS/SA) u poređenju sa podgrupama kod kojih je sinteza, odnosno apsorpcija bila povećana (SS/PA, PS/SA) ( $p < 0,01$ , za oba poređenja). Iako nisu utvrđene značajne razlike u udelima LDL I subklase između SS/SA i PS/PA podgrupa, primećen je trend ka višim vrednostima udela ove subfrakcije u SS/SA podgrupi. U podgrupi zdravih ispitanika sa povišenom sintezom i sniženom apsorpcijom, udeo druge po veličini LDL subfrakcije, LDL IIA, bio je značajno manji u odnosu na podgrupu sa smanjenom i sintezom i apsorpcijom ( $p < 0,01$ ). Poređenjem ove dve podgrupe ustanovili smo da PS/SA podgrupa ima veće udele manjih, LDL IIIA i LDL IIIB subklasa, u poređenju sa SS/SA podgrupom ( $p < 0,05$ , za oba poređenja). U podgrupi koja ima obrazac sinteze i apsorpcije holesterola takav da je sinteza smanjena, a apsorpcija povećana, udeo LDL IIIA subklasa je bio veći u odnosu na podgrupu koja ima smanjenu i apsorpciju (SS/SA) ( $p < 0,05$ ). U okviru KG, u podgrupama sa smanjenom apsorpcijom, udeo sdLDL čestica je bio značajno veći u podgrupi koja ima povećanu sintezu (PS/SA) u odnosu na podgrupu koja ima smanjenu sintezu (SS/SA).

Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima nisu utvrđene značajne razlike u veličini LDL dijametara i distribuciji pojedinih subklasa, s tim da je primećen trend ka većem udelu sdLDL čestica u podgrupama sa povišenom sintezom.

Kod pacijenata na terapiji statinima, primećen je trend porasta relativnog udela LDL IVB subfrakcija u podgrupama koje imaju povišenu apsorpciju. Podgrupa sa povišenom sintezom i smanjenom apsorpcijom je imala značajno niže vrednosti udela proaterogenih LDL čestica (LDL IVB) u odnosu na podgrupu kod koje je došlo do smanjenja sinteze, ali i povećanja apsorpcije ( $p < 0,05$ ).

Između podgrupa dobijenih korišćenjem medijalnih vrednosti dezmosterola i  $\beta$ -sitosterola, a u okviru jedne ispitivane grupe, poređene su vrednosti osnovnih parametara lipidnog statusa i koncentracije apoB-100 i apoA-I. Uočene su razlike u vrednostima TG, gde



su nivoi TG bili najveći u PS/SA podgrupi ( $1,6 \pm 0,39$  mmol/L) u odnosu na SS/SA ( $1,0 \pm 0,44$  mmol/L) ( $p < 0,05$ ), SS/PA ( $0,9 \pm 0,39$  mmol/L) ( $p < 0,05$ ) i PS/PA podgrupu ( $0,8 \pm 0,19$  mmol/L) ( $p < 0,01$ ). U okviru grupe pacijenata na terapiji statinima nisu uočene razlike u koncentracijama osnovnih parametara lipidnog statusa i koncentracijama apoB-100 i apoA-I. U grupi pacijenata koja je bila na terapiji statinima, zapažene su razlike u koncentracijama apoB-100 između podgrupa SS/SA ( $1,0 \pm 0,27$  g/L) i PS/PA ( $1,5 \pm 0,42$  g/L) ( $p < 0,05$ ). Rezultati su dobijeni korišćenjem ANOVA testa i *Tukey post hoc* testa.

## 5. Diskusija

Ateroskleroza predstavlja hroničnu, fokalnu bolest intime krvnih sudova i najčešće se razvija na bifurkacijama i krivinama krvnih sudova. Česte varijacije u pritisku cirkulišuće krvi, kao i pojave vrtložnih struja na ovim mestima, uzrokuju oštećenje endotela praćeno inflamacijom i hemotaksom leukocita [21, 152]. Iako inflamacija ima za cilj da obnovi oštećeno tkivo, ona dovodi do nastanka takozvanog *circulus vitiosus*-a i dalje progresije aterosklerotskog procesa [152, 153]. Pored inflamacije, ključnu ulogu u patogenezi i progresiji ateroma ima hiperholesterolemija. Kliničari se obično za procenu hiperholesterolemije oslanjaju na koncentracije UH, LDL-h, HDL-h i nivoe apolipoproteina. Međutim, ovi parametri su samo indikatori trenutne koncentracije holesterola. Autori savremenih studija smatraju određivanje osnovnih parametara lipidnog statusa nedovoljnim za procenu rizika i otpočinjanje lečenja [36, 37, 40, 42, 44, 47]. Danas se zna da koncentracije holesterola u krvi zavise dominantno od brzine procesa sinteze, odnosno apsorpcije. Određivanjem koncentracija NHS, moguće je identifikovati individualne razlike u metabolizmu holesterola i izvršiti procenu stanja njegove homeostaze [36, 47].

Vodeća stručna udruženja iz oblasti kardiologije preporučuju promene u ishrani i, ako je potrebno, primenu hipolipemika za smanjenje visokih koncentracija holesterola, posebno LDL-h, u primarnoj i sekundarnoj prevenciji KVB [5-7]. Primećeno je da terapija statinima pruža veliku korist, ali rezultati epidemioloških studija ukazuju na postojanje subpopulacije pacijenata kod kojih terapija statinima ne postiže očekivane efekte. Razlog zbog kojeg veliki broj ispitanika i pored terapije statinima ima loš klinički ishod, još uvek nije poznat. Kao mogući uzrok smanjene efikasnosti terapije statinima navode se individualne razlike u metabolizmu holesterola [47, 154].

Kako navodi Kuksis, određivanje koncentracija NHS je korisno za procenu homeostaze holesterola, ali ova kompleksna mešavina relativno niskih koncentracija i hemijski nestabilnih steroidnih struktura, predstavlja specifičan problem za njihovu izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju [39]. Smatra se da varijacije u koncentracijama NHS u različitim studijama, potiču od problema metodološke prirode.

Prethodno navedene činjenice ilustruju potrebu za validacijom metoda za određivanje NHS i njihovom harmonizacijom, kao i za utvrđivanjem preanalitičkih i analitičkih faktora

uticaja na kvantifikaciju NHS. Takođe, nameće se potreba za daljim bazičnim i kliničkim ispitivanjima kompleksnosti obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola i njihove povezanosti sa osnovnim lipidnim parametrima i parametrima koji opisuju kvalitet i funkcionalnost glavnih lipoproteinskih čestica.

Cilj mnogih kliničkih istraživanja bio je ispitivanje povezanosti dislipidemije i razvoja KVB, kao i upotrebe statina u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih događaja [36, 42, 46, 47]. Smatra se da aterogena trijada, koju čine povišene koncentracije TG, smanjeni nivoi HDL-h i prisustvo sdLDL čestica ima poseban značaj u razvoju ateroskleroze [29, 31]. U našoj opservacionoj studiji, nivoi UH i LDL-h pokazali su trend ka višim vrednostima u grupama pacijenata, međutim, nije bilo značajnih razlika u nivoima ovih parametara između posmatranih grupa (Tabela 7). Takođe, primetili smo da je kod pacijenata koji su bili tretirani statinima prisutan trend ka višim vrednostima HDL-h i nižim nivoima LDL-h u poređenju sa pacijentima koji nisu bili na terapiji hipolipemicima. Koncentracije HDL-h su bile značajno niže u obe grupe pacijenata u odnosu na KG (Tabela 7), time potvrđujući rezultate drugih studija koje govore o kardioprotektivnoj ulozi ove antiaterogene čestice [4, 109, 110]. Iako se vrednosti UH i LDL-h nisu značajno razlikovale između ispitivanih grupa, očekivani rezultati su dobijeni za vrednosti TG, koje su bile značajno više u obe grupe pacijenata u poređenju sa KG (Tabela 7). Poznato je da sa povećanjem sadržaja TG, LDL čestice postaju aterogenije [31, 155]. U studiji koju su sprovedeli Rizzo i saradnici [31], ova činjenica je potvrđena kroz rezultate negativne korelacije veličina LDL čestica i koncentracije serumskih TG. Kako navode ovi autori, povišena koncentracija TG u serumu, koja je primećena i kod obe grupe naših pacijenata, ukazuje na moguće prisustvo aterogenih, sdLDL čestica. Takođe, Stefanutti i saradnici u sprovedenoj meta-analizi potvrđuju ulogu hipertrigliceridemije u remodelovanju LDL čestica [156].

Danas je u rutinskoj laboratorijskoj praksi moguće odrediti koncentracije glavnih apolipoproteina HDL i LDL čestica – apoA-I i apoB-100. Tabas i saradnici su kroz nekoliko bazičnih i eksperimentalnih studija ukazali da je lipoproteinska čestica koja sadrži apoB-100 glavni pokretač aterosklerotskog procesa [157, 158]. U svojim istraživanjima, u kojima se bavi patogeneom ateroskleroze i morfološkim karakteristikama ateroma, Tabas navodi da je subendotelna akumulacija LDL-čestica ključni korak u pokretanju lezije, te da subendotelna akumulacija apoB-100 dovodi do aktivacije endotelnih ćelija, koje lučeći hemokine uzrokuju

hemotaksu monocita i pokretanje i progresiju inflamatornog procesa [157, 158]. Naši rezultati su pokazali da su koncentracije apoB-100 bile nešto više (na granici statističke značajnosti) kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u odnosu na KG, dok nije bilo značajnih razlika između vrednosti dobijenih kod pacijenata na terapiji statinima dužoj od tri meseca i KG (Slika 24). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studija Ballantyne i saradnika [159], koji ukazuju na značajno sniženje vrednosti UH, LDL-h i apoB-100 nakon primene statina. Takođe, značajno sniženje vrednosti apoB-100 nakon kombinovane terapije statinima i ezetimibom utvrdili su u svojoj studiji Tremblaya i saradnici [160]. Kako su opisali Goldstein i Brown, tokom terapije statinima, pored inhibicije sinteze holesterola, povećava se i uklanjanje LDL čestica iz cirkulacije, što dovodi do sniženja koncentracije apoB-100 lipoproteina [161]. Možemo da pretpostavimo da je u grupi pacijenata na terapiji statinima tretman dao pozitivne rezultate i da su vrednosti apoB-100 dostigle one u zdravoj populaciji. Premda su razlike u vrednostima apoB-100 bile na granici statističke značajnosti, primećen je trend ka višim vrednostima u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u odnosu na KG (Slika 24). Ovaj rezultat govori u prilog utvrđenoj činjenici da je jedan od etioloških faktora koji leži u osnovi ateroskleroze, te posledično IBS, povišena vrednost apoB-100, a time i prisustvo većeg broja LDL čestica [29, 31].

ApoA-I je esencijalni apolipoprotein odgovoran za odvijanje procesa RTH, sazrevanje HDL čestica i za njihovu protektivnu ulogu. Kardioprotektivna uloga HDL čestica je potvrđena ne samo kroz RTH, već i kroz dokazana antiinflamatorna, antioksidativna i antitrombotska svojstva ove partikule [110, 111]. Smatra se da je apoA-I bolji prediktor rizika za nastanak KVB u odnosu na osnovne parametre lipidnog statusa [162]. Pored efekta koji ostvaruju na lipidne komponente, statini deluju i na proteinske komponente lipoproteina. U studiji koju su sprovedi Sharma i saradnici, primećena je značajna modifikacija lipidnog profila i rast koncentracija apoA-I kod pacijenata koji su 16 nedelja bili na terapiji atorvastatinom ili simvastatinom [163]. Mnogi naučnici opisuju povećanje koncentracija ApoA-I nakon terapije kao plejotropni efekat statina, imajući u vidu pre svega antiinflamatorna i antioksidativna svojstva HDL čestica [164]. Rezultati naše studije su pokazali značajno niže koncentracije apoA-I u grupi pacijenata koja nije bila na terapiji statinima, u odnosu na KG (Slika 23). Takođe, nije primećena razlika u nivoima apoA-I

između pacijenata na terapiji statinima i KG, što bi bilo u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija, o uticaju statina na povećanje koncentracija apoA-I [162-164].

LDL čestice, naročito sdLDL, su najosetljivije na oksidaciju indukovanu slobodnim radikalima. Viigima i saradnici kao nezavisni marker ateroskleroze predlažu oksidovanu modifikaciju LDL čestica na koje je vezan MDA (oxLDL) [165]. U studiji Yanga i saradnika predložen je potencijalni mehanizam koji dovodi do oštećenja endotelnih ćelija pod dejstvom molekula MDA. Kako navode autori, pored dokazane supresije gena koji regulišu endotelnu funkciju, kao što je endotelna azot-monoksid sintaza, oxLDL čestica dovodi do supresije transkripcije gena za fibroblastni faktora rasta 2 (eng. *fibroblast growth factor 2 – FGF2*), koji je uključen u angiogenezu. Mehanizam je posredovan MDA epitopima i uključuje metilaciju promotor regiona u genu za FGF2, time smanjujući koncentraciju FGF2 u endotelnim ćelijama. Autori navode da je oštećenje endotelnih ćelija smanjeno dodavanjem anti-MDA antitela u ćelijski medijum. Kako su cirkulušući nivoi MDA i oxLDL čestica značajno povećani kod pacijenata sa IBS, autori ukazuju na potrebu za određivanjem MDA u visokorizičnim grupama za nastanak i razvoj KVB, kao i kod pacijenata sa KVB [166]. Imajući sve ovo na umu, kao i rezultate koje smo dobili prilikom određivanja apoB-100, u sve tri grupe ispitanika određena je koncentracija MDA. Očekivano, rezultati su pokazali da su koncentracije MDA značajno više kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG (Slika 25) i ovim potvrdile nalaze prethodnih studija koje govore o ulozi MDA u aterogenezi [32]. Trenutno se sprovodi veliki broj *in vitro* eksperimenata koji ispituju efekte imunizacije MDA-modifikovanim LDL česticama. Ateroprotektivno dejstvo potvrđeno u *in vitro* istraživanjima ukazuje na mogućnost otkrivanja vakcine, time otvarajući nove terapijske mogućnosti u primarnoj i sekundarnoj prevenciji [167].

Iako postoje nedvosmisleni dokazi o inverznoj povezanosti nivoa HDL-h i rizika za KVB, danas se smatra da je ovaj efekat povezan sa funkcionalnošću HDL čestice. Studija Voighta i saradnika, potvrdila je da su biomarkeri funkcije HDL čestica ključni za protektivnu ulogu ove čestice, pre nego sama koncentracija HDL-h [168]. Biomarkeri funkcionalnosti HDL čestice se trenutno ispituju u brojnim kliničkim studijama i podrazumevaju ispitivanja efluksa ćelijskog holesterola, antioksidativnih i antiinflamatornih efekata čestice, kao i efekata na vaskularni endotel. S tim u vezi, jedan od postavljenih ciljeva bio je da ispitamo funkcionalnost RTH, određujući aktivnost LCAT i CETP kod sve tri grupe ispitanika. LCAT

se sintetiše u jetri, a u cirkulaciji se vezuje za diskoidne i sferne HDL čestice. Vezan za HDL, katalizuje reakciju esterifikacije holesterola, uz pomoć apoA-I kao kofaktora, time doprinoseći sazrevanju HDL čestice. Mutacije u genu za LCAT koje dovode do smanjenja ili inhibicije njegove aktivnosti, povezane su sa nagomilavanjem malih HDL čestica u cirkulaciji i smanjenim koncentracijama HDL-h, ukazujući na povećan rizik za nastanak i razvoj KVB [112]. Sa druge strane, CETP katalizuje dvosmerni prenos estara holesterola i TG sa HDL čestice na čestice bogate TG. Deficijencija CETP kod ljudi povezana je sa povišenim nivoima HDL-h, prisustvom većih HDL čestica u cirkulaciji, te smanjenim rizikom za pojavu KVB [112]. Veliki broj bazičnih i kliničkih studija usmeren je ka otkrivanju novih inhibitora i modulatora aktivnosti CETP [30]. Studija Abd El-Aziza i saradnika je pokazala da su kod pacijenata sa KVB promenjene aktivnosti LCAT i CETP [169]. Rezultati naše studije su delom potvrdili ove nalaze. Naši rezultati su pokazali trend ka višim vrednostima aktivnosti CETP kod pacijenata koji nisu bili na tretmanu statinima u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 26). Međutim, nisu primećene razlike u aktivnostima LCAT enzima između ispitivanih grupa (Slika 26).

Imajući u vidu sve do sada navedeno, razlike u koncentracijama apoA-I između posmatranih grupa, kao i trend ka većim aktivnostima CETP u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, smatrali smo da je za detaljniju analizu lipoproteinskog profila neophodno odrediti udeo pojedinih HDL i LDL subklasa. Raspodela subfrakcija lipoproteina zavisi od opšteg fiziološkog i metaboličkog stanja organizma [101, 102]. Mnoge prethodne studije su pokazale da različite LDL i HDL subfrakcije imaju različite metaboličke i funkcionalne osobine, te posledično imaju različit uticaj na razvoj KVB. Poznato je da su sdLDL čestice najaterogenije [101, 102, 104]. Nasuprot tome, međusobni odnosi između veličina HDL čestica i funkcija ovog lipoproteina još uvek nisu u potpunosti definisani. Postoji sve više dokaza da manje HDL imaju smanjen protektivni potencijal [28, 112].

Rezultati analize zastupljenosti LDL fenotipova u ispitivanim grupama pokazali su veću učestalost fenotipa LDL A kod zdravih ispitanika, u odnosu na pacijente (Slika 27). U obe grupe pacijenata, zastupljenosti LDL A i LDL B fenotipova su bile gotovo podjednake. Ovo pomeranje dominantnog dijametra LDL čestice ka manjim vrednostima ukazuje na prisustvo aterogenijeg LDL profila u grupama pacijenata. Dobijeni podaci govore u prilog rezultatima naših prethodnih istraživanja [170, 28]. Naime, u našem ranijem istraživanju se

zastupljenost oba LDL fenotipa kod pacijenata sa IBS kretala oko 50%, što je u skladu i sa rezultatima ove studije. Takođe, prethodne studije su ukazale na veću zastupljenost fenotipa A u grupi zdravih ispitanika [170, 28]. Kako navode Rizzo i saradnici [31], zastupljenost LDL B fenotipa u populaciji zdravih odraslih muškaraca se kreće oko 30% sa čime se slažu i rezultati ovog istraživanja.

Pored toga što je analiza fenotipova dala donekle očekivane rezultate, relativni udeli pojedinih LDL subfrakcija se nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa (Tabela 8). Primećen je trend ka višim udelima sdLDL čestica kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Iako je gotovo u svim studijama primećena razlika u zastupljenosti pojedinih LDL subklasa između pacijenata sa IBS i zdravih osoba [31], prethodni rezultati našeg istraživačkog tima su ukazali na nisku kliničku tačnost određivanja LDL subfrakcija u skriningu pacijenata za IBS [28]. Važno je napomenuti da su u odnosu na aktuelnu studiju, prethodne studije u kojima su primećene razlike u zastupljenosti pojedinih LDL subklasa sprovedene na većem uzorku pacijenata i zdravih ispitanika. Pretpostavljamo da je sa manjim brojem ispitanika teže uočiti interindividualne metaboličke razlike. Pored toga, rezultati naše studije su pokazali razlike u nivoima TG između grupa pacijenata i KG, ali ne i u koncentracijama LDL-h (Tabela 7). Ovo donekle može objasniti rezultate dobijene za distribuciju LDL subklasa i trend ka većim udelu sdLDL čestica u obe grupe pacijenata u odnosu na KG (Tabela 8).

Za razliku od LDL subfrakcija, dobijene su značajne razlike u relativnim udelima pojedinih HDL subfrakcija između posmatranih grupa. Učešće sdLDL čestica u patogenezi ateroskleroze je potvrđeno, dok je još uvek nejasna uloga pojedinih subklasa HDL čestica. Neki autori navode da se funkcionalnost HDL čestica ogleda u količini holesterola prisutnog u HDL česticama, te da je prisustvo većih, HDL čestica, koje sadrže više holesterola, u cirkulaciji znak očuvanosti RTH [28, 31, 170]. Sa druge strane, pojedini autori su mišljenja da se funkcionalnost HDL čestice ogleda u njenom potencijalu da preuzima holesterol iz perifernih tkiva, te je zastupljenost manjih, diskoidnih HDL čestica u cirkulaciji odraz funkcionalnosti ovog lipoproteina [171]. Naši rezultati su pokazali značajnu razliku u zastupljenosti HDL fenotipova između pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima i KG (Slika 28). U grupi pacijenata primećena je veća zastupljenost HDL 3 fenotipa, u odnosu na KG, što ukazuje da kod pacijenata preovlađuje populacija HDL čestica manjeg dijametra. Ovaj rezultat ide u prilog prvoj teoriji da manje HDL čestice imaju snižene protektivne,

antiaterogene sposobnosti [28, 31, 170]. Kako Kardassis i koautori navode, velike HDL čestice snažno koreliraju sa ukupnom koncentracijom HDL-h i inverzno su povezane sa rizikom za KVB [112]. Sa druge strane, povišene koncentracije malih HDL čestica povezane su sa aterogenijim profilom koji karakteriše visoka koncentracija TG u plazmi i povećan nivo sdLDL čestica. Dakle, autori navode da veći antiaterogeni potencijal imaju HDL čestica većeg dijametra [112]. Naši rezultati su pokazali značajno veći udeo manjih subklasa, HDL 3b i HDL 3c, kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG (Tabela 9). U skladu sa prethodnim, ukupan udeo malih HDL subklasa kod obe grupe pacijenata bio je značajno veći nego u KG. Očekivano, udeo većih subfrakcija, HDL 2a i HDL 2b bio je značajno niži u grupama pacijenata. Naši rezultati govore u prilog rezultatima meta-analize koju su sprovedi Pérez-Méndez i saradnici [172], a koja ukazuje na povišenu zastupljenost manjih HDL čestica kod različitih manifestacija KVB, kao i u bolestima kod kojih se kao komorbiditet javljaju KVB. Kako navode Kardassis i saradnici, određivanje sastava i veličine HDL čestica moglo bi da bude ključ razumevanja njihovih antiaterogenih svojstava [112].

Pored svih navedenih parametara, koji detaljnije opisuju LDL i HDL lipoproteinske partikule, kao i parametara koji govore o funkcionalnosti metaboličkih puteva HDL čestice i oksidativnim promenama LDL čestice, smatrali smo da je za potpuniji uvid u metabolizam holesterola neophodno sagledati efikasnost njegove sinteze i apsorpcije. Takođe, brojni izvori ukazuju da statini, koji inhibiraju sintezu holesterola, u pojedinim podgrupama pacijenata ne daju očekivane rezultate [36, 79].

Koncentracije endogenih sterola, koji predstavljaju prekursore u sintetskim putevima holesterola, pokazatelji su efikasnosti njegove sinteze, dok egzogeni fitosteroli služe kao surogat-markeri efikasnosti apsorpcije [36, 37, 39]. Upotrebom savremenih hromatografskih tehnika, mogućnosti detekcije i kvantifikacije NHS otvorile su nova vrata u pogledu određivanja efikasnosti sinteze i apsorpcije holesterola. Poremećaj homeostaze holesterola, koji se javlja na nivou sinteze ili apsorpcije, može biti povezan sa razvojem hiperholesterolemije, ateroskleroze, te posledično IBS [36, 47, 48]. Veliki broj studija ukazao je da promene u metabolizmu holesterola leže u osnovi različitih bolesti i smatra se da promene u brzinama sinteze i apsorpcije holesterola, te posledično narušavanje homeostaze holesterola, leže u osnovi hiperholesterolemije i razvoja KVB [38-42]. Međutim, i pored njihovog značajnog dijagnostičkog potencijala [38-42], veći broj faza u analizi NHS i dalje



pokazuje široku varijabilnost [89]. Razlike u metodologiji značajano doprinose varijaciji u koncentracijama NHS, time otežavajući mogućnost sprovođenja meta-analize. Smatra se da čak 25% varijacije koncentracija fitosterola potiče od metodoloških razlika [89]. Upravo zato, jedan od ciljeva ove studije bio je da se uspostavi i validira metoda za određivanje NHS, kao i da se ispituju različiti preanalitički i analitički faktori uticaja na kvantifikaciju NHS.

Do danas je sproveden mali broj istraživanja koja su se bavila validacijom metoda za određivanje NHS [36, 89], a prema našim saznanjima nema podataka o različitim preanalitičkim faktorima uticaja na njihovu kvantifikaciju. Do 1000 puta veće koncentracije UH u uzorku, ometaju određivanje NHS, naročito metodama tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom. Kako navode Mackay i saradnici, metoda izbora za određivanje NHS je GC [89], koja je korišćena i u ovoj studiji. Studije koje su se bavile validacijom postupaka za određivanje NHS navode moguće preanalitičke i analitičke probleme i naglašavaju potrebu za uspostavljanjem preciznih i tačnih metoda za njihovu kvantifikaciju [36, 89]. Optimalna metoda pripreme uzorka za analizu NHS uključuje korake saponifikacije, tečno-tečne ekstrakcije i, kako neki autori navode, proces derivatizacije. Saponifikacija se obično izvodi sa metanolnim ili etanolnim rastvorima NaOH ili KOH, nakon čega sledi inkubacija u periodu od 30-120 min na 60-100 °C. Nakon završenog procesa saponifikacije i hidrolize estarskih veza, tečno-tečna ekstrakcija sterolnih jedinjenja iz plazme/seruma obično se vrši sa nepolarnim rastvaračima, kao što su petroletar, n-heksan, n-heptan i cikloheksan [89]. Neki autori nakon procesa tečno-tečne ekstrakcije primenjuju postupak višestrukog "ispiranja" ekstrakta, kako bi se izvršila desalinizacija organskog sloja [36, 89, 90]. Kako navode Lütjohann i saradnici, izbor IS je važan za izračunavanje prinosa ekstrakcije i dalju kvantifikaciju NHS, naročito u GC-FID metodama [89]. Ovi autori navode da sa posebnom pažnjom treba izabrati IS ukoliko je u pripremu uzoraka uključen i proces derivatizacije. Najčešće korišćeni IS su 5 $\alpha$ -holestan, koji je korišćen u ovoj studiji, i epikoprostanol [36, 47, 89]. Studiju koju su sprovedeli Toivo i saradnici [173], imala je za cilj otkrivanje mogućih faktora uticaja na pripremu uzoraka za određivanje sterola u biljnim uljima. Rezultati ove studije su pokazali da nema razlike u prinosima ekstrakcije korišćenjem tečno-tečne ekstrakcije i SPE metode. Za uspostavljenju metodu, primenjena je tečno-tečna ekstrakcija, sa prinosom od 80-95% koji je uspešno korigovan primenom KFE.

Tokom procesa uspostavljanja metode, u cilju postizanja zadovoljavajućeg hromatografskog razdvajanja pikova od interesa ( $R_s < 1,2$ ), primenjivani su različiti postupci pripreme uzoraka, kao i različiti hromatografski uslovi. Priprema uzoraka bez procesa derivatizacije nije dala zadovoljavajuće razdvajanje pikova NHS (Slika 30). Poznato je da se bolje razdvajanje pikova postiže sa većim faktorom rezolucije, odnosno povećanjem dužine hromatografske kolone. Međutim, povećanje dužine kolone se izbegava u rutinskoj praksi, jer svako povećanje dužine kolone povećava retenciono vreme i zahteva veći ulazni pritisak gasa, što može dovesti do problema u zaptivanju i nanošenju uzorka na kolonu. Istovremeno, zbog stišljivosti gasova, samo jedan deo kolone ima željeni protok mobilne faze. Zbog svega navedenog, povećanje dužine kolone u praksi predstavlja krajnju opciju za poboljšanje rezolucije, te smo se u našim eksperimentima ograničili na korišćenje kolone dužine 30 m. Alternativno, promenom polarnosti analiziranih jedinjenja, promenama temperature kolone, izborom različitih nosećih gasova i njihovih brzina protoka ili promenom karakteristika kolone, može se postići bolja rezolucija pikova [91, 150, 174]. Primenom multilinearnog programiranja temperature, zatim korišćenjem različitih nosećih gasova (azot i helijum), kao i upotrebom kolona različite polarnosti stacionarne faze nije postignuta adekvatna separacija pikova dezmosterola i latosterola. Male razlike u njihovoj hemijskoj strukturi uslovljavaju i male razlike u njihovim fizičim osobinama, pa tako i male razlike u temperaturama ključanja [175]. Kako navodi Lütjohann, za razdvajanje NHS primenom GC-FID metode ključna je razlika u njihovoj isparljivosti [89]. Primenom postupka derivatizacije i prevođenjem NHS u njihove trimetil-silil derivate postignuta je zadovoljavajuća separacija pikova od interesa ( $R_s > 1,2$ ) (Slika 32 i Slika 33). Silanizacija je najčešće korišćena tehnika derivatizacije u analizi NHS koja omogućava zamenu hidroksilne grupe u C3 položaju sa trimetil-silil grupom (-SiMe<sub>3</sub>) [89, 90, 176]. Promenom hemijske strukture, derivati NHS postaju manje polarni, isparljiviji i termički stabilniji u odnosu na polazna jedinjenja. Izbor silanizirajućeg reagensa se vrši na osnovu njegove reaktivnosti i selektivnosti prema datom jedinjenju, kao i stabilnosti dobijenih derivata i količini nusprodukata reakcije [89, 179]. Idealno, postupak derivatizacije bi trebao biti brz, ponovljiv i jednostavan, i sa prinosom derivatizacije od 95-100% [89]. Uslovi derivatizacije koji su korišćeni u ovoj studiji dali su zadovoljavajuće prinose derivatizacije koji su se kretali u rasponu od 97,4-99,7% sa *cut off* vrednošću za prinos od 95% (Slika 34). Iako se koncentracije NHS uspešno koriguju sa prinosom derivatizacije većim od

95%, koji je dobijen korišćenjem 150  $\mu\text{L}$  derivatizujućeg reagensa, u ovom radu korišćena je zapremina od 220  $\mu\text{L}$ . Za korišćenje veće zapremine opredelili smo se zbog uticaja vlage na prinos derivatizacije i različitih vrednosti holesterola u ispitivanim uzorcima u odnosu na *pool* plazme koji je korišćen za analizu ispitivanja prinosa derivatizacije.

U praksi je međutim, primena derivatizacije povezana sa mnogim poteškoćama. Uz uobičajene probleme i smetnje u toku proces derivatizacije, kao što su izbor optimalnog volumena reagensa, dužina trajanja procesa derivatizacije, reakciona temperatura i vlažnost [89], veoma je važno ispitati i dodatne faktore koji mogu da utiču na prinos derivatizacije. Kako derivatizujući reagens koji smo koristili u kontaktu sa vlagom podleže hidrolizi [175], reakcija derivatizacije je izvedena u struji azota. Pretragom literaturnih izvora, nismo naišli na podatak o proceni prinosa derivatizacije kada se kao IS koristi 5 $\alpha$ -holestan, načinu njegove kvantifikacije, kao i uticaju upotrebe plastičnog laboratorijskog posuđa na reakciju silanizacije. Iako neki autori navode da je prinos derivatizacije moguće korigovati korišćenjem 5- $\alpha$ -holestana [36], zbog odsustva hidroksilne grupe u položaju C3 ovaj molekul ne podleže silanizaciji. Predložili smo jednostavan način procene efikasnosti derivatizacije korišćenjem procentualnih odnosa pikova nederivatizovanog i derivatizovanog holesterola prisutnog u uzorcima plazme.

Uticaj preanalitičkih faktora na kvantifikaciju NHS je veliki. Poznato je da prisustvo vlage u atmosferi, kao i korišćenje različitih derivatizujućih reagenasa, utiču na kvantifikaciju NHS [89, 176]. Međutim, malo je poznat uticaj plastičnih materija na kvantifikaciju NHS. Prilikom uspostavljanja metode korišćene su pipete dva različita proizvođača. U sastavu pipeta jednog od proizvođača nalazili su se plastični polimeri niske gustine. Za razliku od prethodno korišćenih pipeta, koje su bile sačinjene od polimera visoke gustine, plastika u čiji sastav ulaze polimeri niske gustine u kontaktu sa organskim rastvaračima lako otpušta određene komponente plastike [96]. Koristeći pipete u čijem su se sastavu nalazili polimeri niske gustine, u seriji hromatograma pojavila su se tri neidentifikovana pika. Na osnovu podataka dobijenih iz tih hromatograma, pokazalo se da je prinos derivatizacije bio svega 60%, što je daleko ispod vrednosti ustanovljene za pouzdanu kvantifikaciju (95%). Ispitivanjem kompletnog preanalitičkog i analitičkog postupka, ustanovljeno je da je izvor problema upotreba plastičnih Pasterovih pipeta za jednokratnu upotrebu tokom procesa ekstrakcije sterola iz biološkog materijala. Imajući ovo na umu, izolovali smo i identifikovali specifične

komponente plastike koje interferiraju u postupku derivatizacije (Slika 35, Tabela 12). Amidi masnih kiselina, palmitamid, oleamid i stearamid, koji se rutinski koriste u postupcima polimerizacije plastičnih masa, identifikovani su kao interferirajuće supstance (Slika 35). Ispitivanjem smo ustanovili da ova jedinjenja nisu bila prisutna u n-heksanu koji smo koristili prilikom procesa ekstrakcije, kao ni u uzorcima pripremanim sa staklenim pipetama. Do sličnih nalaza u svojim eksperimentima, došli su i Watson i saradnici [96]. Ovi autori su otkrili da čak i promena serijskog broja pojedinog plastičnog laboratorijskog posuđa može dovesti do pogrešnih rezultata, te posebno treba obratiti pažnju prilikom upotrebe plastičnih materijala u toku analitičkog procesa. U svojoj studiji, navedeni autori su ispitivali uticaj DMSO reagensa na plastične nastavke za jednokratnu upotrebu koji su bili potopljeni u rastvaraču tokom noći, na sobnoj temperaturi. Ovim postupkom, iz nastavaka je izolovan erukamid, amid masne kiseline koji može da interferira u specifičnim biološkim analizama [96]. Prema navodima Olivieri i saradnika [177], eksperimentalni uslovi koji utiču na otpuštanje plastifikatora iz plastičnog materijala su temperatura i dužina trajanja kontakta plastičnih materija sa rastvaračima. Takođe, Garrido-Lopez i saradnici su pokazali da je ekstrakcija erukamida i oleamida iz polietilenskih filmova zavisila od temperature na kojoj se izvodila i dužine trajanja ekstrakcije. U njihovim eksperimentima primećeno je da je maksimalna ekstrakcija amida postignuta tokom šesnaestominutnog izlaganja organskim rastvaračima na temperaturi od 105 °C [178]. Pri uslovima koji su primenjeni u našoj studiji, iz Pasterovih pipeta izolovani su palmitamid, oleamid i stearamid.

Poznato je da se ftalati koriste kao aditivi za poboljšanje fizičkih karakteristika plastike, pa njihovo ispuštanje iz plastičnih materija takođe može da interferira u analitičkim postupcima [96, 179]. Zbog toga smo ispitali da li plastične Pasterove pipete otpuštaju ftalate i da li oni interferiraju prilikom procesa pripreme uzoraka za kvantifikaciju NHS. Ekstrakt pripreman na isti način kao i za ispitivanje sadržaja amida, sadržao je <0,01% ftalata. Fankhauser-Noti i Grob su u svojoj studiji pokazali da su ftalati sveprisutni hemijski agensi u plastičnom laboratorijskom priboru, da su određene koncentracije prisutne gotovo na svim površinama u laboratoriji, kao i da je njihovo prisustvo zabeleženo čak i u heksanu HPLC čistoće nakon otvaranja boce [95]. Rezultati dobijeni u našem eksperimentu, kojima je utvrđeno prisustvo ftalata u količini manjoj od 0,01% u ekstraktima, ne smatraju se značajnim [95, 96].

Naši rezultati potvrđuju potrebu korišćenja isključivo staklenog laboratorijskog posuđa u postupcima pripreme uzoraka za kvantifikaciju NHS. Ukoliko drugačije nije moguće, upotrebu plastičnog materijala treba svesti na minimum, uz obavezno korišćenje plastike sačinjene od dobro umreženih plastičnih polimera visoke gustine.

U praksi je, zbog eventualnog ponavljanja ili dodatnih analiziranja, potrebno sačuvati alikvotne biološkog materijala, te smo zbog toga sprovedli studiju stabilnosti uzoraka za kvantitativno određivanje NHS. Podaci o stabilnosti analita od interesa su korisni naročito ukoliko uzorci ne mogu biti pripremljeni i analizirani istog dana. Rezultati su pokazali da nije bilo razlika u koncentracijama NHS nakon skladištenja uzoraka na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od dva meseca (Tabela 13). Sa druge strane, primećeno je da prilikom izlaganja visokim temperaturama, holesterol i fitosteroli podležu oksidativnim promenama [97, 180]. Kako je prema našoj metodi, postupak pripreme uzoraka dugotrajan i zametan i uključuje dva procesa inkubacije, postoji realna mogućnost oksidativne modifikacije sterola, koja može dalje napredovati prilikom čuvanja derivatizovanih uzoraka na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati naše studije su pokazali da su derivatizovani uzorci stabilni nedelju dana, ukoliko se čuvaju na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , te da pod ovim uslovima čuvanja ne dolazi do oksidativne modifikacije analiziranih NHS.

Takođe, dokumentovano je da oksidaciju steroidnih jedinjenja indukuje i prisustvo metalnih jona [97]. U nastojanju da smanjimo verovatnoću oksidacije steroidnih jedinjenja tokom postupka pripreme uzoraka, najčešće korišćene metalne zatvarače za epruvete zamenili smo poklopcima od inertnog politetrafluoroetilena. Literaturni podaci naglašavaju da je posebno osetljiva C5-C6 dvostruka veza u jezgru fitosterola i da je sklona oksidaciji. Reakcija počinje formiranjem hidroperoksida, nakon čega sledi niz reakcija čiji su krajnji proizvodi različiti alkoholi, ketoni i epoksidi. Osim ove, oksidativna modifikacija je moguća i u položaju C25 [181, 182]. Česta odmrzavanja i zamrzavanja alikvota u slučaju ponavljanja i dodatnih analiziranja, povećavaju mogućnost oksidativnih modifikacija. Treba istaći da svaka promena u strukturi jedinjenja može da utiče na kvantifikaciju korišćenjem visokoosetljivih tehnika. Zbog toga smo ispitali uticaj procesa zamrzavanja/odmrzavanja na kvantifikaciju NHS u uzorcima sa i bez antioksidanasa. Kao antioksidans izabran je hidrofilni analog vitamina E (Trolox®) koji se ne prenosi u organski sloj ekstrakta. Zahvaljujući njegovoj hidrofilnosti i smanjenoj mogućnosti prelaska u organski ekstrakt, interferencije prilikom hromatografskog razdvajanja NHS su svedene na minimum. Za ovaj eksperiment, izabrani su uzorci plazme,

zbog većeg antioksidativnog kapaciteta u poređenju sa serumom [183]. Kao što pokazuju naši rezultati, dodatak antioksidansa pre prvog procesa zamrzavanja povećava stabilnost uzoraka sa jednog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, na četiri ciklusa. Važnost ispitivanja stabilnosti uzoraka prilikom ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja je značajno i zbog eventualnog transporta uzoraka, nestanka električnog napajanja, kao i premeštanja uzoraka tokom godišnjih održavanja i servisiranja rashladnih uređaja. Mnoge studije su se bavile uticajem zamrzavanja i odmrzavanja na koncentraciju holesterola, pa su Cuhadar i saradnici pokazali da se koncentracija holesterola izmerena enzimskom metodom ne menja nakon pet ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja [184]. Međutim, dugotrajna priprema uzoraka za analizu NHS, mogla bi da dovede do modifikacija strukture steroidnih jedinjenja. Ove promene nije moguće otkriti prilikom korišćenja rutinskih spektrofotometrijskih metoda, ali osetljivije tehnike, kao što je GC, mogu da detektuju razlike u strukturnim promenama koje dovode do razlika u hromatografskim svojstvima jedinjenja. Kada govorimo o NHS, veliki broj najnovijih studija povezuje promene u koncentracijama ovih markera sa patogenezom i prognozom različitih bolesti [38-42]. Međutim, do sada nije bilo studija koje su se detaljnije bavi različitim preanalitičkim faktorima uticaja na kvantifikaciju NHS.

U savremenoj literaturi možemo da nađemo na stavove istraživača vezane za izbor biološkog materijala za određivanje NHS. Dok jedni autori opravdavaju korišćenje plazme, zbog kraćeg vremena dobijanja uzorka, drugi isključivo preporučuju upotrebu seruma [90]. Rezultati naše studije su pokazali da je metoda za pripremu uzoraka i detekciju analita primenjiva i za serum i za plazmu, što potvrđuju vrednosti koeficijenata varijacije unutar i između serije, kao i rezultati *recovery* analize (tabele 15-18). Prema smernicama FDA za hromatografske tehnike, prihvatljivi koeficijenti varijacije između i unutar serije su manji od 15% [146]. Rezultati naše studije su pokazali zadovoljavajuće vrednosti koeficijenata varijacije za svaki ispitivani sterol i za oba tipa uzorka (Tabela 15). Vrednosti koeficijenata varijacije između i unutar serije za LOD i LOQ nivoe iznosile su manje 15% za svaki sterol (Tabela 14), što je prema smernicama FDA zadovoljavajuća preciznost za ove nivoe koncentracija [146]. Primetili smo da se u razblaženim uzorcima plazme dobijaju više vrednosti LOD i LOQ nego kada smo koristili razblažene standardne rastvore (Tabela 14). Kako su u ovoj studiji za procenu LOD i LOQ korišćeni S/N odnosi, nešto više vrednosti u razblaženim uzorcima seruma i plazme se mogu objasniti uticajem matriksa, te većim

signalom bazne linije [185]. U ovom eksperimentu dobijeni su zadovoljavajući rezultati za *recovery* vrednosti za pet nivoa koncentracija, koristeći serum i plazmu kao biološke materijale (tabele 16-18). Prema smernicama FDA, prihvatljive *recovery* vrednosti za GC metode kreću se u opsegu od  $\pm 25\%$  [146].

Nakon validacije i verifikacije metode i na osnovu dobijenih rezultata, potvrđeno je da je uspostavljena metoda optimizovana i validna za kvantifikaciju NHS. Veliki broj mogućih preanalitičkih grešaka je uklonjen, rezolucije pikova analita od interesa su zadovoljavajuće, a određivanje koncentracija NHS je tačno i precizno.

Dalje smo pristupili određivanju koncentracija NHS u sve tri grupe ispitanika. Naša namera je bila da izvršimo detaljniju procenu metabolizma holesterola u cilju identifikacije asimptomatskih osoba sa povećanim rizikom za nastanak i razvoj ateroskleroze, kao i za individualnu optimizaciju farmakološkog tretmana kod pacijenata sa IBS. Povezanost između dislipidemije i razvoja IBS je odavno utvrđena, kao i koristi od primene statina u primarnoj i sekundarnoj prevenciji KVB [29, 76]. Statini, delujući kao inhibitori HMG-KoA reduktaze smanjuju sintezu holesterola. Smanjenjem sinteze povećava se apsorpcija holesterola, iako ne u tolikoj meri da dostigne koncentracije holesterola pre tretmana [30]. Međutim, kod nekih osoba, zbog primarnog poremećaja na nivou apsorpcije, statini ne pokazuju potpunu efikasnost [47, 79]. U ovoj studiji, efikasnost procesa sinteze je procenjena preko koncentracija latosterola i dezmosterola, dok je efikasnost procesa apsorpcije procenjen analizom fitosterola (kampesterola, stigmasterola i  $\beta$ -sitosterola).

Za procenu efikasnosti homeostaze korišćene su apsolutne vrednosti NHS i njihove relativne vrednosti (odnos koncentracije NHS i UH). Više apsolutne i relativne vrednosti dezmosterola u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom pacijenata na terapiji statinima, ukazuju na to da je terapija statinima efikasno smanjila sintezu holesterola u Bloch-ovom sintetskom putu (Tabela 19). Ovi rezultati su očekivani i potvrđuju rezultate prethodnih studija [36, 45, 76]. Apsolutni i relativni nivoi latosterola, kao prekursora u glavnom sintetskom putu, bili su značajno viši u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok se vrednosti između grupa pacijenata nisu razlikovale. Rezultati studije Matthana i saradnika pokazali su da se koncentracije dezmosterola i latosterola značajno smanjuju nakon šest meseci primene statina u odnosu na početne nivoe [47]. Učesnici u našoj studiji su bili na terapiji statinima tri ili više meseci. Slične vrednosti u

koncentracijama latosterola, dobijene kod dve grupe pacijenata, mogu se objasniti time da se dejstvo statina još uvek nije ispoljilo na *Kandutsch-Russell*-ov sintetski put, odnosno kraćim vremenskim periodom primene leka kod dela pacijenata uključenih u našu studiju, u odnosu na studiju Matthana i saradnika. Rezultati naše studije su pokazali veće vrednosti stigmasterola,  $\beta$ -sitosterola i stigmasterol/UH u KG u odnosu na obe grupe pacijenata (Tabela 19). U studiji koju su sprovedeli Strandberg i saradnici [186], ispitivane su vrednosti markera sinteze i apsorpcije u populaciji zdravih muškaraca tokom 22 godine i njihov prognostički efekat na razvoj KVB. Rezultati ove studije su pokazali da osobe koje su na početku istraživanja imale više vrednosti biljnih sterola, naročito  $\beta$ -sitosterola, imaju niži rizik od smrtnog ishoda usled KVB. Asorpcija pomoću istog NPC1L1 receptora omogućava fitosterolima da kompetitivnim mehanizmima smanje apsorpciju holesterola u crevima i da na taj način učestvuju u održavanju nižih koncentracija holesterola u plazmi [30, 64]. Na ovaj način opisuje se mehanizam protektivnog dejstva biljnih sterola i mogućnost da u populaciji zdravih osoba značajno utiču na održavanje homeostaze holesterola [30, 36, 37]. Više apsolutne i relativne vrednosti biljnih sterola kod zdravih ispitanika u našoj studiji, govore u prilog prethodnoj tvrdnji. Odnosi koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola se često koriste u proceni homeostaze holesterola. Vrednosti odnosa dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol u našoj studiji pokazali su razlike između sve tri ispitivane grupe. Očekivano, najviše vrednosti ovog odnosa bile su u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima. U studiji koju su sprovedeli Strandberg i saradnici navodi se da su povišene vrednosti odnosa dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol udružene sa povećanom incidencom smrtnosti od KVB [186].

Trenutno ne postoji konsenzus o načinu prikazivanja vrednosti markera sinteze i apsorpcije holesterola [187, 188]. Neki autori smatraju da NHS treba prikazivati kao relativne koncentracije zbog izraženih intraindividualnih varijacija u nivoima UH [188]. Drugi pak sugerišu da efekat terapije statinima treba sagledavati kroz promene u apsolutnim vrednostima markera sinteze i apsorpcije, jer se sa smanjenjem koncentracije holesterola mogu povećati relativne koncentracije NHS [187]. Autori koji podržavaju ovakav način predstavljanja vrednosti NHS, pored terapije statinima, kao ograničenje za prikazivanje relativnih vrednosti markera apsorpcije navode i ishranu bogatu biljnim sterolima. Iako je potrebno 100 puta povećati unos biljnih sterola da bi se njihove vrednosti u plazmi povećale dva puta, pri tumačenju rezultata analize NHS, treba voditi računa o dijetarnim navikama i odnosima biljnih



i životinjskih masti u ishrani pojedinca [76, 77]. Važno je napomenuti da ispitanici koji su bili uključeni u našu studiju nisu bili na vegetarijanskom ni veganskom načinu ishrane. Miettinen i saradnici preporučuju merenje najmanje dva ili više markera sinteze i apsorpcije holesterola, kako bi rezultati merenja bili validni. Ovi autori ne preporučuju izražavanje rezultata NHS u vidu relativnih vrednosti [189].

U cilju boljeg razumevanja procesa sinteze i apsorpcije holesterola i njihove povezanosti sa osnovnim parametrima lipidnog statusa i veličinom LDL i HDL čestica, sprovedena je korelaciona analiza, unutar svake ispitivane grupe (tabele 20-25). Očekivano, latosterol kao marker sinteze, pokazao je pozitivnu korelaciju sa vrednostima UH, LDL-h i TG u KG (Tabela 20). Navodi pojedinih bazičnih studija ukazuju na to da je glavni put sinteze holesterola *Kandutsch-Russel-ov* put [30, 37]. Iako se doprinos sintetskih puteva u zavisnosti od tkiva razlikuje, Kempen i saradnici su pokazali da su serumski nivoi latosterola indikatori sinteze holesterola u celom organizmu [190, 191]. Rezultati navedenih studija navode da postoji fenomen takozvane „ekstrakcije“ latosterola iz tkiva u plazmu koji je proporcionalan količini prisutnog holesterola u plazmi [191]. Takođe, studija Stellaarda i saradnika je pokazala da koncentracija latosterola dobro korelira sa celokupnom *de novo* sintezom holesterola, kao i da prati cirkadijalni ritam sinteze holesterola [192]. U studiji koju je sproveo Kempen, takođe su zabeležene pozitivne korelacije latosterola sa UH i TG [191]. Rezultati naše studije su pokazali pozitivnu korelaciju između vrednosti dezmosterola i koncentracija TG i negativnu korelaciju dezmosterola sa dijametrom LDL čestica. Istraživanje Matthana i saradnika sprovedeno u populaciji zdravih ispitanika, pokazalo je pozitivnu korelaciju između vrednosti dezmosterola i koncentracije ne-HDL-h [37]. Poznato je da ne-HDL-h predstavlja koncentraciju holesterola sadržanu u svim aterogenim lipoproteinskim česticama i da je bolji prediktor rizika za IBS od LDL-h [193]. Sa druge strane, ustanovljeno je da aterogenost LDL čestice zavisi od njene veličine i sadržaja TG [28, 31, 103]. Naši rezultati govore u prilog rezultatima studije Matthana i saradnika koji su pokazali da zdrave osobe sa povišenim stepenom sinteze holesterola imaju aterogeniji profil praćen hipertrigliceridemijom i, kako navode autori, veću šansu da u narednih 10 godina dožive neki kardiovaskularni događaj [37].

Efekat biljnih sterola na metabolizam holesterola kao i na rizik za nastanak i razvoj KVB i dalje je predmet mnogih diskusija. Neki istraživači smatraju da biljni steroli imaju značajan uticaj na razvoj ateroskleroze, čemu govori u prilog činjenica da mutacije u genu za

ABCG5/G8 proteina dovode do pojačane apsorpcije biljnih sterola, te posledično do razvoja sitosterolemije, nakupljanja biljnih sterola u zidu arterija i razvoja KVB [194]. S druge strane, različite studije su pokazale zaštitne efekte suplementacije biljnim sterolima, pre svega u snižavanju vrednosti LDL-h [195-197]. Korelaciona analiza između markera apsorpcije i parametara lipidnog statusa u našoj studiji je prikazala povezanost relativnih vrednosti  $\beta$ -sitosterola i nivoa UH (Tabela 21), što je rezultat matematičke relacije između ovih parametara. Rezultati korelacione analize koju smo sprovedeli, pokazali su negativnu asocijaciju između apsolutnih vrednosti  $\beta$ -sitosterola i dijametra LDL čestica i pozitivnu asocijaciju između relativnih vrednosti  $\beta$ -sitosterola i kampesterola sa relativnim udelom sdLDL. Iako fitosteroli dovode do sniženja koncentracije LDL-h, postoje različiti rezultati i tumačenja o njihovoj povezanosti sa veličinom LDL čestice. Dok jedni autori navode da fitosteroli smanjuju broj sdLDL čestica [198], Charest je u svojoj studiji primetio da dodatak stanola u ishrani dovodi do značajnog smanjenja LDL-h, usled smanjenja nivoa holesterola unutar velikih LDL subfrakcija [199]. Sprovedena meta-analiza koja je se bavila efektima unosa biljnih sterola na lipidni profil je objedinila rezultate epidemioloških studija sprovedenih u Velikoj Britaniji, Švedskoj i Kini [197]. Analizirane studije su ispitivale uticaj sterola i stanola dostupnih u namirnicama biljnog porekla na parametre lipidnog statusa. Rezultati ovih studija su pokazali da, uprkos modulirajućim efektima na metabolizam holesterola kod zdravih osoba, nakon konzumiranja ovih namirnica ne dolazi do smanjenja nivoa LDL-h. Štaviše, analiza je pokazala da samo najviši nivoi unosa biljnih sterola/stanola imaju skroman hipoholesterolemijski efekat [197]. Za razliku od prirodno dostupnih biljnih sterola i stanola, učinak fortifikovanih namirnica je mnogo veći i rezultati studije su pokazali značajno smanjenje UH i LDL-h kod ispitanika sa blagom hiperholesterolemijom. Zaključak ove meta-analize je bio da namirnice fortifikovane biljnim sterolima imaju pozitivan efekat na lipidni status kod osoba sa razvijenom hiperholesterolemijom i da pokazuju sinergistički efekat sa terapijom hipolipemicima. Autori ove meta-analize navode da efekat biljnih sterola i stanola na razvoj KVB treba detaljnije ispitati kroz velike i dobro kontrolisane studije [197]. Važno je napomenuti da u toku sprovođenja ove studije, na našem tržištu nisu postojale namirnice fortifikovane biljnim sterolima i/ili stanolima. Imajući u vidu sve gore navedeno, na osnovu naših rezultata može se zaključiti da povećanje apsorpcije holesterola, praćeno povišenom

koncentracijom biljnih sterola, dovode do promena u strukturi LDL čestica i povećanog prisustva sdLDL čestica.

Rezultati korelacione analize sprovedene u grupi pacijenata koji su bili na terapiji statinima pokazali su pozitivnu asocijaciju između koncentracija dezmosterola i koncentracija TG i relativnog udela malih HDL čestica. Istraživanje koje su sprovedeli Tian i saradnici [200] imalo je za cilj da ispita uticaj statina na distribuciju HDL subklasa kod pacijenata sa IBS. Rezultati studije su pokazali da tokom primene terapije statinima dolazi do promena u distribuciji HDL subklasa. Kod pacijenata je primećena smanjenja zastupljenosti većih, HDL 2b, te povećana zastupljenosti manjih HDL čestica u odnosu na zdrave osobe. Autori su zaključili da bi za pojavu kardiovaskularnih događaja tokom primene terapije statinima moglo da bude odgovorno pomeranje raspodele HDL subklasa ka manjim česticama. Poznato je da tokom terapije statinima dolazi do povećanja vrednosti HDL-h [46], ali se nameće pitanje veličine i sastava HDL čestica tokom terapije. Naši rezultati distribucije HDL subklasa su pokazali značajno niže vrednosti udela HDL 2b čestica kod pacijenata na terapiji statinima u odnosu na KG (Tabela 9). Zanimljivo je i to da je zastupljenost HDL 2b subklasa imala trend ka višim vrednostima u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u odnosu na pacijente koji su bili na terapiji hipolipemicima. Zastupljenost malih HDL subklasa je bila najveća u grupi pacijenata na terapiji statinima. Naši rezultati govore u prilog rezultatima studije Tiana i saradnika [200] i uticaju terapije statinima na distribuciju HDL subklasa. U dve odvojene studije, Moore i Leitinger su u ispitivali uticaj dezmosterola na RTH [201, 202]. Smatra se da dezmosterol promovise efluks holesterola iz penastih ćelija posredovan HDL česticama [201]. Iako su vrednosti dezmosterola u grupi pacijenata koji su bili na terapiji statinima dostigle vrednosti u KG (Tabela 19), na osnovu rezultata korelacione analize (Tabela 22) možemo da pretpostavimo da pacijenti koji ne odgovaraju adekvatno na terapiju statinima i kod kojih vrednosti dezmosterola ostaju povišene, uz prisutnu hipertrigliceridemiju, mogu imati i povećan udeo manjih HDL subklasa.

Naši rezultati su pokazali da apsolutne vrednosti kampesterola i  $\beta$ -sitosterola pozitivno koreliraju sa vrednostima UH i LDL-h kod pacijenata na terapiji statinima (Tabela 23). Kako navode Wu i saradnici, smanjenje sinteze pod dejstvom statina, povećava apsorpciju holesterola u cilju uspostavljanja dinamičke ravnoteže [36]. Apsorpcija holesterola tokom terapije statinima raste, ali vrednosti UH ne dostižu vrednosti pre otpočinjanja tretmana [30].

Poznato je da je odgovor na terapiju statinima individualan. Novije studije naglašavaju da je za predviđanje odgovora na terapiju potrebno merenje markera sinteze i apsorpcije holesterola pre otpočinjanja tretmana [36, 44, 48, 154]. Rezultati studije Wua i saradnika su pokazali da pacijenti koji pre otpočinjanja terapije statinima imaju povišene vrednosti markera apsorpcije lošije odgovaraju na terapiju. Autori smatraju da je kod ovih pacijenata primarni poremećaj na nivou apsorpcije uzrokovao razvoj dislipidemije, odnosno hiperholesterolemiju [36]. Rezultati naše studije nisu pokazali značajno povećanje markera apsorpcije kod pacijenata na terapiji statinima u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji (Tabela 19), ali na osnovu rezultata korelacione analize možemo da utvrdimo da kod pacijenata na terapiji sa povećanjem apsorpcije dolazi do povećanja koncentracija UH i LDL-h. Pored snižavanja vrednosti UH i LDL-h, u 4S studiji je zabeleženo povećanje vrednosti HDL-h za 8% nakon terapije statinima u trajanju od 5,4 godina [46]. Kako navode Matthan i saradnici [47], kod pacijenata na terapiji statinima, stepen povećanja vrednosti  $\beta$ -sitosterola tokom terapije statinima ukazuje na adekvatan odgovor na terapiju statinima i pozitivno korelira sa stepenom povećanja koncentracija HDL-h. Autori takođe navode da je pored povećanja koncentracije HDL-h tokom terapije, važno sagledati i njegovu funkcionalnost, te da terapija statinima kod nekih pacijenata može da utiče i na druga ateroprotektivna svojstva ovih čestica. Na osnovu rezultata studije Matthana i saradnika, možemo da pretpostavimo da pozitivna korelacija između relativnih vrednosti  $\beta$ -sitosterola i dijametra HDL čestica (Tabela 23), može da ukaže na to da je povoljan efekat terapije, praćen povećanjem  $\beta$ -sitosterola, praćen i povećanjem veličine HDL čestica.

Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, vrednosti sitosterola kao markera sinteze pozitivno su korelirale sa vrednostima UH, ali i sa vrednostima holesterola sadržanog u LDL i HDL lipoproteinskim česticama (Tabela 24). Ovaj rezultat je očekivan, a pozitivna korelacija između ovih parametara uočena je i u *Framingham Offspring* studiji [37]. U ovoj grupi ispitanika primetili smo inverznu asocijaciju između apsolutnih i relativnih vrednosti dezmosterola sa dijametrom LDL čestica. Prisustvo sdLDL čestica u ovoj grupi ispitanika, potvrđuje postojanje aterogene trijade [31], a uzrok narušene homeostaze holesterola kod pacijenata sa većom zastupljenošću sdLDL čestica treba tražiti u povećanoj sintezi. Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, uočena je pozitivna korelacija između vrednosti kampesterola sa koncentracijom HDL-h i negativna korelacija kampesterola sa dijametrom

HDL čestica (Tabela 25). Slične rezultate pokazala je i korelaciona analiza  $\beta$ -sitosterola sa HDL-h i udelom malih HDL čestica. U studiji Matthana i saradnika, kod pacijenata sa IBS, takođe je primećena pozitivna asocijacija između markera apsorpcije i koncentracija HDL-h, ali i koncentracija TG [37]. Možemo da pretpostavimo da narušena homeostaza holesterola, praćena povećanom apsorpcijom, dovodi do povećanog preuzimanja holesterola od strane HDL-a preko ABCA1 na bazolateralnoj membrani enterocita. Prisutna hipertrigliceridemija kod ovih pacijenata (Tabela 7), dovodi do remodelovanja HDL posredstvom CETP. U hipertrigliceridemiji, modifikacija HDL čestice posredovana CETP-om je intenzivnija, te HDL čestice postaju manje i bogatije TG [114]. Ove nalaze potvrđuju i naši rezultati aktivnosti CETP, gde je primećen trend ka višim vrednostima u grupi pacijenata bez terapije statinima (Slika 26). Takođe, kod ovih pacijenata primećena je veća zastupljenost manjih HDL čestica u odnosu na KG (Tabela 9.). Na osnovu gore navedenog možemo da primetimo da uz prisutnu hipertrigliceridemiju, poremećaj na nivou sinteze holesterola dovodi do remodelovanja LDL čestica i povećanog prisustva sdLDL. Sa druge strane, pretpostavljamo da poremećaj na nivou apsorpcije dovodi do pomeranja profila HDL čestica ka manjim česticama, posredstvom CETP enzima.

Kod pacijenata koji nisu na terapiji statinima, merenjem markera sinteze i apsorpcije, može se ustanoviti na kom nivou je došlo do narušavanja homeostaze holesterola i predvideti odgovor na eventualnu terapiju hipolipemicima. Znajući da trećina pacijenata na terapiji statinima ne odgovara adekvatno na tretman [79], najverovatnije zbog narušavanja homeostaze na nivou apsorpcije, potencijal NHS u predviđanju odgovora na terapiju hipolipemicima je značajan. Studije sprovedene u Kini, Americi i Evropi sugerišu da kod pacijenata sa KVB postoje promenjeni obrasci apsorpcije i sinteze holesterola [197]. Wu i saradnici naglašavaju da je za utvrđivanje obrazaca homeostaze holesterola najvažnije pratiti nivoe NHS zajedno sa parametrima osnovnog lipidnog statusa [36]. Za procenu obrazaca homeostaze holesterola, mnogi autori predlažu odnos markera sinteze i markera apsorpcije. Najčešće su to kombinacije dezmosterola, odnosno latosterola sa kampesterolom, odnosno  $\beta$ -sitosterolom [37, 43, 47, 187]. Često se za procenu obrazaca homeostaze navode odnosi ukupnih koncentracija markera sinteze i ukupnih koncentracija markera apsorpcije [37]. U našoj studiji koristili smo dva odnosa, dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol i latosterol/ $\beta$ -sitosterol. Očekivano, najviše vrednosti odnosa primećene su u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji

statinima. Kako statini smanjenjem sinteze i povećanjem apsorpcije regulišu homeostazu holesterola, vrednosti ovih odnosa bile su niže u odnosu na netretirane pacijente, a najniže zabeležene vrednosti bile su u KG. Iako ovi odnosi mogu da ukažu na poremećaj homeostaze holesterola, oni ne daju precizan odgovor na kom nivou je homeostaza narušena. Imajući ovo u vidu izvršili smo podelu ispitanika u podgrupe na osnovu medijalnih vrednosti koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola. Kako prisustvo bolesti ili upotreba hipolipemika značajno utiču na promene u obrascima sinteze i apsorpcije holesterola, obrasci su tumačeni unutar svake ispitivane grupe zasebno. U KG i grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, vrednosti UH, LDL-h i apoB-100 rastu kako raste efikasnost sinteze i/ili apsorpcije (Tabela 26). Prema preporukama nacionalnih i međunarodnih vodiča, kod osoba koje razviju dislipidemiju bez kliničkih znakova KVB, promenom životnih navika ili eventualnim uvođenjem hipolipemika u primarnoj prevenciji, moguće je smanjiti incidencu i prevalencu KVB [5-7]. U KG primetili smo da podgrupa SS/PA ima više koncentracije apoA-I i HDL-h u odnosu na podgrupu koja ima isti stepen sinteze, ali niži stepen apsorpcije holesterola. Ovaj rezultat u skladu je sa rezultatima prethodnih studija koje su pokazale pozitivnu korelaciju između nivoa markera apsorpcije i koncentracije HDL-h [37, 190, 186, 191]. Takođe, ova podgrupa imala je najniže vrednosti TG u odnosu na ostale grupe (Tabela 26). Naši rezultati su pokazali da SS/PA podgrupa u okviru KG ima najpovoljniji lipidni profil. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 26, možemo da uočimo podgrupu zdravih osoba (PS/SA) kod koje je primećena veća koncentracija TG, u odnosu na ostale tri podgrupe (Tabela 26). Imajući u vidu uticaj hiperholesterolemije na modifikaciju LDL i HDL lipoproteinskih čestica [114], možemo da zaključimo da ova podgrupa poseduje aterogeniji lipidni profil (Tabela 27).

Podela ispitanika na osnovu obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola prikazana u ovom radu, dala je detaljniji uvid u očuvanje homeostaze holesterola. Kod zdravih osoba, ova podela pruža mogućnost identifikacije individua sa povišenim rizikom za razvoj KVB. Kod pacijenata koji su razvili IBS, na osnovu ovih obrazaca moguće je predvideti odgovor na terapiju hipolipemicima. Ukoliko je do poremećaja homeostaze došlo na nivou sinteze, adekvatan tretman kod ovih pacijenata podrazumevao bi uključivanje statina u terapiju, dok je terapija izbora za pacijente sa poremećajem na nivou apsorpcije ezetimib [36, 47]. Slične rezultate pokazale su i druge studije, korišćenjem različitih NHS za procenu homeostaze holesterola [30, 36, 47, 187]. Wu i saradnici su pokazali da pacijenti sa povišenim vrednostima

latosterola i sniženim apsolutnim i relativnim vrednostima stigmasterola dobro odgovaraju na terapiju statinima [36]. U studiji Matthana i saradnika za procenu obrazaca homeostaze holesterola korišćeni su latosterol i kampesterol [187]. Autori su primetili da pacijenti koji adekvatno odgovaraju na terapiju statinima, značajnim smanjenjem vrednosti holesterola, imaju i značajno smanjenje vrednosti latosterola. Rezultati studije su dokazali da u pogledu markera apsorpcije, rosuvastatin neznatno smanjuje apsolutne vrednosti kampesterola, dok je upotreba atorvastatina neznatno povećala njegove apsolutne vrednosti. Relativne vrednosti kampesterola su pokazale značajno povećanje za oba statina [187]. Kako navode autori, merenjem NHS pre otpočinjanja terapije i tokom terapije statinima, moguće je pratiti odgovor na terapiju i ukoliko je potrebno, blagovremeno je modifikovati [187]. U grupi pacijenata koja je na terapiji statinima, najniže vrednosti LDL-h zabeležene su u PS/SA podgrupi, na osnovu čega možemo da zaključimo da ova podgrupa adekvatno odgovara na terapiju statinima (Tabela 26).

Dalje, želeli smo da ispitamo da li između grupa ispitanika sa različitim statusom sinteze i apsorpcije holesterola postoje razlike u raspodeli LDL subklasa. Za ovo ispitivanje izabran je dezmosterol zbog prethodno primećene korelacije sa zastupljenošću sdLDL čestica [187]. U našoj studiji, viši nivoi dezmosterola povezani su sa prisustvom manjih LDL čestica u KG i grupi pacijenata koja nije bila na terapiji statinima (Tabela 20 i Tabela 24). Slično prethodnom,  $\beta$ -sitosterol je izabran kao reprezentativni marker efikasnosti apsorpcije, s obzirom da su mnoge studije ukazale na njegovu protektivnu ulogu u snižavanju nivoa holesterola, kao i u sprečavanju oksidacije LDL čestica [203, 204]. Naime, kod zdravih osoba, PS/SA podgrupa ima najveću zastupljenost sdLDL čestica (Tabela 27), što ukazuje da disbalans u homeostazi holesterola u korist povećane sinteze može rezultovati ne samo većom koncentracijom LDL-h, već i pojačanim formiranjem sdLDL čestica. Podgrupe zdravih osoba koje su se razlikovale na nivou apsorpcije (SS/SA i SS/PA) nisu pokazale razlike u relativnim udelima sdLDL. Međutim, relativni udeo LDL IIIA u podgrupi SS/PA je bio viši u odnosu na SS/SA podgrupu, što bi moglo da ukaže da promene na nivou apsorpcije mogu da dovedu do preraspodele lipoproteina ka manjim i gušćim česticama. Slični rezultati su dobijeni i kada je homeostaza procenjena na osnovu koncentracija latosterola i  $\beta$ -sitosterola. Za dalju potvrdu ovih nalaza potrebno je sprovesti dobro kontrolisanu studiju sa većim brojem ispitanika, uz praćenje pacijenata pre i nakon primene terapije hipolipemicima. Rezultati ovog istraživanja

mogu da ukažu na to da pacijenti tretirani statinima, koji pripadaju PS/SA podgrupi, dobro odgovaraju na terapiju, jer imaju značajno niži udeo LDL IVB subklasa (Tabela 27) i niže vrednosti LDL-h (Tabela 26) u odnosu na ostale podgrupe. Takođe, naši rezultati su pokazali da podgrupe sa povećanom apsorpcijom imaju veću zastupljenost LDL IVB čestica (Tabela 27). Kako ove čestice predstavljaju najaterogeniju subpopulaciju LDL čestica, moglo bi se pretpostaviti da grupe sa povećanom apsorpcijom (SS/PA i PS/PA) imaju veći rizik za razvoj KVB od grupa sa nižom apsorpcijom. Matthan i saradnici su pokazali da su u grupi pacijenata koji su bili na terapiji statinima, povećani rizik za nastanak kardiovaskularnog događaja imale osobe sa povišenim vrednostima TG [47]. Naša klasifikacija pacijenata može pružiti preciznije informacije o poremećajima na nivou sinteze i apsorpcije holesterola. Na osnovu klasifikacije pacijenata u jednu od četiri podgrupe, možemo pretpostaviti da će pacijenti sa povišenom sintezom pokazati adekvatan odgovor na terapiju statinima, dok pacijenti koji pripadaju SS/SA podgrupi mogu imati koristi od terapijske promene načina života. Na osnovu svega navedenog, proizilazi da bi u PS/PA podgrupi kombinovana terapija (statini i ezetimib) mogla dati najbolji efekat [36, 47, 187]. U grupi pacijenata koji nisu lečeni statinima, merenjem NHS pre otpočinjanja tretmana i tokom primene hipolipemika, moguće je predvideti odgovor na terapiju i pratiti efekte terapije [36, 170, 197].

Produkti hidrolitičkog dejstva Lp-PLA2 doprinose razvoju endotelne disfunkcije, inflamacije plaka i formiranja nekrotičnog jezgra unutar plaka, te Lp-PLA2 može da se koristi kao biomarker vaskularne inflamacije [123]. U studiji koju su sprovedi White i saradnici, dokazano je da viši bazični nivoi aktivnosti Lp-PLA2 značajno povećavaju rizik za kasniji razvoj kardiovaskularnih događaja. Nakon primene terapije pravastatinom u trajanju od godinu dana, ovi autori su dokazali značajno smanjenja aktivnost Lp-PLA2 u poređenju sa placeboom [205, 206]. Naši rezultati su dokazali da su pacijenti koji su bili na terapiji statinima imali značajno niže vrednosti Lp-PLA2 u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima. Ovi rezultati mogu da ukažu na veoma značajan plejotropni efekat terapije statinima koji se dalje može odraziti na stabilizaciju aterosklerotskog plaka i smanjenje nekrotičnih naslaga unutar lezije [118, 119].

Povećan unos  $\omega$ -3 MK predstavlja specifičnu preporuku u prevenciji KVB, zahvaljujući kardioprotektivnim efektima serija eikozanoida koji nastaju kao proizvodi metabolizma ovih MK [35]. Svoje protektivno dejstvo  $\omega$ -3 MK ostvaruju ugradnjom u



fosfolipide membrana umesto ARA. Posledično, nakon dejstva PLA2 na ove fosfolipide, smanjena je koncentracija slobodne ARA, prekursora u sintezi proinflamatornih medijatora [34, 35]. Rezultati mnogih studija su dokazali povezanost povećanog unosa  $\omega$ -3 masnih kiselina i smanjene incidence KVB, ukazujući na to da suplementacija ovim MK može imati kardioprotektivni efekat [207]. Dokazano je da  $\omega$ -3 MK snižavaju koncentracije TG smanjujući stvaranje i ubrzavajući katabolizam VLDL čestica, te se pacijentima koji su na terapiji statinima, a čiji su nivoi TG i dalje povišeni, preporučuje upotreba  $\omega$ -3 MK [34]. Dokumentovan je uticaj  $\omega$ -3 polinezasićenih MK na sastav i distribuciju lipoproteinskih čestica, kao i njihovo vazodilatatorno, antiinflamatorno i antitrombotsko dejstvo, čime se potvrđuje višestruka korist njihove upotrebe [208]. Određivanje procentualnog udela MK u ukupnom masnokiselinskom profilu plazme može da ukaže na nutritivni status organizma i ulogu nutrimenata u razvoj aterosklerotskog procesa, ali i na eventualni uticaj farmakološkog tretmana na njihov metabolizam. Najzastupljenija zasićena MK u našoj ishrani je palmitinska kiselina, koja može da se sintetiše *de novo* u organizmu. S obzirom na to da potiče iz dva izvora, endogenog i egzogenog, udeo ove masne kiseline u ukupnom sadržaju masnih kiselina plazme je najveći [208]. Rezultati naše studije ukazuju na povišene vrednosti udela palmitinske kiseline kod pacijenata sa i bez terapije statinima u odnosu na KG. Poznato je da zasićene masne kiseline menjaju fizičko-hemijske karakteristike molekula TG, što se smatra jednim od načina na koji ostvaruju aterogeni efekat [208]. Više vrednosti palmitinske kiseline u obe grupe pacijenata govore u prilog činjenici o aterogenom potencijalu „zasićenih masti“. Kada je u pitanju analiza udela nezasićenih MK, dobijeni rezultati ukazuju na smanjenje procentualnog udela linolne kiseline, a povećanje udela ARA i DHA kod pacijenata koji su na terapiji statinima. Ovakav masnokiselinski profil u grupi pacijenata na terapiji statinima mogao bi se objasniti plejotropnim efektima statina. Naime, u *in vitro* studijama na ćelijskim linijama pokazano je da statini pojačavaju aktivnost  $\delta$ 5- i  $\delta$ 6-desaturaza [209]. Ove desaturaze kao supstrat koriste, između ostalog, i linolnu kiselinu, čime se može objasniti smanjenje njenog udela kod pacijenata na terapiji statinima dobijeno u ovoj studiji. Serijom reakcija koje katalizuju pomenute desaturaze i naknadno elongaze, dolazi do sinteze različitih polinezasićenih masnih kiselina. Možemo da zaključimo da povišeni udeli ARA i DHA koji su dobijeni u ovoj studiji, mogu biti rezultat pojačane desaturazne aktivnosti. Povećanje procentualnih udela EPA i DHA vodi ka manjem riziku od akutnog koronarnog događaja pa je

ovaj efekat statina itekako povoljan [35]. Iako su mnoge studije dokazale da u populaciji pacijenata koji su na terapiji statinima postoji podgrupa koja ne odgovara na terapiju adekvatnim sniženjem vrednosti LDL-h, korist od primene statina je višestruka, te plejotropni efekti mogu imati važnu ulogu u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih događaja.

Iz naših rezultata, kao i rezultata drugih autora, proizilazi zaključak da osnovni parametri lipidnog statusa ne daju potpunu sliku o riziku za razvoj dislipidemije, niti o mehanizmima njenog nastanka, te samim tim ni dovoljnu informaciju o pravilnom izboru terapije. Sagledavanje celokupnog metabolizma holesterola kroz procese njegove sinteze i apsorpcije, ali i kroz sastav i funkcionalnost lipoproteina uključenih u njegov transport, doprinosi razumevanju mehanizama održavanja homeostaze holesterola, kao i etiopatogenetskih procesa uključenih u narušavanju homeostaze. Analizom statusa sinteze i apsorpcije holesterola i ispitivanjem odnosa sa drugim lipidnim faktorima rizika, moguće je u grupi zdravih individua izdvojiti podgrupu sa povećanim rizikom za nastanak i razvoj KVB. Dalje, kod pacijenata koji su razvili IBS, ispitivanje homeostaze holesterola može da bude od koristi za predviđanje odgovora na terapiju hipolipemicima. U tom smislu, upotreba terapije ostvarila bi maksimalne efekte kod individua kod kojih je do poremećaja u homeostazi holesterola došlo zbog prekomerne sinteze. Konačno, primena validiranih analitičkih metoda za određivanje NHS predstavlja važan preduslov za tačnu i preciznu procenu obrazaca homeostaze holesterola.

## 6. Zaključci

- ✓ Koncentracije UH, LDL-h i apoB-100 između ispitivanih grupa pacijenata sa IBS i zdravih osoba se nisu značajno razlikovale. Vrednosti TG su bile značajno više u grupama pacijenata u odnosu na KG, dok su vrednosti HDL-h bile značajno niže kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Vrednosti apoA-I bile su značajno niže u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima u odnosu na KG.
  
- ✓ Nije bilo značajnih razlika u aktivnostima LCAT i CETP između ispitivanih grupa, ali je primećen trend ka višim aktivnostima CETP u grupi pacijenata koja nije bila na terapiji statinima. Koncentracije MDA bile su značajno veće u obe grupe pacijenata u odnosu na KG.
  
- ✓ Udeo HDL 3 fenotipa u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima je bio značajno veći nego u KG. Razlike u zastupljenosti LDL fenotipova nisu bile značajne, ali je uočen trend ka većoj frekvenci LDL fenotipa B u grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima.
  
- ✓ Iako nije bilo razlike u raspodeli relativnih udela LDL subklasa, utvrđene su značajne razlike u distribuciji HDL subklasa među ispitivanim grupama. Relativni udeo manjih HDL čestica bila je značajno veća u obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Raspodela relativnih udela HDL subfrakcija bile su pomerene ka manjim česticama kod pacijenata sa IBS koji su bili na terapiji statinima, u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji.
  
- ✓ GC-FID metoda za kvantifikaciju NHS kojom se postižu tačni i precizni rezultati podrazumeva razdvajanje uzoraka na nepolarnoj tridesetometarskoj koloni, uz *splitless* režim injektovanja, pri multilinearnom programiranju temperature kolone, korišćenjem helijuma kao nosećeg gasa.

✓ Serum i plazma su adekvatni uzorci za kvantifikaciju NHS i stabilni su 2 meseca na -80 °C. Priprema uzoraka za njihovo određivanje trebalo bi da sadrži i korak derivatizacije, kako bi hromatografska analiza pikova od interesa dala zadovoljavajuće  $R_s$  vrednosti za svaki ispitivani pik. Treba izbegavati upotrebu plastičnog laboratorijskog posuđa u toku pripreme uzoraka za određivanje NHS zbog uticaja plastifikatora na prinos reakcije derivatizacije. Uzorci pripremljeni na ovaj način su stabilni 7 dana na -20 °C.

✓ Apsolutne i relativne koncentracije markera sinteze su bile povišene kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok su apsolutne i relativne koncentracije markera apsorpcije bile značajno niže. Kod zdravih osoba snižena sinteza i povišena apsorpcija ukazuju na očuvanu homeostazu holesterola. Pacijenti na terapiji statinima su imali niže koncentracije markera sinteze i više nivoe markera apsorpcije u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima, što se može smatrati posledicom terapije. Pacijenti koji nisu bili na terapiji statinima imali su značajno više vrednosti odnosa dezmosterol/ $\beta$ -sitosterol u odnosu na ostale ispitivane grupe.

✓ Merenjem koncentracija dezmosterola, latosterola i  $\beta$ -sitosterola, moguće je proceniti efikasnost sinteze i apsorpcije, te svrstati ispitanike u kategorije dobrih ili loših sintetizera, odnosno dobrih ili loših apsorbera. Na osnovu ovako dobijenih obrazaca homeostaze holesterola, moguće je izdvojiti podgrupu zdravih osoba koja ima povišenu sintezu i smanjenu apsorpciju holesterola, te povećan rizik za nastanak i razvoj KVB, koji je praćen povišenim udelima manjih LDL sufrakcija. Podgrupa zdravih osoba sa smanjenom sintezom i povećano apsorpcijom ima najpovoljniji lipidni profil praćen višim vrednostima apoA-I i HDL-h i nižim vrednostima TG.

✓ Kod pacijenata sa IBS, procenom obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola pre otpočinjanja hipolipemijskog tretmana, moguće je predvideti odgovor na terapiju, a kasnije pratiti efekte terapije. Može se očekivati da su podgrupe pacijenata sa povećanim nivoima sinteze adekvatni kandidati za terapiju statinima, a podgrupe sa povećanom apsorpcijom adekvatni kandidati za terapiju ezetimibom.

✓ Kod pacijenata sa IBS procenom obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola, pre otpočinjanja hipolipemiskog tretmana, moguće je predvideti odgovor na terapiju, a kasnije pratiti efekte preporučene terapije. Podgrupe pacijenti sa povećanim nivoima sinteze mogu biti adekvatni kandidati za terapiju statinima, dok podgrupe sa povećanom apsorpcijom mogu adekvatno da odgovore na terapiju ezetimibom.

✓ U grupi pacijenata koji su na terapiji statinima, podgrupa u kojoj je apsorpcija holesterola povišena, a sinteza snižena, ima nižu koncentraciju LDL-h i manji udeo sdLDL čestica, što se može smatrati adekvatnim odgovorom na terapiju.

✓ Praćenjem vrednosti Lp-PLA2, moguće je proceniti pozitivan efekat terapije statinima na stabilizaciju aterosklerotske lezije. Takođe, relativni udeli zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, kao i  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 MK kod pacijenata na terapiji statinima, daju dodatne informacije o plejotropnim efektima terapije na metaboličke puteve desaturacije i elongacije masnih kiselina.

## **7. Literatura:**

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.
2. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med.* 2016;4:256-67.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133:447-54.
4. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet.* 2014;383:999-1008.
5. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 2016;37:2315-81.
6. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, De Jesus JM, Miller NH, Hubbard VS et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2960-84.
7. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za prevenciju, dijagnostifikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd 2013.

8. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G et al. Global, regional and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70:1–25.
9. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5:927-46.
10. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J.* 1996; 131: 379-84.
11. Kreienberg PB, Darling RC, Fowkes F. The Epidemiology and Etiology of Atherosclerosis. In: *Vascular Surgery.* 2006 Springer Specialist Surgery Series. Springer, London.
12. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:529-38.
13. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *Am J Epidemiol.* 1997;146:483-94.
14. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev.* 2010;9:142-52.
15. Villablanca AC, Jayachandran M, Banka C. Atherosclerosis and sex hormones: current concepts. *Clin Sci.* 2010;119:493-513.
16. Siasos G, Tsigkou V, Kokkou E, Oikonomou E, Vavuranakis M, Vlachopoulos C, Verveniotis A, Limperi M, Genimata V, G Papavassiliou A, Stefanadis C. Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Curr Med Chem.* 2014;21:3936-48.
17. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med.* 2004;116:9-16.

18. Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2006;8:100-6.
19. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 2001;37:1053-9.
20. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473:317-25.
21. Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B. *Kardiologija.* Beograd. Zavod za Udžbenike, 2011.
22. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2013;424:245-52.
23. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* 2013;22:399-411.
24. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276:618-32.
25. Açar G, Kalkan ME, Avci A, Alizade E, Tabakci MM, Toprak C, Özkan B, Alici G, Esen AM. The relation of platelet–lymphocyte ratio and coronary collateral circulation in patients with stable angina pectoris and chronic total occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015;21:462-8.
26. Liu X, Dornbos III D, Pu Y, Leng X, Song L, Jia B, Pan Y, Wang D, Miao Z, Wang Y, Liu L. Collateral circulation alters downstream hemodynamic stress caused by intracranial atherosclerotic stenosis. *Neurol Res.* 2017;39:498-503.
27. Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circulation.* 2014;114:214-26.
28. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Vujovic A, Kalimanovska-Ostic D. Does simultaneous



- determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk?. *Clin Exp Med.* 2008;8:109-16.
29. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Stone NJ, Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:720-32.
  30. van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;368:1-6.
  31. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM.* 2006;99:1-4.
  32. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15:316-28.
  33. Jansen H, Samani NJ, Schunkert H. Mendelian randomization studies in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2014;35:1917-24.
  34. Ito MK. Long-chain omega-3 fatty acids, fibrates and niacin as therapeutic options in the treatment of hypertriglyceridemia: a review of the literature. *Atherosclerosis.* 2015;242:647-56.
  35. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. *Nutr Res.* 2004;24:761-72.
  36. Wu WF, Wang QH, Zhang T, Mi SH, Liu Y, Wang LY. Gas chromatography analysis of serum cholesterol synthesis and absorption markers used to predict the efficacy of simvastatin in patients with coronary heart disease. *Clin Biochem.* 2013;46:993-8.
  37. Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Sex-Specific Differences in the Predictive Value of Cholesterol Homeostasis Markers

- and 10-Year Cardiovascular Disease Event Rate in Framingham Offspring Study Participants. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:50-66.
38. Son HH, Kim SH, Moon JY, Chung BC, Park MJ, Choi MH. Serum sterol profiling reveals increased cholesterol biosynthesis in childhood obesity. *J Steroid Biochem.* 2015;149:138-45.
  39. Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A.* 2001; 935:203-36.
  40. Seo HS, Choi MH. Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J Steroid Biochem.* 2015;153:72–79.
  41. Wang N, Yvan-Charvet L, Lütjohann D, Mulder M, Vanmierlo T, Kim TW et al. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* 2008;22:1073–82.
  42. Lupattelli G, De Vuono S, Mannarino E. Patterns of cholesterol metabolism: pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:620–27.
  43. Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lütjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO et al. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res.* 2010; 51: 2384–93
  44. Weingärtner O, Lütjohann D, Vanmierlo T, Müller S, Günther L, Herrmann W et al. Markers of enhanced cholesterol absorption are a strong predictor for cardiovascular diseases in patients without diabetes mellitus. *Chem Phys Lipids.* 2011;164:451-6.
  45. Gylling H, Miettinen TA. Baseline intestinal absorption and synthesis of cholesterol regulate its response to hypolipidaemic treatments in coronary patients. *Atherosclerosis.* 2002;160:477-81.
  46. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet.* 1994;344:1383-9.

47. Matthan NR, Resteghini N, Robertson M, Ford I, Shepherd J, Packard C et al. Cholesterol absorption and synthesis markers in individuals with and without a CHD event during pravastatin therapy: insights from the PROSPER trial. *J Lipid Res.* 2010;51:202-9.
48. Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev.* 2006;64:385-402.
49. Sharpe LJ, Howe V, Prabhu AV, Luu W, Brown AJ. Navigating the shallows and rapids of cholesterol synthesis downstream of HMGCR. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2015;61:154-6.
50. Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog Lipid Res.* 2013;52:666-80.
51. Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res.* 2011;52:6-34.
52. Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J BiolChem.* 2006;281:27816-26.
53. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife.* 2015;4:e07999.
54. Gill S, Stevenson J, Kristiana I, Brown AJ. Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA reductase. *Cell Metab.* 2011;13:260-73.
55. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell Metab.* 2015;161:161-72.

56. Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol.* 2006;12: 6429-39.
57. Howles PN. Cholesterol absorption and metabolism. *Methods Mol Biol.* 2016;1438:177-97.
58. Ikeda I. Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *J Oleo Sci.* 2015;64:9-18.
59. Sudhop T, Lütjohann D, Kodali A, Igel M, Tribble DL, Shah S, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation.* 2002;106:1943-8.
60. Cohn JS, Kamali A, Wat E, Chung RW, Tandy S. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients.* 2010;2:116-27.
61. Iqbal J, Al Qarni A, Hawwari A. Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption: A Disease Perspective. *Adv Biol Chem.* 2017;7:60-75.
62. Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res.* 1994; 35:943–55.
63. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303:1201–4.
64. Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Acta Biochim Biophys.* 2009;1791:679–83.
65. Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 2004;279:33586–92.
66. Altmann SW, Davis HR Jr, Yao X, Lavery M, Compton DS, Zhu LJ et al. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression

- cloning and its role in cholesterol absorption. *Acta Biochim Biophys.* 2002;1580:77–93.
67. Drobnik W, Lindenthal B, Lieser B, Ritter M, Christiansen Weber T, Liebisch G et al. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology.* 2001;120:1203–11.
68. Valasek MA, Weng J, Shaul PW, Anderson RG, Repa JJ. Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J Biol Chem.* 2005;280:28103-9.
69. Nguyen DV, Drover VA, Knopfel M, Dhanasekaran P, Hauser H, Phillips MC. Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *J Lipid Res.* 2009;50:2235–44.
70. Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology.* 2006;131:1197–207.
71. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116:1052–62.
72. Ostlund RE Jr, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytosteranols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:911–6.
73. Wang J, Sun F, Zhang DW, Ma Y, Xu F, Belani JD et al. Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: in vitro assay and reconstitution. *J Biol Chem.* 2006;281:27894–904.
74. Guardamagna O, Abello F, Baracco V, Federici G, Bertucci P, Mozzi A, Mannucci L et al. Primary hyperlipidemias in children: effect of plant sterol supplementation on plasma lipids and markers of cholesterol synthesis and absorption. *Acta Diabetol.* 2011;48:127–33.
75. Dutta, P. *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals.* 2003 Basel: Marcel Dekker.

76. Matthan NR, Giovanni A, Schaefer EJ, Brown BG, Lichtenstein AH. Impact of simvastatin, niacin, and/or antioxidants on cholesterol metabolism in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res.* 2003;44:800-6.
77. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J.* 2011;32:1769-818.
78. Verdoia M, Galasso G, Filardi P, De Luca G. (2018). Statins and elderly: from clinical trials to daily practice. *Curr Vasc Pharmacol* 2018;16:1-4.
79. Trompet S, Postmus I, Slagboom PE, Heijmans BT, Smit RA, Maier AB et al. Non-response to (statin) therapy: the importance of distinguishing non-responders from non-adherers in pharmacogenetic studies. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016;72:431-7.
80. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation.* 2004; 109: 39-43.
81. Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:239-59.
82. Wang HH, Portincasa P, Mendez-Sanchez N, Uribe M, Wang DQ. Effect of ezetimibe on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones. *Gastroenterology.* 2008;134:2101–10.
83. Tang W, Jia L, Ma Y, Xie P, Haywood J, Dawson PA et al. Ezetimibe restores biliary cholesterol excretion in mice expressing Niemann-Pick C1-Like 1 only in liver. *Acta Biochim Biophys.* 2011;1811:549–55.
84. Sudhop T, Reber M, Tribble D, Sapre A, Taggart W, Gibbons P et al. Changes in cholesterol absorption and cholesterol synthesis caused by ezetimibe and/or simvastatin in men. *J Lipid Res.* 2009;50:2117–23.
85. Mikhailidis DP, Lawson RW, McCormick AL., Sibbring GC, Tershakovec AM, Davies GM et al. Comparative efficacy of the addition of ezetimibe to statin vs statin

- titration in patients with hypercholesterolaemia: systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 2011;27:1191-210.
86. Bays HE, Davidson MH, Massaad R, Flaim D, Lowe RS, Tershakovec AM et al. Safety and efficacy of ezetimibe added on to rosuvastatin 5 or 10 mg versus up-titration of rosuvastatin in patients with hypercholesterolemia (the ACTE Study). *Am J Cardiol.* 2011;108:523-30.
87. Huang JC, Lee TY, Liou MJ, Lin CM, Pei D et al. Begin with the real-world patients of non-goal-achieved hypercholesterolemia in taiwan through the ezetimibe/simvastatin tablet - The BRAVO Study. *Curr Med Res Opin* 2011;27:1645-51.
88. Migdalis I, Efthimiadis A, Pappas S, Alexopoulos D, Vlasserou F, Mikhailidis DP. Clinical experience with ezetimibe/simvastatin in a Mediterranean population. *Curr Med Res Opin.* 2009;25:2571-6.
89. Mackay DS, Jones PJ, Myrie SB, Plat J, Lütjohann D. Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J Chromatogr B.* 2014;957:116-22.
90. Andrade I, Santos L, Ramos F. Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols. *Biomed Chromatogr.* 2013;27:1234-42.
91. Robinson JW, Skelly Frame EM, Frame II GM. *Undergraduate Instrumental Analysis, Sixth Edition.* 2004 New York: Marcel Dekker.
92. Mitra, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry.* 2003. New Jersey: John Wiley & Sons.
93. Phillips KM, Ruggio DM, Bailey JA. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;732:17-29.

94. Lipidlibrary.aocs.org. (2018). Gas Chromatographic Analysis of Plant Sterols - AOCS Lipid Library. [online] Dostupno na: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40384> [Accessed 14 Sep. 2018].
95. Fankhauser-Noti A, Grob K. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. *Acta Chim Anal.* 2007;582:353-60.
96. Watson J, Greenough EB, Leet JE, Ford MJ, Drexler DM, Belcastro JV et al. Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen.* 2009; 14: 566-72.
97. Lu B, Hu Y, Huang W, Wang M, Jiang Y, Lou T. Effect of transition metal ions on the B ring oxidation of sterols and their kinetics in oil-in-water emulsions. *Sci Rep.* 2016;6:1-9.
98. Barriuso B, Otaegui-Arrazola A, Menéndez-Carreño M, Astiasarán I, Ansorena D. Sterols heating: degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chem.* 2012;135:706–12.
99. Austin MA, Krauss RM. Genetic control of low-density lipoprotein subclasses. *Lancet* 1986;2:592–595.
100. Austin MA. Genetic and environmental influences on LDL subclass phenotypes. *Clin Genet.* 1994;46:64-70.
101. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363-1379.
102. Rosenson RS. Clinical role of LDL and HDL subclasses and apolipoprotein measurement. *ACC Curr J Rev.* 2004;13:33-37.
103. Rizzo M, Berneis K. Should we measure routinely the LDL peak particle size? *Int J Cardiol.* 2006;107:166-170.



104. Rizzo M, Berneis K. Who needs to care about small, dense low-density lipoproteins? *Int J Clin Pract.* 2007;61:1949-56.
105. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *American J Cardiol.* 1998;81:13-7.
106. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:1161-78.
107. Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem.* 1988;34:2433-8.
108. Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:946-51.
109. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62:707-14.
110. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996;124:11-20.
111. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342-74.
112. Eckardstein A. and Kardassis D. *High Density Lipoproteins.* 2015. Cham: Springer.
113. Navab M, Ananthramaiah, GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004;45:993–1007.

114. Le Goff W, Guerin M, and Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther.* 2004;101:17–38.
115. Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, and Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1750–4.
116. Mailoino G., et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 prognostic role in atherosclerotic complications. *World J Cardiol.* 2015;7:609-20.
117. Jabor B, Choi H, Ruel I, Hafiane A, Mourad W, Genest J. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in acute coronary syndrome: relationship with low-density lipoprotein cholesterol. *Can J Cardiol.* 2013;29:1679-86.
118. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A 2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791:327-38.
119. Hassan M. STABILITY and SOLID-TIMI 52: Lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) as a biomarker or risk factor for cardiovascular diseases. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2015;1:6-10.
120. Charniot JC, Khani-Bittar R, Albertini JP, Giral P, Cherfils C, Cosson C, Guillerme E, Leprince P, Gandjbakhch I, Bonnefont-Rousselot D. Interpretation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels is influenced by cardiac disease, comorbidities, extension of atherosclerosis and treatments. *Intern J Cardiol.* 2013;168:132-8.
121. Sertić J, Skorić B, Lovrić J, Bozina T, Reiner Z. Does Lp-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease?. *Acta Med Croatica.* 2010;64:237-45.
122. Xu RX, Zhang Y, Li XL, Li S, Guo YL, Dong Q, Liu G, Li JJ. Relationship between plasma phospholipase A2 concentrations and lipoprotein subfractions in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 2015;446:195-200.

123. Bostan M, Avni UH, Yildirmiř S, Malkoç M, Atak M, Demir A, Yilmaz A, Uđurlu Y, Karadađ Z, Duman H, Ėatirođlu Ö. Pleiotropic effects of HDL subfractions and HDL-associated enzymes on protection against coronary artery disease. *Acta Cardiol.* 2015;70:333-40.
124. Cai A, Li G, Chen J, Li X, Li L, Zhou Y. Increased serum level of Lp-PLA2 is independently associated with the severity of coronary artery diseases: a cross-sectional study of Chinese population. *BMC Cardiovas Disord.* 2015;15:14-8.
125. Erdman Jr JW, MacDonald IA, Zeisel SH, editors. Present knowledge in nutrition. John Wiley & Sons; 2012.
126. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:937-46.
127. Djuricic ID, Mazic SD, Kotur-Stevuljevic JM, Djordjevic VR, Sobajic SS. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid dietary recommendations are moderately efficient in optimizing their status in healthy middle-aged subjects with low fish consumption: a cross-over study. *Nutr Res.* 2014;34:210-8.
128. Jensen MD. Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *J R Soc Med.* 2002;95:3-7.
129. Nestel P, Clifton P, Colquhoun D, Noakes M, Mori TA, Sullivan D, Thomas B. Indications for omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Heart Lung Circ.* 2015;24:769-79.
130. Flock MR, Kris-Etherton PM. Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16:133-40.
131. Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *FAO Food Nutr Pap.* 1994; 57:1-147

132. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(11):1621-30.
133. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet.* 2009; 100: 1–21.
134. Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clinical Nutr.* 2000;71:179-88.
135. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Bio Med.* 2008;233:674-88.
136. Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, et al. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation.* 2004;110:1645–9.
137. Weatherly CA, Zhang Y, Smuts JP, Fan H, Xu C, Schug KA, Lang JC, Armstrong DW. Analysis of long-chain unsaturated fatty acids by ionic liquid gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 2016;64:1422-32.
138. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL. Application of the thiobarbiturate assay to the measurement of lipid peroxidation products in microsomes. *J Bioch Biophys Methods.* 1986;13:185-94.
139. Fielding CJ, Reaven GM, Fielding PE. Human noninsulin-dependent diabetes: identification of a defect in plasma cholesterol transport normalized in vivo by insulin and in vitro by selective immunoadsorption of apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:6365–9.
140. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, Stanhope KL, Austrheim-Smith I, Wolfe BM, Ali M, Havel PJ. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *J Lipid Res.* 2010;51:2405–12.

141. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2012;53:1755–66.
142. Glaser C, Demmelmair H, Koletzko B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS One.* 2010;5:e12045.
143. Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, Lowe WF, Blanche PJ, Krauss RM. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res.* 1992;33:1876-81.
144. H. Van den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *J Chromatogr A.* 1963;11:463–471.
145. Z.H. Yuping, L.I. Jiming, X.U. Yan, D.U. Hui, F.A. Wenlai, Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO brandy, *Chin J Chromatogr.* 2008;26:212–22.
146. Food US Drugs Administration. Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation.
147. Gimeno P, Maggio AF, Bousquet C, Quoirez A, Civade C, Bonnet PA. Analytical method for the identification and assay of 12 phthalates in cosmetic products: Application of the ISO 12787 international standard “Cosmetics–Analytical methods–Validation criteria for analytical results using chromatographic techniques”. *J Chromatogr A.* 2012;1253:144-53.
148. Vidović BB, Milašinović NZ, Kotur-Stevuljević JM, Dilber SP, Kalagasidis-Krušić MT, Đorđević BI, Knežević-Jugović ZD. Encapsulation of  $\alpha$ -lipoic acid into chitosan and alginate/gelatin hydrogel microparticles and its in vitro antioxidant activity. *Hem Ind.* 2016;70:49-58.
149. Pallant, J. SPSS survival manual. 2011. Crows Nest, N.S.W., Australia: Allen & Unwin.
150. Milosavljević S. Strukturne instrumentalne metode. 2004. Hemijski fakultet

151. Berger A, Jones PJ, Abumweis SS. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 2004;3:5-23.
152. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145:341-55.
153. Chiarelli, F., Dahl-Jørgensen, K. and Kiess, W. *Diabetes in childhood and adolescence.* 2005. Basel: Karger.
154. Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci.* 2007;80:505–14.
155. Rizzo M, Perez-Martinez P, Nikolic D, Montalto G, Lopez-Miranda J. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14:1869–73.
156. Stefanutti C, Labbadia G, Athyros V. Hypertriglyceridaemia, postprandial lipaemia and non-HDL cholesterol. *Curr Pharm Des.* 2014;20:6238-48.
157. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:36–46.
158. Tabas, I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;107:839–50.
159. Ballantyne CM, Raichlen JS, Cain VA. Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients: the MERCURY II (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin therapy II) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:626-32.
160. Tremblay AJ, Lamarche B, Hogue JC, Couture P. Effects of ezetimibe and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in males with mixed hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2009;50:1463-71.

161. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:431-8.
162. Li MM, Lin YY, Huang YH, Zhuo ST, Yang ML, Lin HS, Cai RW. Association of Apolipoprotein A1, B with Stenosis of Intracranial and Extracranial Arteries in Patients with Cerebral Infarction. *Clin Lab.* 2015;61:1727-35.
163. Sharma R, Mahajan M, Singh B, Bal BS, Kant R. Apolipoprotein modifying effects of statins and fibrate in various age groups of coronary artery disease patients. *J Indian Med Assoc.* 2006;104:492-4.
164. Miura SI, Saku K. Effects of statin and lipoprotein metabolism in heart failure. *J Cardiol.* 2010;55:287-90.
165. Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, Lankin V. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Pressure.* 2010;19:164-8.
166. Yang TC, Chen YJ, Chang SF, Chen CH, Chang PY, Lu SC. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. *J Biomed Sci.* 2014;21:11-16.
167. Gonen A, Hansen LF, Turner WW, Montano EN, Que X, Rafia A, Chou MY, Wiesner P, Tsiantoulas D, Corr M, VanNieuwenhze MS. Atheroprotective immunization with malondialdehyde modified LDL is hapten-specific and dependent on advanced MDA-adducts: Implications for development of an atheroprotective vaccine. *J Lipid Res.* 2014;55:2137-55.
168. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, Hindy G, Hólm H, Ding EL, Johnson T, Schunkert H. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012;380:572-80.

169. El-Aziz TA, Mohamed RH, Hagrass HA. Increased risk of premature coronary artery disease in Egyptians with ABCA1 (R219K), CETP (TaqIB), and LCAT (4886C/T) genes polymorphism. *J Clin Lipidol*. 2014;8:381-9.
170. Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem*. 2007;40:310-6.
171. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis*. 2016;251:454-9.
172. Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure?. *Clin Chim Acta*. 2014;429:111-22.
173. Toivo J, Lampi AM, Aalto S, Piironen V. Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour. *Food Chem*. 2000;68:239-45.
174. Skoog DA, West DM. Principles of instrumental analysis, 2nd edition. 1980. Philadelphia: Saunders College
175. Vollhardt KP, Core NE. Organic chemistry: structure and function. 2011. New York: WH Freeman.
176. D. Saraiva, R. Semedo, M. da Conceição Castilho, J.M. Silva, F. Ramos, Selection of the derivatization reagent—the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC–MS analyses. *J Chromatogr B*. 2011; 879:3806–11.
177. Olivieri A, Degenhardt OS, McDonald GR, Narang D, Paulsen IM, Kozuska JL, Holt A. On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90:697-703.
178. Garrido-López Á, Esquiú V, Tena MT. Determination of oleamide and erucamide in polyethylene films by pressurised fluid extraction and gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2006;1124:51-6.



179. Geisler C, Swanson AR, Zieve L, Anders MW. Phthalate interference in gas-chromatographic determination of long-chain fatty acids in plasma. *Clin Chem.* 1979;25:308-10.
180. Guder WG. Preanalytical factors and their influence on analytical quality specifications. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999;59:545-9.
181. Barriuso B, Ansorena D, Astiasarán I. Oxysterols formation: a review of a multifactorial process. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169:39-45.
182. Lengyel J, Rimarčík J, Vagánek A, Fedor J, Lukeš V, Klein E. Oxidation of sterols: Energetics of C–H and O–H bond cleavage. *Food Chem.* 2012;133:1435-40.
183. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochem.* 2004;37:277-85.
184. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochem Med.* 2013;23:70-7.
185. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists.* 2011;2:21-5.
186. Strandberg TE, Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis.* 2010;210:282-7.
187. van Himbergen TM, Matthan NR, Resteghini NA, Otokozawa S, Ai M, Stein EA, Jones PH, Schaefer EJ. Comparison of the effects of maximal dose atorvastatin and rosuvastatin therapy on cholesterol synthesis and absorption markers. *J Lipid Res.* 2009;50:730-9.
188. Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest* 2003;33:976–82.

189. Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:765-9.
190. Kempen HJM, Glatz JFC, Gevers Leuven JA. et al: Serum lathosterol is an indicator of whole-body cholesterol synthesis. *J Lipid Res.* 1988;29:1149-56
191. Kempen HJ, De Knijff P, Boomsma DI, Van Der Voort HA, Leuven JG, Havekes L. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism.* 1991;40:604-11.
192. Stellaard F, von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. The value of surrogate markers to monitor cholesterol absorption, synthesis and bioconversion to bile acids under lipid lowering therapies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169:111-22.
193. Rana JS, Boekholdt SM, Kastelein JJ, Shah PK. The role of non-HDL cholesterol in risk stratification for coronary artery disease. *Current atherosclerosis reports.* 2012 Apr 1;14(2):130-4.
194. Weingärtner O, Böhm M, Laufs U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J.* 2009;30:404–9.
195. AbuMweis SS, Jones PJ. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Curr Atheroscler Rep.* 2008;10:467–72.
196. AbuMweis SS, Marinangeli CP, Frohlich J, Jones PJ. Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: overview of efficacy, effectiveness, and safety. *Can J Cardiol.* 2014;30:1225–32.
197. Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegard L, Jessup W, et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2014;232:346–60.
198. Gylling H, Simonen P. Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients.* 2015;7:7965-77.

199. Charest A, Desroches S, Vanstone CA, Jones PJ, Lamarche B. Unesterified plant sterols and stanols do not affect LDL electrophoretic characteristics in hypercholesterolemic subjects. *J Nutr.* 2004;134:592-5.
200. Tian L, Chen Y, Li C, Zeng Z, Xu Y, Long S, Fu M. Statin treatment improves plasma lipid levels but not HDL subclass distribution in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Lipids.* 2013;48:127-37.
201. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:709-21.
202. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1120-6.
203. Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M, et al. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22:843-8.
204. Vivancos M, Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and betasitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr.* 2008;99:1199-207.
205. White, H.D., Simes, J., Stewart, R.A., Blankenberg, S., Barnes, E.H., Marschner, I.C., Thompson, P., West, M., Zeller, T., Colquhoun, D.M. and Nestel, P. Changes in lipoprotein-associated phospholipase A2 activity predict coronary events and partly account for the treatment effect of pravastatin: results from the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease study. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000360.
206. Moutzouri E, Liberopoulos EN, Tellis CC, Milionis HJ, Tselepis AD, Elisaf MS. Comparison of the effect of simvastatin versus simvastatin/ezetimibe versus rosuvastatin on markers of inflammation and oxidative stress in subjects with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2013;231:8-14.

207. Cao Y, Lu L, Liang J, Liu M, Li X, Sun R, Zheng Y, Zhang P. Omega-3 fatty acids and primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72:77-81.
208. Ooi EM, Watts GF, Ng TW, Barrett PH. Effect of dietary fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients*. 2015;7:4416-25.
209. Risé P, Ghezzi S, Priori I, Galli C. Differential modulation by simvastatin of the metabolic pathways in the n-9, n-6 and n-3 fatty acid series, in human monocytic and hepatocytic cell lines. *Biochemical pharmacology*. 2005;69:1095-100.

## ***Biografija autora***

Tamara Gojković je rođena 16.10.1985. godine u Peći. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu, a 2004. godine je upisala Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,94. Po završetku fakulteta, obavezan pripravnički staž je obavila na Institutu za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“, nakon čega je 2012. godine položila državni ispit. 2011. godine upisala je doktorske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Iste godine angažovana je kao istraživač na projektu pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“ koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Na radno mesto saradnika na Katedri za medicinsku biohemiju primljena je 2014. godine, a u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Medicinska biohemija izabrana je 2016. godine. Od početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju, učestvuje u pripremi i izvođenju dodiplomske praktične nastave iz obaveznih i izbornih predmeta: Opšta biohemija, Statistika, Klinička enzimologija i Primena informacionih tehnologija u akademskoj praksi na studijskom programu magistar farmacije – medicinski biohemičar i na predmetima Medicinska biohemija, Statistika i Laboratorijska dijagnostika poremećaja metabolizma na studijskom programu magistar farmacije. Bila je član komisija za odbranu velikog broja diplomskih radova. Na studentskim anketama o vrednovanju pedagoškog rada saradnika ocenjivana je odličnim ocenama za obavezne i izborne predmete. Školske 2015/2016 upisala je specijalističke akademske studije na modulu Biohemijska dijagnostika na Farmaceutskom fakultetu, koje je završila 11. jula 2017. godine. U aprilu 2017. godine je upisala specijalizaciju zdravstvenih radnika i zdravstvenih saradnika iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu..

Kao autor ili koautor objavila je ukupno 14 radova. Od toga 13 radova u međunarodnim časopisima (6 radova u časopisima kategorije M21, 5 radova u časopisima kategorije M22 i 3 rada u časopisima kategorije M23) i 1 rad u domaćem časopisu (kategorije M52). Učestvovala je sa preko 30 saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima. Učesnik je na više međunarodnih projekata. Iz doktorske disertacije je publikovala dva rad u vrhunskom međunarodnim časopisima kategorije M21.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Тамара Гојковић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 41/11 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Медицинска биохемија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Значај одређивања маркера синтезе и апсорпције холестерола код  
здравих испитаника и пацијената са исхемијском болешћу срца \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф. др Зорана Јелић-Ивановић \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 19.09.2018.

\_\_\_\_\_

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара Гојковић

Број индекса 41/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај одређивања маркера синтезе и апсорпције холестерола код здравих испитаника и пацијената са исхемијском болешћу срца

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

Потпис аутора

У Београду, 17.09.2018.

---

## Изјава о коришћењу

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

Значај одређивања маркера синтезе и апсорпције холестерола код здравих испитаника и пацијената са исхемијском болешћу срца

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 17.09.2018.

---



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.