

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Милица Д. Зрнић Ћирић

ЕФЕКАТ СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ
КОМБИНАЦИЈОМ ОКТАКОЗАНОЛА И
ВИТАМИНА К2 НА *PCSK9*, ЛИПИДНИ
ПРОФИЛ, ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И
ИНФЛАМАЦИЈУ КОД ПАЦИЈЕНАТА НА
ТЕРАПИЈИ АТОРВАСТАТИНОМ

докторска дисертација

Београд, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Milica D. Zrnić Ćirić

THE EFFECT OF SUPPLEMENTATION
WITH A COMBINATION OF OCTACOSANOL
AND VITAMIN K2 ON PCSK9, LIPID
PROFILE, OXIDATIVE STRESS AND
INFLAMMATION IN PATIENTS ON
ATORVASTATIN THERAPY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Ментори:

др сц. Иван Станковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Академик проф. др Миодраг Остојић, професор емеритус
Универзитет у Београду – Медицински факултет

Чланови Комисије:

др сц. Брижита Ђорђевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Јелена Котур-Стевуљевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Ивана Баралић Кнежевић, научни сарадник
Клиничко-болнички центар „Звездара“

Датум одбране: _____

Ефекат суплементације комбинацијом октакозанола и витамина К2 на *PCSK9*, липидни профил, оксидативни стрес и инфламацију код пацијената на терапији аторвастатином

Сажетак: Примена нутрацеутика са хиполипемичким ефектом заузима значајно место у смањењу фактора ризика за развој кардиоваскуларних болести и као допуна терапији. Циљ овог рада је испитивање ефеката суплементације октакозанолом и витамином К2 на *PCSK9*, параметре липидног профила, маркере редокс статуса и инфламације код пацијената на терапији аторвастатином. Спроведена је двоструко слепа, рандомизована, плацебо контролисана студија; учесници су уз редовну терапију аторвастатином (20 mg) узимали дијететски суплемент (октакозанол (20 mg) и витамин К2 (45 µg)) ($n=42$) или плацебо ($n=45$), једном дневно, током 13 седмица. Октакозанол, главна компонента дијететског суплемента, није утицао на промене вредности параметара липидног профила и концентрације *PCSK9* након 8, односно 13 седмица. Утврђена је позитивна корелација између процентуалних промена *PCSK9* и *LDL*-холестерола већ након 8 седмица суплементације и задржана је до краја студије. Испитаници код којих је уочено највеће смањење вредности *PCSK9*, имали су и тенденцију највећег смањења *LDL*-холестерола. Уочен је повећан антиоксидативни капацитет (повећање вредности *TAS*, *PONI* и *SHG*), али и повећање вредности *TOS* у обе групе на крају студије. Анализа промена вредности *PCSK9* у подгрупама *responders* и *non-responders* показала је тренд смањења концентрација *PCSK9* након 13 седмица у групи *responders*, и то само код оних испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанол. Показано је да комбинација аторвастатина и октакозанола може превенирати потенцијалне нежељене ефекте који су повезани са повећањем вредности *PCSK9* изазваним аторвастатином код неких пацијената. Утврђено је да испитаници у групи *responders*, уз жељене промене параметара липидног профила и константне вредности *PCSK9*, имају и ниже вредности окси-скора на крају студије.

Кључне речи: аторвастатин, дијететски суплемент, хиполипемички ефекат, октакозанол, *PCSK9*, *LDL*-холестерол, редокс статус, окси-скор

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Броматологија

The effect of supplementation with a combination of octacosanol and vitamin K2 on PCSK9, lipid profile, oxidative stress and inflammation in patients on atorvastatin therapy

Abstract: The use of nutraceuticals with a hypolipemic effect plays an important role in reducing risk factors for the development of cardiovascular diseases and as an adjunct to therapy. The aim of this investigation is to examine the effects of supplementation with octacosanol and vitamin K2 on PCSK9, lipid profile parameters, markers of redox status and inflammation in patients on atorvastatin therapy. A double-blind, randomized, placebo-controlled study was conducted; participants took a dietary supplement (octacosanol (20 mg) and vitamin K2 (45 µg)) (n=42) or placebo (n=45) along with regular atorvastatin (20 mg) therapy, once a day, for 13 weeks. Octacosanol, the main component of the dietary supplement, did not affect changes in the values of lipid profile parameters and PCSK9 concentration after 8 and 13 weeks, respectively. A positive correlation was established between the percentage changes of PCSK9 and LDL-cholesterol already after 8 weeks of supplementation and was maintained until the end of the study. Subjects with the greatest reduction in PCSK9 values also tended to have the greatest reduction in LDL-cholesterol. An increased antioxidant capacity was observed (increase in TAS, PON1 and SHG values), but also an increase in TOS values in both groups at the end of the study. The analysis of changes in PCSK9 values in the subgroups of responders and non-responders showed a trend of decreasing PCSK9 concentrations after 13 weeks in the group of responders, but only in those subjects who took atorvastatin and octacosanol. It has been shown that the combination of atorvastatin and octacosanol may prevent potential side effects associated with atorvastatin-induced PCSK9 elevation in some patients. It was determined that patients in responders group, along with desired changes in lipid profile parameters and constant PCSK9 values, also had lower oxy-score values at the end of the study.

Keywords: atorvastatin, dietary supplement, hypolipemic effect, octacosanol, PCSK9, LDL-cholesterol, redox status, oxy-score

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Bromatology

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Откриће и улога <i>PCSK9</i> у хомеостази холестерола.....	3
1.1.1. Хепатична регулација експресије гена за <i>PCSK9</i> и <i>LDLR</i>	5
1.1.2. Екстрахепатична експресија <i>PCSK9</i>	5
1.2. Развој <i>PCSK9</i> инхибитора.....	6
1.3. Примена комбиноване терапије статинима и <i>PCSK9</i> инхибиторима у третману дислипидемија.....	8
1.4. Инхибиција <i>PCSK9</i> посредством биолошки активних састојака.....	9
1.5. Улога оксидативног стреса и инфламације у развоју кардиоваскуларних болести.....	13
1.6. Октакозанол.....	14
1.6.1. Структура октакозанола.....	14
1.6.2. Дијетарни извори октакозанола.....	14
1.6.3. Биорасположивост и метаболизам октакозанола.....	16
1.6.4. Безбедност суплементације октакозанолом.....	17
1.6.5. Примена октакозанола у унапређењу здравља и превенцији болести.....	17
1.7. Витамин К2.....	20
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	22
3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ.....	23
3.1. Избор испитаника.....	23
3.2. Дизајн студије.....	23
3.3. Протокол студије.....	24
3.4. Методе.....	26
3.4.1. Антропометријска мерења.....	26
3.4.2. Одређивање параметара липидног профила и биохемијске анализе.....	26
3.4.3. Одређивање <i>PCSK9</i>	26
3.4.4. Одређивање параметара оксидативног статуса.....	27
3.4.5. Одређивање параметара антиоксидативне заштите.....	27
3.4.6. Одређивање прооксидативно-антиоксидативног баланса.....	28
3.4.7. Израчунавање прооксидативног, антиоксидативног и оксидативног скорa.....	29
3.4.8. Одређивање <i>hsCRP</i>	29
3.5. Статистичка обрада података.....	30
4. РЕЗУЛТАТИ.....	31
4.1. Дијаграм тока студије.....	31
4.2. Демографске, антропометријске и клиничке карактеристике испитаника.....	32

4.3. Утицај суплементације октакозанолом на концентрације <i>PCSK9</i> и параметре липидног профила у крви пацијената.....	33
4.3.1. Испитивање корелација <i>PCSK9</i> и параметара липидног профила.....	35
4.4. Утицај суплементације октакозанолом на вредности глукозе у серуму и на оштећење мишића	41
4.5. Утицај суплементације октакозанолом на параметре редокс статуса	42
4.5.1. Параметри оксидативног стреса	42
4.5.2. Параметри антиоксидативне заштите	43
4.5.3. Прооксидативно-антиоксидативни баланс.....	45
4.6. Анализа <i>PCSK9</i> , параметара липидног профила, редокс статуса и антиоксидативне заштите у зависности од одговора испитаника на крају студије.....	46
4.6.1. Демографске, антропометријске и клиничке карактеристике у групама <i>responders</i> и <i>non-responders</i>	46
4.6.2. Биохемијски параметри у групама <i>responders</i> и <i>non-responders</i>	49
4.6.3. Утицај суплементације октакозанолом на вредности <i>PCSK9</i> у групама <i>responders</i> и <i>non-responders</i>	50
4.6.4. Одређивање параметара редокс статуса и антиоксидативне заштите у групама <i>responders</i> и <i>non-responders</i>	51
4.6.6. Одређивање <i>hsCRP</i> у групама <i>responders</i> и <i>non-responders</i>	52
4.6.7. Факторска анализа	53
5. ДИСКУСИЈА	56
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	69
7. ЛИТЕРАТУРА.....	71

1. УВОД

Кардиоваскуларне болести (КВБ) су водећи узрок морбидитета и морталитета, како у развијеним, тако и у земљама у развоју. Према подацима Светске здравствене организације (СЗО) из 2019. године, скоро 18 милиона људи годишње умире од КВБ, што представља више од трећине свих смртних случајева у свету. КВБ су означене и као водећи узроци инвалидности и превременог умирања. Слична ситуација је и у Србији, где су према недавним подацима Института за јавно здравље Србије “Др Милан Јовановић Батут” и финалног годишњег извештаја за 2021. годину, КВБ биле узрок смрти код скоро 41% популације што је незнатно већи проценат у поређењу са подацима СЗО на основу којих су КВБ узрочник смрти код 38% популације у Србији.

Да би се овако висока стопа смртности смањила, најефикаснија стратегија обухвата превенцију и смањење фактора ризика путем промена животних навика, као и побољшање здравствене неге уз примену одговарајућег фармаколошког третмана. Несумњива чињеница јесте да су КВБ и даље у фокусу интересовања као приоритет у области јавног здравља, где оптимална исхрана, дијетарне интервенције и примена нутрацеутика заузимају веома значајно место у смањењу како фактора ризика за развој КВБ, тако и као допуна адекватној терапији. Већина КВБ може се превенирати модификовањем животног стила, односно елиминисањем фактора ризика као што су употреба дувана, нездрава исхрана и гојазност, физичка неактивност и прекомерна употреба алкохола.

Општи консензус је да су повишене вредности параметара липидног профила у крви међу најважнијим факторима ризика за развој КВБ. Према проценама из 2021. године, хиперхолестеролемије као независни фактор ризика и искључиви узрок, одговорне су за чак 2,6 милиона смртних случајева широм света. У Европи су подаци још неповољнији пошто преваленца хиперхолестеролемије износи чак 59%. Ако се узме у обзир да се готово половина од укупне смртности услед хроничних незаразних болести приписује КВБ, значај превенције и лечења дислипидемија је вишеструк.

Са друге стране, резултати бројних епидемиолошких и клиничких испитивања потврђују да је адекватан третман дислипидемија од примарне важности у превенцији КВБ, али и у снижавању морбидитета и морталитета од КВБ. Терапија дислипидемија се састоји од промене начина живота (нефармаколошке мере), лечења узрока који су секундарно довели до дислипидемија и примене лекова (фармаколошке мере). Према важећим смерницама Европског кардиолошког друштва (енгл. *European Society of Cardiology*, ESC) и Европског друштва за атеросклерозу (енгл. *European Atherosclerosis Society*, EAS) о лечењу дислипидемија, статини су први избор у терапији стања са доминантно повишеним вредностима укупног холестерола и холестерола садржаног у *LDL* (енгл. *low density lipoprotein*, LDL) честицама, као независног фактора ризика за КВБ, без обзира да ли се ради о примарним или секундарним поремећајима. Подаци добијени из бројних клиничких рандомизованих студија и мета-анализа потврђују ефикасност и безбедност примене статина. Ипак, у последње две деценије откриће и развој нових лекова, инхибитора пропротеин конвертазе субтилизин/кексин тип 9 (енгл. *proprotein convertase subtilisin kexin type 9*, PCSK9) заузима важно место у кардиоваскуларној фармакологији.

Поред препорука за лечење, актуелне препоруке Удружења европских кардиолога за лечење дислипидемија (*ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias*) указују да су и нефармаколошке мере неизоставни део сваког програма за превенцију и третман дислипидемија у циљу смањења кардиоваскуларног ризика (*Mach и сар., 2020*). Такође, Европска агенција за безбедност хране (енгл. *European Food Safety Authority, EFSA*) је у последњих неколико година одобрила здравствене изјаве које указују да одређене компоненте хране могу допринети смањењу нивоа холестерола у крви. Иако неке намирнице, односно изоловане компоненте хране, показују физиолошке ефекте који превазилазе уобичајену нутритивну улогу хране, резултат утицаја на параметре липидног профила је свакако мањи у поређењу са фармакотерапијом.

1.1.Откриће и улога *PCSK9* у хомеостази холестерола

Улога ензима *PCSK9* у метаболизму липида први пут се помиње 2003. године када је откривена повезаност између мутације *PCSK9* гена и појаве хомозиготне фамилијарне хиперхолестеролемије (*Abifadel u cap., 2003*). Деценију касније, резултати мета-анализа о утицају полиморфизма гена који кодирају синтезу *PCSK9* на ризик за развој дислипидемија и коронарне артеријске болести показали су да особе које имају низак ниво *PCSK9* у крви (носиоци тзв. *loss-of-function* мутација) имају и знатно мање изражене атеросклеротске промене и значајно нижи ризик за настанак КВБ у поређењу са групом код које су вредности поменутог ензима биле високе (*G. Cai u cap., 2015*). Поред тога, особе са хомозиготном *loss-of-function* мутацијом гена за *PCSK9* код којих је немерљива концентрација овог протеина у крви имају и екстремно ниску концентрацију *LDL*-холестерола ($\approx 0,4$ mmol/L).

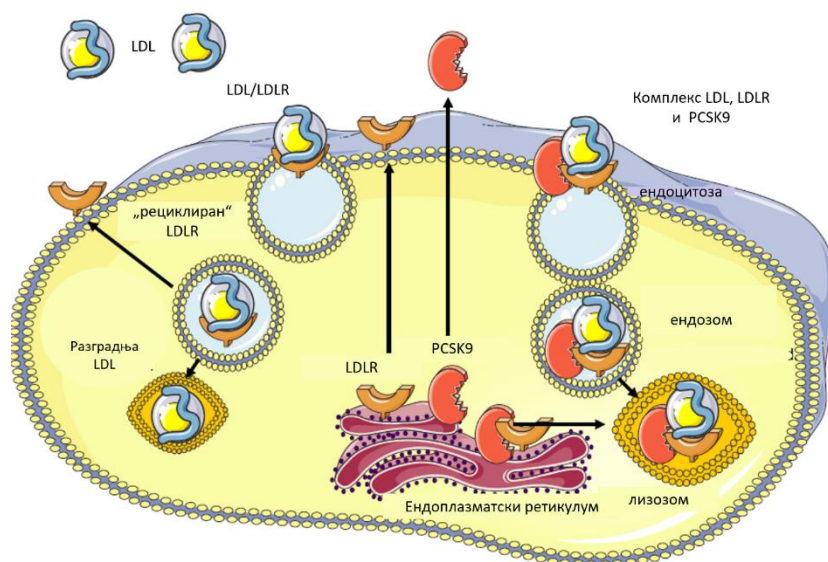
Ова научна сазнања су покренула бројна истраживања у циљу разумевања регулације деловања овог ензима и његове улоге у метаболизму липида, што је у наредним годинама примењено за развој нових терапијских стратегија, односно открића нове групе лекова - *PCSK9* ихибитора, о којима ће бити речи у каснијем тексту.

PCSK9 је пропротеин конвертаза, члан суперфамилије серин протеаза, који се доминантно синтетише и секретује у хепатоцитима, а у мањој мери и у ћелијама бубрега, васкуларног ендотела и централног нервног система, кардиомиоцитима, ентероцитима и β -ћелијама панкреаса (*Seidah u cap., 2003*). *PCSK9* настаје у ендоплазматском ретикулуму у облику прекурсора (*PreProPCSK9*), неактивног гликопротеина са 692 аминокиселине, који садржи сигнални пептид (аминокиселине 1–30), *N*-терминални продомен (аминокиселине 31–152), каталитички домен (аминокиселине 153–404) и *C*-терминални домен (аминокиселине 455–692), а између каталитичког и *C*-терминални домена налази се пептид (аминокиселине 405–454), означен као „шаржа“ (енгл. *hinge*) домен (*Wiciński u cap., 2017*). Након уклањања сигналног пептида настаје проензим, *ProPCSK9*, који подлеже аутокаталитичкој протеолизи продомена у Голџијевом апарату. Продомен је нековалентно везан за *C*-терминални домен што омогућава специфичну просторну конформацију молекула и блокира његову каталитичку активност (*Schulz u cap., 2015*). Након секреције, *PCSK9* може отићи у системску циркулацију или се може одмах везати за рецепторе за липопротеин ниске густине (енгл. *low-density lipoprotein receptor*, *LDLR*) на мембрани хепатоцита.

Експресија *LDLR* се сматра једним од најважнијих фактора који одређују концентрацију *LDL*-холестерола у серуму, с обзиром на то да се главни пут елиминације *LDL*-холестерола из циркулације одвија преко ових рецептора. *LDLR*-лиганд комплекс се транспортује у унутрашњост ћелије где се у ендозомима *LDL*-холестерол одваја из комплекса са *LDLR*, рецептор се рециклира и враћа на мембрану ћелије, а ендозоми се стапају са лизозомима где долази до финалне разградње *LDL*-холестерола (*Huang u cap., 2010*). У одсуству *PCSK9*, комплекс *LDL/LDLR* се транспортује клатрин-посредованом ендоцитозом, затим се у ендозомима *LDL*-холестерол ослобађа из комплекса са *LDLR*, након чега се ендозоми стапају са лизозомима у којима се одвија завршна разградња *LDL*-холестерола (*Qian u cap., 2007*). Рецептор заузима затворену просторну конформацију и рециклира се у везикули која се одваја од ендозома, након чега се враћа на површину ћелије где поново добија активну форму, односно заузима отворену конформацију (*Arias-Moreno u cap., 2008*). Метаболизам *LDL*-холестерола посредован *LDLR* у присуству *PCSK9* приказан је на **слици 1**.

Кључна функција *PCSK9* у хомеостази *LDL*-холестерола је посттранслациона регулација броја *LDLR* на површини ћелије. *PCSK9* смањује елиминацију *LDL*-холестерола тако што доводи до деградације *LDLR* и смањења броја *LDLR*, што резултује повећањем концентрације *LDL*-холестерола у циркулацији (*Farnier, 2011*). Везивање прекурсорских форми *PCSK9* и *LDLR* се одвија у ендоплазматском ретикулуму чиме се обезбеђује транспорт *Pro-LDLR* до Голџијевог апарата и сазревање до зреле молекуле. *PCSK9* својим везивањем за

LDLR у Голци комплексу започиње интрацелуларни пут деградације рецептора, чиме спречава њихов транспорт до ћелијске мембране (*Schulz u cap., 2015*). Секретовани *PCSK9* се везује за А-секвенцу екстрацелуларног домена *LDLR* који је хомологан прекурзору епидермалног фактора раста (енгл. *epidermal growth factor precursor homology domain, EGFPH*). Настали комплекс се интернализује ендоцитозом у унутрашњост ћелије до ендозома – лизозома (*Qian u cap., 2007*). У лизозомима се одвија још једна интеракција између лиганд-везујућег домена *LDLR* и С-терминалног домена *PCSK9* која онемогућава да рецептор постигне затворену просторну конформацију и да се рециклира, што резултује лизозомалном деградацијом, и рецептора и ензима (*Schulz u cap., 2015*). *PCSK9* у циркулацији може формирати димере и тримере, чиме се појачава способност овог протеина да разгради *LDLR* (*D. Fan u cap., 2008*).



Слика 1. Шематски приказ интеракције *LDL*-холестерола и *LDLR* у присуству *PCSK9* (преузето и прилагођено из *Schultz u cap., 2015*)

Хумане студије указују на важност улоге липопротеинских честица у метаболизму *PCSK9*. То би практично значило да се липопротеинске честице могу везати за *PCSK9* у циркулацији и тако контролисати његову регулаторну улогу, односно способност везивања за *LDLR*. Сматра се да липопротеинске честице компетитивно инхибирају деловање *PCSK9* на *LDLR*, односно да *LDL*-холестерол и липопротеин(а) (енгл. *lipoprotein (a), Lp(a)*) честице стварају комплексе са *PCSK9* модулирајући његову активност (*Kosenko u cap., 2013; Tavori u cap., 2016*). *In vitro* истраживања су показала да везивање *LDL*-холестерола снижава афинитет *PCSK9* према *LDLR*, што доводи до смањене деградације рецептора (*Kosenko u cap., 2013*). Испитивање повезаности вредности *PCSK9* и *HDL* (енгл. *high density lipoprotein, HDL*) холестерола нису дале усаглашене закључке, почевши од студија које су указале на позитивну корелацију, до студија које нису утврдиле постојање корелације (*Ferri u cap., 2020; Guardiola u cap., 2015*). Недавно су *Burnap u cap. (2021)* показали да је *PCSK9* у циркулацији претежно везан за *HDL*-холестерол, а не за *LDL*-холестерол како се првобитно сматрало, међутим, остаје непознато да ли *HDL*-холестерол утиче на функцију *PCSK9*.

Да би се у потпуности разјаснио и физиолошки и клинички значај везане форме *PCSK9* потребна су даља истраживања са фокусом на начин регулације ензимске активности *PCSK9* у зависности од вредности липида у циркулацији.

1.1.1. Хепатична регулација експресије гена за *PCSK9* и *LDLR*

Експресија гена који кодирају синтезу *PCSK9* и *LDLR* у хепатоцитима је под утицајем бројних транскрипционих фактора, од којих је најважнији протеин који се везује за стерол регулаторни елемент (енгл., *sterol regulatory element binding protein*, *SREBP*). *SREBP* фамилија протеина обухвата три изоформе које регулишу хомеостазу липида контролишући експресију гена укључених у синтезу ендогеног холестерола, масних киселина, триглицерида и фосфолипида (*Horton u cap., 2002*). *SREBP-1a* регулише синтезу масних киселина и холестерола, док *SREBP-1c*, регулише метаболичке путеве липида и угљених хидрата под утицајем инсулина. Изоформа *SREBP-2* превасходно регулише синтезу холестерола.

До активације *SREBP-2* долази услед смањења нивоа холестерола у циркулацији који активира експресију кључних гена одговорних за синтезу холестерола, тј. регулише интрацелуларну експресију/активност *HMG-CoA* редуктазе, као и синтезу гена за *LDLR* (*Goldstein u Brown, 2015*). Када је концентрација *LDL*-холестерола ниска, активација *SREBP-2* започиње тако што протеин који покреће разградњу *SREBP-2* (енгл. *SREBP cleavage activating protein*, *SCAP*) интерагује са комплексом протеина (енгл. *coat protein complex II*, *COPII*) одговорним са транспорт *SREBP-2/SCAP* из ендоплазматског ретикулума до Голџијевог апарата (*Goldstein u Brown, 2015*). У Голџијевом апарату се под утицајем протеолитичких ензима (енгл. *site protease*, *SP*) *S1P* и *S2P* врши одвајање активног домена *SREBP-2*. Као резултат овог процеса, након уласка у једру, *SREBP-2* се везује за стерол регулаторни елемент (енгл. *sterol-regulatory element*, *SRE*) који представља ДНК секвенцу у промоторском региону гена, директно регулишући транскрипцију и транслокацију гена за *LDLR* и *PCSK9* (*Jeong u cap., 2008; Smith u cap., 1990*). У случају високе концентрације холестерола, *SCAP* се везује за липидне честице и гене које покрећу ослобађање инсулина (енгл. *insulin induced-genes*, *INSIG*), што даље доводи до одвајања протеина *COPII* из комплекса *SREBP-2/SCAP* чиме је блокиран даљи транспорт из Голџијевог апарата и транскрипција гена укључених у интрацелуларну биосинтезу холестерола (*Goldstein u Brown, 2015*).

Истовремено, *SREBP-2* снажно супримира експресију гена за *PCSK9* при смањеној ресорпцији холестерола, а стимулише је након уноса хране (*Schulz u cap., 2015*). Промоторски регион гена за *PCSK9*, за разлику од промотора гена за *LDLR*, садржи и место везивања хепатичног нуклеарног фактора 1α (енгл. *hepatocyte nuclear factor 1 alpha*, *HNF1 α*) чија супресија значајно инхибира експресију *PCSK9* (*Shende u cap., 2015*). Транскрипциони фактор *HNF1 α* је одговоран за базалну секрецију *PCSK9* (*Schulz u cap., 2015*) и регулацију активности *PCSK9* независно од експресије *LDLR*. Иако су места везивања поменутих транскрипционих фактора одвојена, недавни резултати указују да мутације на месту везивања *HNF1 α* могу утицати и на интегритет *SRE* чиме индиректно нарушавају везивање *SREBP-2* (*Xia u cap., 2021*). Узимајући у обзир чињеницу да експресија *PCSK9* може бити регулисана посредством *HNF1 α* на начин независно од експресије *LDLR*, потенцијална инхибиција *HNF1 α* може бити алтернативна стратегија за специфично смањење нивоа *PCSK9* у циркулацији.

1.1.2. Екстрахепатична експресија *PCSK9*

PCSK9 доминантно настаје у јетри, али као што је поменуто секреција и ослобађање *PCSK9* одвијају се и у екстрахепатичним ткивима. Потенцијални механизми регулације, као и физиолошке и патолошке улоге *PCSK9* ван хепатоцита, знатно су мање истражене и разјашњене. Ипак, познато је да су концентрације *PCSK9* у екстрахепатичним ткивима ниже у поређењу са концентрацијама карактеристичним за хепатоците (*Schlüter u cap., 2017*). *PCSK9* регулише експресију гена за епителне натријумске канале у бубрезима, ступа у интеракцију са ћелијама васкуларног ендотела и модулира контрактилну активност кардиомиоцита, а учествује и у регулацији нивоа експресије *LDLR* у ентероцитима, чиме утиче на процесе

апсорпције и екскреције холестерола на нивоу гастроинтестиналног тракта (*Schlüter u cap., 2020*).

Резултати *in vitro* студије на ембрионалним ћелијским линијама бубрега (енгл. *human embryonic kidney cells*) HEK293 су показали да се PCSK9 може везати за све три субјединице епителних натријумских канала (*Sharotri u cap., 2012*). Познато је да поремећај у функционисању ових канала утиче на процес реасорпције јона натријума у дисталном тубулу нефрона, проузрокујући промене у крвном притиску. Са друге стране, реналне болести утичу на хепатичну експресију PCSK9 (*Sucajtyš-Szulc u cap., 2016*). Оштећене гломеруларне ћелије, подоцити, активирају фактор некрозе тумора α (енгл. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α) под чијим се утицајем мења хепатична експресија PCSK9 (*Busuioc u cap., 2020*). Покренута секреција PCSK9 у јетри повећава концентрације PCSK9 и LDL-холестерола у циркулацији, али и у бубрезима, што резултује смањеном реналном експресијом LDLR. Резултати студије на животињама су показали да измењена експресија LDLR под утицајем PCSK9 доводи до реналне фиброзе код хиперхолестеролемичних мишева (*Wu u cap., 2020*). У ендотелним ћелијама, слично као у хепатоцитима, PCSK9 директно контролише експресију LDLR на мембрани ћелија (*Milasan u cap., 2016*). Васкуларна експресија PCSK9 укључује неколико корака који воде ка атеросклеротским променама независно од промена концентрација LDL-холестерола у циркулацији (*Schlüter u cap., 2020*). *Sakamoto u cap. (2015)* су показали да у глатким мишићним ћелијама аорте, ангиотензин II редукује експресију PCSK9 и на тај начин доприноси повећању броја LDLR. За сада је мало доказа о директној интеракцији између ангиотензина II и PCSK9, али високе концентрације холестерола у циркулацији могу модификовати активност молекула ангиотензина II (*Lu u cap., 2016*). Резултати недавне студије показују да код пацијената са акутним инфарктом миокарда долази до повећане синтезе PCSK9 у хепатоцитима и кардиомиоцитима, што води до апоптозе кардиомиоцита и хипертрофије срца (*Miñana u cap., 2020*).

Може се извести закључак да су функције ендогено експримираног PCSK9 у екстрахепатичним ткивима, као паракриног или аутокриног фактора, значајне и да постоји доказана повезаност између локалних и системских ефеката PCSK9. У условима стреса, сигнали из бубрега и срца могу утицати на хепатичну експресију PCSK9, пораст концентрације PCSK9 у циркулацији, а затим и на друге циљне органе (*Schlüter u cap., 2020*).

1.2. Развој PCSK9 инхибитора

Описан механизам интеракције PCSK9 и LDLR иницирао је развој нове генерације лекова познатих под именом PCSK9 инхибитори, који се примењују као појединачна или адјувантна терапија за лечење примарне хиперхолестеролемије код пацијената који су резистентни на статине или код којих је лечење статинима контраиндиковано, као и код оних пацијената код којих се не постижу циљне вредности упркос примени максимално подношљиве дозе статина. Примена инхибитора PCSK9 у третману дислипидемија заснива се на: (1) инхибицији интеракције PCSK9 и LDLR помоћу анти - PCSK9 моноклонских антитела, пептидних миметика и аднектина; (2) инхибицији синтезе PCSK9 помоћу антисенс олигонуклеотида (енгл. *antisense oligonucleotides*, ASOs) и мале интерференте рибонуклеинске киселине (енгл. *small interfering RNA*, siRNA), тзв. генска терапија; и (3) инхибицији PCSK9-зависних аутокаталитичких процеса помоћу специфичних малих молекула. Генска терапија је усмерена како на екстра-, тако и на интрацелуларну функцију ензима PCSK9, док анти-PCSK9 моноклонска антитела, пептидни миметици и аднектини делују искључиво на PCSK9 у системској циркулацији (*Dragan u cap., 2015*).

Захваљујући ефикасном блокирању лизозомске деградације *LDLR*, ова група лекова, код највећег броја пацијената, снижава ниво *LDL*-холестерола у циркулацији за 50-65% (*Lagace, 2014*), што су потврдили и резултати најновије мета-анализе која је обухватила 48 рандомизованих клиничких студија (*Toth u cap., 2022*). Закључци већине клиничких студија показују да терапија *PCSK9* инхибиторима делује и на концентрацију *HDL*-холестерола резултујући умереним повећањем (до 10%) (*Filippatos u cap., 2018*). Могуће објашњење пораста концентрације *HDL*-холестерола јесте смањена вредност *LDL*-холестерола и смањена размена естара холестерола између ових липопротеинских честица посредством холестерол естар трансферног протеина (енгл., *cholesteryl ester transfer protein, CETP*) (*Choi u Korstanje, 2013; Ferri u cap., 2016*). Главна физиолошка улога *CETP* је транспорт холестерола у јетру путем *LDL* честица које се везују *LDLR*, док се у реверзном транспорту мањи део холестерола допрема до хепатоцита путем *HDL* честица.

Европска Агенција за Лекове (енгл. *European Medicines Agency, EMA*) и Америчка агенција за храну и лекове (енгл. *US Food and Drug Administration, FDA*) су 2015. године одобриле два моноклонска тела (еволокумаб и алирокумаб) за регулисање вредности *LDL*-холестерола. На **слици 2** приказан је развојни пут алирокумаба, од тренутка открића мутације гена *PCSK9*, преко идентификације његове структуре и улоге у метаболизму липида, затим анималних студија и клиничких истраживања моноклонских антитела, до примене у терапији хиперлипидемија (*Yadav u cap., 2016*). Развој трећег моноклонског антитела, боцоцизумаба, обустављен је 2016. године пошто је забележен повишен титар антитела као одговор на примењен лек. Резултати мета-анализе из 2020. године која је обухватила 32 рандомизоване студије потврдили су да примена моноклонских антитела доводи до смањења стопе морталитета. Крајем 2021. године, *EMA* и *FDA* су одобрили и примену генске терапије усмерене на каталитичку разградњу *PCSK9* која је од недавно доступна пацијентима и у Србији али уз праћење нежељених реакција од стране здравствених радника. Резултати *FOURIER, ODYSSEY* и *ORION* студија показују да сва три, за сада доступна, *PCSK9* инхибитора доводе до смањења инциденце великих кардиоваскуларних догађаја (*Ray u cap., 2023; Sabatine u cap., 2017; Schwartz u cap., 2018*).



Слика 2. Развојни пут алирокумаба (преузето и прилагођено из *Yadav u cap., 2016*)

Примена тренутно доступне терапије *PCSK9* инхибиторима, односно употреба одобрених моноклонских антитела, има неколико ограничавајућих аспеката: (1) веома високи трошкови примене лека; (2) субкутана апликација и последично нижа комплијанса; (3) потенцијална имуногеност током дугорочне примене (*Adorni u cap., 2020*). Са друге стране, парентерална примена новоодобрене генске терапије се карактерише специфичним фармакокинетичким профилем и још увек захтева праћење безбедности лека (*Macchi u cap., 2019*).

1.3. Примена комбиноване терапије статинима и *PCSK9* инхибиторима у третману дислипидемија

Статини, инхибитори 3-хидрокси-3-метил-глутарил коензим А (енгл. *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A*, HMG-CoA) редуктазе, представљају прву терапијску линију у примарној и секундарној превенцији дислипидемија. Инхибицијом редукције *HMG-CoA* до мевалоната, кључног корака у синтези ендогеног холестерола, смањује се интрацелуларна концентрација холестерола, што активира транскрипциони фактор *SREBP-2* који стимулише експресију гена за синтезу *LDLR* (*Sahebkar u cap., 2015*). Резултат покренуте каскаде реакција, под утицајем примењене терапије, јесте смањење концентрације *LDL*-холестерола у серуму. Мета-анализа која је обухватала 28 рандомизованих клиничких студија и скоро 190 000 пацијената показала је несумњиву ефикасност статина и смањење инциденце великих кардиоваскуларних догађаја (*Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration, 2019*). Чињеница да се дејством статина постиже смањење морталитета/морбидитета за 20-40% представља значајан резултат (*Xia u cap., 2021*), али оставља и простор за даља истраживања комбиноване терапије са циљем још већег смањења ове стопе.

Међутим, све је више доказа да се код 50% пацијената на терапији статинима, и код чак 80% високо ризичних пацијената, не постижу препоручене вредности, чак и са највећом подношљивом дозом. Учесталост статинске интолеранције се креће и до 20% (*Xia u cap., 2021*), од чега мање од 1% пацијената развија озбиљне нуспојаве као што су миопатија или рабдомиолиза. Мишићне нуспојаве су најчешће пријављиване нежењене реакције статина, али подаци у којој мери се јављају нису униформни и варирају од 5 до 15% (*Fitchett u cap., 2015*). Такође, резултати мета-анализе указују на повећан ризик за 10% у погледу настанка и развоја *Diabetes mellitus*-а типа 2 након дуготрајне терапије високим дозама статина (*S. Wang u cap., 2017*). Показано је да статини могу смањити секрецију инсулина из β -ћелија панкреаса и повећати инсулинску резистенцију у периферним ткивима. Механизми укључени у ове процесе су различити и обухватају мултифакторску комбинацију ефеката статина на: прекомерну експресију неактивне киназе у β -ћелијама панкреаса, што доводи до поремећаја у ослобађању инсулина, измењену сигнализацију посредовану инсулином и смањену експресију гена за протеин транспортер глукозе *GLUT4* (енгл. *glucose transporter type 4*, GLUT4) (*Paseban u cap., 2019*).

Постоји неколико дефиниција статинске интолеранције, а карактерише их неподношење статина у пуној терапијској дози или у било којој дози. *Banach u cap. (2015)* су дали дефиницију статинске интолеранције као немогућност толерисања оне дозе статина која је потребна за довољно смањење кардиоваскуларног ризика, а може настати као последица различитих нуспојава повезаних са терапијом статинима. Статинску интолеранцију је важно разликовати од статинске резистенције која подразумева немогућност постизања циљних вредности *LDL*-холестерола.

Једно од могућих објашњења зашто статини имају ограничену ефикасност у смањењу *LDL*-холестерола представља чињеница да статини повећавају синтезу *PCSK9* путем транскрипционог фактора *SREBP-2* (*Sahebkar u cap., 2015*), што доводи до пораста системских

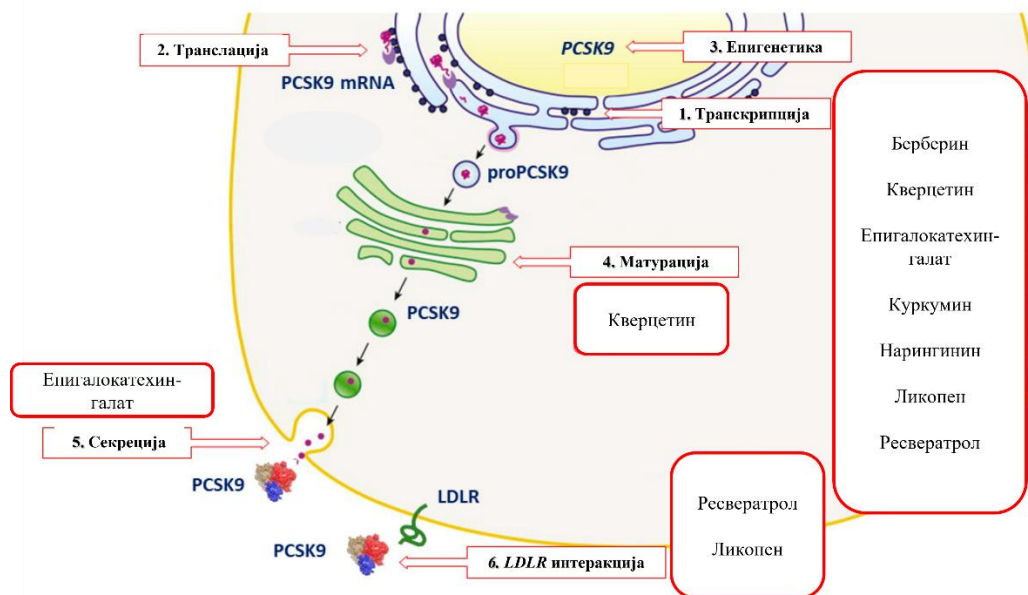
нивоа *PCSK9* за 6–39% током терапије статинима (Nozue, 2017). Такође, показано је да статини повећавају експресију *HNF1α* у хепатоцитима, чиме се повећава експресија *PCSK9* у већој мери него експресију *LDLR* (Dong *u cap.*, 2010). Међу осталим потенцијалним недостацима примене статина издвојена је и минимална ефикасност на повишене нивое *Lp(a)* (Willeit *u cap.*, 2014).

Због свега наведеног, испитивања нових терапијских приступа у третману дислипидемија у последње две деценије су интензивна. Применом *PCSK9* инхибитора показано је да је могуће додатно смањити стопу морталитета/морбидитета, било да се користе као монотерапија (до 55%) или допунска терапија (до 75%) (Shimada *u Cannon*, 2015). Потенцијална комбинација статина, као лекова првог избора у третману дислипидемија, и инхибитора *PCSK9*, као њихове допуне, могла би да доведе до постизања циљних вредности *LDL*-холестерола и код пацијената који не толеришу статине, или у случајевима када се применом статина не могу постићи циљне вредности, упркос примени максималне дозе. Код фамилијарне хиперхолестеролемије или у случајевима комбиноване дислипидемије, такође је оправдано размотрити претходно поменути комбинацију (Pokhrel *u cap.*, 2023).

1.4. Инхибиција *PCSK9* посредством биолошки активних састојака

Открића нових лекова и разјашњавање механизма њиховог деловања, увек прате и упоредна истраживања у откривању сличних ефеката код биолошки активних састојака изолованих из природних извора, нутрацеутика. Појам „нутрацеутик“ је термин који је први пут дефинисао *Dr. Stephen De Felice* 1989. године комбинујући речи „*nutrition*“ и „*pharmaceutical*“. Нутрацеутици обухватају биоактивне састојке присутне у храни или изоловане из биљака, који поред нутритивних карактеристика поседују (потенцијалне и/или доказане) различите здравствене бенефите у превенцији и/или лечењу болести (Nasri *u cap.*, 2014).

Међу нутрацеутицима са хиполипидемијским ефектом (Cicero *u cap.*, 2021; Sahebkar *u cap.*, 2016), у фокусу истраживања су они који инхибирају експресију или активност *PCSK9* и као такви могу бити ефикасан додаток фармаколошком третману (Adorni *u cap.*, 2020; Momtazi *u cap.*, 2017; Waiz *u cap.*, 2022). Као што је већ објашњено, парадоксални ефекти статина на експресију *PCSK9* могу умањити њихов хиполипидемијски ефекат при вишим дозама. Иако су *PCSK9* инхибитори веома ефикасни лекови који значајно смањују и *LDL*-холестерол и кардиоваскуларне догађаје, самостално или у комбинацији са статинима, трошкови лечења, начин примене (субкутано или парентерално) и релативно висока имугеност, представљају лимитирајуће факторе за њихову широку примену, сем у случају пацијената са изразито високим ризиком. На слици 3 је представљен шематски приказ нутрацеутика са доказаним механизмом модулаторних ефеката процеса транскрипције/транслације и матурације *PCSK9* (Adorni *u cap.*, 2020). Нутрацеутици, као састојци уобичајене исхране, имају далеко бољи безбедоносни профил, нижу цену и комфорнију (оралну) примену у поређењу са одобреним моноклонским антителима. Са друге стране, врло је важно истаћи да су дозе клинички испитаних нутрацеутика са потенцијалним кардиопротективних ефектима и до неколико десетина пута мање од оних које су коришћене у експерименталним студијама, и да због ниске биорасположивости, ефикасност нутрацеутика не може бити поређена са синтетским лековима (Adorni *u cap.*, 2020; Momtazi *u cap.*, 2017).



Слика 3. Шематски приказ механизма деловања биолошки активних једињења, нутрацеутика, која поседују *PCSK9* инхибиторну активност (преузето и прилагођено из *Adorni et al.*, 2020)

Постоје бројни експериментални докази да испитивани нутрацеутици поседују *PCSK9* инхибиторну активност на различитим ћелијским културама и анималним моделима. У **табели 1** приказан је преглед најзначајнијих радова у којима је доказана *PCSK9* инхибиторна активност издвојених нутрацеутика, њихова биорасположивост, механизам деловања, као и потенцијалне интеракције са статинима. Значајан експериментални резултат са клиничког аспекта представља ефикасност берберина и куркумина у инхибицији *PCSK9* активности механизмом независним од *SREBP* сигналног пута, а посебно интересантан налаз је да оба нутрацеутика ступају у интеракцију са статинима. Ови резултати сугеришу да би нутрацеутици могли бити разматрани и као допуна хроничној терапији статинима. Поред резултата *in vitro* и *in vivo* студија, постоје извесни клинички докази о инхибицији *PCSK9* посредованој нутрацеутицима (**табела 2**), где је након суплементације у интервентним студијама углавном установљена ефикасност у складу са резултатима експерименталних студија.

Табела 1. Најзначајније *in vitro* и *in vivo* студије у којима је показана *PCSK9* инхибиторна активност нутрацеутика

Нутрацеутикал	Биорасположивост	Механизам деловања	Тип студије	Интеракције са статинима	Референца
Берберин	0,37%	Инхибиција експресије <i>SREBP-2</i> и <i>HNF1α</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Да	<i>Dong u cap., 2015; T.-Y. Fan u cap., 2021; Hua u cap., 2007; D. Liu u cap., 2015</i>
Епигалокатехин-галат	0,1%	Инхибиција секреције <i>PCSK9</i> и експресије <i>SREBP-2</i>	<i>in vitro</i>	Да	<i>Kitamura u cap., 2017; Y. Li u Wu, 2018; Santangelo u cap., 2019; Scholl u cap., 2018</i>
Кверцетин	0,31%	Инхибиција матурације <i>PCSK9</i> и експресије <i>SREBP-2</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Није испитано	<i>Q. Jia u cap., 2019; Mbikay u cap., 2014; Terao, 2017</i>
Ресвератрол	<1%	Инхибиција експресије <i>SREBP-1c</i> и блокирање интеракције <i>PCSK9</i> и <i>LDLR</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Није испитано	<i>Jing u cap., 2019; A. P. Singh u cap., 2019; P. Wang u Sang, 2018</i>
Куркумин	<1%	Инхибиција <i>HNF1α</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Да	<i>Y. Cai u cap., 2017; Stohs u cap., 2020; Tai u cap., 2014</i>
Пептиди лупине	Није испитано	Блокирање интеракције <i>PCSK9</i> и <i>LDLR</i> , инхибиција <i>HNF1α</i>	<i>in vitro</i>	Није испитано	<i>Lammi u cap., 2016; Ruscica u cap., 2018</i>
Нарингин	<1%	Инхибиција <i>SREBP-2</i>	<i>in vivo</i>	Није испитано	<i>Sui u cap., 2018; Zeng u cap., 2019</i>
Ликопен	34%	Инхибиција транскрипције и интеракције <i>PCSK9</i> и <i>LDLR</i>	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Није испитано	<i>Alvi u cap., 2017; Cohn u cap., 2004</i>

Табела 2. Клиничке студије у којима је показана *PCSK9* инхибиторна активност различитих нутрацеутика

Нутрацеутикал	Дизајн студије и број учесника	Доза и трајање студије	Најзначајнији резултати	Референца
Берберин	<ul style="list-style-type: none"> Двоструко слепа рандомизована студија Пацијенти са хетерозиготном фамилијарном хиперхолестеролемијом ($n = 30$) 	<ul style="list-style-type: none"> 500 mg 6 месеци 	<ul style="list-style-type: none"> Значајно ↓ <i>PCSK9</i> Значајна Δ<i>LDL</i> (↓ 10,5%) 	<i>Pisciotta u cap., 2012</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Двоструко слепа рандомизована плацебо контролисана студија Пацијенти са хиперхолестеролемијом ($n = 39$) 	<ul style="list-style-type: none"> 200 mg 3 месеци 	<ul style="list-style-type: none"> Без Δ<i>PCSK9</i> Значајна Δ<i>LDL</i> (↓ 20%) 	<i>Spigoni u cap., 2017</i>
Поликозанол	<ul style="list-style-type: none"> Рандомизована плацебо контролисана студија 1. протокол - пацијенти на терапији статинима ($n = 36$) 2. протокол - здрави испитаници ($n = 16$) 	<ul style="list-style-type: none"> 20 mg 2 месеца 20 mg 3 месеца 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>PCSK9</i> (17,4%) значајно ↓ <i>LDL</i> ↓ <i>PCSK9</i> (19%) Без Δ<i>LDL</i> 	<i>Y.-L. Guo u cap., 2014</i>
Уље каноле обогаћено докозахексаенском киселином	<ul style="list-style-type: none"> Двоструко слепа рандомизована <i>cross over</i> студија Пацијенти са бар једним ризиком за метаболички синдром ($n = 54$) 	<ul style="list-style-type: none"> ≈ 50 g 3 месеца 	<ul style="list-style-type: none"> Значајно ↓ <i>PCSK9</i> Значајно ↓ <i>LDL</i> 	<i>Rodríguez-Pérez u cap., 2016</i>
<p><i>w-3</i> масне киселине са уделом:</p> <p>38,5% еикозапентаенска 25,9% докозахексаенска 6,0% докозапентаенске киселина</p>	<ul style="list-style-type: none"> Двоструко слепа рандомизована плацебо контролисана студија Здраве жене у репродуктивном периоду и здраве жене у менопаузи ($n=92$) 	<ul style="list-style-type: none"> 2200 mg 12 месеци 	<ul style="list-style-type: none"> Значајна Δ<i>PCSK9</i> (↓10,5%) Значајно ↓ <i>LDL</i> 	<i>Graversen u cap., 2016</i>

1.5. Улога оксидативног стреса и инфламације у развоју кардиоваскуларних болести

Оксидативни стрес и стање хроничне инфламације ниског интензитета блиско су повезани са ендотелном дисфункцијом и васкуларним оштећењем (*Siti u cap., 2015*). Оксидативни стрес у организму се одликује нарушеном равнотежом између прооксиданаса и антиоксиданаса тако да је она померена у смеру прооксиданаса (*Fink, 2015*), а као последица настају оксидативна оштећења есенцијалних биомолекула (*Münzel u cap., 2017*). По новој дефиницији, оксидативни стрес представља промену у редокс зависним сигналним путевима, која може бити и корисна али и штетна по организам (*Sies, 2015*). Највећи значај имају реактивне кисеоничне врсте (енгл. *reactive oxygen species, ROS*) које се могу формирати интрацелуларно и/или екстрацелуларно, а доминантно настају током процеса ћелијског дисања у митохондријама, тј. у процесу оксидативне фосфорилације. Поред овог главног пута настанка, *ROS* се стварају и током процеса фагоцитозе, синтезе еикозаноида, оксидативне хидроксилације у микрозомима, као и у неким ензимским реакцијама. Пролазне промене у редокс равнотежи, настале било као последица повећане продукције *ROS* или смањене антиоксидативне заштите, представљају сигнал за активацију одређених регулаторних механизма у организму, у циљу одржања оптималних физиолошких функција (*D'Oria u cap., 2020*). Са друге стране, ендогени систем антиоксидативне заштите, коју чине цитопротективни ензими и неензимски антиоксиданси, посредују у одговору организма на повећану продукцију *ROS*.

Резултати бројних епидемиолошких и клиничких студија потврђују позитивну корелацију између редокс маркера и ризика од будућих кардиоваскуларних догађаја (*Ho u cap., 2013*). Биомаркери редокс статуса у патогенези КВБ предмет су интензивног истраживања у претходној декади и неупитна је повезаност између посматраних маркера и развоја КВБ (*Münzel u cap., 2017*). Ипак, многобројне студије репрезентују различите биомаркере повезане са редокс статусом у организму, што отежава идентификацију једног или више биомаркера који би могли бити означени као предиктори настанка и развоја КВБ (*Daiber u cap., 2021*).

У основи настанка и развоја атеросклеротске болести јесте инфламаторни процес који настаје као последица хроничног оштећења зида крвног суда вишеструким факторима, а одвија се преко каскадних процеса који обухватају ендотелну дисфункцију, повећан оксидативни стрес, продукцију инфламаторних цитокина, експресију адхезивних молекула и акумулацију оксидованих липопротеинских честица (*Rafieian-Kopaei u cap., 2014*). Различите студије су показале да бројни биомаркери инфламације као што су адхезивни молекули, цитокини, хемокини и протеини акутне фазе, могу да предвиде компликације КВБ. У прилог тим сазнањима, проспективне епидемиолошке студије су потвдиле да је одређивање високо сензитивног *C*-реактивног протеина (енгл. *high sensitivity C reactive protein, hsCRP*) значајан и независан предиктор ризика за настанак КВБ (*Fonseca u Izar, 2016*).

hsCRP је препознат као важан маркер за предвиђање КВБ, с обзиром на то да има улоге у различитим стадијумима развоја атеросклеротске болести; може се везивати за липопротеине и оштећене ћелије у атеросклерозном плаку индукујући активацију комплемента, промовишући инфламацију, а тиме и прогресију болести (*Nilsson, 2005*). Међутим, поред тога што је утврђена његова улога као маркера ризика, постоје докази који указују и на његову улогу у самој патогенези атеросклерозе и даљој прогресији КВБ, односно појави инфаркта миокарда, možданог удара, периферне артеријске болести, и изненадне срчане смрти (*Bassuk u cap., 2004*). Рецептори за *CRP* су идентификовани на мононуклеарним ћелијама, неутрофилима и ендотелним ћелијама хумане аорте. На ендотелним ћелијама *CRP* остварује своје ефекте везивањем за *CD32* и *CD64*, што утиче на повећану експресију адхезивних молекула и смањену експресију ендотелне азот-синтазе (*Devaraj u cap., 2005*).

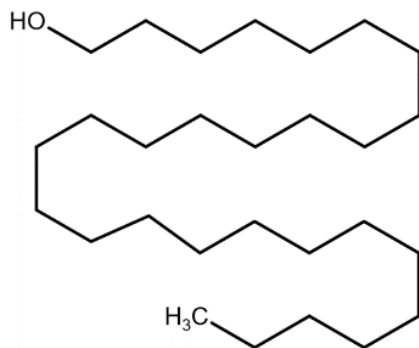
1.6. Октакозанол

Октакозанол је примарни дуголанчани засићен алкохол са 28 атома угљеника. Изолован је 1986. године из уља пшеничних клица и првобитно окарактерисан као потенцијални терапијски агенс у третману репродуктивних поремећаја (*Saint-John и Mcnaughton, 1986*). *Granja и cap.* (1997) су детектовали и одредили октакозанол као најзаступљенију компоненту поликозанола, смеше алкохола екстрахованих из воска шећерне трске (*Saccharum officinarum* L.).

Октакозанол је присутан са уделом од 60% до 70% у смеши поликозанола (*Mas, 2000*) и одговоран је за биолошку активност који ови алкохоли показују у *in vitro* и хуманим студијама. Поред октакозанола (C28; 60–70%), у смеши су у већим количинама присутни триакоктанол (C30; 10–15%), хексакозанол (C26; 5–10%) и дотриакоктанол (C32; 3–8%), а у мањим количинама хептакозанол (C27; ≤5%), тетракозанол (C24; ≤2%), нонакозанол (C29; ≤2%) и тетратриакоктанол (C34; ≤2%) (*Mas, 2000*).

1.6.1. Структура октакозанола

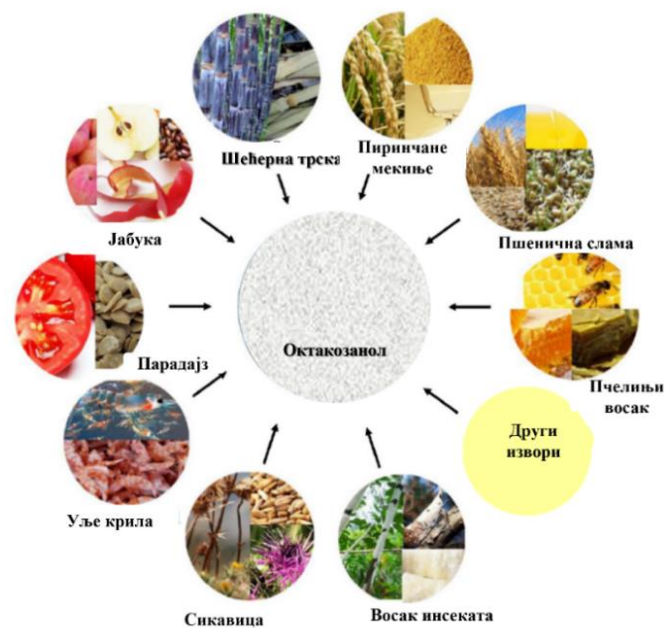
Дуголанчани алкохоли, компоненте поликозанола, могу се представити заједничком хемијском формулом $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_2 \text{OH}$, где је дужина ланца варијабилна и може садржати од 24 до 34 угљеникова атома. Молекулска формула октакозанола је $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{CH}_2\text{OH}$. Структурна формула октакозанола приказана је на **слици 4**. Октакозанол је супстанца слабо растворна у води, а растворна у органским растварачима као што су етанол, хлороформ, етар. Захваљујући присуству хидрофилних хидроксилних и хидрофобних алкил група у својој линеарној структури, октакозанол углавном учествује у реакцијама естерификације, хидроксилације и халогенације (*Saito и cap., 2007*).



Слика 4. Структурна формула октакозанола

1.6.2. Дијетарни извори октакозанола

Октакозанол је у природи широко распрострањен у биљном и животињском свету. Различити дијетарни извори октакозанола приказани су на **слици 5**. Шећерна трска је најзначајнији извор октакозанола, а затим следе пшенична слама, пиринчане мекиње и нерафинисана биљна уља (*Irmak и cap., 2006; Jung и cap., 2011*), а у мањим количинама присутан је у перикарпу воћа и поврћа (*Giuffrè и Capocasale, 2015; Jung и cap., 2011*). Налази се и у воску на епидермису, унутрашњости или излучевинама животиња, као што су антарктички крил, пчеле и инсекти (*Gao и cap., 2015; Irmak и cap., 2006; Venturelli и cap., 2019*), који су означени као потенцијални обновљиви извори октакозанола. Садржај октакозанола у различитим узорцима биљног и анималног порекла приказан је у **табели 3**.



Слика 5. Дијетарни извори октакозанола (преузето и прилагођено из Zhou *u cap.*, 2022)

Вишеструки биоактивни потенцијал октакозанола је разлог његове широке употребе у производњи дијететских суплемената. Главни пут добијања октакозанола као полазне сировине у прехранбеној и фармацеутској индустрији представља екстраховање и изоловање из шећерне трске (Irmak *u cap.*, 2006). Иако се поступак екстракције за добијање биоактивних једињења примењује вековима уназад, и даље представља изазов због сложености састава узорак из којих се компоненте екстрахују. Поред конвенционалних екстракционих техника, сапонификације и трансестерификације, за изоловање октакозанола се све више примењују и савремене екстракционе технике које одликује знатно већа ефикасност самог поступка екстракције и мањи негативни утицај на здравље и животну средину (Shen *u cap.*, 2019; Zhou *u cap.*, 2022). Последњих година дошло је до значајног напретка у процесима изоловања биоактивних једињења, пре свега захваљујући новим научним сазнањима везаним за механизме издвајања једињења из сложених матрикса природног порекла. Неке од до сада развијених савремених метода за изоловање октакозанола из природних извора су микроталасно потпомогнута екстракција (Venturelli *u cap.*, 2019), ултразвучна екстракција (Ishaka *u cap.*, 2014; Orozco-Solano *u cap.*, 2010), екстракција флуидима у суперкритичном стању (Attard *u cap.*, 2016; Ou *u cap.*, 2012).

Табела 3. Садржај октакозанола (mg/kg) у различитим узорцима

Узорак	Октакозанол (mg/kg)	Референца
Биљни извори		
Нерафинисано пшенично уље	127	<i>Irmak u cap.</i> , 2006
Пшенична слама	140	
Восак шећерне трске	219	
Лист шећерне трске	84	<i>Jung u cap.</i> , 2011
Уље коштица грожђа	54	
Уље пиринчаних мекиња	34	
Уље семенки парадајза	40	<i>Giuffrè u Capocasale</i> , 2015
Анимални извори		
Уље арктичког крила	11	<i>Gao u cap.</i> , 2014
Браон пчелињи восак	2000	<i>Irmak u cap.</i> , 2006
Жути пчелињи восак	900	

Нема података о процењеном дневном дијетарном уносу октакозанола. За разлику од природних извора, у којима је октакозанол најчешће присутан у форми естара, у дијететским суплементима октакозанол се налази у слободном облику или у комбинацији поликозанола са другим биоактивним компонентама (астаксантин, берберин, екстракт црвеног пиринча, коензим Q10) (*Marchitto u cap., 2018; Mazza u cap., 2015; Pirro u cap., 2017*). Дијететски суплементи најчешће садрже до 20 mg поликозанола у појединачном дозираном облику, што је вишеструко већа количина од оне која се може унети путем уобичајене исхране.

1.6.3. Биорасположивост и метаболизам октакозанола

Постоји врло мало експерименталних података о биорасположивости и метаболизму октакозанола. Октакозанол је изразито липофилна супстанца што резултује лошом апсорпцијом на нивоу гастроинтестиналног тракта (*Hargrove u cap., 2004*). Апсорпција дуголанчаних алкохола, односно дуголанчаних масних киселина, из гастроинтестиналног тракта је активан процес који укључује специјалне транспортере. У ентероцитима октакозанол се инкорпорира у хиломикроне и прелази прво у лимфни систем, па у системску циркулацију, а затим се транспортује до јетре (*Hargrove u cap., 2004*) где се примарно депонује. Делимично се акумулира и у мишићима и адипозном ткиву (*Kabir u Kimura, 1993*).

Резултати студија на животињама показали су да се октакозанол конвертује до воштане масне киселине, октакозанске киселине (*Menéndez u cap., 2005; Haim, 2008*). *Haim u cap. (2009)* су такође одредили, методом гасне хроматографије, да се максимална концентрација октакозанола у плазми, након оралне примене, достиже релативно брзо, за 30–60 минута. У плазми пацова након оралне примене октакозанола у дози 60 mg/kg, измерене концентрације су биле у распону 160–510 ng/mL. У студији која је претходила, такође је показана ниска биорасположивост, тако да је измерена концентрација октакозанола у плазми пацова након оралне администрације 40 mg/kg поликозанола износила 14–16 ng/mL (*Marrero Delange u González Bravo, 2001*).

За разлику од митохондријалне β -оксидације масних киселина кратког (<C4), средњег (C4–C12) и дугог ланца (C12–C20), катаболички пут масних киселина веома дугог ланца (>C20) се одвија унутар пероксизома (*Nelson u cap., 2008*). Део масних киселина се одмах инкорпорира у мембрану пероксизома (*Marinangeli u cap., 2007*), што потенцијално објашњава механизам хиполипидемијског деловања октакозанола. Дуголанчане масне киселине, пре уласка у матрикс пероксизома, морају бити активирани што ограничава брзину β -оксидације. Активирани масне киселине пролазе мембрану пероксизома и подлежу процесу β -оксидације која се, као и код митохондрија, састоји из четири корака, дехидрогенације, хидратације, поновне дехидрогенације и тиолитичког исецања. Међутим, оксидација ових масних киселина се не одвија у потпуности у пероксизомима (*Nelson u cap., 2008*), већ се процес разградње након пероксизома наставља и завршава у митохондријама. Тачан механизам транспорта скраћених масних киселина из пероксизома у митохондрије још увек није познат.

Ниска орална биорасположивост одлаже корисне здравствене ефекте октакозанола. Формирање комплекса са циклодестринима, примена липидних формулација на бази биљних уља упакованих у желатинске капсуле или нанокапсулација, представљају различите технолошке поступке којима се може превазићи проблем ниске биорасположивости једињења (*X. Chen u cap., 2022; Dima u cap., 2020*). У циљу повећања растворљивости, октакозанол је инкапсулиран у хидрофобне шупљине сојиног протеина, који формира глобуларну структуру са хидрофилним спољашњим слојем и хидрофобним центром који садржи октакозанол (*Sen Gupta u Ghosh, 2017; Xiang u cap., 2018*). Уз модификацију растворљивости, промена морфолошких својстава октакозанола додатно је допринела побољшању биорасположивости. Такође је показано да се стабилност формираног нанокомплекса сојин протеин-октакозанол, као и ефикасност инкапсулације, побољшава додавањем полисахарида (*D. Li u cap., 2020*).

Користећи фармакокинетички модел гастроинтестиналне стимулације, показано је да нанокристали октакозанола, синтетисани техником нанопреципитације, имају већу брзину дифузије, антиоксидативни капацитет, пенетрабилност и биорасположивост (*Sen Gupta u Ghosh, 2017*).

1.6.4. Безбедност суплементације октакозанолом

Мета-анализа 22 студије из 2018. године показала је да је употреба поликозанола у дневној дози у распону од 5 mg до 20 mg безбедна (*Gong u cap., 2018*). Током дуготрајне примене, октакозанол се добро подноси без појаве озбиљних нежељених реакција. Најчешће пријављени нежељени догађаји су губитак тежине, ноктурија (0,7%) и главобоља (0,6%). Остали могући нежељени ефекти су несаница, полифагија, алергијске реакције на кожи, гастроинтестиналне тегобе. Све забележене нежељене реакције су пролазног карактера. Појединачно орално примењена доза од 1000 mg дневно код здравих испитаника није довела до појаве озбиљних нежељених дејстава (*Gouni-Berthold u Berthold, 2002*). Захваљујући свом безбедоносном профилу, употреба октакозанола је широко заступљена у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији. Иако нема података о тератогеном деловању, услед недовољно података о безбедности, употреба препарата са октакозанолом се не препоручује током трудноће (*Rodríguez u Garcia, 1998*).

1.6.5. Примена октакозанола у унапређењу здравља и превенцији болести

Октакозанол и кардиоваскуларне болести

Резултати *in vitro* и *in vivo* студија на животињама показују да поликозаноли индиректно инхибирају синтезу холестерола тако што посредством аденозин монофосфат-активираних протеинских киназа (енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK) смањују ензимску активност *HMG-CoA* редуктазе (*Banerjee u cap., 2011; D. K. Singh u cap., 2006*). *Nam u cap. (2019)* су, уз потврду ових ефеката у студији на мишевима, доказали да поликозанол утиче на повећање преузимања *LDL*-холестерола у јетру, као и на екскрецију укупног холестерола. Претпостављени механизам хиполипидемијског деловања поликозанола објашњава се утицајем смеше ових дуголанчаних алкохола на повећање фосфорилације треонина у каталитичком домену AMPK (*Thr172*), за шта је неопходна оксидација масних алкохола до масних киселина у пероксизомима, током које се генерише довољна концентрација аденозин-монофосфата (*Banerjee u cap., 2011*). Своју функцију AMPK директно остварује фосфорилацијом бројних метаболичких ензима, укључујући и *HMG-CoA* редуктазу. AMPK, која је маркер ћелијских залиха енергије, смањује експресију протеина *SREBP1c* и инхибира липогенезу, док стимулише оксидацију масних киселина (*Enjoki u cap., 2016*).

Резултати великих рандомизованих клиничких студија и мета-анализе о ефектима стерола, станола и поликозанола, показују да су поликозаноли ефикасни у редукцији *LDL*-холестерола и триглицерида за 15–30%, односно 17–21%, у дози 2–20 mg дневно (*J. T. Chen u cap., 2005*). Поред утицаја на смањење *LDL*-холестерола, поликозаноли утичу и на пораст *HDL*-холестерола за 8-15% (*Gouni-Berthold u Berthold, 2002*). Хиполипидемијски ефекти су испитивани код деце, здравих особа и одраслих са већ успостављеном дијагнозом дислипидемија. Ипак, и поред описаног механизма деловања поликозанола на инхибицију синтезе холестерола и потврдних резултата хиполипидемијског ефекта поликозанола у хуманим студијама, закључак актуелне мета-анализе о ефикасности и безбедности примене поликозанола у третману дислипидемија (22 студије, 1886 пацијената) указује да добијени резултати нису конзистентни и да се разликују у зависности да ли су студије спроведене на Куби или у Европи (*Gong u cap., 2018*). Иако није утврђено у чему је проблем који доводи до

различитих резултата истраживачких група са Кубе и других, неоспорно је да се у датој смеши налазе биолошки активне компоненте од значаја по здравље људи.

У студији *Kim и сарадника*, истраживачи су показали да је код здравих добровољаца који су суплементирани поликозаноном дошло до значајног повећања концентрације *HDL* честица и смањења њихове „дисфункционалности“, а као последица супресије активности *СЕТР* (*S.-J. Kim и сар., 2018*). *Y.-L Guo и сар. (2014)* су спровели интервентну студију и показали да поликозаноли, иако инхибирају *HMG-CoA* редуктазу слично статинима, имају изванредан ефекат на снижавање *PCSK9* код здравих добровољаца, као и код пацијената који започињу терапију статинима.

Није јасно да ли су генетске разлике одговорне за такву разноликост резултата, али без обзира на то, поликозанол (октакозанол) је широм света доступан као додаток исхрани (појединачно или у комбинацији са другим нутрацеутицима) са означеним корисним ефектима у третману дислипидемија. С обзиром на ниску интестиналну апсорпцију ових дуголанчаних алкохола, цревна микрофлора такође може бити значајан фактор који утиче на механизам деловања. Како поликозанол регулише цревну микробиоту и како ступа у интеракцију са интестиналним бактеријама, и даље остаје нејасно. Поставља се питање на који је начин цревна микрофлора укључена у механизам деловања, односно да ли индивидуалне карактеристике цревне микробиоте имају утицај на повећање концентрације полинезасићених масних киселина у цревима домаћина и у серуму након третмана поликозаноном (*Zhai и сар., 2021*).

Поред описаних ефеката октакозанола у третману дислипидемија, резултати експерименталних студија указују и на његова антиоксидативна и антиинфламаторна својства. Подаци добијени из до сада једине спроведене студије у хуманој популацији, показују да примена октакозанола код спортиста значајно смањује оксидативни стрес током периода интензивних тренинга (*S.-H. Lee и сар., 2019*). Октакозанол може побољшати антиоксидативни капацитет ћелија смањењем оштећења митохондрија миокарда које је изазвано слободним радикалима, као и смањењем липидне пероксидације (*Zhou и сар., 2022*). *In vitro* студије су показале да октакозанол изолован из маслиновог уља и листова *Sabicea grisea* показује антиинфламаторна и антиноцицептивна деловања (*Fernández-Arche и сар., 2009; Oliveira и сар., 2012*). Такође, показано је да октакозанол инхибира липополисахаридом изазвану секрецију проинфламаторних цитокина, *IL-6*, *IL-1β* и *TNF-α*, као и експресију индуцибилне азот-моноксид синтазе (*T. Guo и сар., 2017; Montserrat-de la Paz и сар., 2014*).

Октакозанол и дијабетес

У *in vitro* студијама уочено је да октакозанол поседује корисне ефекте у превенцији симптома и знакова повезаних са преддијабетесом и дијабетесом. Испитивање инхибиције алфа-глюкозидазе октакозаноном екстрахованим из листова биљке *Polygonum maritimum* показало је значајну антидијабетесну активност испитиваног екстракта у поређењу са инхибиторном активношћу антидијабетика акарбозе (*Rodrigues и сар., 2017*). *Kaur и сар. (2013)* су истраживали октакозанол екстрахован из пиринчаних мекиња и резултати *in vitro* тестова су показали дозно-зависни инсулинотропни ефекат. Примена комбинације поликозанола са берберином и ферментисаним црвеним пиринчем код пацијената са метаболичким синдромом током 18 седмица довела је до значајног побољшања параметара инсулинске резистенције (*Affuso и сар., 2012*).

Октакозанол и болести јетре

Резултати студија указују да октакозанол поседује хепатопротективни ефекат. Заштитни ефекат на хепатоците остварује различитим механизмима. У моделу угљен-тетрахлоридом индукованог оштећења јетре пацова, суплементација октакозанолом (10, 50 или 100 mg/kg) ефикасно је ублажила повећање серумских трансминаза, као и активност мијелопероксидазе и ксантинооксидазе. Такође је забележено и смањење концентрације липидне пероксидазе и глутатиона (*Ohta u cap., 2008*). Овим резултатима су претходили и закључци да октакозанол позитивно делује на активност глутатиона, инфламаторне процесе и степен некрозе паренхима јетре (*Fraga u cap., 1997; Noa u cap., 2003*).

Октакозанол и неуродегенеративне болести

Етиологија селективног умирања неурона у неуродегенеративним болестима, укључујући и Паркинсонову болест, још увек није у потпуности позната. Орална примена октакозанолом (35–70 mg/kg) је испитана на анималним моделима Паркинсонове болести и током две седмице употребе побољшан је морфолошки изглед неуронских ћелија, довела до видљивих бихејвиоралних промена, веће способности уклањања слободних радикала у стријатуму мозга и смањења апоптозе индуковане допаминергичким неуротоксином, 6-хидроксидопамином (*T. Wang u cap., 2010*). Уз неуропротективни ефекат, показано је да октакозанол спречава настанак комплекса, прекурсора нервних фактора раста и сортилина, одговорног за регулацију апоптотских сигналних путева. У наставку истраживања, резултати оралне примене октакозанолом у већој дози (100 mg/kg) су показали да неуропротективни ефекат октакозанолом може бити посредован инхибицијом фосфорилације молекула укључених у процесе сигналне трансдукције (*T. Wang u cap., 2012*).

Октакозанол и спорт

Ефекти октакозанолом на спортске перформансе испитивани су на анималним моделима. Додатак октакозанолом исхрани је значајно допринео побољшању активности креатин фосфокиназе у плазми и цитрат синтазе у мишићима, резултујући повећаним оксидативним капацитетом мишића и депоновањем гликогена у мишићима пацова изложених интензивном тренингу (*H. Kim u cap., 2003*). Две студије су описане ергогене ефекте октакозанолом потврдиле на нивоу промена у експресији гена. Недавна студија је показала да октакозанол учествује у регулацији експресије гена *Trim63*, *Prx*, *Cacna1h* и *Mybp3* за протеине повезане са функцијом миофибрила, контрактилних влакана и *Ca-ATP*-азе (*Zhou u cap., 2021*). Октакозанол је утицао на аутономну регулацију активности, мишићну издржљивост и на нивое гликогена у јетри и у мишићима, лактат дехидрогеназе и млечне киселине у крви. Резултати претходне студије указују да октакозанол појачава лучење хормона раста, глукагона и адреналина у крви животиња, као и експресију гена за транспортер глукозе *GLUT4* и *AMPK* у мишићима и јетри, који могу да контролишу метаболичке процесе, смањују реакције на стрес и побољшавају перформансе (*Long u cap., 2015*).

Адаптогена својства октакозанолом су испитана и у погледу његовог утицаја на смањење стреса и побољшање квалитета сна (*Kaushik u cap., 2017*). Орална примена 100–200 mg/kg октакозанолом је довела до смањења латенције успављивања и значајног продужетка нон-РЕМ (енгл. *non-rapid eye movement*, NREM) фазе спавања.

Добар квалитет сна доприноси бољим спортским перформансама, бржем опоравку, бољим когнитивним способностима и уопштено добром менталном здрављу спортиста. У прилог овим чињеницама говоре и релевантне препоруке званичних међународних спортских организација посвећене значају спавања код професионалних спортиста (*Charest u Grandner, 2020*).

Октакозанол и тумори

Истраживање на културама туморских ћелија је показало да октакозанол екстрахован из тропске биљке *Tinospora cordifolia* може инхибирати ћелијску пролиферацију и метастазе, супримирајући експресију нуклеарног фактора κB (енгл. *nuclear factor-kappa B*, *Nf- κB*) као и активност матриксних металопроотеиназа (ММП) из групе гелатиназа, ММП-2 и ММП-9 (*Thippeswamy u cap., 2008*).

Ензими ММП-2 и ММП-9 су означени као потенцијални биомаркери прогнозе и предикције у различитим типовима хуманих канцера. Повећана експресија ММП-2 је доказана у малигним туморима дигестивног тракта. ММП-2 може самостално активирати ММП-9 који даље може или стимулирати ослобађање фактора ангиогенезе или смањити ослобађање инхибитора ангиогенезе (*Z. Li u cap., 2017*). Захваљујући способности да врши деградацију компоненти екстрацелуларног матрикса, ММП-9 има важну улогу у процесу ангиогенезе омогућавајући миграцију ендотелних ћелија.

Транскрипциони фактор *Nf- κB* је регулаторни протеин који контролише експресију многих индуцибилних и ткивно специфичних гена. *Nf- κB* се налази у у неактивном облику у цитоплазми свих типова ћелија, а само када је активиран транслоцира се до једра, где регулише експресију више од стотину гена одговорних за функционисање имунског система и инфламаторни одговор ћелија, али и за канцерогенезу (*Karin, 2006*). Експресија *Nf- κB* директно утиче на секрецију васкуларног ендотелног фактора раста и регулисање микроваскуларне густине (*Sadick u cap., 2005*). Супресија *Nf- κB* у ћелијама тумора инхибира ћелијски циклус и делује апоптотски, што указује на кључну улогу *Nf- κB* у ћелијској пролиферацији.

Chi u cap.(2016) су потврдили антитуморске ефекте октакозанола у правцу инхибиције активности ММП-2 и ММП-9 и транслокације *Nf- κB* до једра. Резултати недавно спроведеног истраживања на ћелијама гастричног аденокарцинома *GC SNU-16* и на моделу мишјег ксенографта су показали да поликозанол значајно успорава развој тумора супресијом експресије пролиферативног маркера *Ki-67* и смањењем броја дендритских ћелија (*S. Lee u cap., 2022*). Сматра се да промене дендритских ћелија представљају један од механизма избегавања апоптозе код многих туморских ћелија, укључујући и аденокарцином дебелог црева.

1.7. Витамин К2

Улога витамина К2 у превенцији КВБ се остварује посредством екстрахепатичног, матриксног протеина који учествује у регулацији хомеостазе калцијума. Матриксни γ -карбоксиглутамат протеин (енгл. *matrix γ -carboxyglutamate protein*, *MGP*) се синтетише од стране васкуларних глатких мишићних ћелија, фибробласта, ендотелних ћелија и хондроцита (*Schurgers u cap., 2013*), и има важну улогу инхибитора у процесу васкуларне калцификације (*Willems u cap., 2014*). Значај фосфорилације серинских остатака овог матриксног протеина није у потпуности разјашњен али се са сигурношћу зна да је карбоксилација неопходна за његову активацију (*Evrard u cap., 2015*). Повезаност између концентрације витамина К2 и функције објашњава се преко витамин К–зависне γ -глутамат карбоксилације (*Stafford, 2005*). Недостатак витамина К2 узрокује повећан ниво неактивне форме овог протеина, дефосфодекарбоксилане форме *MGP*, што даље доводи до таложења калцијума у крвним судовима и повећаног кардиоваскуларног ризика (*Schurgers u cap., 2005*). Такође, употреба антагониста витамина К2 може довести до смањења активне форме *MGP*, односно може допринети развоју васкуларне калцификације, која је означена као независни предиктор кардиоваскуларног морбидитета и морталитета (*Cranenburg u cap., 2010*).

Дозе витамина К2 које су испитиване у циљу праћења кардиопротективних ефеката су биле у распону 180–360 μg дневно (Knapen *u cap.*, 2015; Mansour *u cap.*, 2017). Није познато које су количине витамина К2 неопходне за карбоксилацију *MGP* код здравих особа (Dalmeijer *u cap.*, 2012). Код присутног дефицита, витамин К2 се прво транспортује на места где је његово присуство од суштинске важности за “преживљавање”, у овом случају у јетру, где је неопходан за синтезу фактора коагулације а тек након тога се дистрибуира и на друга места ван јетре где је неопходан за активацију осталих витамин К–зависних протеина.

Резултати опсервационих студија показују да је висок унос витамина К2 повезан са смањењем кардиоваскуларног и укупног морталитета, што се објашњава улогом витамина К2 у активацији *MGP* (Beulens *u cap.*, 2009; Gast *u cap.*, 2009; Shea *u cap.*, 2009). Присуство неактивне форме овог протеина повезано је са различитим маркерима КВБ укључујући повећану крутост артерија, васкуларну и валвуларну калцификацију, инсулинску резистенцију, као и и срчану инсуфицијенцију (Hariri *u cap.*, 2021). Иако су директни ефекти витамина К2 на одлагање прогресије васкуларне и валвуларне калцификације тренутно предмет већег броја клиничких испитивања, резултати до сада спроведених студија указују на потенцијално побољшање преживљавања међу пацијентима који су узимали витамин К2 (Hariri *u cap.*, 2021).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Истраживање је спроведено постављањем следећих циљева:

- праћење ефеката суплементације октакозанолом на концентрације *PCSK9* и параметре липидног профила у серуму пацијената који су на хроничној терапији аторвастатином после 8 и после 13 седмица од почетка дијетарне интервенције;
- анализа повезаности између промена у вредности *PCSK9* и параметара липидног профила током дефинисаних временских интервала;
- испитивање утицаја суплементације октакозанолом на концентрације параметара оксидативног стреса, антиоксидативне заштите и *hsCRP* током дефинисаних временских интервала;
- анализа *PCSK9*, маркера редокс статуса и *hsCRP* у зависности од одговора испитаника у погледу промена параметара липидног профила (*responders vs. non-responders*).

3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ

3.1. Избор испитаника

На почетку истраживања урађен је иницијални скрининг потенцијалних учесника студије, који је обухватао преглед медицинске документације пацијената, као и евалуацију критеријума за укључивање, односно искључивање из студије. Сви учесници студије су били пацијенти лечени у амбуланти/стационару Клиничког одељења за кардиоваскуларне болести, Клиничко-болничког центра „Звездара“, Београд, и у тренутку истраживања нису били хоспитализовани. Сто седамдесет седам пацијената је контактирано телефонским путем и у испитивање је укључено осамдесет седам испитаника. Испитаници су детаљно обавештени о самој процедури, методама и циљевима истраживања, као и о правима и обавезама током извођења студије и могућности повлачења из истраживања у било ком тренутку. Такође, учесници студије су информисани да са једнаком вероватноћом могу бити распоређени у плацебо групу, односно у групу која ће током интервенције добијати дијететски суплемент.

3.2. Дизајн студије

Студија је реализована као проспективна, рандомизована, двоструко слепа, плацебо контролисана. Истраживање је осмишљено као дијетарна интервентна студија која је обухватила пацијенте који су минимум четири месеца користили аторвастатин (20 mg). Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Клиничко-болничког центра „Звездара“, Београд, и студија је пратила етичке стандарде дефинисане Хелсиншком декларацијом.

Одређивање величине узорка

Статистичком анализом *a priori* применом *G-Power* програма, израчунато је да је за смањење нивоа *PCSK9* за 22% , $\alpha=0,05$ и $\beta=0,8$, потребно укључити укупно 76 испитаника (*Y.-L. Guo и сар., 2014*). На овај минимални довољни узорак додато је +10% због непредвиђених околности и могућег расипања узорка (енгл., *dropout*), па је коначан предвиђен број испитаника износио 84.

Критеријуми за укључивање испитаника у истраживање

- старост 40-80 година,
- дијагноза дислипидемије и терапија аторвастатином у дози од 20 mg, минимум 4 месеца до тренутка укључивања у студију.

Критеријуми за искључење испитаника из истраживања

- индекс телесне масе (ИТМ) $>35 \text{ kg/m}^2$,
- вредност триглицерида $>5.6 \text{ mmol/L}$,
- срчани и мождани удар у последњих месец дана,
- употреба оралних антикоагулантних лекова,
- тромбоза у последњих годину дана,

- присуство одређених болести (болести јетре и бубрега, малигнитет, неуролошка и психијатријска обољења, као и аутоимуне, инфламаторне и инфективне болести),
- повишене вредности ензима креатин киназе (енгл. *creatine kinase*, СК), пет пута у односу на горњи ниво референтних вредности,
- повишене вредности аланин аминотрансферазе (енгл., *alanine aminotransferase*, ALT) и аспартат аминотрансферазе (енгл., *aspartate aminotransferase*, AST), три пута у односу на горњи ниво референтних вредности.

3.3. Протокол студије

Након изјашњавања и давања писменог пристанка за добровољно учествовање у студији, испитаници су прегледани. Испитаници су на почетку студије такође попунили и упитник о демографским подацима, а урађена су и основна антропометријска мерења. Преглед, антропометријска мерења и попуњавање упитника су обављени у Клиничко-болничком центру „Звездара“ (Клиничко одељење за кардиоваскуларне болести). Испитаници су саветовани да не мењају своје дотадашње навике у исхрани и физичкој активности током трајања интервентне студије. У истом дану вршено је узорковање биолошког материјала (крви) испитаника. Учесници истраживања током трајања студије, и месец дана пре укључивања у студију, нису користили суплементе који могу имати утицати на липидни статус (ω -3 масне киселине, црвени пиринач, уље рачића и др.). Пацијентима је посебно наглашено да наставе са узимањем прописане фармаколошке терапије.

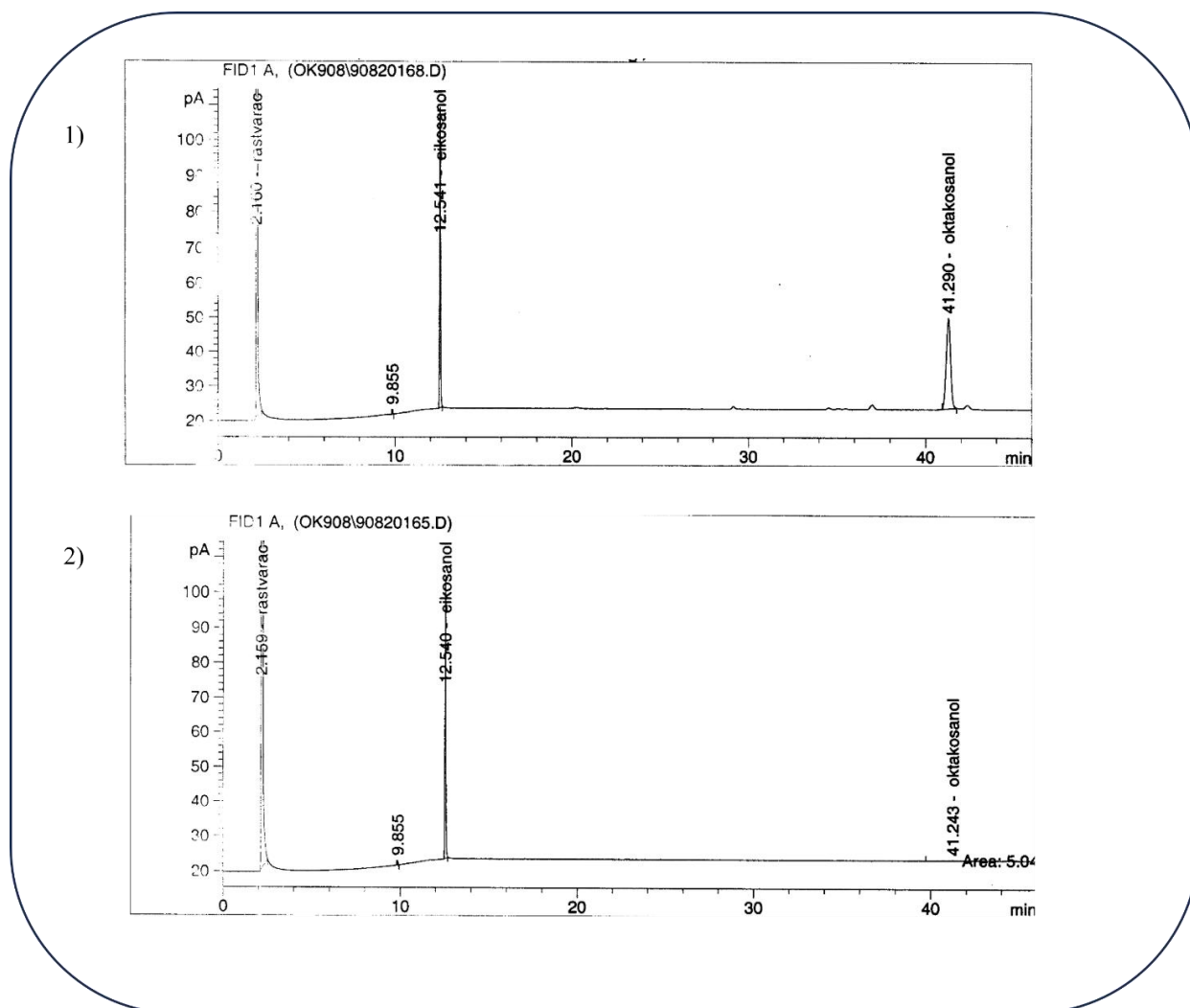
По плану студије, друга и трећа визита су реализоване након 8, односно 13 седмица од почетка суплементације. У току посете поново су обављени преглед пацијента, антропометријска мерења и узимање узорка крви. Протокол студије, односно све фазе од почетног скрининга до завршетка студије, приказан је у **табели 4**.

Табела 4. Протокол студије

Процедура	Скрининг	Дијетарна интервенција			Follow-up
		Почетак (визита 1)	8.седмица (визита 2)	13.седмица (визита 3)	
Историја болести пацијента	✓				
Информисан пристанак испитаника		✓			
Евалуација критеријума за укључивање/искључивање	✓				
Демографски подаци		✓			
Антропометријска мерења		✓	✓	✓	
Физикални преглед		✓		✓	
Конкомитентна медикација		✓		✓	
Електрокардиограм (ЕКГ)		✓		✓	
Крвни притисак и пулс		✓	✓	✓	
Мониторинг нежељених реакција на дијететски суплемент			✓	✓	✓
Узорковање биолошког материјала		✓	✓	✓	

Материјал за дијетарну интервенцију

У студији је коришћен дијететски суплемент *Arteroprotect*[®] капсуле, комбинација октакозанола (20 mg) и витамина К2 (45 µg), произвођача *AbelaPharm* д.о.о., Вилине воде бб, Слободна зона Београд. Плацебо капсуле су садржале микрокристалну целулозу, силицијум-диоксид и магнезијум-стеарат, и произведене су од стране истог произвођача као и дијететски суплемент. Обе групе добијале су капсуле идентичног изгледа (облик, боја, укус, мирис). Хроматограми дијететског суплемента и плацебо капсула приказани су на **слици 6**. Свим испитаницима је препоручено да капсуле узимају једном дневно, и то у вечерњим часовима.



Слика 6. Хроматограми дијететског суплемента (1) и плацебо капсула (2)

Узорковање биолошког материјала

Испитаницима је у Клиничко-болничком центру „Звездара“ узимана крв из предње кубиталне вене наташте, после ноћног гладовања, у јутарњим часовима (8–9 h) и сакупљана у вакутејнерима са серум сепаратор гелом за добијање серума. Епрувете су остављане пола сата на собној температури пре центрифугирања (1500 x g, 15 минута, на 4°C). Узорковање биолошког материјала вршено је укупно три пута, на дан почетка суплементације, као и након 8, односно 13 недеља дијетарне интервенције. Узорци серума су подељени у аликвоте и чувани на -80°C до тренутка анализирања.

Праћење нежељених реакција на суплементацију

Протоколом истраживања испитаницима се омогућава да у случају било какве сумње на нежељену реакцију одмах могу контактирати истраживаче. Посебна пажња је усмерена на случајеве са повећањем нивоа ензима трансaminaза и креатин киназе.

3.4. Методе

3.4.1. Антропометријска мерења

Сва антропометријска мерења вршена су у јутарњим часовима. Свим испитаницама су измерени следећи основни антропометријски параметри:

- телесна маса (kg),
- телесна висина (cm),
- обим струка (cm),
- обим кукова (cm),
- проценат телесне масти,
- проценат воде.

Процент телесних масти и воде одређени су методом биоелектричне импеданце на професионалном анализатору телесне конституције (*Tanita Scale BC587 InnerScan Body Composition Monitor*). Индекс телесне масе (ИТМ) прерачунат је на основу телесне масе и висине преко формуле: $ИТМ = \text{телесна маса (kg)} / \text{висина(m)}^2$. У циљу процене дистрибуције телесних масти рачунат је однос обим струка/обим кукова.

3.4.2. Одређивање параметара липидног профила и биохемијске анализе

Основне лабораторијске и биохемијске анализе обухватају одређивање глукозе, липидног статуса (укупни холестерол, *LDL*-холестерол, *HDL*-холестерол, триглицериди, аполипопротеин *A1* (*ApoA1*) и аполипопротеин *B100* (*ApoB100*)), *AST*, *ALT*, *CK*) Биохемијски параметри су одређени у Лабораторији „Београд“ применом стандардних спектрофотометријских метода коришћењем комерцијалних тестова *Boehringer* (Манхајм, Немачка) на аутоматском анализатору *Hitachi 7150* (Токио, Јапан).

3.4.3. Одређивање *PCSK9*

За мерење концентрације *PCSK9* у серуму коришћен је *ELISA* комерцијални тест (*R&D systems*, Висбаден, Немачка) према упутству произвођача. Тест детектује и слободне и везане форме *PCSK9* у узорку. Коефицијенти интра- и интериндивидуалне варијације теста су у опсегу 4,1–6,5%, а опсег одређених вредности у случајном узорку здравих испитаника је 177–460 ng/mL, при чему средња вредност±стандардна девијација износе 313±71 ng/mL. Минимална концентрација која се може квантификовати износи 0,096 ng/mL.

Припремљене *ELISA* плоче су обложене антителима, тако да се стандарди и узорци серума испитаника апликују директно у базене, у које је претходно нанет дилуент, а након чега следи инкубација. После периода инкубације и испирања плоче, у базене се додаје хумани *PCSK9* конјугат, односно поликлонско детекционо антитело, конјуговано са пероксидазом. После још једне инкубације и испирања, додаје се раствор супстрата који садржи водоник пероксид и хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (*TMB*). Пероксидаза у присуству водоник пероксида оксидује хромоген до плаво обојеног једињења. Додатак раствора сумпорне киселину блокира реакцију преводeћи плаво обојени производ реакције у жути. Интензитет боје је пропорционалан концентрацији *PCSK9* у испитиваном узорку и мери се на 450 nm.

3.4.4. Одређивање параметара оксидативног статуса

Одабрани параметри оксидативног статуса одређени су на аутоматском анализатору *ILAB 300+* (*Instrumentation Laboratory*, Милано, Италија) у лабораторији Катедре за медицинску биохемију Фармацеутског факултета у Београду коришћењем претходно валидираних спектрофотометријских метода.

Одређивање концентрације продуката оксидације протеина

Продукти унапредовале оксидације протеина (енгл. *advanced oxidation protein products*, *AOPP*) који представљају маркере оксидативног стреса, одређивани су спектрофотометријском методом описаном од стране *Witko-Sarsat-a* (*Witko-Sarsat u cap.*, 1996). У узорак серума разблежен фосфатним пуфером ($pH=7,4$) додата је глацијална киселина и раствор калијум јодида, након чега долази до промене апсорбанције која је мерена на 340 nm. Концентрација *AOPP* се изражава преко еквивалената хлорамина Т (натријум-*N*-хлоро-*p*-толуенсулфонамид) који се користи за израду стандардне криве у концентрацијама 10–100 $\mu\text{mol/L}$, при чему његова апсорбанција линеарно расте са порастом концентрације.

Одређивање тоталног оксидативног статуса

Одређивање тоталног оксидативног статуса (енгл. *total oxidative status*, *TOS*) модификованом методом по *Erel*-у која се заснива на способности оксиданаса из серума да оксидују феро-јоне у фери-јоне (*Erel*, 2005; *Kotur-Stevuljevic u cap.*, 2015). Главне компоненте *TOS* у серуму представљају липидни пероксиди и водоник пероксид. Оксиданси из узорка оксидују јоне гвожђа (Fe^{2+}) из феро-*o*-дианизидиног комплекса у фери-јоне (Fe^{3+}). Настали фери-јоне граде обојени комплекс са ксиленол-оранжом у киселој средини у присуству глицерола (олакшава реакцију оксидације). Калибрација методе рађена је са воденим растворима водоник пероксида у опсегу концентрација 10–200 $\mu\text{mol/L}$, што одговара очекиваним концентрацијама у биолошком материјалу. Интензитет боје раствора пропорционалан је укупном садржају оксидационих молекула у серуму чији је апсорпциони максимум на 560 nm. Резултати су изражени као еквиваленти H_2O_2 ($\mu\text{mol/L}$).

3.4.5. Одређивање параметара антиоксидативне заштите

Одабрани параметри антиоксидативне заштите одређени су на аутоматском анализатору *ILAB 300+* (*Instrumentation Laboratory*, Милано, Италија) у лабораторији Катедре за медицинску биохемију Фармацеутског факултета у Београду, коришћењем претходно валидираних спектрофотометријских метода.

Одређивање активности ензима супероксид дизмутазе

Са циљем одређивања ензимске активности супероксид дизмутазе (енгл. *superoxide dismutase*, *SOD*) коришћена је модификована метода која се заснива на способности овог ензима да инхибира аутооксидацију адреналина у алкалној средини при $pH=10,2$ (*Misra u Fridovich*, 1972). Аутооксидација адреналина је иницирана траговима тешких метала присутних као нечистоће реагенаса. Резултати за активност *SOD* добијају се мерењем апсорбанције насталог производа оксидације адреналина црвене боје на 480 nm. Врше се два мерења, и то без присуства *SOD* (контрола) и у присуству *SOD* (узорци серума). Активност *SOD* ензима се изражава у релативним јединицама, где је једна релативна јединица активности *SOD* дефинисана као она активност ензима која доводи до 50% инхибиције аутооксидације адреналина под дефинисаним условима.

Одређивање активности параоксоназе 1

Ниво параметара антиоксидативне заштите у серуму испитаника испитиван је и путем одређивање антиоксидативне активности параоксоназе 1 (енгл. *paraoxonase-1*, PON1), ензима који смањује оксидацију липида (*Litvinov u cap., 2012*). Параоксоназна активност је одређивана методом описаном од стране *Richter u Furlong (1999)*. Метода се заснива на конверзији параоксона, нефизиолошког супстрата *PON1* ензима, до *p*-нитрофенола који је жуто обојен у алкалној средини ($pH=8,5$). Брзина конверзије параоксона до *p*-нитрофенола је праћена кинетички мерењем промене апсорбанције/минути на 405 nm, што је максимум апсорбанције *p*-нитрофенолног аниона у који прелази *p*-нитрофенола у базној реакционој средини. Параоксоназна активност се изражава као број микромола насталог *p*-нитрофенола по минути или једноставније као U/L.

Одређивање садржаја сулфхидрилних група

Укупни садржај сулфхидрилних група (енгл. *sulfhydryl groups*, SHG) одређиван је *Ellman*-овом методом (*Ellman, 1959*) која се заснива на реакцији 2,2'-динитро-5,5'-дитионитробензојеве киселине са алифатичним тиолним једињењима у алкалној средини (фосфатни пуфер, $pH=9,0$). Апсорбанција жуто обојеног производа реакције *p*-нитрофенола се мери на 412 nm. Водени раствор глутатиона је коришћен као стандард у концентрационом опсегу 0,1-1 mmol/L.

Одређивање тоталног антиоксидативног статуса

Тотални антиоксидативни статус (енгл. *total antioxidant status*, TAS) одређен је модификованом спектрофотометријском методом (*Erel, 2004; Kotur-Stevuljevic u cap., 2015*) уз употребу 2,2'-азино-*bis*(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине (*ABTS*) као хромогена. Након оксидације овог хромогена до *ABTS* катјона уз водоник пероксид у киселој средини (ацетатни пуфер, $pH=3,6$), раствор добија карактеристичну смарагдну боју. Када се настали зелено обојени раствор помеша са супстанцама које могу да се оксидују (антиоксиданси присутни у серуму), долази до његове редукције у безбојни *ABTS*. Интензитет обезбојавања измерен на 660 nm, сразмеран је концентрацији присутних укупних антиоксиданаса, тј. антиоксидативном потенцијалу испитиваног узорка. Концентрације присутних антиоксиданаса у серуму су одређиване методом стандардне криве, уз употребу *Trolox*-а, хидросолубилног еквивалента витамина Е. Добијени резултати су изражени као *Trolox* еквиваленти ($\mu\text{mol/L}$).

3.4.6. Одређивање прооксидативно-антиоксидативног баланса

За мерење прооксидативно-антиоксидативног баланса (енгл. *pro-oxidant antioxidant balance*, PAB) коришћена је модификована *Hamidi-Alamdari* метода (*Alamdari u cap., 2007*) којом се одређује концентрација водоник пероксида у антиоксидативном окружењу. Извођење теста омогућава симултано одређивање прооксиданаса и антиоксиданаса у серуму, односно мерење постојеће равнотеже између њих. Метода се заснива на истовременој реакцији између хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (*TBM*) са водоник пероксидом и мокраћном киселином, с обзиром на то да се налазе у истој средини. Ова два једињења су изабрана за представнике прооксиданаса и антиоксиданаса пошто међусобно не реагују и не ометају активност једно другом према хромогену. Ензим пероксидаза катализује реакцију између водоник пероксида и *TBM*, при чему оксидацијом *TBM* настаје плаво обојен производ. Са друге стране, реакција мокраћне киселине и хромогена је некатализована хемијска реакција у којој се *TBM* катјон редукује до безбојног производа. Интензитети обојења раствора су сразмерни односу додатих количина водоник пероксида и мокраћне киселине. Апсорбанција се читава на 450 nm. *PAB* вредности су изражене у арбитрарним јединицама – *HKU* (хидроген-пероксид комплементарне јединице), које представљају проценат водоник пероксида у стандардним растворима.

3.4.7. Израчунавање прооксидативног, антиоксидативног и оксидативног скорa

Прооксидативни скор се добија израчунавањем средње вредности z -скорова прооксидативних параметара, а антиоксидативни скор као средња вредност z -скорова антиоксидативних параметара. Z -скор се рачуна према формули $(X-\mu)/\sigma$, где су: X - вредност одређеног параметра редокс статуса; μ - популациона средња вредност; σ - популациона стандардна девијација одређена у серумима здравих особа.

Разлика између вредности прооксидативног и антиоксидативног скорa представља оксидативни скор (окси-скор) који директно описује редокс потенцијал испитиваног узорка. Већа вредност овог скорa указује да су прооксиданси надвладали антиоксидансе у узорку, и обрнуто, мања вредност упућује да у узорку доминирају антиоксиданси.

3.4.8. Одређивање *hsCRP*

Високосензитивно одређивање *CRP* рађено је имунотурбиметријском методом тестовима *BioSystems*, са лимитом детекције 0,06 mg/L на аутоматском анализатору *Hitachi 7150* (Токио, Јапан). Као референтне вредности коришћене су препоручене вредности од стране Националне академије за клиничку биохемију, тако да су класификоване на следећи начин: значајне вредности за кардиоваскуларни ризик (ниски ризик < 1,0 mg/L), просечан ризик 1,0-3,0 mg/L, висок ризик > 3,0 mg/L, веома висок ризик \geq 10 mg/L) (*NACB LMPG Committee Members u cap., 2009*).

3.5. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података изведена је коришћењем *SPSS* статистичког програма (верзија 20.0, Чикаго, САД). Нормалност дистрибуције података проверавана је применом *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестова. Континуирани подаци су приказани као средња вредност и стандардна девијација за параметре чија је расподела следила нормалну, Гаусову дистрибуцију. Код параметара чија дистрибуција није следила нормалан ток, проверавана је дистрибуција логаритмованих вредности. За променљиве које су након извршене трансформације следили нормалну расподелу, резултати су приказани као геометријска средина и 95% интервал поузданости. За варијабле које након трансформације нису следили нормалну дистрибуцију, резултати су приказани као медијана и интерквartilни распони.

Категорички подаци су приказани као апсолутне и релативне фреквенце, а разлике између њих тестиране су употребом *Chi*-квадрат теста.

За испитивање корелације између различитих параметара који су одређивани у студији, рачунат је *Pearson-ов* коефицијент корелације (подаци са нормалном расподелом).

Континуиране варијабле које следе нормалну расподелу, као и континуиране варијабле које након логаритмовања следе нормалну расподелу, поређене су параметарским статистичким *Student t*-тестом. За анализирање више група параметарских података коришћена је двофакторска анализа варијансе (енгл. *analysis of variance*, ANOVA) са понављањем, уз *Bonferroni post hoc* тест. Променљиве које не прате нормалну расподелу поређене су *Mann-Whitney* тестом. За непараметарску анализу података који су резултат поновљених мерења коришћен је *Wilcoxon* тест означених рангова.

Анализа главних компоненти (енгл. *principal component analysis*, PCA) је примењена у циљу смањења великог броја испитиваних независних варијабли у групи, при чему израчуната нова варијабла представља комбинацију сваке од одређених варијабли. PCA коефицијенти се користе за интерпретацију значаја резултата (велика или мала корелација) и начина (позитивна или негативна корелација) на који мерене променљиве доприносе резултатима. Обрађени подаци укључили су нормално дистрибуиране варијабле, док су променљиве са расподелом која није била нормална уврштене након логаритамске трансформације. Издвојени фактори су одређени на основу *eigenvalues* >1. За интерпретацију фактора коришћене су варијабле са факторским оптерећењима $\geq 0,5$.

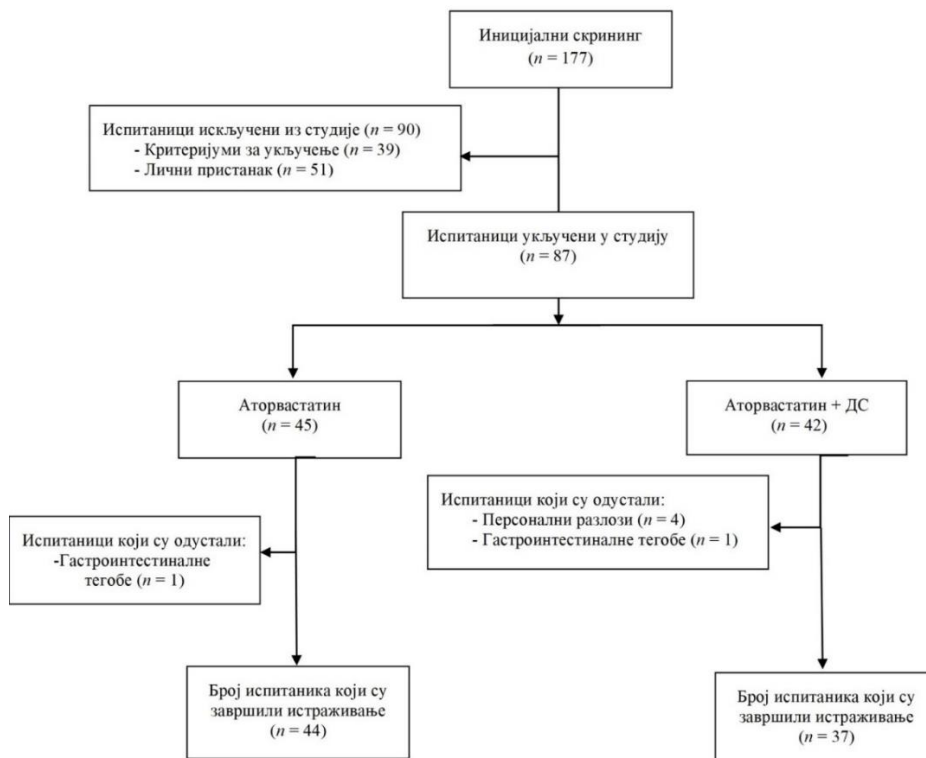
Као минимални услов за постојање статистички значајне разлике сматрана је вероватноћа $p < 0,05$.

Резултати су приказани табеларно и графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Дијаграм тока студије

Дизајн спроведеног истраживања дијетарне интервенције код пацијената на хроничној терапији аторвастатином приказан је на дијаграму студије (слика 7). Дијагноза дислипидемије и терапија аторвастатином у дози од 20 mg, минимум 4 месеца до тренутка укључења у студију, представљали су критеријуме за укључивање у студију, док су вредности триглицерида у серуму веће од 5,6 mmol/L, повишене вредности трансминаза, креатинкиназе, појава тромбозе, означени као критеријуми за искључење из истраживања (детаљан опис критеријума за укључење и критеријума за искључење дат је у делу *Испитаници и методе*). Након провере критеријума за укључење и критеријума за искључење код 177 пацијената, потврдан одговор за учешће у студији добијен је од 87 пацијената. Испитаници су по случајном избору (рандомизацијом) подељени у две групе које су уз редовну терапију аторвастатином узимале дијететски суплемент са октакозанолом, група АО (42 испитаника), или плацебо, група АП (45 испитаника), једном дневно, током 13 седмица. Шест учесника студије није завршило истраживање (лични разлози, гастроинтестиналне тегобе).



Слика 7. Дијаграм тока студије. ДС – дијететски суплемент са октакозанолом.

4.2. Демографске, антропометријске и клиничке карактеристике испитаника

На почетку истраживања узети су подаци о старости и полу, измерена је телесна висина и телесна маса, обим струка, обим кукова, проценат телесних масти и воде, а израчунат је индекс телесне масе и однос обима струка/обима кукова. Демографски подаци и антропометријске карактеристике свих испитаника, као и испитаника по групама, приказане су у **табели 5**.

Табела 5. Основни демографски подаци и антропометријске карактеристике испитаника

Параметар	Сви испитаници (n = 87)	Група АП (n = 45)	Група АО (n = 42)	p
Године старости	62,6 ± 7,8	61,5 ± 8,4	63,8 ± 7,1	0,165
Пол, м/ж	55/32	29/16	26/16	0,806
Пушачи, n (%)	21 (24,1)	11 (24,4)	10 (23,8)	0,945
Телесна маса (kg)	81 ± 13	81 ± 13	80 ± 13	0,774
Телесна висина (cm)	171 ± 9	172 ± 8	172 ± 9	0,773
Индекс телесне масе (kg/m ²)	27,6 ± 3,1	27,8 ± 2,9	27,4 ± 3,3	0,604
Обим струка (cm)	97,6 ± 10,3	98,4 ± 10,4	96,8 ± 10,4	0,446
Обим струка / обим кукова	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,090
Масно ткиво (%)	29,0 ± 6,0	30,0 ± 5,6	27,9 ± 6,4	0,130
Вода (%)	48,8 ± 3,8	48,3 ± 3,5	49,4 ± 4,0	0,181

Континуирани подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација. Категорички подаци су представљени као апсолутне и релативне фреквенце. Категоричке променљиве су поређене *Chi*-квадрат тестом. *Student t*-тест је коришћен за поређење континуираних варијабли. АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол

Испитиване групе су биле сличних година и пола, што је и очекивано с обзиром на критеријуме за укључивање у истраживање. Статистичком анализом утврђено је да нема разлике између почетних вредности антропометријских параметара између посматраних група испитаника (**табела 5**).

У **табели 6** приказана је учесталост претходних кардиоваскуларних догађаја у обе групе. У групи АО, претходни инфаркт миокарда био је присутан код више од 50% испитаника (23 пацијента) а у групи АП проценат је био скоро 65% (29 пацијената); учесталост претходно урађене коронарографије у обе групе износила је око 70%, при чему је имплантација стента спроведена код 62% испитаника у обе групе; док је бајпас графт урађен код 2 пацијента у обе групе. Породична предиспозиција за болести срца и крвних судова била је присутна код 20 испитаника (48%) из групе АО, док је у групи АП, учесталост позитивне породичне анамнезе већа за 10%, али без статистички значајне разлике између група. Такође, не уочава се статистички значајна разлика између испитиваних група у погледу учесталости употребе лекова за КВБ ($p>0,05$).

Табела 6. Клинички подаци о испитаницима

Параметар	Сви испитаници (<i>n</i> = 87)	Група АП (<i>n</i> = 45)	Група АО (<i>n</i> = 42)	<i>p</i>
Породична историја исхемијске болести срца, <i>n</i> (%)	46 (52,9)	26 (57,8)	20 (47,6)	0,343
Примарна превенција, <i>n</i> (%)	20 (23,0)	9 (20,0)	11 (26,2)	0,493
Инфаркт миокарда, <i>n</i> (%)	52 (59,8)	29 (64,4)	23 (54,8)	0,357
Налаз коронарографије, <i>n</i> (%)	63 (72,4)	33 (73,3)	30 (71,4)	0,843
Присуство стента, <i>n</i> (%)	54 (62,1)	28 (62,2)	26 (61,9)	0,976
Присуство бајпас графта, <i>n</i> (%)	4 (4,6)	2 (4,4)	2 (4,8)	0,944
<i>Diabetes mellitus</i> , <i>n</i> (%)	23 (26,4)	12 (26,7)	11 (26,2)	0,960
Систолни крвни притисак [#]	130 (120-140)	130 (120-140)	130 (120-140)	0,368
Дијастолни крвни притисак [#]	80 (80-80)	80 (80-80)	80 (80-80)	0,345
Лекови у терапији кардиоваскуларних болести				
Аспирин/клопидогрел, <i>n</i> (%)	77 (88,5)	39 (86,7)	38 (90,5)	0,578
Бета-блокатори, <i>n</i> (%)	70 (80,5)	38 (84,4)	32 (76,2)	0,332
Блокатори калцијумових канала, <i>n</i> (%)	25 (28,7)	12 (26,7)	13 (31,0)	0,659
Инхибитори ангиотензин конвертујућег ензима/сартани, <i>n</i> (%)	75 (86,2)	41 (91,1)	34 (81,0)	0,170
Остали антихипертензивни лекови, <i>n</i> (%)	11 (12,6)	4 (8,9)	7 (16,7)	0,275
Диуретици, <i>n</i> (%)	41 (47,1)	23 (51,1)	18 (42,9)	0,441
Антиангинални лекови, <i>n</i> (%)	40 (46,0)	20 (44,4)	20 (47,6)	0,767

Резултати су представљени као апсолутне и релативне фреквенце, или као медијана и интерквartilни распон ([#]). Категоричке променљиве су поређене *Chi*-квадрат тестом. *Mann-Whitney* тест је коришћен за поређење континуираних података. АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол

4.3. Утицај суплементације октакозанолом на концентрације *PCSK9* и параметре липидног профила у крви пацијената

Параметри липидног профила испитаника на почетку истраживања (базални статус), после 8 седмица и после 13 седмица дијетарне интервенције приказани су у **табели 7**. Обрађени су подаци свих учесника који су завршили студију. Комбинованом анализом варијансе поновљених мерења утврђено је да испитаници у групи АО, имају значајно ниже концентрације триглицерида на почетку студије у односу на групу АП ($p < 0,05$). Није уочена статистички значајна разлика у почетним вредностима осталих анализираних параметара липидног профила између посматраних група.

Табела 7. Концентрације *PCSK9* и параметара липидног статуса на почетку, после 8 и после 13 седмица дијетарне интервенције

	Базални статус	8 седмица	13 седмица	<i>T</i> <i>S</i> <i>T x S</i>
<i>PCSK9</i> (ng/mL)				
Група АП	245,24 ± 130,27	264,91 ± 102,85	264,54 ± 160,63	0,698
Група АО	233,96 ± 121,23	236,41 ± 94,18	237,80 ± 97,95	0,218 0,807
Холестерол, укупни (mmol/L)				
Група АП	4,61 ± 1,1	4,53 ± 0,9	4,69 ± 1,0	0,192
Група АО	4,60 ± 1,0	4,85 ± 1,2	4,84 ± 1,1	0,479 0,165
Триглицериди (mmol/L)*				
Група АП	1,49 (1,28 – 1,72)	1,64 (1,43 -1,87)	1,55 (1,34 – 1,79)	0,007 0,012 0,731
Група АО	1,16 (1,03 -1,32)	1,35 (1,17 -1,56) ^a	1,20 (1,03 -1,41)	
<i>HDL</i>-холестерол (mmol/L)				
Група АП	1,30 ± 0,3	1,37 ± 0,3	1,50 ± 0,4 ^{aa,b}	0,007 0,416 0,041
Група АО	1,45 ± 0,4	1,40 ± 0,3	1,47 ± 0,3	
<i>LDL</i>-холестерол (mmol/L)				
Група АП	2,70 ± 1,1	2,36 ± 0,8 ^a	2,53 ± 1,0	0,761 0,341 0,023
Група АО	2,61 ± 0,8	2,81 ± 1,1	2,73 ± 1,1	
<i>ApoA1</i> (g/L)				
Група АП	1,41 ± 0,2	1,44 ± 0,3	1,42 ± 0,2	0,638 0,389 0,309
Група АО	1,48 ± 0,2	1,46 ± 0,2	1,45 ± 0,2	
<i>ApoB100</i> (g/L)				
Група АП	1,87 ± 0,5	1,86 ± 0,4	1,97 ± 0,5	0,025 0,632 0,084
Група АО	1,84 ± 0,5	2,02 ± 0,6 ^a	1,98 ± 0,6	

Резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; односно као геометријска средина са 95% интервалом поузданости (*). ANOVA: *T* – главни утицај времена; *S* – главни утицај суплементације; *T x S* – утицај интеракције времена и суплементације. ^a - статистички значајне разлике између 13.седмице и базалног статуса; ^b - статистички значајне разлике између 8.седмице и базалног статуса. ^{a, b} *p*<0,05; ^{aa} *p*<0,01. АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол; *PCSK9* – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *LDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима мале густине; *HDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима велике густине; *ApoA1* – аполипопротеин А1; *ApoB100* – аполипопротеин В100

Концентрације триглицерида у серуму су значајно повећане након 8 седмица у поређењу са почетним вредностима у групи АО (главни ефекат времена ($p < 0,01$; *Bonferroni* тест), али је ефекат нестао након 13 седмица (**Табела 7**). Вредности *PCSK9* су остале константне у обе групе током периода истраживања. Такође, концентрације укупног холестерола и *ApoAI* нису се значајно промениле за време истраживања у обе групе. Комбинована анализа варијансе поновљених мерења је показала значајно смањење нивоа *LDL*-холестерола након 8 седмица у поређењу са вредностима на почетку, и то само у групи АП, али се тај ефекат није задржао до краја истраживања. Нису примећене промене у односу на почетне вредности *HDL*-холестерола код пацијената у групи АО током периода од 13 недеља. Показан је значајан утицај интеракције времена и терапије ($p = 0,041$; *Bonferroni* тест) на повећање вредности *HDL*-холестерола у групи АП. Уочено је да ниво *ApoB100* значајно повећан након 8 недеља у поређењу са почетним вредностима ($p < 0,05$; *Bonferroni* тест) у групи АО, али је ефекат нестао на крају истраживања, након 13 седмица.

4.3.1. Испитивање корелација *PCSK9* и параметара липидног профила

Даља анализа је укључивала проверу постојања корелација између вредности *PCSK9* и параметара липидног статуса, како на почетку студије (базалне вредности) тако и на крају истраживања. Коришћена је метода *Pearson*-ове параметарске корелационе анализе и одговарајући коефицијенти корелације приказани су у **табели 8** и **табели 9**. У посматраним групама, параметарска корелациона анализа показала је да сви анализирани параметри нису у статистички значајној корелацији како на почетку, тако и на крају студије.

Табела 8. *Pearson*-ова корелациона анализа параметара липидног статуса са *PCSK9* на почетку студије у групи АО и групи АП

Параметар	Група АП ($n = 45$)	Група АО ($n = 42$)
холестерол, укупни (mmol/L)	-0,050	-0,242
<i>LDL</i> -холестерол (mmol/L)	-0,036	-0,163
<i>HDL</i> -холестерол (mmol/L)	0,011	-0,180
Триглицериди (mmol/L)	0,114	-0,067
<i>APOAI</i> (g/L)	0,003	0,017
<i>APOB100</i> (g/L)	-0,016	-0,208

Приказани су *Pearson* -ови коефицијенти корелације.

АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол

Табела 9. *Pearson*-ова корелациона анализа параметара липидног статуса са *PCSK9* на крају студије у групи АО и групи АП

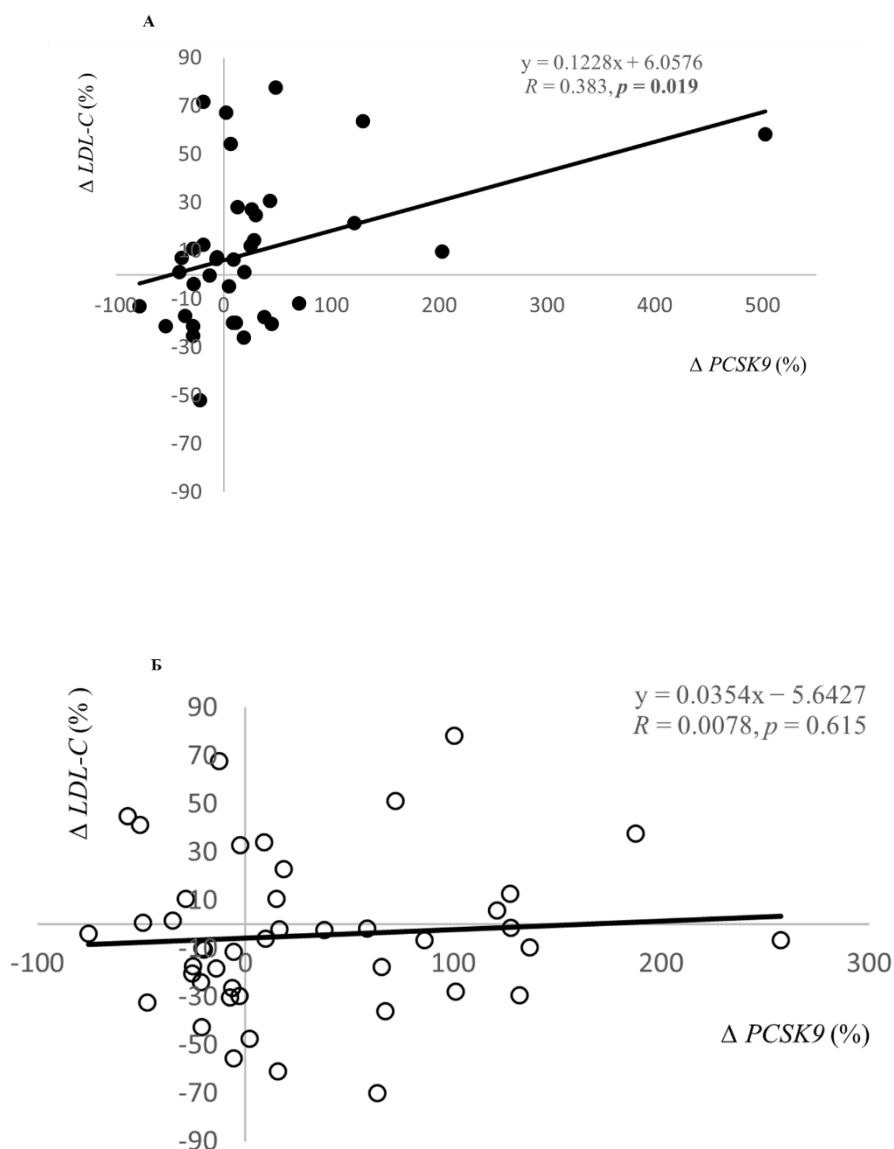
Параметар	Група АП ($n = 44$)	Група АО ($n = 37$)
холестерол, укупни (mmol/L)	0,027	0,074
<i>LDL</i> -холестерол (mmol/L)	-0,101	0,080
<i>HDL</i> -холестерол (mmol/L)	0,149	-0,102
Триглицериди (mmol/L)	0,077	0,066
<i>APOAI</i> (g/L)	0,029	-0,038
<i>APOB100</i> (g/L)	-0,077	0,075

Приказани су *Pearson* -ови коефицијенти корелације.

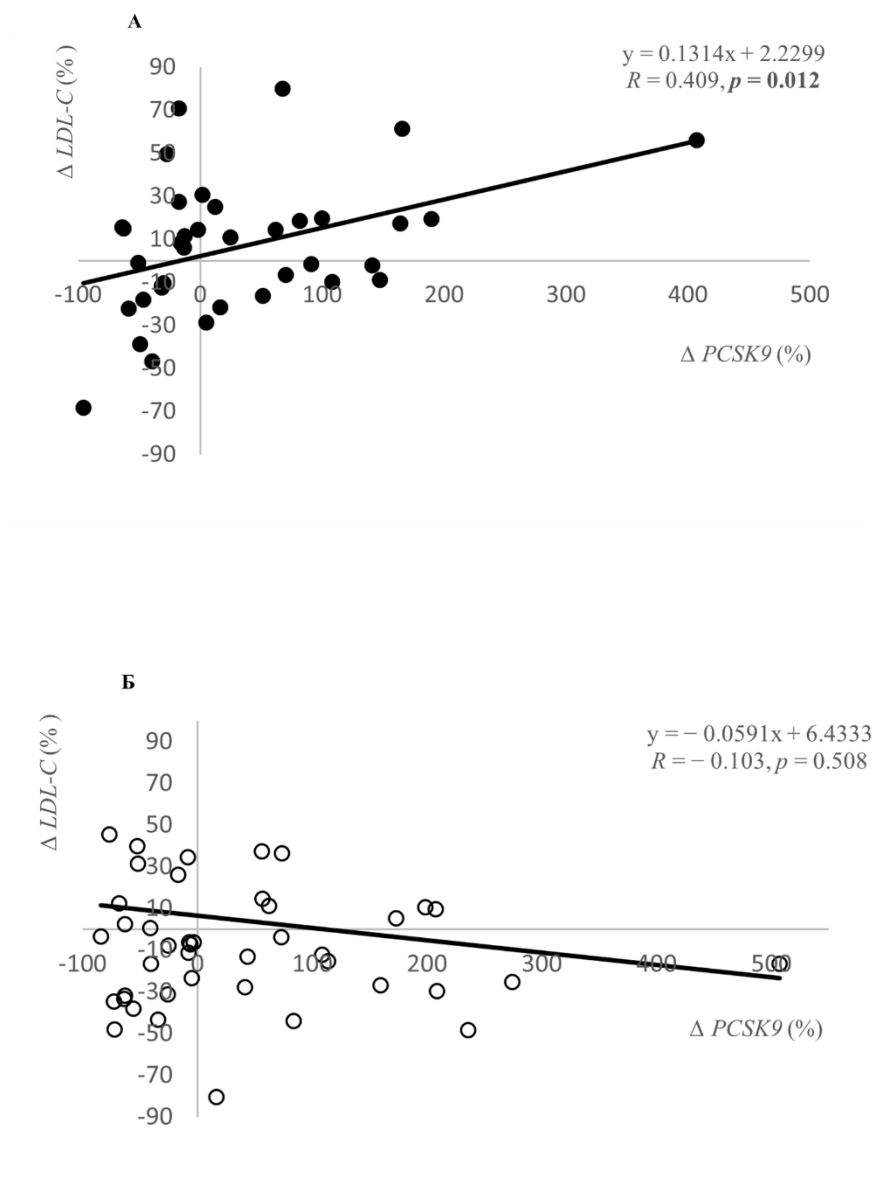
АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол

Имајући у виду важност процентуалних промена параметара липидог профила у различитим временским интервалима, испитивана је повезаност између промена концентрација *PCSK9* и *LDL*-холестерола, као и *PCSK9* и *HDL*-холестерола.

Испитивање корелација процентуалних промена вредности *PCSK9* са процентуалним променама *LDL*-холестерола након 8 и након 13 седмица у односу на почетне вредности (базални статус) приказане су на **слици 8** и **слици 9**. Резултати ових анализа показали су статистички значајну вредност корелације између ефекта комбинације аторвастатина и октакозанола на процентуалне промене *PCSK9* и *LDL*-холестерола. Прецизније, позитивна корелација је забележена између процентуалних промена у вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола након 8 седмица дијетарне интервенције ($R=0,383$; $p=0,019$), која се задржала све до краја студије у поређењу са почетним вредностима ($R=0,409$; $p=0,012$) (**слике 8А и 9А**). У групи АП нису добијене статистички значајне корелације између анализираних параметара ни у једном од посматраних временских интервала: 8. седмица ($R=0,008$; $p=0,615$) и 13. седмица ($R=-0,103$; $p=0,508$) (**слике 8Б и 9Б**).

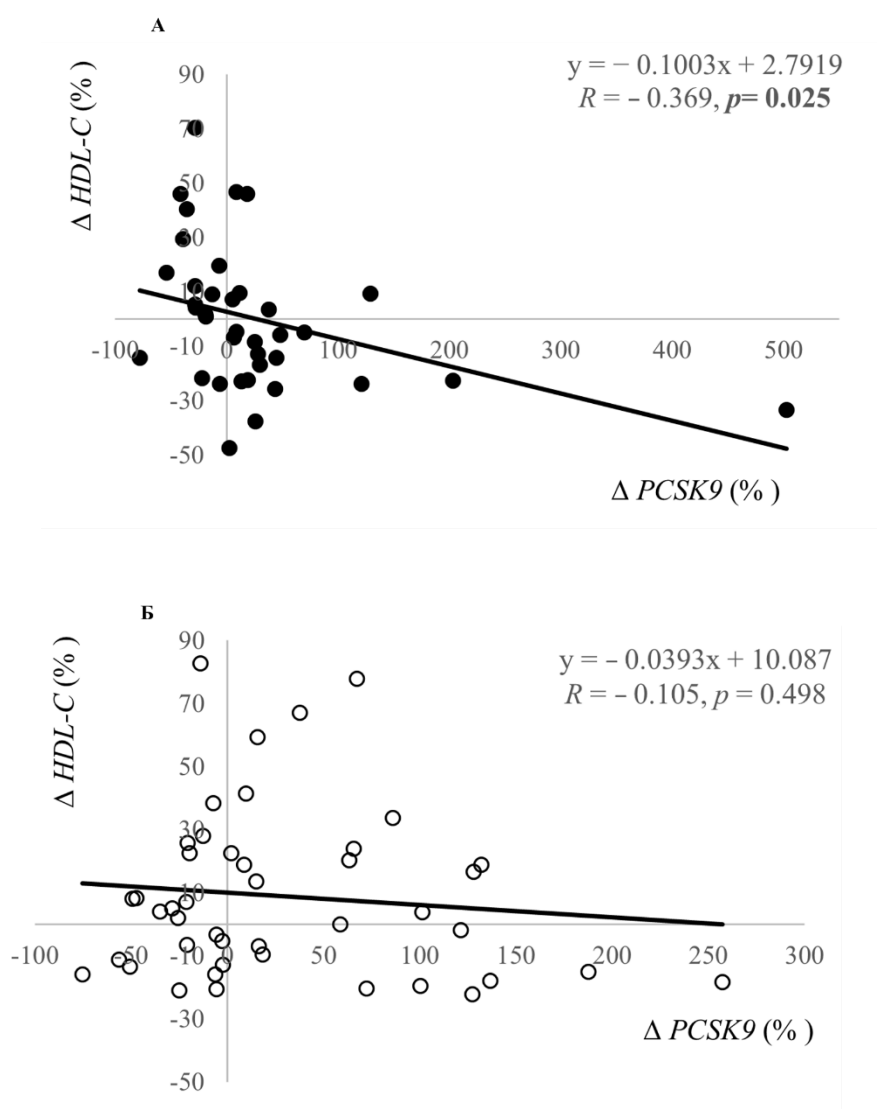


Слика 8. Корелације процентуалних промена вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола након 8 седмица студије. Појединачне вредности параметара испитаника у групама (●) аторвастатин + октакозанол (А) и (○) аторвастатин + плацебо (Б). $\Delta PCSK9 (\%)$ – % промене *PCSK9* вредности између 8.седмице и базалних вредности (почетак студије); $\Delta LDL-C (\%)$ – % промена вредности *LDL*-холестерола између 8.седмице и базалних вредности (почетак студије); *PCSK9* – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *LDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима мале густине; *R*–кофицијент корелације.

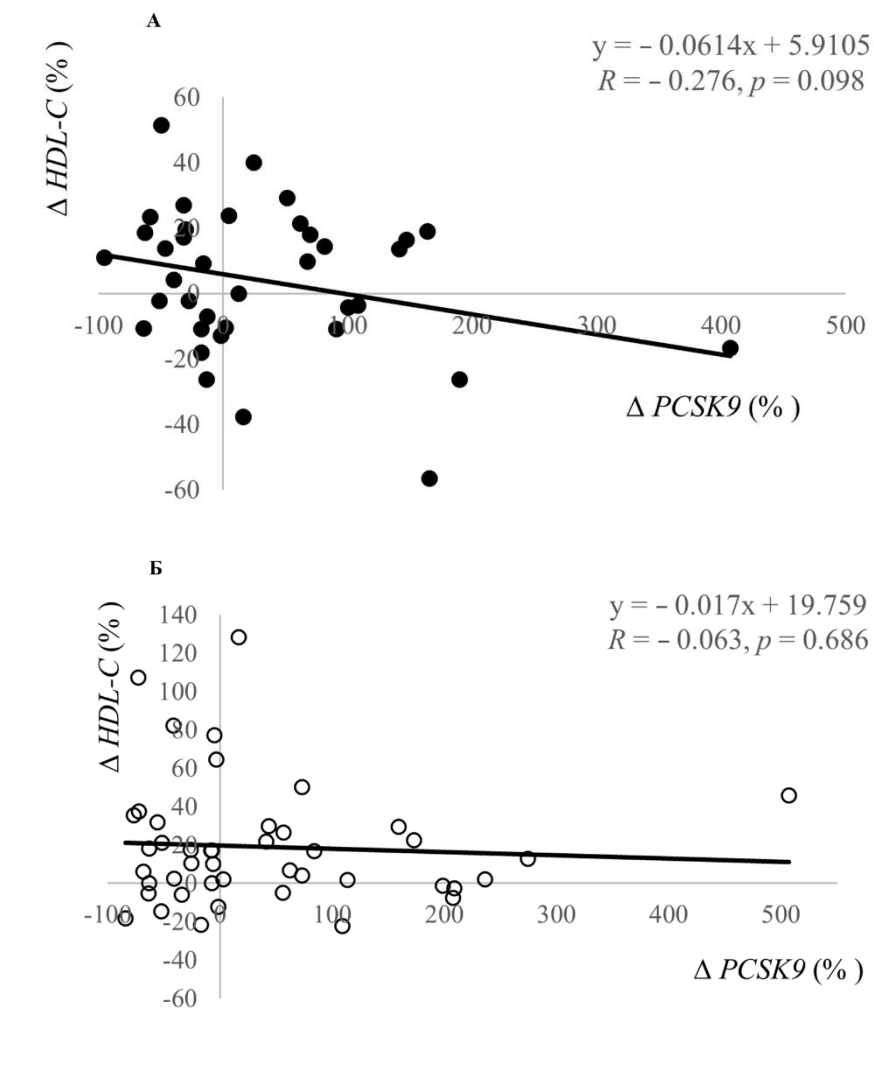


Слика 9. Корелације процентуалних промена вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола након 13 седмица студије. Појединачне вредности параметара испитаника у групама (●) аторвастатин + октакозанол (А) и (○) аторвастатин + плацебо (Б). $\Delta PCSK9$ (%) – % промене *PCSK9* вредности између 13.седмице и базалних вредности (почетак студије); $\Delta LDL-C$ (%) – % промена вредности *LDL*-холестерола између 13.седмице и базалних вредности (почетак студије); *PCSK9* – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *LDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима мале густине; *R*–коэффициент корелације.

На слици 10 и слици 11 приказане су корелације процентуалних промена вредности *PCSK9* са процентуалним променама *HDL*-холестерола након 8 и након 13 седмица у односу на почетне вредности (базални статус). Утврђена је статистички значајна негативна корелација између процентуалних промена у вредностима *PCSK9* и *HDL*-холестерола након 8 седмица у групи испитаника који су суплементирани октакозанолом ($R=-0,369$; $p=0,025$), али на крају истраживања добијена корелација није била статистички значајна ($R=-0,276$; $p=0,098$) (слике 10А и 11А). За групу испитаника која је узимала аторвастатин нису добијене статистички значајне корелације између анализираних параметара ни у једном од посматраних временских интервала: 8. седмица ($R=-0,105$; $p=0,498$) и 13. седмица ($R=-0,063$; $p=0,686$) (слике 10Б и 11Б).



Слика 10. Корелације процентуалних промена вредности *PCSK9* и *HDL*-холестерола након 8 седмица студије. Појединачне вредности параметара испитаника у групама (●) аторвастатин + октакозанол (А) и (○) аторвастатин + плацебо (Б). $\Delta PCSK9 (\%)$ – % промена *PCSK9* вредности између 8.седмице и базалне вредности (почетак студије); $\Delta HDL-C (\%)$ – % промена вредности *HDL*-холестерола између 8.седмице и базалне вредности (почетак студије); *PCSK9* – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *HDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима велике густине; *R*–коэффициент корелације.



Слика 11. Корелације процентуалних промена вредности *PCSK9* и *HDL*-холестерола након 13 седмица студије. Појединачне вредности параметара испитаника у групама (●) аторвастатин + октакозанол (А) и (○) аторвастатин + плацебо (Б). $\Delta PCSK9 (\%)$ – % промена *PCSK9* вредности између 13.седмице и базалне вредности (почетак студије); $\Delta HDL-C (\%)$ – % промена вредности *HDL*-холестерола између 13.седмице и базалне вредности (почетак студије); *PCSK9* – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *HDL*-холестерол – холестерол у липопротеинима велике густине; *R*– коефицијент корелације.

4.4. Утицај суплементације октакозанолом на вредности глукозе у серуму и на оштећење мишића

У циљу испитивања утицаја суплементације октакозанолом на вредности глукозе у серуму, као и на оштећење мишића изазвано хроничном терапијом аторвастатином, упоређене су вредности глукозе, ензима трансминаза и креатин-киназе између суплементираних и плацебо групе применом *ANOVA* теста са понављањем. У **табели 10** приказане су концентрације глукозе, *AST*, *ALT* и *СК* на почетку истраживања (базални статус), после 8 седмица и после 13 седмица дијетарне интервенције. Иако на почетку студије није било статистички значајних разлика у вредностима трансминаза између испитиваних група, на крају посматраног периода уочене су разлике у вредностима ових параметара. Ниво *AST* значајно опада у обе групе, уз израженије смањење у групи испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанол (главни ефекат времена, $p < 0,001$; *Bonferroni* тест). Поред тога, суплементација октакозанолом значајно је смањила и вредности *ALT* на крају периода студије (међусобно дејство октакозанола и времена, $p < 0,05$; *Bonferroni* тест). Вредности глукозе и *СК* нису се значајно мењале током посматраног периода.

Табела 10. Концентрације глукозе, трансминаза и креатин киназе на почетку, после 8 и после 13 седмица дијетарне интервенције

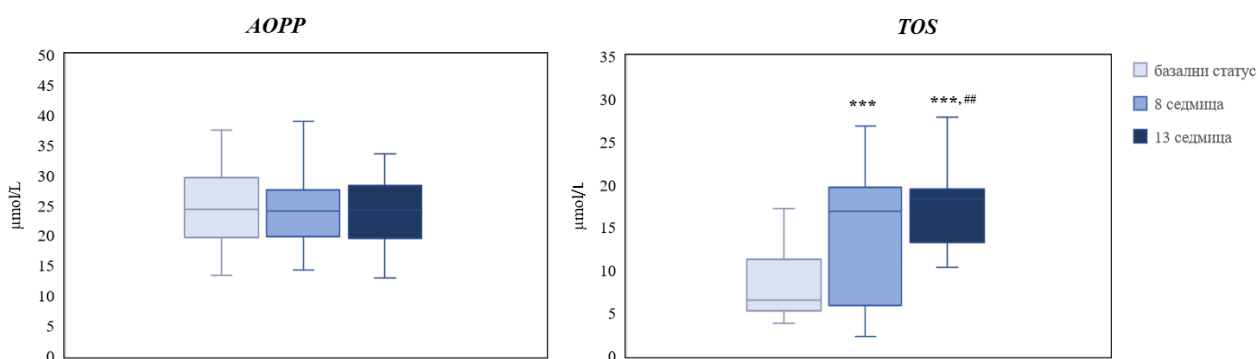
	Базални статус	8 седмица	13 седмица	<i>T</i> <i>S</i> <i>T x S</i>
Глукоза (mmol/L)*				
Група АП	5,85 (5,44 – 6,28)	6,08 (5,65 – 6,50)	6,21 (5,88 – 6,54)	0,292
Група АО	5,86 (5,41 – 6,30)	5,88 (5,43 – 6,33)	5,88 (5,53 – 6,23)	0,493
				0,399
<i>ALT</i> (U/L)				
Група АП	22,6 ± 7,1	21,9 ± 6,8	22,1 ± 5,9	0,049
Група АО	21,2 ± 4,9	19,2 ± 5,1	19,0 ± 5,1 ^a	0,059
				0,357
<i>AST</i> (U/L)*				
Група АП	24,1 (22,6 - 25,7)	23,5 (21,9 - 25,3)	21,6 (20,1 - 23,3) ^a	0,000
Група АО	23,1 (21,5 - 24,8)	22,3 (20,6 - 24,1)	19,7 (18,2 - 21,3) ^{aa,b}	0,641
				0,120
<i>СК</i> (U/L) *				
Група АП	99,5 (83,4 - 118,8)	111,9 (93,1 - 134,3)	105,9 (88,9 - 126,2)	0,529
Група АО	107,1 (88,1 - 130,0)	105,7 (86,5 - 128,8)	98,2 (81,3 - 118,8)	0,828
				0,413

Резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; односно као геометријска средина са 95% интервалом поузданости (*). *ANOVA*: *T* – главни утицај времена; *S* – главни утицај суплементације; *T x S* – утицај интеракције времена и суплементације. ^a - статистички значајне разлике између 13.седмице и базалног статуса; ^b - статистички значајне разлике између 8.седмице и базалног статуса. ^{a, b} $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$. АП – аторвастатин+плацебо; АО – аторвастатин +октакозанол *ALT* – аланин аминотрансфераза; *AST* – аспартат аминотрансфераза; *СК* – креатин киназа

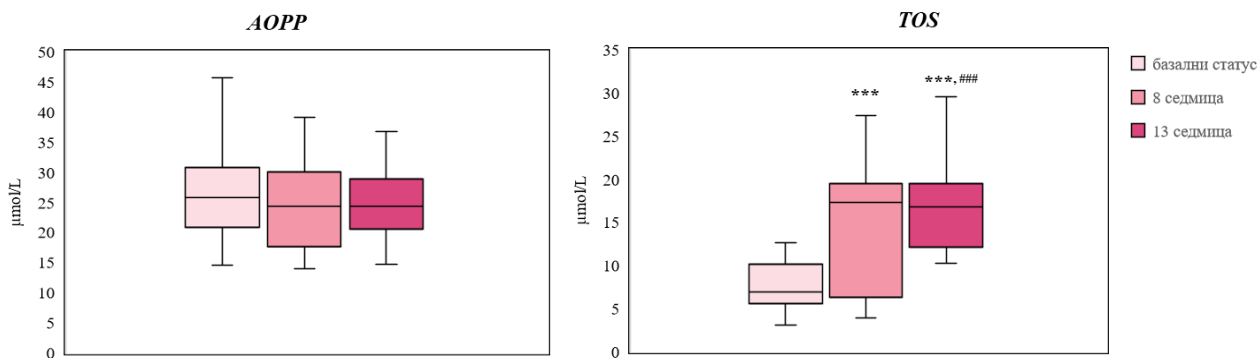
4.5. Утицај суплементације октакозанолом на параметре редокс статуса

4.5.1. Параметри оксидативног стреса

За процену нивоа оксидативног стреса и динамику његове промене под утицајем примењеног третмана у студији: 1) аторвастатин у комбинацији са октакозанолом (**слика 12**), 2) аторвастатин у комбинацији са плацебом (**слика 13**), одређен је *TOS* и концентрација *AOPP* на почетку студије, после 8 и после 13 седмица. *Wilcoxon* тестом утврђено је значајно повећање *TOS*, након оба посматрана временска интервала, у односу на почетне вредности ($p < 0,001$), независно од примењеног третмана. Концентрације *AOPP*, индиректног параметра оксидативног оштећења ћелија, су опадале у обе посматране групе, али промене нису биле статистички значајне.



Слика 12. Параметри оксидативног стреса на почетку, после 8 и после 13 седмица у групи испитаника која је уз аторвастатин узимала октакозанол. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. * статистички значајна разлика у односу на базални статус; # - статистички значајна разлика у односу на 8. седмицу. ## $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (*Wilcoxon* тест означених рангова); *TOS* – тотални оксидативни статус; *AOPP* – продукти узапредовале оксидације протеина.

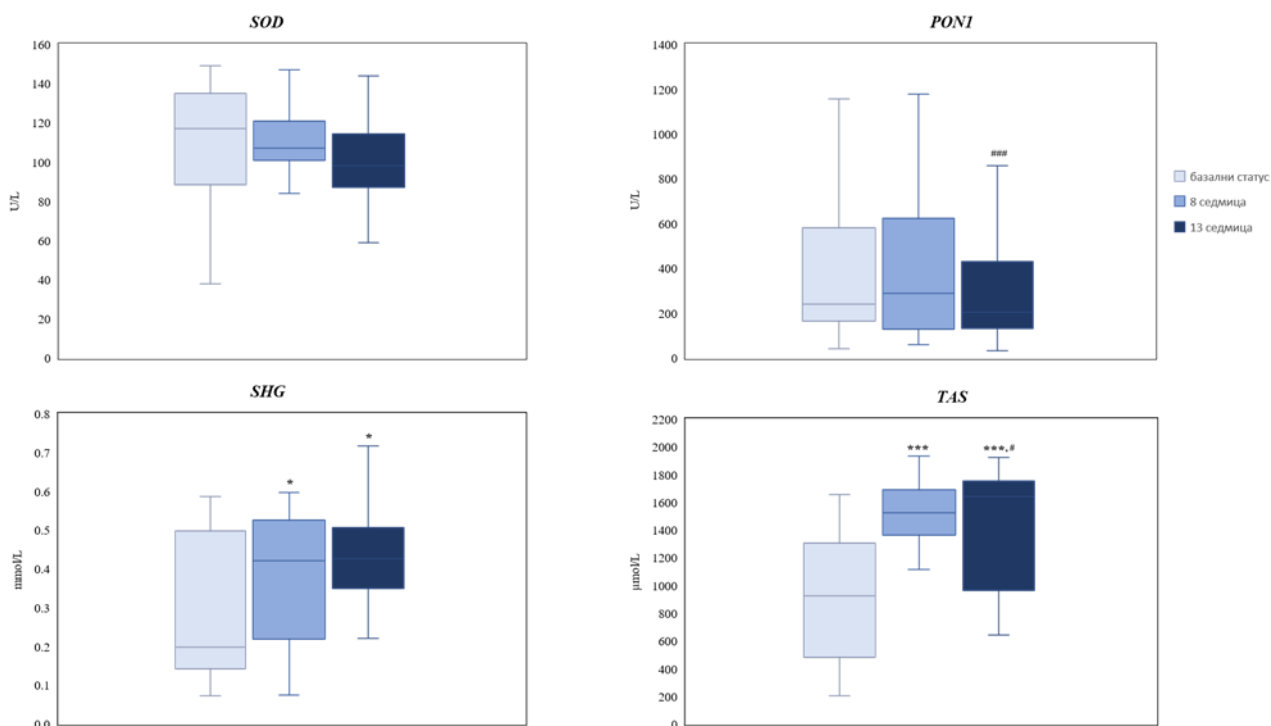


Слика 13. Параметри оксидативног стреса на почетку, после 8 и после 13 седмица у групи испитаника која је уз аторвастатин узимала плацебо. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. * статистички значајна разлика у односу на базални статус; # - статистички значајна разлика у односу на 8. седмицу. ***, ### $p < 0,001$ (*Wilcoxon* тест означених рангова); *TOS* – тотални оксидативни статус; *AOPP* – продукти узапредовале оксидације протеина.

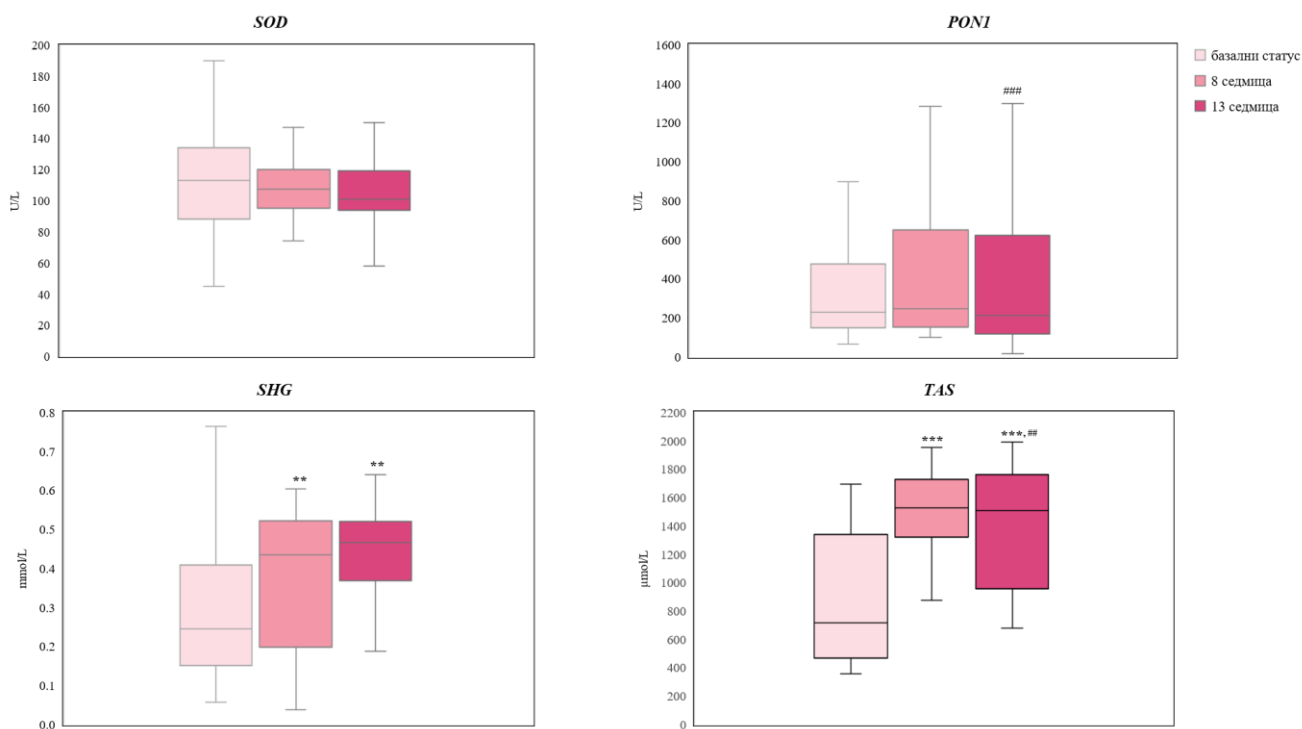
4.5.2. Параметри антиоксидативне заштите

Утицај примењеног третмана (октакозанол или плацебо) уз аторвастатин на антиоксидативни статус праћен је одређивањем укупног садржаја *SH* група, мерењем активности *SOD* и *PONI* у серуму, као и одређивањем *TAS* на почетку студије, након 8 и након 13 седмица. Добијени резултати приказани су графички на **сликама 14** и **15**. Није било статистички значајне разлике између почетних вредности анализираних параметара у обе посматране групе. Уочене промене параметара током времена нису се одвијале на различите начине у односу на примењен третман.

SOD је главни ензим који неутралише супероксидни анјон и део је прве линије одбране од оксидативног стреса. Након 13 седмица студије није забележена промена активности *SOD* у обе посматране групе. Сличан резултат је утврђен и у погледу динамике активности *PONI* која је одређивана према параоксону као супстрату. Иако нису забележене разлике између базалних вредности *PONI* и вредности након 8 и 13 седмица, уочен је пад активности *PONI* на крају студије у поређењу са претходном контролном тачком (8. седмица). *Post hoc* анализа је показала да је промена статистички значајна у обе посматране групе ($p < 0,001$). *SH* групе протеина заузимају важно место у ендоденом систему антиоксидативне заштите, заједно са антиоксидативним ензимима. Уочено је повећање нивоа *SH* група у обе групе, и после 8. седмице и после 13. седмице, у односу на ниво пре почетка третмана ($p < 0,05$, обе групе). *TAS*, маркер свеукупне антиоксидативне заштите, значајно је имао више вредности током времена, у оба посматрана интервала. Утврђене су статистички значајне разлике у свакој контролној тачки у поређењу са претходним вредностима, и то у обе групе испитаника ($p < 0,001$; поређење вредности у 8. и 13. седмици са базалним вредностима; $p < 0,05$ поређење вредности између 8. и 13. седмице).



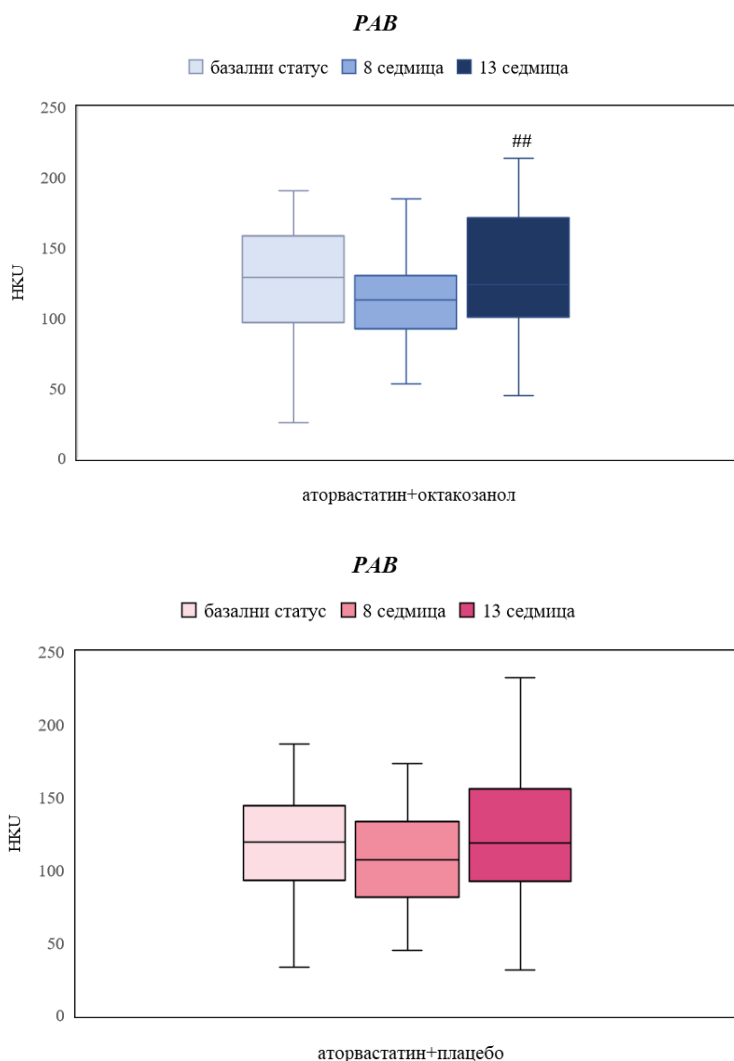
Слика 14. Параметри антиоксидативне заштите на почетку, после 8 и после 13 седмица у групи испитаника која је уз аторвастатин узимала октакозанол. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. * статистички значајна разлика у односу на базални статус; # - статистички значајна разлика у односу на 8. седмицу. *,# $p < 0,05$; ***,### $p < 0,001$ (Wilcoxon тест означених рангова); *TAS* – тотални антиоксидативни статус; *SOD* – супероксид дисмутаза; *SHG* – сулфихидрилне групе; *PONI* – параоксоназа 1.



Слика 15. Параметри антиоксидативне заштите на почетку, после 8 и после 13 седмица у групи испитаника која је уз аторвастатин узимала плацебо. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. * статистички значајна разлика у односу на базални статус; # - статистички значајна разлика у односу на 8. седмицу. ***,### $p < 0,01$; ***,### $p < 0,001$ (Wilcoxon тест означених рангова); TAS – тотални антиоксидативни статус; SOD – супероксид дисмутаза; SHG – сулфхидрилне групе; PON1 – параоксоназа 1.

4.5.3. Прооксидативно-антиоксидативни баланс

Промене у вредностима *PAB*, параметра равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса, током периода дијетарне интервенције у испитиваним групама приказане су на **слици 16**. Резултати показују да постоји статистички значајна разлика ($p < 0,01$) у вредностима *PAB* у серуму испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанол, између вредности на крају студије и вредности након 8 седмице. Између базалних вредности *PAB* у испитиваним групама није било статистички значајне разлике.

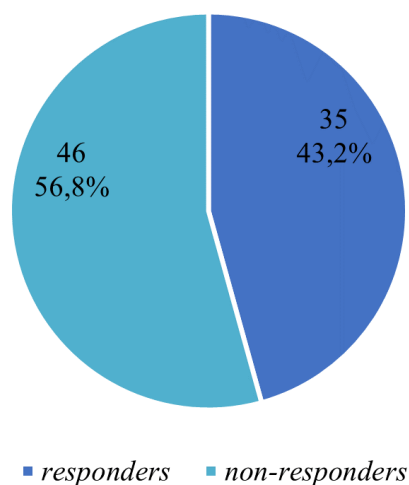


Слика 16. Параметри прооксидативне-антиоксидативне заштите на почетку, после 8 и после 13 седмица у групама испитаника која је уз аторвастатин узимала октакозанол или плацебо. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. ## - статистички значајна разлика у односу на 8. седмицу ($p < 0,01$) (*Wilcoxon* тест означених рангова); *PAB* – прооксидативно-антиоксидативни баланс.

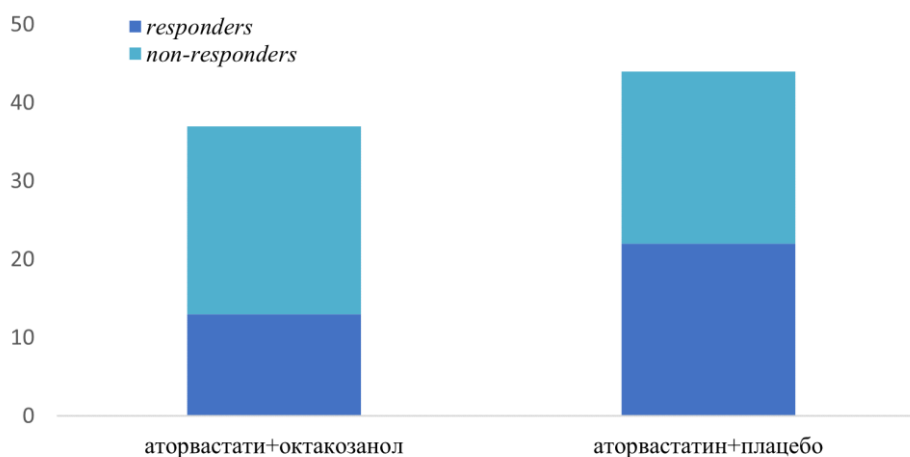
4.6. Анализа *PCSK9*, параметара липидног профила, редокс статуса и антиоксидативне заштите у зависности од одговора испитаника на крају студије

4.6.1. Демографске, антропометријске и клиничке карактеристике у групама *responders* и *non-responders*

За параметре жељеног одговора након 13 седмица дијетарне интервенције, дефинисане су промене у концентрацији вредности холестерола, и то: процентуално смањење вредности *LDL*-холестерола и процентуално повећање вредности *HDL*-холестерола, у поређењу са базалним статусом. Према овим параметрима у групи *responders* било је 35, а у групи *non-responders* 46 испитаника (слика 17). Расподела *responders* и *non-responders* испитаника у групама АО и АП приказана је на слици 18.



Слика 17. Процент *responders/non-responders* од укупног броја испитаника



Слика 18. Заступљеност *responders/non-responders* у групама испитаника који су уз аторвастатин узимали октакозанол или плацебо

Табела 11. Основни демографски подаци и антропометријске карактеристике у групама *responders* и *non-responders*

Параметар	<i>Responders</i> (<i>n</i> = 35)	<i>Non-responders</i> (<i>n</i> = 46)	<i>p</i>
Године старости	63,1 ± 7,1	61,9 ± 8,4	0,511
Пол, м/ж	22/13	29/17	0,986
Пушачи, <i>n</i> (%)	12 (34,3)	7 (15,2)	0,045
Телесна маса (kg)	82 ± 12	80 ± 13	0,459
Телесна висина (cm)	170 ± 9	171 ± 7	0,750
Индекс телесне масе (kg/m ²)	28,2 ± 3,3	27,2 ± 4,0	0,262
Обим струка (cm)	99,3 ± 7,7	96,7 ± 11,8	0,266
Обим струка / обим кукова	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,120
Масно ткиво (%)	29,5 ± 5,8	29,0 ± 6,3	0,717
Вода (%)	48,8 ± 3,4	48,6 ± 4,1	0,837

Континуирани подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација. Категорички подаци су представљени као апсолутне и релативне фреквенце. Категоричке променљиве су поређене *Chi*-квадрат тестом. *Student t*-тест је коришћен за поређење континуираних варијабли.

У групама *responders* и *non-responders* статистичком анализом утврђено је да нема разлике између демографских карактеристика као и почетних вредности антропометријских параметара изузев учесталости пушења дувана (**табела 11**). На основу *Chi* квадрат теста показано је да постоје статистички значајне разлике у статусу пушења између *responders* (34,3%) и *non-responders* (15,2%) групе.

У **табели 12** приказани су резултати који се односе на клиничке податке испитаника у групама *responders* и *non-responders*. Између анализираних група није било статистички значајних разлика у погледу посматраних клиничких параметара, сем у погледу употребе диуретика, које знатно више користе испитаници у групи *non-responders* ($p < 0,05$).

Табела 12. Клинички подаци у групама *responders* и *non-responders*

Параметар	<i>Responders</i> (<i>n</i> = 35)	<i>Non-responders</i> (<i>n</i> = 46)	<i>p</i>
Породична историја исхемијске болести срца, <i>n</i> (%)	24 (68,6)	21 (45,7)	0,200
Примарна превенција, <i>n</i> (%)	7 (20,0)	12 (26,1)	0,522
Инфаркт миокарда, <i>n</i> (%)	21 (60,0)	26 (56,5)	0,269
Налаз коронарографије, <i>n</i> (%)	24 (68,6)	35 (76,1)	0,451
<i>Diabetes mellitus</i> , <i>n</i> (%)	11 (31,4)	9 (19,6)	0,220
Систолни крвни притисак [#]	130 (120-140)	130 (115-140)	0,276
Дијастолни крвни притисак [#]	80 (80-80)	80 (80-80)	0,142
Аторвастатин, <i>n</i> (%)	22 (62,9)	22 (47,8)	0,179
Аторвастатин + октакозанол, <i>n</i> (%)	13 (37,2)	24 (52,2)	
Лекови у терапији кардиоваскуларних болести			
Аспирин/клопидогрел, <i>n</i> (%)	32 (91,4)	40 (87,0)	0,526
Бета-блокатори, <i>n</i> (%)	29 (82,9)	38 (82,6)	0,332
Блокатори калцијумових канала, <i>n</i> (%)	8 (22,9)	14 (30,4)	0,448
Инхибитори ангиотензин конвертујућег ензима/сартани, <i>n</i> (%)	31 (88,6)	39 (84,8)	0,622
Диуретици, <i>n</i> (%)	11 (31,4)	28 (60,9)	0,009
Антиангинални лекови, <i>n</i> (%)	17 (48,6)	21 (45,7)	0,794

Резултати су представљени као апсолутне и релативне фреквенце, или као медијана и интерквartilни распон ([#]). Категоричке променљиве су поређене *Chi*-квадрат тестом. *Mann-Whitney* тест је коришћен за поређење континуираних података.

4.6.2. Биохемијски параметри у групама *responders* и *non-responders*

Резултати стандардних биохемијских анализа на почетку истраживања (базални статус) и после 13 седмица у групама *responders* и *non-responders* приказани су у **табели 13**. Почетне вредности *HDL*-холестерола и *LDL*-холестерола су се статистички значајно разликовале у посматраним групама тако да су испитаници у *non-responders* групи имали значајно веће вредности *HDL*-холестерола ($p < 0,05$), док је концентрација *LDL*-холестерола била значајно мања ($p < 0,05$). Почетне вредности осталих анализираних параметара нису се разликовале између група. На крају студије, у анализираним групама утврђене су статистички значајне промене у вредностима укупног холестерола, *LDL*-холестерола и *HDL*-холестерола, које јесу очекиване у односу на постављен критеријум (не)жељеног одговара. Концентрације *AST* су значајно смањене након 13 седмица у обе посматране групе ($p < 0,01$).

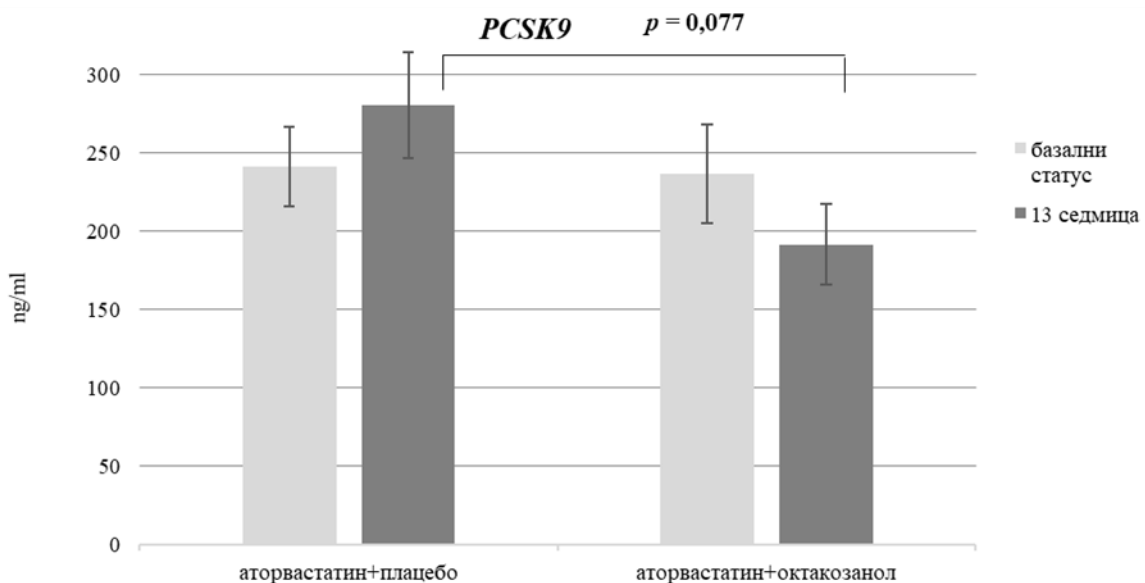
Табела 13. Биохемијски параметри на почетку и на крају студије у групама *responders* и *non-responders*

Параметар	<i>Responders</i> (n = 35)		<i>Non-responders</i> (n = 46)	
	Базални статус	13 седмица	Базални статус	13 седмица
Холестерол, укупни (mmol/L)	4,75 ± 1,02	4,61 ± 0,96	4,49 ± 1,09	4,87 ± 1,16 ^{aa}
<i>HDL</i> -холестерол (mmol/L)	1,28 ± 0,28	1,59 ± 0,36 ^{aaa}	1,44 ± 0,41 ^b	1,40 ± 0,38
<i>LDL</i> -холестерол (mmol/L)	2,94 ± 0,94	2,23 ± 0,90 ^{aaa}	2,45 ± 0,98 ^b	2,91 ± 1,09 ^{aa}
Триглицериди (mmol/L)*	1,40 (1,17–1,67)	1,53 (1,30–1,82)	1,28 (1,14–1,44)	1,27 (1,11–1,47)
<i>ApoA1</i> (g/L)	1,44 ± 0,25	1,40 ± 0,23	1,45 ± 0,25	1,46 ± 0,27
<i>ApoB100</i> (g/L)	1,93 ± 0,48	1,97 ± 0,49	1,80 ± 0,50	1,98 ± 0,57 ^a
Глукоза (mmol/L)*	5,97 (5,16 - 6,53)	6,01 (5,42 - 7,13)	5,44 (5,00 - 6,05)	5,74 (5,25 - 6,79)
<i>ALT</i> (U/L)*	21,5 (19,2–24,0)	20,8 (19,1–22,7)	20,9 (19,5–22,4)	19,1 (17,3–21,0)
<i>AST</i> (U/L)*	23,8 (22,3–25,5)	21,3 (19,5–23,2) ^{aa}	23,5 (21,9–25,1)	20,3 (18,9–21,9) ^{aa}
<i>CK</i> (U/L)*	94,6 (72,8–122,8)	94,1 (77,7–114,1)	109,8 (97,1–124,2)	109,1 (91,4–130,1)

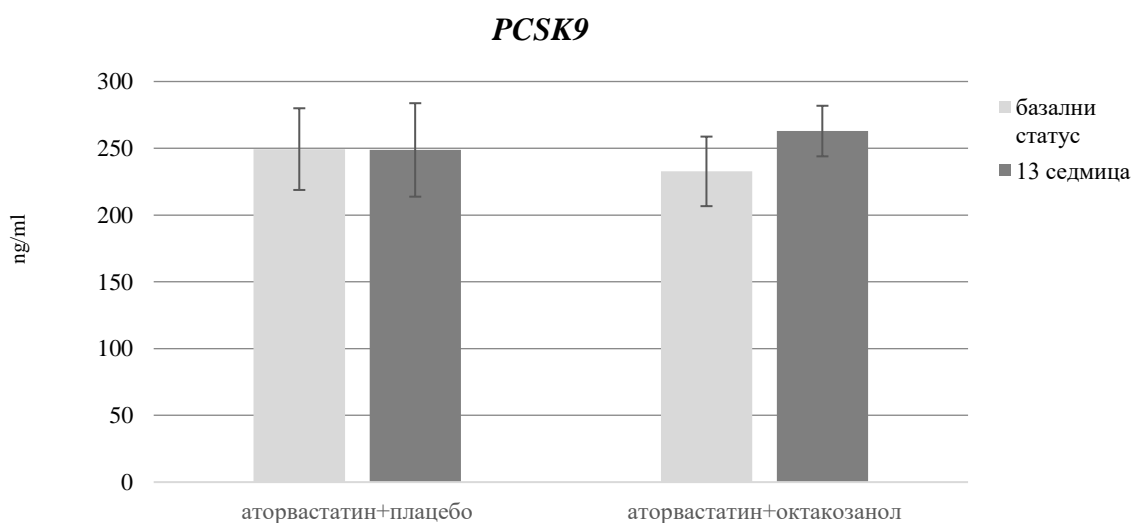
Резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; односно као геометријска средина са 95% интервалом поузданости (*). *p* вредности су добијене *Student t*-тестом; ^a-статистички значајне разлике унутар исте групе између 13.седмице и базалног статуса; ^b-статистички значајне разлике у односу на базални статус групе *responders*. ^{a, b} $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$. *ALT* – аланин аминотрансфераза; *AST* – аспартат аминотрансфераза; *CK* – креатин киназа.

4.6.3. Утицај суплементације октакозанолом на вредности *PCSK9* у групама *responders* и *non-responders*

Утицај суплементације октакозанолом на вредности *PCSK9* у групама *responders* и *non-responders* приказан је на **слици 19** и на **слици 20**. На крају посматраног периода од 13 седмица није уочена статистички значајна разлика у вредностима *PCSK9* унутар подгрупа *responders* (**слика 19**). Ипак, поређењем концентрација *PCSK9* на крају истраживања, показано је да жељене промене параметара липидног профила (смањење *LDL*-холестерола и повећање *HDL*-холестерола) прати тренд опадања нивоа *PCSK9* ($p=0,077$) код оних испитаника који су уз аторвастатин узимали октакозанол у поређењу са вредностима испитаника који су узимали аторвастатин и плацебо. Почетне вредности *PCSK9* у обе посматране групе нису се значајно разликовале. У групи *non-responders* нису забележене статистички значајне промене, као ни тенденције смањења нивоа *PCSK9* независно од третмана (**слика 20**).



Слика 19. Концентрација *PCSK9* на почетку и после 13 седмица у *responders* групи. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка.



Слика 20. Концентрација *PCSK9* на почетку и после 13 седмица у *non-responders* групи. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка.

4.6.4. Одређивање параметара редокс статуса и антиоксидативне заштите у групама *responders* и *non-responders*

Резултати испитивања параметара редокс статуса и антиоксидативне заштите у групама *responders* и *non-responders* приказани су у **табели 14**. Базални ниво *TAS* је био значајно нижи у групи *responders* у односу на групу *non-responders* ($p < 0,05$). Почетне вредности *TOS* и концентрација *SH* група биле су ниже у групи *responders* ($p = 0,057$ и $p = 0,070$, редом), док је ниво *AOPP* био већи, у поређењу са почетним вредностима у групи *non-responders* ($p = 0,066$). Базални ниво прооксидативно-антиоксидативног баланса је био значајно нижи у групи *non-responders* у односу на групу *responders*.

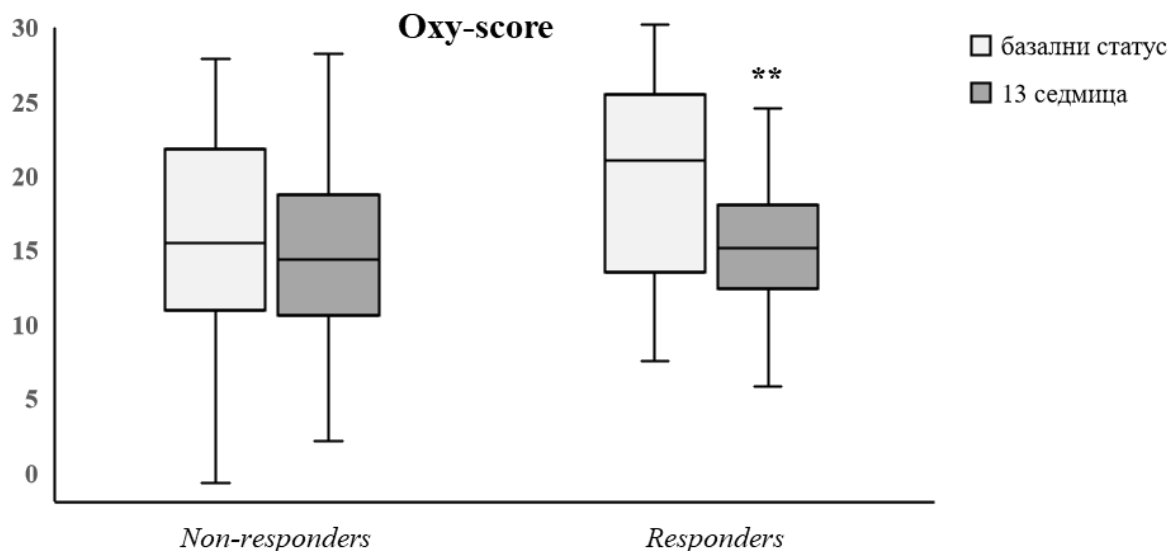
Након статистичке обраде података, показано је да су у обе посматране групе вредности *TAS* биле значајно више на крају студије него на почетку ($p < 0,001$). Слично променама у вредностима *TAS*, забележен је значајан пораст концентрација укупних *SH* група у обе групе после 13 седмица у поређењу са вредностима на почетку ($p < 0,001$). Додатно, активност *PONI* је била статистички значајно виша на крају истраживања само у групи *non-responders* ($p < 0,05$). Није било разлике у вредностима *SOD* између испитиваних група. У групи *non-responders* утврђен је статистички значајан пораст вредности *PAB* на крају студије ($p < 0,05$), док у *responders* групи није било промена. *TOS*, параметар за процену оксидативног стреса, био је значајно повишен на крају истраживања у обе групе ($p < 0,001$) у односу на почетне вредности. Концентрације *AOPP* су се значајно смањиле у групи *responders* након 13 седмица у односу на базалне вредности.

Табела 14. Параметри редокс статуса и антиоксидативне заштите на почетку и после 13 седмица у групама *responders* и *non-responders*

Параметар	<i>Responders</i> (n = 46)		<i>Non-responders</i> (n = 35)	
	Базални статус	13 седмица	Базални статус	13 седмица
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	532 (465–931)	1108 (910–1732) ^{aaa}	1078 (513–1464) ^b	1652 (1122–1785) ^{aaa}
<i>SOD</i> (U/L)	110 ± 31	107 ± 24	109 ± 27	103 ± 18
<i>SHG</i> (mmol/L) [#]	0,200 (0,100–0,400)	0,400 (0,300–0,500) ^{aaa}	0,300 (0,200–0,500)	0,500 (0,400–0,500) ^{aaa}
<i>PONI</i> (U/L) [*]	249 (190–326)	220 (154–314)	286 (222–369)	329 (113–526) ^a
<i>TOS</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	6,0 (5,0–9,0)	16,0 (11,0–19,0) ^{aaa}	7,5 (6,0–12,0)	17,2 (16,1–18,3) ^{aaa}
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	28,6 ± 10,8	24,5 ± 6,3 ^a	24,8 ± 7,3	25,2 ± 7,2
<i>PAB</i> (HKU)	132 ± 35	123 ± 41	113 ± 42 ^b	131 ± 46 ^a

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; односно као геометријска средина са 95% интервалом поузданости (*), или као медијана и интерквartilни распон (#). *p* вредности су добијене *Student t*-тестом за податке са нормалном дистрибуцијом. За непараметарску анализу, коришћен је *Mann-Whitney* тест за поређење података између испитаника у различитим групама а *Wilcoxon* тест означених рангова за поређење података унутар исте групе испитаника. ^a-статистички значајне разлике унутар исте групе између 13. седмице и базалног статуса; ^b-статистички значајне разлике у односу на базални статус у групи *responders*. ^{a, b} $p < 0,05$; ^{aaa} $p < 0,001$. *TAS* – тотални антиоксидативни статус; *SOD* – супероксид дисмутаза; *SHG* – сулфхидрилне групе; *PONI* – параоксоназа 1; *TOS* – тотални оксидативни статус; *AOPP* – продукти узнапредовале оксидације протеина; *PAB* – прооксидативни-антиоксидативни баланс.

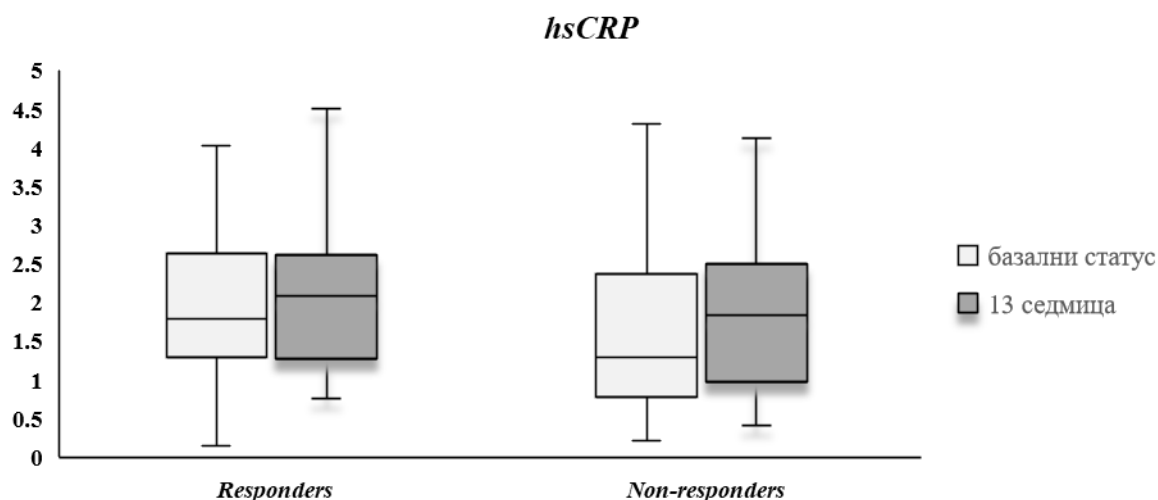
Поред приказаних резултата за параметре редокс статуса и антиоксидативне заштите, за процену степена оксидативног стреса израчунат је окси-скор, као разлика два скорa – прооксидативног и антиоксидативног скорa. Вредности окси-скора на почетку и на крају студије у групама *responders* и *non-responders* приказане су на **слици 21**. Почетне вредности окси-скора су биле статистички значајно веће у групи *responders* у поређењу са испитаницима у групи *non-responders* ($p < 0,05$). Након 13 седмица утврђено је статистички значајно смањење вредности окси-скора код *responders* групе ($p < 0,01$).



Слика 21. Вредности окси-скора на почетку и на крају студије у групама *responders* и *non-responders*. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон. ** $p < 0,01$ (Wilcoxon тест означених рангова).

4.6.6. Одређивање *hsCRP* у групама *responders* и *non-responders*

Резултати испитивања вредности *hsCRP* у групама *responders* и *non-responders* приказани су на **слици 22**. Базални ниво *hsCRP* је био значајно нижи у групи *non-responders* у односу на групу *non-responders* ($p < 0,05$). Након 13 седмица, није било статистички значајних разлика у вредностима *hsCRP* између испитиваних група .



Слика 22. Вредности *hsCRP* на почетку и на крају студије у групама *responders* и *non-responders*. Резултати су приказани као медијана и интерквartilни распон.

4.6.7. Факторска анализа

Како би се испитали независни предиктори (не)жељеног одговора (*non-responders* vs. *responders*) код пацијената на терапији аторвастатином, примењена је анализа главних компоненти. Број варијабли је редукован тако што су параметри груписани по сличној варијабилности у посебне кластере, тј. факторе. За интерпретацију фактора узете су варијабле са факторским оптерећењем већим или једнаким 0,5. Издвојена четири фактора (Фактор 1, Фактор 2, Фактор 3, Фактор 4) у обе посматране групе испитаника, објашњавају 55% варијација у свим анализираним параметрима. Резултати факторске анализе приказани су у **табели 15**.

У групи *non-responders*, Фактор 1 објашњава 16,6% укупне варијације и повезан је са позитивним оптерећењима *PCSK9*, *TAS*, *TOS*, *PAB*, и *PON1* са негативним оптерећењем. Назван је „дислипидемија-редокс баланс“ фактор“. Фактор 2 објашњава 14,7% укупне варијације и укључује *TG*, *hsCRP*, *SHG* и *ApoB100* са позитивним оптерећењима, а назван је „дислипидемија-инфламаторни фактор ризика повезан са протеинима“. Фактор 3 и Фактор 4 објашњавају 12,2% и 11,5% укупне варијације, редом. Трећи фактор укључује *ApoA1* са позитивним оптерећењем, и *ALT* и *AST* са негативним оптерећењима. Назван је „липидо-протективни фактор повезан са метаболизам“. Четврти фактор назван „метаболичко-антиоксидативни фактор повезан са дијетарном интервенцијом“ карактеришу *SOD* и глукоза са позитивним оптерећењем и статус октакозанола (да/не) са негативним оптерећењем.

У групи *responders*, први фактор објашњава 15,5% укупне варијације и повезан је са позитивним оптерећењима *PCSK9*, *TAS*, *TOS*, *PAB*, и *hsCRP* са негативним оптерећењем. Назван је „дислипидемија-редокс баланс фактор повезан са инфламацијом“. Фактор 2 и Фактор 3 објашњавају 14,7% и 12,2% укупне варијације, и процентуално су идентични као код групе *non-responders*. Фактор 2 укључује *ALT*, *AST* и *CK* са позитивним оптерећењима, и статус октакозанола са негативним оптерећењем, а назван је „фактор ризика за коронарне болести повезан са дијетарном интервенцијом“. Фактор 3 карактеришу *AOPP*, *SHG* и *ApoB100* са позитивним оптерећењем. Назван је „дислипидемија-редокс фактор ризика повезан са

протеинима“. Фактор 4 објашњава 12,1% укупне варијације, а укључује *PON1*, *ApoA1* и глукозу, и све варијабле су са позитивним оптерећењем. Назван је „антиоксидативни фактор повезан са метаболизмом“.

Табела 15. Резултати факторске анализе

Варијабле са оптерећењима	<i>Non-responders</i>				<i>Responders</i>			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Factor Variability (%)	16,6	14,7	12,2	11,5	15,5	14,7	12,2	12,1
<i>PON1</i>	-0,631	-	-	-		-	-	0,668
<i>PCSK9</i>	0,509	-	-	-	0,565	-	-	-
<i>TAS</i>	0,766	-	-	-	0,789	-	-	-
<i>TOS</i>	0,829	-	-	-	0,681	-	-	-
<i>PAB</i>	0,608	-	-	-	0,537	-	-	-
<i>hsCRP</i>	-	0,576	-	-	-0,526	-	-	-
<i>TG</i>	-	0,792	-	-	-	-		-
<i>ApoB100</i>	-	0,678	-	-	-	-	0,629	-
<i>SHG</i>	-	0,589	-	-	-	-	0,661	-
<i>AOPP</i>	-	-	-	-	-	-	0,829	-
<i>ApoA1</i>	-	-	0,56	-	-	-	-	0,727
<i>AST</i>	-	-	-0,632	-	-	0,65	-	-
<i>ALT</i>	-	-	-0,645	-	-	0,785	-	-
<i>CK</i>	-	-	-	-	-	0,8	-	-
Октакозанол – да/не	-	-	-	-0,728	-	-0,619	-	-
<i>SOD</i>	-	-	-	0,607	-	-	-	-
Глукоза	-	-	-	0,608	-	-	-	0,675

TG – триглицериди; *ApoA1* – Аполипопротеин А1; *ApoB100* – Аполипопротеин В100; *PCSK9* –пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9; *hsCRP* – високо сензитивни С-реактивни протеин; *ALT* – аланин аминотрансфераза; *AST* – аспартат аминотрансфераза, *CK* – креатин-киназа; *PON1* – параоксоназа 1; *TAS* – тотални антиоксидативни статус; *SOD* – супероксид дисмутаза; *SHG* – сулфидрилне групе; *TOS* – тотални оксидативни статус; *AOPP* – продукти узрадровале оксидације протеина; *PAB* – прооксидативни-антиоксидативни баланс

5. ДИСКУСИЈА

Најновије ESC препоруке (2021) за превенцију КВБ у клиничкој пракси истичу да је здрав стил живота основ превентивне кардиологије (*Visseren u cap., 2021*). Промоција здравог начина живота (здраве навике у исхрани, престанак пушења, редовна физичка активност) представљају најефикаснији приступ како у примарној тако и у секундарној превенцији КВБ. Важно је нагласити да здрав стил живота и контрола телесне масе, такође, доприносе смањењу укупног кардиоваскуларног ризика кроз њихов утицај на друге факторе ризика, као што су модификација липидног профила, хипертензија, субклиничка инфламација и ниво глукозе.

Примена нутрацеутика у превенцији КВБ је предмет великог броја истраживања. За поједине нутрацеутике постоје званичне препоруке чиме је потврђено њихово значајно место у смањењу, како фактора ризика за развој КВБ, тако и као допуна адекватној терапији. Суплементација заснована на доказима, односно примена суплемената који су недвосмислено показали позитивне ефекте на здравље и превенцију болести, може допринети постизању терапијских циљева, побошљању адхеренце, као и ефикасности лека. Примена нутрацеутика се препоручује у следећим случајевима: регулисање фактора ризика који нису повезани са *LDL*-холестеролом и/или другим параметрима липидног профила; регулисање вредности *LDL*-холестерола код пацијената са интолеранцијом на статине; регулисање вредности *LDL*-холестерола када није могуће применити комбинацију статина и другог хиполипемика; за испитанике са високим животним ризиком од атеросклеротских КВБ (*Penson u Vanach, 2020*).

Процењена глобална преваленца употребе дијететских суплемената износи чак 36% (*Bin u Kiat, 2011*), а недавно објављени резултати о употреби нутрацеутика међу пацијентима који су на терапији статинима (више од 2000 испитаника) указују да чак 67% испитаника користи нутрацеутике/дијететске суплементе (*MacDonald u cap., 2022*). Подаци недвосмислено указују да све већи број пацијената разматра њихову примену, појединачно или у комбинацији са лековима, што захтева да ефикасност и безбедност нутрацеутика буде проверена у више контролисаних рандомизованих студија како би се формулисале препоруке засноване на доказима.

Статини представљају „златни“ стандард у лечењу хиперхолестеролемија и превенцији главних нежељених кардиоваскуларних догађаја (*енгл. major adverse cardiovascular events, MACE*). Хиполипидемијски ефекти статина се испољавају већ после две седмице примене, док се максимални терапијски ефекат постиже након 4–6 седмица, и остаје константан током даље терапије (*Bersot, 2015*). Уколико се лечење прекине, концентрације *LDL*-холестерола се убрзо враћају на ниво пре почетка терапије. Откриће повезаности примене статина и пораста вредности *PCSK9*, допринело је разумевању већ утврђеног нелинеарног односа између примењене дозе статина и смањења *LDL*-холестерола, као и варијабилном одговору који пацијенти показују на терапију статинима (*Ridker u cap., 2016*). Присуство *PCSK9* у циркулацији сматра се веома значајним регулатором метаболизма холестерола у организму (*Rosenon u cap., 2018*). Главна улога *PCSK9* је посттранслациона регулација броја *LDLR*, која се остварује тако што након везивања *PCSK9* и *LDLR* долази до деградације и смањења броја рецептора, а то резултује повећањем концентрације *LDL*-холестерола у циркулацији (*Farnier, 2011*). Иако статини представљају први избор у терапији дислипидемија, уколико се не постигну циљне вредности, разматра се комбинована терапија чиме се смањује појава нежељених ефеката.

Нутрацеутици не могу заменити фармаколошку терапију, али могу бити корисни у комбинацији са лековима и допринети смањењу резидуалног ризика од КВБ. Узимајући у обзир доступне резултате клиничких студија нутрацеутика који су за сада највише проучавани у погледу ефикасности на различите параметре липидног профила, може се размотрити комбинована употреба лекова и нутрацеутика у следећим случајевима: код пацијената са мешовитом дислипидемијом, дијагнозом дијабетеса и метаболичког синдрома, код пацијената са ниском до умереном хиперхолестеролемијом, и код свих пацијената код којих постоје нежељени ефекти повезани са употребом (најчешће високих доза) статина, а уз висок ризик од кардиоваскуларних догађаја (*Banach u cap., 2018; Penson u cap., 2020*). Међутим, и даље остаје главно питање клиничке ефикасности нутрацеутика у погледу смањена концентрације параметара липидног профила, као и одрживости ефеката током дужег временског периода.

Полазна претпоставка која подржава комбиновану примену статина и нутрацеутика са хиполипидемијским ефектом јесте побољшање безбедносног профила лека, односно потенцијално смањење дозе у случају примене високих доза статина код пацијената код којих су се јавили изражени нежељени ефекти. Ефикасност комбиноване примене је ретко тестирана у више од једне рандомизоване контролисане студије, док су неке од тестираних комбинација садржале компоненте нутрацеутика у субдозираним количинама ограничене растворљивости и последично ниске биорасположивости (*Colletti u cap., 2022*). Мора се нагласити да још увек не постоји ниједан доказ да нутрацеутици могу спречити морбидитет или морталитет од КВБ (*Cicero u cap., 2017*).

Ова докторска дисертација је осмишљена и спроведена да истражи потенцијалне синергистичке ефекте дијететског суплемента који садржи октакозанол у количини од 20 mg, на концентрације *PCSK9* и параметре липидног профила код пацијената на терапији аторвастатином (20 mg дневно). Такође, анализирани су и параметри редокс статуса испитаника пре и после суплементације октакозанолом.

Добијени резултати у овој дисертацији показују да се вредности *PCSK9* нису значајно промениле током периода студије у обе посматране групе испитаника (**Табела 7**), што потврђује да се постигнут плато концентрација *PCSK9* одржава након 3–4 месеца од почетка примене статина (*Welder u cap., 2010*). Једна од првих студија у којој је праћена динамика промена концентрација *PCSK9* након увођења високих доза статина (80 mg) показала је да се након само 4 седмице примене, вредности *PCSK9* повећавају за 47% у поређењу са почетним вредностима, и да се тај пораст концентрација задржава без знатних варијација све до краја праћења, односно до 16 седмица (вредности су праћене након 4, 8, 12 и 16 седмица) (*Welder u cap., 2010*). Може се извести закључак да се готово истовремено, у периоду након месец дана од увођења терапије, уз постизање максималног терапијског ефекта статина, дешава и постизање платоа концентрација *PCSK9*. (*Careskey u cap., 2008*) су дошли до сличних резултата испитујући ниже доза статина, односно утврдили су да се плато концентрација *PCSK9* постиже незнатно спорије, тј. за 12 седмица.

Мали је број студија о инхибиторној активности нутрацеутика у погледу утицаја на вредности *PCSK9* у серуму пацијената. Преглед досадашњих клиничких студија о инхибицији *PCSK9* посредованој нутрацеутицима упућује да су највише испитивани берберин и ω -3 масне киселине, а у само једној студији поликозанол. У студији коју су спровели *Y.-L. Guo u cap. (2014)*, праћено је 36 пацијената, подељених у две групе: 1) аторвастатин ($n=17$) и 2) аторвастатин и поликозанол ($n=19$). У обе групе се укључени испитаници који претходно нису били на терапији статинима. Резултати студије су показали да током 8 седмица монотерапије аторвастатином вредности *PCSK9* у серуму су се значајно повећале ($\approx 40\%$) у поређењу са вредностима пре третмана. Међутим, у групи која је уз аторвастатин примала и поликозанол, вредности *PCSK9* су порасле за 17%, без статистичке значајности у поређењу са базалним вредностима (*Y.-L. Guo u cap., 2014*). Ови резултати указује на то да поликозанол може ублажити повећање нивоа *PCSK9* у серуму пацијената на терапији статинима. Код здравих

испитаника ($n=7$), који су узимали искључиво поликозанол током 12 седмица, забележено је смањење нивоа *PCSK9*, али без статистичке значајности ($p=0,069$) (*Y.-L. Guo u cap., 2014*).

У студији која је по дизајну била идентична нашој студији (двоструко слепа рандомизована плацебо контролисана студија) и укључивала је пацијенте са хиперхолестеролемијом ($n=39$), није показано да комбинација (берберин, монаколин К, хитозан и коензим Q10) доводе до промена у вредностима *PCSK9* након 3 месеца суплементације (*Spigoni u cap., 2017*). Са друге стране, у двоструко слепој рандомизованој укрштеној (енгл. *cross over*) студији показано је да се код пацијената са бар једним ризиком за развој метаболичког синдрома ($n=54$) након 3 месеца конзумације уља каноле (олеинска киселина је главна компонента овог уља) обogaћеног докозахексаенском киселином постиже значајно смањење концентрација *PCSK9*. Слично, суплементација ω -3 масним киселинама у групи здравих жена ($n=92$) утицала је на значајно смањење вредности *PCSK9*, али након знатно дужег временског периода (12 месеци).

Постоји више фактора који могу утицати на вредности *PCSK9* у циркулацији, а неки од њих су гладовање које је повезано са смањењем нивоа *PCSK9*, као и утицај пола где је примећено да су концентрације *PCSK9* веће код жена него код мушкараца (*F. Jia u cap., 2022*). У једној студији уочено је смањење вредности *PCSK9* у крви, за приближно 60%, током периода гладовања од 36 сати, док је концентрација *LDL*-холестерола била скоро непромењена (*Browning u Horton, 2010*), што се може приписати улози *PCSK9* у синтези липопротеина у цревима и јетри. Такође је уочено да постоје и диурналне варијације у концентрацијама *PCSK9*, тако да су најниже у поподневним сатима, а у раним јутарњим сатима су и до три пута више (*Y. Q. Chen u cap., 2014*). У опсервационој студији која је обухватила готово 3200 испитаника уочене су велике интериндивидуалне варијације у вредностима *PCSK9* у серуму, у широком опсегу концентрација 33–2988 ng/mL, а одређена средња вредност у општој популацији износила је 487 ng/mL (*Lakoski u cap., 2009*). Важно је истаћи да у описаној опсервационој студији нису били укључени пацијенти на терапији статинима.

Насупрот малом броју доступних података из клиничких студија о инхибиторној *PCSK9* активности поликозанола, бројне студије су као предмет истраживања имале испитивање ефикасности поликозанола, односно појединачних компоненти из ове смесе дуголанчаних алкохола, у третману дислипидемија. Резултати нису конзистентни и разликују се у зависности да ли су студије спроведене на Куби или у Европи. Резултати мета-анализа о ефикасности суплементације поликозанолом у третману дислипидемија, изведене на основу података студија спроведених на Куби, сугерисали су да поликозанол доводи до смањења концентрације *LDL*-холестерола за 24% и повећања вредности *HDL*-холестерола за 11%, и то када се примењује самостално, без примене других хиполипемичких лекова (*J. T. Chen u cap., 2005*). Таква сазнања покренула су интересовање за поликозанол од стране различитих истраживачких група у Европи.

У једној од првих студија, спроведених у Европи, која је обухватала 143 хиперхолестеролемична пацијента, подељених у пет група (10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg поликозанола, или плацебо), није било статистички значајних промена у погледу утицаја примењеног третмана на вредности укупног холестерола, *LDL*-холестерола, *HDL*-холестерола и триглицерида (*Berthold u cap., 2006*). Коришћен је препарат поликозанола пореклом са Кубе (*Dalmer Laboratories, Хавана, Куба*) следећег састава: октакозанол (60–70%), триаконтанол (10–15%), хексакозанол (4,5–10%), дотриаконтанол (3–8%), хептакозанол (<5%), тетракозанол (<2%), нонакозанол (<2%), и тетратриаконтанол (<2%).

Ни у једној од пет анализираних група није забележена промена већа од 10% у вредностима *LDL*-холестерола након 12 седмица трајања студије. *Cubeddu u cap. (2006)* су исте године спровели истраживање у Америци које је обухватило пацијенте са базалним вредностима *LDL*-холестерола од 3,6 до 4,9 mmol/L, који најмање 2 месеца пре почетка студије

нису користили статине. Резултати ове плацебо контролисане студије нису утврдили да постоје статистички значајне разлике између анализираних група (аторвастатин (10 mg) или аторвастатин (10 mg)/поликозанол (20 mg)) након 12 седмица трајања студије (*Cubeddu u cap., 2006*). Неколико година касније, истраживачка група *Backes u cap. (2011)* испитивала је ефикасност поликозанола у групи од 36 хиперхолестеролемичних пацијената који су већ на терапији аторвастатином. У овој студији, коришћена је смеша поликозанола (октакозанол 33,5%, триакоктанол 44,1%, хексакозанол 13,3% и дотриакоктанол 7,9%) и дуголанчаних масних киселина, како би се на изванредан начин повећала биорасположивост поликозанола. Ипак, након 8 седмица нису уочене статистички значајне промене без обзира да ли је примењена монотерапија или комбинација са поликозанолом. Такође, извршена је и анализа промена концентрација *LDL*-холестерола у односу на базалне вредности (пацијенти су груписани у групе са нижим, односно вишим почетним вредностима *LDL*-холестерола), где поново није уочена статистички значајна разлика између две групе испитаника (*Backes u cap., 2011*).

Као и у претходно изведеним истраживањима у Европи, суплементација октакозанолом у овој студији није додатно утицала на промене вредности параметара липидног профила (**Табела 7**). Могуће је да нису добијени значајни ефекти октакозанола на вредности *LDL*-холестерола, јер су базалне средње вредности у обе посматране групе биле сличне и износиле $\approx 2,65$ mmol/L, што указује да су већ снижене хроничном употребом статина која је трајала 4 месеца минимално. Добијени резултати се поклапају са резултатима студија спроведених на европском тлу које су испитивале хиполипидемијски ефекат поликозанола или неке од појединачних компоненти ове смеше алкохола (*Backes u cap., 2011; Cubeddu u cap., 2006*).

Уочено је да је након 8 седмица дошло до статистички значајног смањења концентрација *LDL*-холестерола у групи АП (**Табела 7**), али не и после 13 седмица, у поређењу са базалним вредностима. Ова смањења су била око 10% и нису од клиничког значаја. Важно је напоменути да су у другим студијама, где су пацијенти лечени статинима и/или инхибиторима *PCSK9*, примећене одређене флукуације концентрација *LDL*-холестерола током времена (*Cubeddu u cap., 2006; Sabatine u cap., 2017*). Није јасно да ли су ове флукуације последица промена навика у исхрани или су биле последица неких других фактора.

Описани резултати примене поликозанола, као монокомпонентног препарата, у третману дислипидемија су врло различити. Ипак, неколико клиничких студија и мета-анализа указују на ефикасност примене комбинације октакозанола/поликозанола са другим нутрацеутицима (ферментисани црвени пиринач, берберин, силимарин) (*Cicero u cap., 2016; Pirro u cap., 2016; Pisciotto u cap., 2012*). У прилог томе, званичне препоруке Интернационалног експертског панела за липиде (енгл. *International Lipid Expert Panel*, ИЛЕП), за примену нутрацеутика са хиполипидемијским ефектом у клиничкој пракси, укључују и примену комбинације нутрацеутика у којима се налази октакозанол (10 mg) или поликозанол (10-30 mg) (*Banach u cap., 2018*).

Недавно је, по први пут, урађена мрежна мета-анализа (енгл. *network meta-analysis*, NMA) која је за циљ имала симултано поређење ефикасности различитих нутрацеутика у погледу њиховог деловања на параметре липидног профила у популацији одраслих (*Osadnik u cap., 2022*). Овај тип мета-анализе омогућава рангирање различитих третмана према њиховој ефикасности, чак и ако они нису упоредо испитивани у истој студијама. Комплексна анализа урађена од стране *Osadnik u cap. (2022)* обухватала је 131 рандомизовану контролисану студију (више од 13 000 испитаника) са анализом десет различитих нутрацеутика, укључујући и поликозанол. Ова мета-анализа је потврдила да се резултати кубанских студија о испитивању ефеката поликозанола на параметре липидног профила разликују од резултата европских студија. Наиме, када се у анализу укључе резултати свих студија, независно где су спроведене, долази се до закључка да је од свих десет посматраних нутрацеутика смеша поликозанола на другом месту по ефикасности у погледу смањења вредности укупног холестерола и *LDL*-

холестерола, односно да је умерено ефикасна у погледу смањења триглицерида. Насупрот томе, када се из анализе искључе резултати студија спроведених на Куби, примена поликозанола није показала ефикасност у погледу параметара липидног профила (укупни холестерол, *LDL*-холестерол, *HDL*-холестерол, триглицериди). Аутори мета-анализе дају неколико објашњења за овако дијаметрално различите закључке: примена поликозанола у широком распону доза 10–80 mg, променљив удео појединачних алкохола у смеси поликозанола, ниска орална биорасположивост дуголанчаних алкохола, као и различито трајање спроведених интервентних студија (1–6 месеци).

У следећем делу истраживања анализирана је повезаност *PCSK9* и параметара липидног статуса, на почетку и на крају студије. Параметарска корелациона анализа није утврдила постојање корелација између анализираних варијабли ни у једној од посматраних група (табеле 8 и 9). За разлику од наших резултата, у студији са пацијентима код којих је тек уведена терапија статинима, утврђено је постојање јаке корелације између базалних вредности *PCSK9*, *LDL*-холестерола, укупног холестерола и триглицерида, али су те корелације изостале након 4 месеца примене терапије (*Welder u cap., 2010*). Може се закључити да почетна корелација између параметара липидног профила и *PCSK9*, која постоји код пацијената пре увођења статина, нестаје након неколико месеци од почетка примене терапије.

Welder u cap. (2010) су такође запазили да је код испитаника са процентуално највећим смањењем *LDL*-холестерола присутан највећи пораст у концентрацији *PCSK9*. Исти резултат је изведен и након мета-анализе која је обухватила 15 клиничких студија којима су праћене промене вредности *LDL*-холестерола и *PCSK9* након терапије статинима (студија је обухватила примену аторвастатина, росувастатина и симвастатина) (*Sahebkar u cap., 2016*). *Rall u cap. (2013)* су анализирали повезаност вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола, као *PCSK9* и триглицерида, код пацијената са породичном хиперхолестеролемијом. Молекуларну основу овог аутозомно доминантног обољења чине мутације гена за *LDLR*, *ApoB* или *PCSK9*. До сада је идентификовано скоро 3800 мутација гена повезаних са породичном хиперхолестеролемијом, од који се највећи број везује за мутације гена за *LDLR* (80%), а знатно мање за *ApoB* (15%) и *PCSK9* (5%) (*Reeskamp u cap., 2020*). Ген за *LDLR* може бити погођен различитим типовима мутација које доводе до измењене функције рецептора. Хетерозиготна породична хиперхолестеролемија (енгл. *heterozygous familial hypercholesterolemia*, *HeHF*) чини око 10% примарних хиперлипидемија и јавља се код 0,2% популације, док је хомозиготна породична хиперхолестеролемија (енгл. *homozygous familial hypercholesterolemia*, *HoHF*) изузетно редак облик. (*Raal u cap., 2013*) су у студију укључили пацијенте са *HoHF* ($n=20$) и *HeHF* ($n=20$) и након терапије високим дозама статина (аторвастатин (80 mg)/росувастатин (40 mg)) у трајању од 4 седмице, анализирали промене вредности *PCSK9*. У овој студији са малим бројем испитаника потврђено је да уочена корелација између базалних вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола, као *PCSK9* и триглицерида, изостаје након примене високих доза статина, као и да не постоји корелација између процентуалних промена *PCSK9* и *LDL*-холестерола било да је хиперхолестеролемија хомо- или хетерозиготна.

Ипак, након примене високих доза статина утврђено је да је пораст вредности *PCSK9* карактеришу велике интериндивидуалне варијације код *HoHF* пацијената (и смањење и повећање вредности *PCSK9*), док су промене вредности *PCSK9* код већине *HeHF* пацијената биле константне. Није у потпуности јасно зашто се, као одговор на терапију статинима, вредности *PCSK9* различито мењају код *HoFH* и *HeFH* испитаника. Једно од могућих објашњења запажених варијација између *HoFH* пацијената јесте да примена статина у различитој мери делује на активност *SREBP-2* и процес усходне регулације *PCSK9* код *HoFH*. Варијабилност у одговору може бити повезана и са различитим степеном експресије *LDLR* у зависности од типа мутације *LDLR*, које одређују фенотип пацијента, односно клиничку слику и одговор на терапију. Резултати ретроспективне студије (*Di Taranto u cap., 2021*) показали су

да пацијенти са идентификованим *null* мутацијама (активност *LDLR* <2%), имају знатно озбиљнију клиничку слику у односу на пацијенте са дефектним геном који кодира синтезу протеина са дефицијентном активношћу. Испитаници са дефектним геном имају делимично очувану функцију *LDLR* (2–70% нормалне активности рецептора) (*Vrablik u cap.*, 2020). Поред ових фактора, пораст вредности *PCSK9* услед терапије додатно утиче на деградацију и смањење броја *LDLR*.

У наставку је праћена повезаност процентуалних промена *PCSK9* и *LDL*-холестерола. Резултати анализе бележе статистички значајну позитивну корелацију између ових варијабли и то само у групи АО (слике 8А и 9А). Уочена корелација је постојала у оба посматрана периода, односно и после 8 и после 13 седмица. Према томе, испитаници у групи АО који су имали највеће смањење вредности *PCSK9*, имали су и тенденцију највећег смањења *LDL*-холестерола у серуму. Октакозанол је поново успоставио физиолошки однос између нивоа вредности *LDL*-холестерола и *PCSK9* у серуму који је измењен услед хроничне употребе статина. Да ли је поновно успостављање корелације између *PCSK9* и *LDL*-холестерола искључиво узрок суплементације октакозанолом, потребно је да потврде будуће студије пошто нема доступних сличних података са којима би ови резултати могли да се упореде. У поменутој оспервационој студији (*Lakoski u cap.*, 2009), вредности *PCSK9* корелирају са концентрацијама *LDL*-холестерола у серуму, али оне објашњавају само мали део варијација, око 7% (5% код мушкараца и 10% код жена). Имајући у виду ове резултате, треба сагледати значај наших резултата где промене у вредности *PCSK9* могу објаснити 17% варијација у вредностима *LDL*-холестерола у групи АО ($r=0,409$). Овакве корелације, ни у једном од посматраних периода, нису биле статистички значајне у групи АП (слике 8Б и 9Б), што је у складу са резултатима студија где су испитаници били на хроничној терапији статинима (*Berthold u cap.*, 2006; *Careskey u cap.*, 2008; *Welder u cap.*, 2010).

Једно од објашњења постојања корелације између *PCSK9* и *LDL*-холестерола у физиолошким условима јесте то што је експресија гена за *PCSK9* и *LDLR* посредована истим транскрипционим фактором *SREBP-2*. Базална секреција *PCSK9* је посредована и другим транскрипционим фактором, *HNF1 α* , који не утиче на експресију *LDLR* (*Schulz u cap.*, 2015). Корелацији између вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола, код испитаника који нису на терапији статинима, доприноси и истовремена елиминација *PCSK9* и *LDLR* из циркулације заједничким путем, односно процесом лизозомалне деградације *LDLR*. Разлике у брзини елиминације ова два протеина могу допринети и интериндивидуалним разликама у вредностима *PCSK9*. Узимајући у разматрање међусобну интеракцију ових протеина, као и динамику процеса у зависности од концентрације и/или активности *PCSK9* и експресије *LDLR*, процена утицаја свих регулаторних механизма на концентрације *LDL*-холестерола у крви је врло комплексна (*Shapiro u cap.*, 2018). Мора се истаћи да релативно слаба корелација између вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола сугерише да је упитно да ли све форме *PCSK9* у циркулацији испољавају ензимску активност, односно учествују у лизозомалној деградацији рецептора. Питање функционалности молекула *PCSK9* се надовезује на чињеницу да промене у концентрацији *PCSK9* не следе увек и очекиване промене у вредностима *LDL*-холестерола код пацијената на терапији статинима.

Важно је истаћи све бројније доказе клиничких студија који указују да *PCSK9* може бити означен као независни фактор ризика за КВБ (*Panahi u cap.*, 2019; *Peng u cap.*, 2020; *Reeskamp u cap.*, 2021), без обзира на његову интеракцију са *LDLR* и утицај на вредности *LDL*-холестерола у крви. Показано да кардиоваскуларне компликације настале као резултат активности *PCSK9* нису само последица интеракције са *LDLR*, већ да постоје и *LDLR*-независни процеси у којима *PCSK9* има значајне улоге. У атеросклеротским плаковима, *PCSK9* се везује за екстрацелуларни домен рецептора *EGFPH* чиме је стимулирана експресија различитих протеина који утичу на прогресију атеросклеротских промена (*X. Liu u cap.*, 2019). Улога *PCSK9* у развоју КВБ се приписује и експресији овог протеина у васкуларним

ендотелним ћелијама, глатким мишићним ћелијама, као и у кардиомиоцитима (Y. Guo *u cap.*, 2021). PCSK9 ступа у интеракцију и са другим протеинима из фамилије LDLR, као што су VLDLR (енгл. *very low density lipoprotein receptor*), apoER2 (енгл. *apolipoprotein E receptor 2*) и LRP1 (енгл. *LDLR-related protein 1*) (Canuel *u cap.*, 2013; Shapiro *u Fazio*, 2017). Није познато да ли након интеракције PCSK9 са овим рецепторима долази и до њихове деградације. Оно што је уочено јесте да лизозомална деградација LDLR посредством PCSK9 доводи и до хипертриглицеридемија јер је концентрација ApoB расте као последица недостатка LDLR (Shapiro *u Fazio*, 2017).

Регулација концентрације и ензимске активности PCSK9 у циркулацији је врло комплексна. Формирањем димера и тримера између молекула PCSK9 појачава се способност овог протеина да разгради LDLR (D. Fan *u cap.*, 2008). Насупрот овим реакцијама, PCSK9 подлеже деградацији посредством протеин-конвертаза, фурином или PC5/6, након чега задржава активност, али у смањеном обиму (Benjannet *u cap.*, 2006). Код здравих особа 10–20% укупне количине PCSK9 у циркулацији чине форме са смањеном активношћу (Lagace, 2014). Физиолошка инактивација ензимске активности PCSK9 одвија се на N-терминалном продомену, и то само за форме секретоване у циркулацију. Иако је фурин присутан и у Голџијевом апарату, нема доказа да се скраћивање молекула PCSK9 врши и интрацелуларно (Oleaga *u cap.*, 2021). Интактна форма PCSK9 има два пута јачи афинитет за везивање за LDLR, већу способност деградације рецептора и дужи полуживот, у поређењу са мање активном формом (Han *u cap.*, 2014).

Резултати клиничких студија су показали да се интактна форма PCSK9 везује за LDL-холестерол, за разлику од мањих форми, насталих протеолитичким дејством фурина, које су слободне (Tavori *u cap.*, 2013). Комплекс молекула PCSK9 са LDL-холестеролом не подлеже протеолитичкој деградацији и на тај начин задржава непромењену ензимску активност (Norata *u cap.*, 2016). На основу ових података може се рећи да је веза између PCSK9 и LDL-холестерола двосмерна, односно да PCSK9 везивањем за LDLR утиче на пораст концентрација LDL-холестерола, а са друге стране честице LDL-холестерола „чувају“ молекула PCSK9 од протеолитичке деградације. У циркулацији је око 40% интактне форме PCSK9 везано за LDL-холестерол (Kosenko *u cap.*, 2013; Tavori *u cap.*, 2013).

Значајно је истаћи да се за квантификацију PCSK9 користе различите ELISA методе што може довести до дискрепанце у резултатима истраживања на експерименталним моделима и у клиничким студијама. Највећи број студија користи тестове који не разликују везане од интактних и фурин-деградираних форми PCSK9. ELISA тест који је коришћен у овој студији подразумева одређивање концентрације укупног PCSK9, тј. интактне форме, скраћене (деградиране) форме и форме везане за LDL-холестерол. Резултат од значаја је рад Hori *u cap.*, (2015) који су развојем нове методе одредили обе форме PCSK9, интактне и скраћене форме, и потврдили да имају различит афинитет везивања за LDLR.

Једно од отворених питање на почетку интервентних студија јесте да ли на основу базалних вредности одређених параметара може да се предвиди одговор пацијената, било да се ради о испитивању лека или нутрацеутика. Поред тога, у случају примене статина веома је важно размотрити пацијенте код којих је изостао очекиван одговор на терапију. Индивидуализована терапија код статинске интолеранције је императив о чему сведоче и најновије ESC смернице (Banach *u cap.*, 2023). Са друге стране, ефикасност нутрацеутика такође зависи од многих индивидуалних карактеристика испитаника, као што су дијетарне навике, утицај исхране на епигеном и микробиоту (Serini *u Calviello*, 2020). Истраживачка група (Taylor *u Thompson*, 2016) је прва спровела пилот студију ($n=36$) у којој су праћене промене вредности PCSK9 након 6 месеци примене високе дозе аторвастатина (80 mg) у групама *responders* и *non-responders*. Резултати су показали да су у групи *non-responders* значајно више почетне концентрације PCSK9, а да је на крају студије у групи *responders* значајно већа промена концентрација PCSK9 него у групи *non-responders*.

Узимајући у разматрање све наведене факторе који могу утицати на одговор испитаника на комбиновану примену лека и нутрацеутика, али и важност индивидуализоване терапије, у наредном делу ове докторске дисертације урађена је анализа промена вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола у подгрупама испитаника. У зависности од промена параметара липидног профила (процентуално смањење вредности *LDL*-холестерола и процентуално повећање вредности *HDL*-холестерола), испитанике смо поделили у групе *responders* (43,2%) и *non-responders* (56,8%) (слика 17). Најзначајнији резултат представља уочен тренд смањења концентрација *PCSK9* након 13 седмица студије (236,26 ng/mL vs. 191,47 ng/mL, $p=0,077$) у групи *responders*, и то само код оних испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанол (слика 19). Такав налаз, односно смањење концентрације *PCSK9*, изостао је код 50% пацијената који су уз аторвастатин узимали плацебо, и поред постигнутих жељених промена у погледу параметара липидног профила. Иако је код њих концентрација *LDL*-холестерола била нижа на крају студије у односу на почетак, концентрације *PCSK9* нису пратиле тренд смањења (241,1 ng/mL vs. 280,33 ng/mL, $p>0,05$).

Овде су истакнуте просечне вредности *PCSK9* у анализираним групама испитаника, јер су недавно по први пут предложене граничне вредности *PCSK9* на основу којих се могу идентификовати пацијенти код којих може изостати одговор на статинску терапију. Пошто се интактна форма *PCSK9* у циркулацији везује за *LDLR*, након чега се оба уклањају из циркулације, повећана секреција *PCSK9* услед терапије статинима не мора нужно одражавати и утицај статина на експресију гена за *PCSK9*, што отежава процену одговора на терапију. Стога, процена вредности различитих форми *PCSK9*, а пре почетка употребе статина, може бити бољи клинички маркер за процену степена смањења *LDL*-холестерола, односно за правилан одабир потребне дозе лека.

Kiyama и сар. (2021) су показали предикцију одговора испитаника на статинску терапију на основу базалних вредности *PCSK9*. На основу *ROC* (енгл. *receiver operating characteristic curve*) анализе утврђено је да гранична (*cut-off*) вредност базалне концентрације интактне форме *PCSK9* већа од 228 ng/mL може идентификовати појединце који неће имати адекватан/очекиван одговор на терапију статинима, независно од пола и година (*Kiyama и сар.*, 2021). Испитаници у поменутој студији ($n=101$) били су пацијенти који никада пре укључења у студију нису користили ниједан од хиполипемичких лекова. Перкутана коронарна интервенција је спроведена код 80% испитаника, што је само незнатно већи проценат од наших резултата (72%) (табела 6). Након месец дана од почетка терапије статинима, код 40% испитаника вредности *LDL*-холестерола су снижене, уз истовремени пораст концентрација *PCSK9* (и интактне и скраћене форме), док је код 11% испитаника изостао одговор на терапију. Изостанком одговара сматра се смањење вредности *LDL*-холестерола мање од 15% у односу на почетне вредности (*Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration и сар.*, 2010).

Базалне вредности испитаника у групи *responders*, независно од примењеног третмана, биле су веће од *cut-off* вредности *PCSK9* која је одређена у студији *Kiyama и сар.* (2021). Такав налаз је очекиван, јер су испитаници у овом истраживању били на хроничној терапији аторвастатином, а познато је да се већ у периоду након 3–4 месеца од увођења статина достиже плато концентрација *PCSK9*. Добијени резултати након суплементације октакозанолом показују да примена дијететског суплемента може довести до смањења вредности *PCSK9* испод поменуте граничне вредности, што указује да се наставком примене статина поново могу очекивати додатни ефекти у погледу смањења концентрације *LDL*-холестерола. Врло је важно истаћи да је у групи *responders*, 80% пацијената већ имало постојећу КВБ (секундарна превенција), где је релативно смањење ризика пропорционално апсолутном смањењу *LDL*-холестерола захваљујући примени одговарајуће терапије. Према *ESC* препорукама за превенцију КВБ у клиничкој пракси (*Visseren и сар.*, 2021), циљне вредности *LDL*-холестерола у секундарној превенцији износе мање од 1,8 mmol/L за пацијенте са високим ризиком,

односно мање од 1,4 mmol/L за пацијенте са врло високим ризиком. Ове циљне вредности за пацијенте са високим ризиком су у складу са препорукама Америчког колеџа за кардиологију/Америчког удружења за болести срца (енгл. *American College of Cardiology/American Heart Association*, ACC/AHA) (*Grundy u cap.*, 2019).

У мултицентричној рандомизованој студији у популацији испитаника са умереном хиперхолестеролемијом и ниским кардиоваскуларним ризиком који нису на терапији статинима (*De Castro-Orós u cap.*, 2016), показано је да постоје велике интериндивидуалне варијације у одговору на комбинацију нутрацеутика са хиполипидемијским деловањем, у којој је био садржан и поликозанол. *De Castro-Oros u cap.* (2016) су у студији истраживали полиморфизме једног нуклеотида (енгл. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) у везујућим местима за транскрипционе факторе који регулишу експресију молекула *LDLR* и *PCSK9*. SNPs представљају најчешћу нормално присутну варијацију у геному која има значај у предвиђању одговора испитаника на одређени лек/нутрацеутик, осетљивости на разне факторе или ризика за развој појединих болести (*Rong u cap.*, 2021; *Shamloo u cap.*, 2020). Утврђено је да присуство SNPs (c.*52G>A, c.*504G>A и c.*773A>G) у 3' нетранслатирајућем региону (енгл. *untranslated region*, UTR) *LDLR* и SNPs (c.-3383C>G и c.-2063A>G) у 5' UTR *PCSK9* утиче на слабији одговор (смањење *LDL*-холестерола) испитаника на примену комбинације нутрацеутика. Показано је да се чак 20,5% варијација у одговору може објаснити присуством анализираних генетичких варијанти, односно да полиморфизам c.-3383C>G у 5'UTR *PCSK9* објашњава 14,1%, а c.*52G>A у 3' UTR *LDLR* 6,4% варијација, без обзира на старост, пол и ИТМ испитаника. Једна од компоненти анализираних комбинација нутрацеутика је берберин који утиче на стабилност информационе рибонуклеинске киселине (енгл. *messenger ribonucleic acid*, *mRNA*), односно на експресију гена за *LDLR*, тако што продужава полуживот *mRNA* (*H. Li u cap.*, 2009). У физиолошким условима, посттранскрипциона регулација експресије гена за *LDLR* је под контролом AU-богатим секвенци (енгл. *adenylate-uridylate-rich elements*, AREs) за које се сматра да подстичу брзу разградњу *mRNA LDLR*. С обзиром на то да су уочене SNPs у 3'UTR *LDLR* који садржи AREs, слабији одговор испитаника на примењену комбинацију нутрацеутика може бити услед изостанка активности транскрипционих фактора под утицајем берберина као последице полиморфизма гена. У студији није испитана веза између утврђених генетских варијација и свих компоненти препарата (анализиран је само берберин).

Закључак описане мултицентричне студије да носиоци одређених генетичких варијанти имају већу шансу да покажу слабији одговор на примењену комбинацију нутрацеутика у поређењу са оним испитаницима код којих нису присутне ове мутације, сугерише на значај анализе полиморфизма гена у циљу препознавања и идентификације оних испитаника који би имали потенцијалну корист од примењене суплементације октакозанолом. Истовремено смањење вредности и *LDL*-холестерола и *PCSK9* након суплементације октакозанолом може бити последица полиморфизма гена за *LDLR* и *PCSK9* који утиче на интериндивидуалне варијације у одговору.

С обзиром на то да су учесници били пацијенти који су на хроничној терапији аторвастатином дуже од 4 месеца, а знајући да је то период након кога се остварује максималан хиполипидемијски ефекат статина (независно да ли су примењене ниске или високе дозе статина), још један интересантан налаз наше студије јесте да је у групи *responders* базална вредност *LDL*-холестерола статистички била значајно виша него у групи *non-responders* ($p<0,05$) (табела 13). Након 13 седмица трајања студије, у групи *responders* концентрација *LDL*-холестерола је била статистички значајно нижа ($p<0,01$), што указује да жељени ефекти терапије могу зависити и од базалних вредности параметара.

Суплементација октакозанолом је утицала на промене концентрација *LDL*-холестерола само код дела суплементираних пацијената. Ипак, добијени резултати показују да, код одређеног броја испитаника, комбинација аторвастатина и октакозанола може превенирати потенцијалне нежељене ефекте који су повезани са повећањем вредности *PCSK9* изазваним

аторвастатином. Хипотеза да ће прогноза пацијената бити боља уколико се уз снижене вредности *LDL*-холестерола одржавају и константне концентрације *PCSK9* (*Leander u cap., 2016*), што је добијен налаз за неке пацијенте који су узимали октакозанол, остаје да се потврди у клиничким студијама са већим бројем испитаника. *Leander u cap. (2016)* су спровели проспективну студију током 15 година са више од 4200 здравих испитаника старости око 60 година, оба пола, како би испитали корелацију између *PCSK9* и будућих кардиоваскуларних догађаја (инфаркт миокарда, хронична исхемијска болест срца, изненадна срчана смрт, и фатални/нефатални исхемијски мождани удар). Испитаници су били селектовани у групе према вредностима прогностичких параметара (*PCSK9* и *LDL*-холестерол). Добијени резултати, у односу на прогностичке групе, сугеришу да испитаници у подгрупи (висок *PCSK9* – низак *LDL*-холестерол) имају највећи ризик за будући кардиоваскуларни догађај, чак и у поређењу са испитаницима у подгрупи висок *PCSK9* – висок *LDL*-холестерол (*Leander u cap., 2016*). Уочена повезаност између повишеног *PCSK9* и ризика од КВБ у одсуству повишеног *LDL*-холестерола указује и на улоге *PCSK9* које нису повезане искључиво са метаболизмом *LDL*-холестерола. Оно што је занимљиво јесте да комбинација повишених вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола пре указује на антагонизам, а не на додатни ризик за појаву КВБ у случају када су оба параметра повишена.

Могуће објашњење како је код одређеног броја испитаника након суплементације октакозанолом поново успостављена нарушена позитивна корелација између *PCSK9* и *LDL*-холестерола, захтева праћење утицаја полиморфизма гена који су укључени у комплексан регулаторни механизам функција протеина *PCSK9* и *LDLR*.

У овом делу докторске дисертације анализирани су параметри редокс статуса испитаника и динамика промена након 8 и 13 седмица. Добијени резултати показују да се промене посматраних параметара оксидативног стреса одвијају на исти начин у обе групе пацијената: уочено је статистички значајно повећање *TOS* након оба посматрана временска интервала, као и смањење концентрације *AOPP*, које нису биле статистички значајне (слике 12 и 13). Утицај суплементације октакозанолом на антиоксидативни статус праћен је одређивањем укупног садржаја *SH* група, мерењем активности *SOD* и *PON1* у серуму, као и одређивањем *TAS* (слике 14 и 15). Уочене промене параметара током времена нису се одвијале на различите начине у односу на примењен третман. Уочено је повећање нивоа *SH* група у обе групе, и после 8 седмице и после 13 седмица, у односу на ниво пре почетка третмана. Није забележена промена активности *SOD* у обе посматране групе. Запажено је статистички значајно смањење активности *PON1* на крају студије у поређењу са претходном контролном тачком (8. седмица) у обе посматране групе. *TAS*, маркер свеукупне антиоксидативне заштите, је током времена показивао значајно веће вредности, у оба посматрана интервала. Утврђене су статистички значајне разлике у свакој контролној тачки у поређењу са претходним вредностима, и то у обе групе испитаника. Промене *PAB*, параметра равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса су се одвијале различито у зависности од примењеног третмана. Резултати показују да постоји статистички значајно повећање *PAB* код испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанол, и то између 8. и 13. седмице (слика 16).

Повећани антиоксидативни капацитет код свих учесника након периода терапије може се објаснити као последица плејотропних ефеката статина, али и као компензациони механизам услед повећане продукције *ROS* у митохондријама. Бројни плејотропни ефекти статина се повезују са њиховом улогом у смањењу оксидативног стреса у организму (*Antoniades u Channon, 2014*). Познато је да статини смањују оксидативни стрес блокирајући стварање *ROS* и смањујући однос оксидованог (*NAD⁺*) и редукованог никотинамид аденин динуклеотида (*NADH*), а такође утичу на повећање активности азот-моноксид синтазе, липидну пероксидацију и вредности адипонектина (*Lim u Barter, 2014*). Описани механизми деловања статина су независни од њиховог хиполипемичког деловања и у знатној мери доприносе плејотропним ефектима статина. Скорашњи литературни подаци, такође, указују

на антиоксидативни улогу статина у КВБ (*Mason u cap., 2018; Tissier u cap., 2018*), као и да су антиатерогени ефекти статина повезани са њиховим плејотропним ефектима, посебно са антиоксидативним деловањем (*Profumo u cap., 2014*). Антиоксидативни ефекти статина заснивају се на способности статина да модулирају сигнални пут нуклеарни фактор 2 повезан са нуклеарним фактором еритроидом 2/хем оксигеназа-1 (енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ heme-oxygenase-1*, Nrf2/НО-1) у различитим органима индукујући експресију циљних гена (хем оксигеназа, глутатион пероксидаза) (*Mansouri u cap., 2022*). Транскрипциони фактор *Nrf2* регулише експресију великог броја гена који кодирају синтезу цитопротективних протеина укључујући и антиоксидативне ензиме, а његова активација омогућава адаптацију на различите врсте ћелијског стреса (*Zazueta u cap., 2022*).

Са друге стране, употреба статина, односно појава нежељених реакција се све чешће повезује управо за оксидативни стрес. Сложени механизам митохондријалне дисфункције и апоптозе, насталих као последица терапије статинима није у потпуности разјашњен (*Broniarek u cap., 2020*). Статини могу и индуковати производњу ROS, оштећење ДНК и протеина, што доводи до промењене концентрације ћелијских антиоксиданаса, повећања потенцијала мембране митохондрија, нарушене хомеостазе калцијума и активације сигналних путева који посредују у реакцијама оксидативног стреса (*Ward u cap., 2019*). Резултати *in vitro* студије су показали да се на изолованим митохондријама након третмана статинима уочавају следеће промене: смањена активност комплекса II која је била праћена оксидативним стресом, појавом набубрелих митохондрија и смањеним мембранским потенцијалом митохондрија (*Sadighara u cap., 2017*). Статинима индукован оксидативни стрес може бити повезан са појавом дијабетеса (*Park u cap., 2017*), миопатије (*du Souich u cap., 2017*) и развојем масне јетре (*Hadzi-Petrushev u cap., 2018*). Истраживачка група *Jiao u cap., (2017)* истиче двојаке ефекте статина у зависности од посматраног места деловања у организму тако да у атеросклеротским ткивима статини показују антиоксидативну улогу, док у јетри, бубрезима и мишићима доводе до тзв. статинима индуковане токсичности.

Важно је нагласити да је примена статина хронична, и то најчешће код пацијената који користе већи број лекова у терапији КВБ. Највећи број испитаника који су учествовали у студији у оквиру ове докторске дисертације је користио истовремено већи број лекова у терапији (табела 6). Запажено је да комбинације лекова утичу на поремећај равнотеже оксидоредукционих процеса које ћелијски хомеостатски механизми нису у стању да неутралишу. Врста статина (липофилни/хидрофилни), доза статина, дужина трајања лечења, али и физичко стање испитаника могу утицати на исходе терапије и појаву нежељених реакција. У самом процесу биотрансформације статина генеришу се ROS, али за разлику од липофилних статина који подлежу биотрансформацији, хидрофилни статини се излучују непромењени. Метаболизам се одвија првенствено преко *CYP3A4* за симвастатин, ловастатин и аторвастатин, док се флувастатин метаболише углавном преко *CYP2C9* (*Ward u cap., 2019*). Додатно, хепатотоксичност липофилних статина у старијој популацији настаје и као последица полиморфизма *CYP3A4*, смањеног клиренса лека и интеракције са другим индукторима/инхибиторима ензима укључених у метаболизам.

Врло је мали број доступних података о базалном редокс статусу пацијената на хроничној терапији статинима. Стога је рад *Sorenson u cap. (2019)* од посебног значаја, јер је ова истраживачка група спровела укрштену студију са 3420 пацијената на хроничној терапији статинима у којој је пратила биомаркер оксидативног стреса, 8-оксо-7,8-дихидро-2'-деоксигуанозин (*8-oxodG*) у урину *8-oxodG* представља продукт оксидативног оштећења ДНК и важан је у процени системских ефеката оксидативног стреса. Резултати ове популационе студије су показали да је у поређењу са особама које нису на терапији статинима, концентрација *8-oxodG* нижа за 4,3–6%. Када је у истој студији извршена подела испитаника на подгрупе у зависности од година старости, добијени су резултати који указују да код пацијената старијих од 60 година статини имају већи протективни ефекат у погледу

оксидативног стреса него код млађих пацијената (<60 година). Такође је утврђено да је у подгрупи пацијената са хипертензијом и смањеном бубрежном функцијом израженији протективни ефекат статина у погледу заштите ћелија од оксидативног оштећења ДНК. *Rasmussen u cap (2013)* су показали да код здравих мушкараца узраста 18-50 година статини не доводе до промена у вредностима *8-oxodG*. До истих резултата су дошли *Scheffer u cap. (2016)* који су потврдили да након 12 седмица примене аторвастатина/симвастатина није промењена концентрација *8-oxodG* у урину испитаника са високим ризиком за КВБ.

Подаци о ефектима октакозанола на редокс маркере код пацијената лечених статинима су непознати. Већина студија је пратила ефекте поликозанола (октакозанола) на субјекте у физиолошким условима када њихова природна антиоксидативна одбрана није нарушена. *Arteche-Hidalgo u cap. (2020)* су истраживали ефекте поликозанола, када су учесници изложени повећању оксидативног стреса због патолошких стања, и открили да шестомесечни третман поликозанолом код пацијената са метаболичким синдромом смањује редокс индекс. Поред тога, *S.-H. Lee u cap. (2019)* су показали да октакозанол може бити користан додаток за побољшање нивоа антиоксидативних ензима код спортиста након тренинга високог интензитета.

Појединачни биомаркери који се односе на редокс статус пацијената са КВБ повезани су са великом интра- и интер-индивидуалном варијабилношћу испитаника и не могу на једноставан начин да упуте на закључке (*Veglia u cap., 2006*), што су и наши резултати потврдили. Актуелна истраживања све више испитују полиморфизам гена чији производи испољавају антиоксидативна својства, а самим тип могу бити повезани са повећаном осетљивошћу на оксидативни стрес. Тако је полиморфизам селенопротеина *P, rs3877899* и *rs7579* повезан са различитим одговором на суплементацију селеном уз примену статина, што узрокује и различит одговор испитаника у погледу параметара редокс статуса и параметара липидног профила (*Moriguchi Watanabe u cap., 2022*).

Промене параметара редокс статуса током трајања студије су анализиране и у групама *responders* и *non-responders* (табела 14). Показано је да су у обе посматране групе, концентрација укупних *SH* група и вредности *TAS*, али и *TOS*, биле значајно више на крају студије него на почетку. Након 13 седмица, концентрације *AOPP* су се значајно смањиле само у групи *responders*, док су активност *PON1* и вредности *PAB* била статистички значајно више на крају истраживања само у групи *non-responders*. Поред анализе појединачних параметара, израчунат је окси-скор који комбинује појединачне биомаркере оксидативног оштећења и антиоксидативног капацитета и потпуније описује редокс статус испитаника (*Kliscic u cap., 2019; Perović-Blagojević u cap., 2018*). Показано је да окси-скор може помоћи у дијагнози клиничких кардиоваскуларних манифестација и праћењу одговора на терапију (*Quintana-Villamandos u cap., 2020*). Иако су почетне вредности окси-скора биле статистички значајно веће у групи *responders* у поређењу са испитаницима у групи *non-responders*, након 13 седмица утврђено је статистички значајно смањење вредности окси-скора само у *responders* групи (слика 21). Добијени резултати указују на значај одређивања овог скорa код пацијената с обзиром на то да су уочене статистички значајне разлике у групама *responders* и *non-responders*. Дакле, испитаници у групи *responders* су уз жељене промене параметара липидног профила и константне вредности *PCSK9*, имали и ниже вредности окси-скора на крају студије.

Анализа главних компоненти, као мултиваријантна статистичка анализа се све више примењује у дијетарним интервентним студијама, јер омогућава да се истражи комплексна међузависност између већег броја анализираних параметара. Такав приступ је, за сада примењен у само неколико недавно спроведених студија где је испитиван утицај суплементације на метаболички одговор спортиста (*Esquiús u cap., 2019; Pugh u cap., 2019; Stander u cap., 2021*). Применом анализе главних компоненти за испитивање независних предиктора (не)жељеног одговора (*non-responders vs. responders*) код пацијената на терапији аторвастатином издвојена су по четири фактора у обе посматране групе испитаника (табела

15), који заједно објашњавају 55% варијација у свим анализираним параметрима. У обе посматране групе, добијене су врло сличне процентуалне варијације за Фактор 1, у групи *responders* 15,5%, а у групи *non-responders* 16,6%, и што је још интересантније варијабле са позитивним оптерећењима *PCSK9*, *TAS*, *TOS* и *PAB* су заједничке, независно од посматране групе. За разлику од процента варијације Фактора 1 који је сличан у обе групе, остали фактори се разликују између посматраних група. Анализа главних компоненти је показала да у *responders* групи Фактор 2 објашњава 14,7% укупне варијације и укључује *ALT*, *AST* и *CK* и статус октакозанола (да/не). Назван је „фактор ризика за коронарне болести повезан са дијетарном интервенцијом“. У групи *non-responders* Фактор 4 карактеришу *SOD*, вредности глукозе и статус октакозанола (да/не), а објашњава 11,5% варијација. Назван је „метаболичко-антиоксидативни фактор повезан са дијетарном интервенцијом“. Добијени резултати потврђују да суплементација октакозанолом доприноси жељеном одговору, а интересантно је да нова варијабла представља комбинацију статуса суплементације и параметара који се одређују у циљу праћења нежељених ефеката терапије статинима (*ALT*, *AST* и *CK*). Одређивањем активности ензима трансaminaза и креатин киназе у нашој студији је показано да комбинација аторвастатина и октакозанола није показала нежељене ефекте у испитиваној популацији у погледу функције јетре нити је довела до оштећења мишића (табела 10).

Нови приступи у дизајнирању и интерпретацији дијетарних интервентних студија, укључују и анализу резултата у односу на одговор испитаника на крају истраживања, сугеришући значај идентификације специфичних маркера (генетских или метаболичких) који могу да предвиде индивидуални одговор испитаника на суплементацију (*responders vs. non-responders*) (Serini u Calviello, 2020). У студији коју су спровели Scolaro u cap., (2018) праћен је ефекат рибљег уља обогаченог ω -3 масним киселинама код испитаника који су на терапији статинима. Након 6 седмица суплементације, издвојене су групе *responders* и *non-responders* и то на основу ефеката на *LDL*-холестерол и *hsCRP*. Истраживање је настављено уз корекцију дозе статина у групи *responders* и задржавање исте дозе статина у групи *non-responders*. Показано је да примена ниже дозе статина (50% пуне дозе) у комбинацији са ω -3 масним киселинама доводи до истих ефеката на параметре липидног профила као пуна доза статина (без ω -3 масних киселина) у *non-responders* групи. У том смислу, на основу интериндивидуалних разлика у одговору на испитивани третман, могу се дати препоруке да ли ће примена одређеног нутрацеутика била корисна или не за пацијента, што је и један од увида ове докторске дисертације. Добијени резултати у нашој студији (слика 22) показују да иако су у групи *responders* на почетку студије биле веће вредности *hsCRP* у поређењу са базалним вредностима у групи *non-responders*, после 13 седмица студије нису уочене статистички значајне промене у вредностима *hsCRP* у посматраним групама.

Испитивана популација у нашој студији ($n = 87$) била је довољно велика да одговори на циљеве студије, али се мора истаћи да је у истраживање био укључен релативно мали број испитаника, што је утицало на вероватноћу за утврђивање статистички значајних промена одређених параметара који су праћени током ове интервентне студије. Анализирајући само једну дозу октакозанола (20 mg) није могао да се изведе закључак о дозно зависном утицају октакозанола на промене вредности посматраних параметара. Доступни литературни подаци указују да су ефективне дозе витамина K2 (180–360 μ g) знатно више од количине витамина K2 (45 μ g) у примењеној комбинацији нутрацеутика у нашој студији. Своју улогу, у смањењу кардиоваскуларног морбидитета, витамин K2 остварује активацијом матричног протеина и потенцијалним смањењем васкуларне калцификације. Иако су испитаници укључени у истраживање представљали случајеве из клиничке праксе, односно пацијенте који су већ неко време на хроничној терапији статинима, један од недостатака ове студије је одсуство групе „статин наивних“ (тј. *de novo*) пацијената који би у истом тренутку отпочели и терапију аторвастатином и примену октакозанола.

6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима студије, на основу резултата испитивања изведени су следећи закључци:

1. Суплементација октакозанолом (20 mg дневно) не испољава ефекте на вредности *PCSK9* ни на параметре липидног профила (укупни холестерол, *LDL*-холестерол, *HDL*-холестерол и триглицериди) након 8, односно 13 седмица трајања студије.
2. Суплементација октакозанолом је допринела поновном успостављању корелације између вредности *PCSK9* и *LDL*-холестерола у серуму која је вероватно била нарушена услед хроничне употребе статина. Позитивна корелација је забележена између процентуалних промена *PCSK9* и *LDL*-холестерола већ након 8 седмица примене октакозанола и задржала се све до краја студије. Испитаници код којих је уочено највеће смањење вредности *PCSK9*, имали су и тенденцију највећег смањења *LDL*-холестерола у серуму.
3. У односу на промене параметара липидног профила (процентуално смањење вредности *LDL*-холестерола и процентуално повећање вредности *HDL*-холестерола), испитаници су подељени у групе *responders* (43,2%) и *non-responders* (56,8%). Анализа промена вредности *PCSK9* у подгрупама испитаника *responders* и *non-responders* показала је тренд смањења концентрација *PCSK9* након 13 седмица у групи *responders*, и то само код оних испитаника који су уз аторвастатин узимали и октакозанола.
4. Суплементација октакозанолом је утицала на промене концентрација *LDL*-холестерола код дела суплементираних пацијената, чиме је показано да комбинација аторвастатина и октакозанола може превенирати потенцијалне нежељене ефекте који су повезани са повећањем вредности *PCSK9* изазваним аторвастатином.
5. Препоручена гранична (*cut-off*) вредност базалне концентрације *PCSK9* (>228 ng/mL) може идентификовати појединце који неће имати адекватан/очекиван одговор на терапију статинима. Суплементација октакозанолом је у *responders* групи довела до смањења вредности *PCSK9* испод поменуте граничне вредности *PCSK9*, што указује да се наставком примене статина поново могу очекивати додатни ефекти у погледу смањења концентрације *LDL*-холестерола.
6. Суплементација октакозанолом није утицала на параметре оксидативног статуса (*TOS*, *PAB*, *AOPP*), као ни на параметре антиоксидативне заштите (*PONI*, *SOD*, *TAS*, *SHG*) када се посматра цела група суплементираних пацијената.
7. Анализа промена вредности параметара редокс статуса у групама *responders* и *non-responders* је показала истовремени пораст вредности и *TAS* и *TOS* у обе групе. Повећани антиоксидативни капацитет код свих учесника је највероватније

последича плејотропних ефеката статина, али и компензациони механизам услед повећане продукције *ROS* у митохондријама под утицајем хроничне терапије статинима, што је у овој студији показано повећањем концентрације *TOS*.

8. Утврђено је да испитаници у групи *responders*, уз жељене промене параметара липидног профила и константне вредности *PCSK9*, имају и ниже вредности оксидног статуса на крају студије.
9. Применом анализе главних компоненти добијена су по 4 значајна фактора у групама *responders* и *non-responders*. Ова четири издвојена фактора, у обе посматране групе испитаника, објашњавају 55% варијација у свим анализираним параметрима.
10. У групи *responders*, нова варијабла „дислипидемија-редокс баланс фактор повезан са инфламацијом“ објашњава највећи проценат укупне варијације (15,5%) и повезан је са позитивним оптерећењима *PCSK9*, *TAS*, *TOS*, *PAB*, и *hsCRP* са негативним оптерећењем.
11. Фактори који садрже варијаблу „статус октакозанола“ објашњавају 14,7% (*responders*) и 11,5% (*non-responders*) укупне варијације. У групи *responders* ова варијабла је названа „фактор ризика за коронарне болести повезан са дијетарном интервенцијом“ и повезује статус суплементације и параметаре који се одређују у циљу праћења нежељених ефеката терапије статинима (*ALT*, *AST* и *CK*).

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.-M., Luc, G., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, *34*(2), 154–156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>
2. Adorni, M. P., Zimetti, F., Lupo, M. G., Ruscica, M., & Ferri, N. (2020). Naturally Occurring PCSK9 Inhibitors. *Nutrients*, *12*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/nu12051440>
3. Affuso, F., Mercurio, V., Ruvolo, A., Pirozzi, C., Micillo, F., Carlomagno, G., Grieco, F., & Fazio, S. (2012). A nutraceutical combination improves insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. *World Journal of Cardiology*, *4*(3), 77–83. <https://doi.org/10.4330/wjc.v4.i3.77>
4. Alamdari, D. H., Paletas, K., Pegiou, T., Sarigianni, M., Befani, C., & Koliakos, G. (2007). A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical Biochemistry*, *40*(3–4), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017>
5. Alvi, S. S., Ansari, I. A., Ahmad, M. K., Iqbal, J., & Khan, M. S. (2017). Lycopene amends LPS induced oxidative stress and hypertriglyceridemia via modulating PCSK-9 expression and Apo-CIII mediated lipoprotein lipase activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *96*, 1082–1093. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.116>
6. Antoniadou, C., & Channon, K. M. (2014). Statins: Pleiotropic Regulators of Cardiovascular Redox State. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(8), 1195–1197. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5836>
7. Arias-Moreno, X., Velazquez-Campoy, A., Rodríguez, J. C., Pocoví, M., & Sancho, J. (2008). Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: Implications of the stability and Ca²⁺ affinity of the fifth binding module of the LDL receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(33), 22670–22679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802153200>
8. Artech-Hidalgo, L., Fernandez-Travieso, J. C., Suarez-Camejo, N., Marin-Preval, J., Alvarez-Acosta, V., Chaviano-Pereira, J., Garcia-Sanchez, M., Esquivel-Moinelo, I., Diaz-Gonzalez, M., Matos-Reyes, O., Fernandez-Dorta, L., Illnait-Ferrer, J., Mendoza-Castano, S., Monzon-Perez, M., & Pedroso, V. S. (2020). Effects of Policosanol in Patients With

- Metabolic Syndrome: A Six-Month Study. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.14740/jem.v10i2.642>
9. Attard, T. M., McElroy, C. R., Gammons, R. J., Slattery, J. M., Supanchaiyamat, N., Kamei, C. L. A., Dolstra, O., Trindade, L. M., Bruce, N. C., McQueen-Mason, S. J., Shimizu, S., & Hunt, A. J. (2016). Supercritical CO₂ Extraction as an Effective Pretreatment Step for Wax Extraction in a Miscanthus Biorefinery. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(11), 5979–5988. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01220>
 10. Backes, J. M., Gibson, C. A., Ruisinger, J. F., & Moriarty, P. M. (2011). Modified-policosanols does not reduce plasma lipoproteins in hyperlipidemic patients when used alone or in combination with statin therapy. *Lipids*, 46(10), 923–929. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3591-8>
 11. Banach, M., Cannon, C. P., Paneni, F., Penson, P. E., & endorsed by the International Lipid Expert Panel (ILEP). (2023). Individualized therapy in statin intolerance: The key to success. *European Heart Journal*, 44(7), 544–546. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac556>
 12. Banach, M., Patti, A. M., Giglio, R. V., Cicero, A. F. G., Atanasov, A. G., Bajraktari, G., Bruckert, E., Descamps, O., Djuric, D. M., Ezhov, M., Fras, Z., von Haehling, S., Katsiki, N., Langlois, M., Latkovskis, G., Mancini, G. B. J., Mikhailidis, D. P., Mitchenko, O., Moriarty, P. M., ... International Lipid Expert Panel (ILEP). (2018). The Role of Nutraceuticals in Statin Intolerant Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(1), 96–118. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.040>
 13. Banach, M., Rizzo, M., Toth, P. P., Farnier, M., Davidson, M. H., Al-Rasadi, K., Aronow, W. S., Athyros, V., Djuric, D. M., Ezhov, M. V., Greenfield, R. S., Hovingh, G. K., Kostner, K., Serban, C., Lighezan, D., Fras, Z., Moriarty, P. M., Muntner, P., Goudev, A., ... Mikhailidis, D. P. (2015). Statin intolerance—An attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Archives of Medical Science: AMS*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.49807>
 14. Banerjee, S., Ghoshal, S., & Porter, T. D. (2011). Activation of AMP-kinase by policosanols requires peroxisomal metabolism. *Lipids*, 46(4), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3540-6>
 15. Bassuk, S. S., Rifai, N., & Ridker, P. M. (2004). High-sensitivity C-reactive protein: Clinical importance. *Current Problems in Cardiology*, 29(8), 439–493.
 16. Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., & Seidah, N. G. (2006). The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30561–30572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606495200>
 17. Bersot, T.P. (2015). Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. Brunton, L.L., & Chabner, B.A., & Knollmann B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12e. McGraw Hill.
 18. Berthold, H. K., Unverdorben, S., Degenhardt, R., Bulitta, M., & Gouni-Berthold, I. (2006). Effect of Policosanol on Lipid Levels Among Patients With Hypercholesterolemia or Combined Hyperlipidemia: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 295(19), 2262–2269. <https://doi.org/10.1001/jama.295.19.2262>

19. Beulens, J. W. J., Bots, M. L., Atsma, F., Bartelink, M.-L. E. L., Prokop, M., Geleijnse, J. M., Witteman, J. C. M., Grobbee, D. E., & van der Schouw, Y. T. (2009). High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*, *203*(2), 489–493. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.010>
20. Bin, Y. S., & Kiat, H. (2011). Prevalence of Dietary Supplement Use in Patients with Proven or Suspected Cardiovascular Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2011*, 632829. <https://doi.org/10.1155/2011/632829>
21. Broniarek, I., Dominiak, K., Galganski, L., & Jarmuszkiewicz, W. (2020). The Influence of Statins on the Aerobic Metabolism of Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), E1485. <https://doi.org/10.3390/ijms21041485>
22. Browning, J. D., & Horton, J. D. (2010). Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *Journal of Lipid Research*, *51*(11), 3359–3363. <https://doi.org/10.1194/jlr.P009860>
23. Burnap, S. A., Sattler, K., Pechlaner, R., Duregotti, E., Lu, R., Theofilatos, K., Takov, K., Heusch, G., Tsimikas, S., Fernández-Hernando, C., Berry, S. E., Hall, W. L., Notdurfter, M., Rungger, G., Paulweber, B., Willeit, J., Kiechl, S., Levkau, B., & Mayr, M. (2021). PCSK9 Activity Is Potentiated Through HDL Binding. *Circulation Research*, *129*(11), 1039–1053. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319272>
24. Busuioc, R. M., Covic, A., Kanbay, M., Banach, M., Burlacu, A., & Mircescu, G. (2020). Protein convertase subtilisin/kexin type 9 biology in nephrotic syndrome: Implications for use as therapy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *35*(10), 1663–1674. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz108>
25. Cai, G., Zhang, B., Shi, G., Weng, W., Ma, C., Song, Y., & Zhang, J. (2015). The associations between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 E670G polymorphism and the risk of coronary artery disease and serum lipid levels: A meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, *14*, 149. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0154-7>
26. Cai, Y., Lu, D., Zou, Y., Zhou, C., Liu, H., Tu, C., Li, F., Liu, L., & Zhang, S. (2017). Curcumin Protects Against Intestinal Origin Endotoxemia in Rat Liver Cirrhosis by Targeting PCSK9. *Journal of Food Science*, *82*(3), 772–780. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13647>
27. Canuel, M., Sun, X., Asselin, M.-C., Paramithiotis, E., Prat, A., & Seidah, N. G. (2013). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PloS One*, *8*(5), e64145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064145>
28. Careskey, H. E., Davis, R. A., Alborn, W. E., Troutt, J. S., Cao, G., & Konrad, R. J. (2008). Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *Journal of Lipid Research*, *49*(2), 394–398. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700437-JLR200>
29. Charest, J., & Grandner, M. A. (2020). Sleep and Athletic Performance: Impacts on Physical Performance, Mental Performance, Injury Risk and Recovery, and Mental Health. *Sleep Medicine Clinics*, *15*(1), 41–57. <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2019.11.005>

30. Chen, J. T., Wesley, R., Shamburek, R. D., Pucino, F., & Csako, G. (2005). Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: Plant sterols and stanols versus policosanol. *Pharmacotherapy*, *25*(2), 171–183. <https://doi.org/10.1592/phco.25.2.171.56942>
31. Chen, X., Chen, Y., Liu, Y., Zou, L., McClements, D. J., & Liu, W. (2022). A review of recent progress in improving the bioavailability of nutraceutical-loaded emulsions after oral intake. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *21*(5), 3963–4001. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13017>
32. Chen, Y. Q., Troutt, J. S., & Konrad, R. J. (2014). PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. *Lipids*, *49*(5), 445–455. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3895-6>
33. Choi, S., & Korstanje, R. (2013). Proprotein convertases in high-density lipoprotein metabolism. *Biomarker Research*, *1*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-1-27>
34. Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration. (2019). Efficacy and safety of statin therapy in older people: A meta-analysis of individual participant data from 28 randomised controlled trials. *Lancet (London, England)*, *393*(10170), 407–415. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31942-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31942-1)
35. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., Holland, L. E., Reith, C., Bhala, N., Peto, R., Barnes, E. H., Keech, A., Simes, J., & Collins, R. (2010). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet (London, England)*, *376*(9753), 1670–1681. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61350-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61350-5)
36. Chu, B., Qu, Y., Huang, Y., Zhang, L., Chen, X., Long, C., He, Y., Ou, C., & Qian, Z. (2016). PEG-derivatized octacosanol as micellar carrier for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *500*(1–2), 345–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.030>
37. Cicero, A. F., Colletti, A., Rosticci, M., Grandi, E., & Borghi, C. (2016). Efficacy and tolerability of a combined lipid-lowering nutraceutical on cholesterolemia, hs-CRP level and endothelial function in moderately hypercholesterolemic subjects. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, *30*(2), 593–598.
38. Cicero, A. F. G., Colletti, A., Bajraktari, G., Descamps, O., Djuric, D. M., Ezhov, M., Fras, Z., Katsiki, N., Langlois, M., Latkovskis, G., Panagiotakos, D. B., Paragh, G., Mikhailidis, D. P., Mitchenko, O., Paulweber, B., Pella, D., Pitsavos, C., Reiner, Ž., Ray, K. K., ... Banach, M. (2017). Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutrition Reviews*, *75*(9), 731–767. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux047>
39. Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Stoian, A. P., Vrablik, M., Al Rasadi, K., Banach, M., Toth, P. P., & Rizzo, M. (2021). Nutraceuticals in the Management of Dyslipidemia: Which, When, and for Whom? Could Nutraceuticals Help Low-Risk Individuals with Non-optimal Lipid Levels? *Current Atherosclerosis Reports*, *23*(10), 57. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00955-y>
40. Cohn, W., Thürmann, P., Tenter, U., Aebischer, C., Schierle, J., & Schalch, W. (2004). Comparative multiple dose plasma kinetics of lycopene administered in tomato juice, tomato soup or lycopene tablets. *European Journal of Nutrition*, *43*(5), 304–312. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0476-0>

41. Colletti, A., Fratter, A., Pellizzato, M., & Cravotto, G. (2022). Nutraceutical Approaches to Dyslipidaemia: The Main Formulative Issues Preventing Efficacy. *Nutrients*, *14*(22), 4769. <https://doi.org/10.3390/nu14224769>
42. Cranenburg, E. C. M., Koos, R., Schurgers, L. J., Magdeleyns, E. J., Schoonbrood, T. H. M., Landewé, R. B., Brandenburg, V. M., Bekers, O., & Vermeer, C. (2010). Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species. *Thrombosis and Haemostasis*, *104*(4), 811–822. <https://doi.org/10.1160/TH09-11-0786>
43. Cubeddu, L. X., Cubeddu, R. J., Heimowitz, T., Restrepo, B., Lamas, G. A., & Weinberg, G. B. (2006). Comparative lipid-lowering effects of policosanol and atorvastatin: A randomized, parallel, double-blind, placebo-controlled trial. *American Heart Journal*, *152*(5), 982.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2006.08.009>
44. Daiber, A., Hahad, O., Andreadou, I., Steven, S., Daub, S., & Münzel, T. (2021). Redox-related biomarkers in human cardiovascular disease—Classical footprints and beyond. *Redox Biology*, *42*, 101875. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101875>
45. Dalmeijer, G. W., van der Schouw, Y. T., Magdeleyns, E., Ahmed, N., Vermeer, C., & Beulens, J. W. J. (2012). The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein. *Atherosclerosis*, *225*(2), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.019>
46. De Castro-Orós, I., Solà, R., Valls, R. M., Brea, A., Mozas, P., Puzo, J., & Pocoví, M. (2016). Genetic Variants of LDLR and PCSK9 Associated with Variations in Response to Antihypercholesterolemic Effects of Armolipid Plus with Berberine. *PloS One*, *11*(3), e0150785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150785>
47. Devaraj, S., Du Clos, T. W., & Jialal, I. (2005). Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(7), 1359–1363. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168573.10844.ae>
48. Di Taranto, M. D., Giacobbe, C., Palma, D., Iannuzzo, G., Gentile, M., Calcaterra, I., Guardamagna, O., Auricchio, R., Di Minno, M. N. D., & Fortunato, G. (2021). Genetic spectrum of familial hypercholesterolemia and correlations with clinical expression: Implications for diagnosis improvement. *Clinical Genetics*, *100*(5), 529–541. <https://doi.org/10.1111/cge.14036>
49. Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(3), 954–994. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12547>
50. Dong, B., Li, H., Singh, A. B., Cao, A., & Liu, J. (2015). Inhibition of PCSK9 transcription by berberine involves down-regulation of hepatic HNF1α protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(7), 4047–4058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597229>
51. Dong, B., Wu, M., Li, H., Kraemer, F. B., Adeli, K., Seidah, N. G., Park, S. W., & Liu, J. (2010). Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1α and SREBP2: Mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *Journal of Lipid Research*, *51*(6), 1486–1495. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003566>

52. D’Oria, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2020). The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, e5732956. <https://doi.org/10.1155/2020/5732956>
53. Dragan, S., Serban, M.-C., & Banach, M. (2015). Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibitors: An emerging lipid-lowering therapy? *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20(2), 157–168. <https://doi.org/10.1177/1074248414539562>
54. du Souich, P., Roederer, G., & Dufour, R. (2017). Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacology & Therapeutics*, 175, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.029>
55. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
56. Enjoji, M., Kohjima, M., & Nakamuta, M. (2016). Lipid Metabolism and the Liver. In H. Ohira (Ed.), *The Liver in Systemic Diseases* (pp. 105–122). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6_6
57. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
58. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
59. Esquiú, L., Garcia-Retortillo, S., Balagué, N., Hristovski, R., & Javierre, C. (2019). Physiological- and performance-related effects of acute olive oil supplementation at moderate exercise intensity. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12970-019-0279-6>
60. Evrard, S., Delanaye, P., Kamel, S., Cristol, J.-P., Cavalier, E., & SFBC/SN joined working group on vascular calcifications. (2015). Vascular calcification: From pathophysiology to biomarkers. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 438, 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.034>
61. Fan, D., Yancey, P. G., Qiu, S., Ding, L., Weeber, E. J., Linton, M. F., & Fazio, S. (2008). Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*, 47(6), 1631–1639. <https://doi.org/10.1021/bi7016359>
62. Fan, T.-Y., Yang, Y.-X., Zeng, Q.-X., Wang, X.-L., Wei, W., Guo, X.-X., Zhao, L.-P., Song, D.-Q., Wang, Y.-X., Wang, L., & Hong, B. (2021). Structure-activity relationship and biological evaluation of berberine derivatives as PCSK9 down-regulating agents. *Bioorganic Chemistry*, 113, 104994. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104994>
63. Farnier, M. (2011). The role of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in hyperlipidemia: Focus on therapeutic implications. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions*, 11(3), 145–152. <https://doi.org/10.2165/11590330-000000000-00000>
64. Fernández-Arche, A., Marquez-Martín, A., de la Puerta Vazquez, R., Perona, J. S., Terencio, C., Perez-Camino, C., & Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Long-chain fatty alcohols from pomace

- olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.01.007>
65. Ferri, N., Corsini, A., Macchi, C., Magni, P., & Ruscica, M. (2016). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: Experimental animal models and clinical evidence. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 173, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.10.004>
 66. Ferri, N., Ruscica, M., Coggi, D., Bonomi, A., Amato, M., Frigerio, B., Sansaro, D., Ravani, A., Veglia, F., Capra, N., Lupo, M. G., Macchi, C., Castelnovo, S., Savonen, K., Silveira, A., Kurl, S., Giral, P., Pirro, M., Strawbridge, R. J., ... IMPROVE study group. (2020). Sex-specific predictors of PCSK9 levels in a European population: The IMPROVE study. *Atherosclerosis*, 309, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.07.014>
 67. Filippatos, T. D., Kei, A., Rizos, C. V., & Elisaf, M. S. (2018). Effects of PCSK9 Inhibitors on Other than Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lipid Variables. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 23(1), 3–12. <https://doi.org/10.1177/1074248417724868>
 68. Fink, G. (2007). *Encyclopedia of Stress*, 2nd ed. San Diego: Academic Press.
 69. Fitchett, D. H., Hegele, R. A., & Verma, S. (2015). Cardiology patient page. Statin intolerance. *Circulation*, 131(13), e389-391. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013189>
 70. Fonseca, F. A. H., & Izar, M. C. de O. (2016). High-Sensitivity C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease Across Countries and Ethnicities. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 71(4), 235–242. [https://doi.org/10.6061/clinics/2016\(04\)11](https://doi.org/10.6061/clinics/2016(04)11)
 71. Fraga, V., Menéndez, R., Amor, A. M., González, R. M., Jiménez, S., & Mas, R. (1997). Effect of policosanol on in vitro and in vivo rat liver microsomal lipid peroxidation. *Archives of Medical Research*, 28(3), 355–360.
 72. Gao, W., Liu, D., & Su, S. (2015). High-performance thin-layer chromatography for quantification of 1-octacosanol in Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana). *Journal of Chromatographic Science*, 53(5), 811–815. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu098>
 73. Gast, G. C. M., de Roos, N. M., Sluijs, I., Bots, M. L., Beulens, J. W. J., Geleijnse, J. M., Witteman, J. C., Grobbee, D. E., Peeters, P. H. M., & van der Schouw, Y. T. (2009). A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 19(7), 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.10.004>
 74. Giuffrè, A. M., & Capocasale, M. (2015). Policosanol in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed Oil: The Effect of Cultivar. *Journal of Oleo Science*, 64(6), 625–631. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15002>
 75. Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2015). A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell*, 161(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036>
 76. Gong, J., Qin, X., Yuan, F., Hu, M., Chen, G., Fang, K., Wang, D., Jiang, S., Li, J., Zhao, Y., Huang, Z., Dong, H., & Lu, F. (2018). Efficacy and safety of sugarcane policosanol on dyslipidemia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700280>

77. Gouni-Berthold, I., & Berthold, H. K. (2002). Policosanol: Clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid-lowering agent. *American Heart Journal*, *143*(2), 356–365. <https://doi.org/10.1067/mhj.2002.119997>
78. Granja, A. L., Hernandez, J. M., Quintana, D. C., Valmana, L. A., Ferreiro, R. M., & Mesa, M. G. (1997). *Mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses* (United States Patent US5663156A). <https://patents.google.com/patent/US5663156/en>
79. Graversen, C. B., Lundbye-Christensen, S., Thomsen, B., Christensen, J. H., & Schmidt, E. B. (2016). Marine n-3 polyunsaturated fatty acids lower plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels in pre- and postmenopausal women: A randomised study. *Vascular Pharmacology*, *76*, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.07.001>
80. Grundy, S. M., Stone, N. J., Bailey, A. L., Beam, C., Birtcher, K. K., Blumenthal, R. S., Braun, L. T., de Ferranti, S., Faiella-Tommasino, J., Forman, D. E., Goldberg, R., Heidenreich, P. A., Hlatky, M. A., Jones, D. W., Lloyd-Jones, D., Lopez-Pajares, N., Ndumele, C. E., Orringer, C. E., Peralta, C. A., ... Yeboah, J. (2019). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, *139*(25), e1082–e1143. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000625>
81. Guardiola, M., Plana, N., Ibarretxe, D., Cabré, A., González, M., Ribalta, J., & Masana, L. (2015). Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *128*(12), 877–882. <https://doi.org/10.1042/CS20140832>
82. Guo, T., Lin, Q., Li, X., Nie, Y., Wang, L., Shi, L., Xu, W., Hu, T., Guo, T., & Luo, F. (2017). Octacosanol Attenuates Inflammation in Both RAW264.7 Macrophages and a Mouse Model of Colitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(18), 3647–3658. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05465>
83. Guo, Y., Yan, B., Gui, Y., Tang, Z., Tai, S., Zhou, S., & Zheng, X.-L. (2021). Physiology and role of PCSK9 in vascular disease: Potential impact of localized PCSK9 in vascular wall. *Journal of Cellular Physiology*, *236*(4), 2333–2351. <https://doi.org/10.1002/jcp.30025>
84. Guo, Y.-L., Xu, R.-X., Zhu, C.-G., Wu, N.-Q., Cui, Z.-P., & Li, J.-J. (2014). Policosanol attenuates statin-induced increases in serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 when combined with atorvastatin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, *2014*, 926087. <https://doi.org/10.1155/2014/926087>
85. Hadzi-Petrushev, N., Dimovska, K., Jankulovski, N., Mitrov, D., & Mladenov, M. (2018). Supplementation with Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid to Nonalcoholic Fatty Liver Disease's Statin Therapy in Men. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2018*, 4673061. <https://doi.org/10.1155/2018/4673061>
86. Haim, D., Videla, L. (2008). Policosanols, protective natural compounds in cardiovascular disease. *Agro Food Industry Hi-Tech*, *19*, 60-63.
87. Haim, D., Berríos, M., Valenzuela, A., & Videla, L. A. (2009). Trace quantification of 1-octacosanol and 1-triacontanol and their main metabolites in plasma by liquid-liquid

- extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(32), 4154–4158. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.034>
88. Han, B., Eacho, P. I., Knierman, M. D., Troutt, J. S., Konrad, R. J., Yu, X., & Schroeder, K. M. (2014). Isolation and characterization of the circulating truncated form of PCSK9. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1505–1514. <https://doi.org/10.1194/jlr.M049346>
 89. Hargrove, J. L., Greenspan, P., & Hartle, D. K. (2004). Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(3), 215–226. <https://doi.org/10.1177/153537020422900301>
 90. Hariri, E., Kassis, N., Iskandar, J.-P., Schurgers, L. J., Saad, A., Abdelfattah, O., Bansal, A., Isogai, T., Harb, S. C., & Kapadia, S. (2021). Vitamin K2-a neglected player in cardiovascular health: A narrative review. *Open Heart*, 8(2), e001715. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2021-001715>
 91. Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C.-C., Bhindi, R., & Figtree, G. A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1(1), 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
 92. Hori, M., Ishihara, M., Yuasa, Y., Makino, H., Yanagi, K., Tamanaha, T., Kishimoto, I., Kujiraoka, T., Hattori, H., & Harada-Shiba, M. (2015). Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for PCSK9. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(1), E41-49. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3066>
 93. Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>
 94. Hua, W., Ding, L., Chen, Y., Gong, B., He, J., & Xu, G. (2007). Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(4), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.022>
 95. Huang, S., Henry, L., Ho, Y. K., Pownall, H. J., & Rudenko, G. (2010). Mechanism of LDL binding and release probed by structure-based mutagenesis of the LDL receptor. *Journal of Lipid Research*, 51(2), 297–308. <https://doi.org/10.1194/jlr.M000422>
 96. Irmak, S., Dunford, N. T., & Milligan, J. (2006). Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry*, 95(2), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.009>
 97. Ishaka, A., Umar Imam, M., Mahamud, R., Zuki, A. B. Z., & Maznah, I. (2014). Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2261–2269. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56999>
 98. Jeong, H. J., Lee, H.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-K., Yoon, D., & Park, S. W. (2008). Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *Journal of Lipid Research*, 49(2), 399–409. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700443-JLR200>

99. Jia, F., Fei, S.-F., Tong, D.-B., Xue, C., & Li, J.-J. (2022). Sex difference in circulating PCSK9 and its clinical implications. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.953845>
100. Jia, Q., Cao, H., Shen, D., Li, S., Yan, L., Chen, C., Xing, S., & Dou, F. (2019). Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1. *International Journal of Molecular Medicine*, *44*(3), 893–902. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4263>
101. Jiao, X., Ashtari, N., Rahimi-Balaei, M., Chen, Q. M., Badbezanchi, I., Shojaei, S., Marzban, A., Mirzaei, N., Chung, S., Guan, T., Li, J., Vriend, J., Mehr, S. E., Kong, J., & Marzban, H. (2017). Mevalonate Cascade and Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases: Future Targets for Therapeutic Application. *Current Molecular Pharmacology*, *10*(2), 115–140. <https://doi.org/10.2174/1874467209666160112125446>
102. Jing, Y., Hu, T., Lin, C., Xiong, Q., Liu, F., Yuan, J., Zhao, X., & Wang, R. (2019). Resveratrol downregulates PCSK9 expression and attenuates steatosis through estrogen receptor α -mediated pathway in L02 cells. *European Journal of Pharmacology*, *855*, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.019>
103. Jung, D. M., Lee, M. J., Yoon, S. H., & Jung, M. Y. (2011). A gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometric analysis of policosanols in commercial vegetable oils. *Journal of Food Science*, *76*(6), C891-899. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02232.x>
104. Kabir, Y., & Kimura, S. (1993). Biodistribution and metabolism of orally administered octacosanol in rats. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *37*(1), 33–38. <https://doi.org/10.1159/000177746>
105. Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, *441*(7092), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature04870>
106. Kaup, R. M., Khayyal, M. T., & Verspohl, E. J. (2013). Antidiabetic effects of a standardized Egyptian rice bran extract. *Phytotherapy Research: PTR*, *27*(2), 264–271. <https://doi.org/10.1002/ptr.4705>
107. Kaushik, M. K., Aritake, K., Takeuchi, A., Yanagisawa, M., & Urade, Y. (2017). Octacosanol restores stress-affected sleep in mice by alleviating stress. *Scientific Reports*, *7*(1), 8892. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08874-2>
108. Kim, H., Park, S., Han, D. S., & Park, T. (2003). Octacosanol supplementation increases running endurance time and improves biochemical parameters after exhaustion in trained rats. *Journal of Medicinal Food*, *6*(4), 345–351. <https://doi.org/10.1089/109662003772519903>
109. Kim, S.-J., Yadav, D., Park, H.-J., Kim, J.-R., & Cho, K.-H. (2018). Long-Term Consumption of Cuban Policosanol Lowers Central and Brachial Blood Pressure and Improves Lipid Profile With Enhancement of Lipoprotein Properties in Healthy Korean Participants. *Frontiers in Physiology*, *9*, 412. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00412>
110. Kitamura, K., Okada, Y., Okada, K., Kawaguchi, Y., & Nagaoka, S. (2017). Epigallocatechin gallate induces an up-regulation of LDL receptor accompanied by a reduction of PCSK9 via the annexin A2-independent pathway in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(8). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600836>

111. Klisic, A., Kavacic, N., Stanisic, V., Vujcic, S., Spasojevic-Kalimanovska, V., Ninic, A., & Kotur-Stevuljevic, J. (2019). Endocan and a novel score for dyslipidemia, oxidative stress and inflammation (DOI score) are independently correlated with glycosylated hemoglobin (HbA1c) in patients with prediabetes and type 2 diabetes. *Archives of Medical Science*, *16*(1), 42–50. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.87541>
112. Knapen, M. H. J., Braam, L. A. J. L. M., Drummen, N. E., Bekers, O., Hoeks, A. P. G., & Vermeer, C. (2015). Menaquinone-7 supplementation improves arterial stiffness in healthy postmenopausal women. A double-blind randomised clinical trial. *Thrombosis and Haemostasis*, *113*(5), 1135–1144. <https://doi.org/10.1160/TH14-08-0675>
113. Kosenko, T., Golder, M., Leblond, G., Weng, W., & Lagace, T. A. (2013). Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(12), 8279–8288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421370>
114. Kotur-Stevuljevic, J., Bogavac-Stanojevic, N., Jelic-Ivanovic, Z., Stefanovic, A., Gojkovic, T., Joksic, J., Sopic, M., Gulan, B., Janac, J., & Milosevic, S. (2015). Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*, *241*(1), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.016>
115. Kuyama, N., Kataoka, Y., Takegami, M., Nishimura, K., Harada-Shiba, M., Hori, M., Ogura, M., Otsuka, F., Asaumi, Y., Noguchi, T., Tsujita, K., & Yasuda, S. (2021). Circulating Mature PCSK9 Level Predicts Diminished Response to Statin Therapy. *Journal of the American Heart Association*, *10*(11), e019525. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.019525>
116. Lagace, T. A. (2014). PCSK9 and LDLR degradation: Regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Current Opinion in Lipidology*, *25*(5), 387–393. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000114>
117. Lakoski, S. G., Lagace, T. A., Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2009). Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(7), 2537–2543. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0141>
118. Lammi, C., Zaroni, C., Aiello, G., Arnoldi, A., & Grazioso, G. (2016). Lupin Peptides Modulate the Protein-Protein Interaction of PCSK9 with the Low Density Lipoprotein Receptor in HepG2 Cells. *Scientific Reports*, *6*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep29931>
119. Leander Karin, Mälärstig Anders, van't Hooft Ferdinand M., Hyde Craig, Hellénus Mai-Lis, Troutt Jason S., Konrad Robert J., Öhrvik John, Hamsten Anders, & de Faire Ulf. (2016). Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation*, *133*(13), 1230–1239. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018531>
120. Lee, S., Lee, G. S., Moon, J. H., & Jung, J. (2022). Policosanol suppresses tumor progression in a gastric cancer xenograft model. *Toxicological Research*, *38*(4), 567–575. <https://doi.org/10.1007/s43188-022-00139-z>
121. Lee, S.-H., Scott, S. D., Pekas, E. J., Lee, J.-G., & Park, S.-Y. (2019). Improvement of Lipids and Reduction of Oxidative Stress With Octacosanol After Taekwondo Training. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 1–7. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2018-0704>

- 122.Li, D., Wu, G., Zhang, H., & Qi, X. (2020). The soy protein isolate-Octacosanol-polysaccharides nanocomplex for enhanced physical stability in neutral conditions: Fabrication, characterization, thermal stability. *Food Chemistry*, 322, 126638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126638>
- 123.Li, H., Chen, W., Zhou, Y., Abidi, P., Sharpe, O., Robinson, W. H., Kraemer, F. B., & Liu, J. (2009). Identification of mRNA binding proteins that regulate the stability of LDL receptor mRNA through AU-rich elements. *Journal of Lipid Research*, 50(5), 820–831. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800375-JLR200>
- 124.Li, Y., & Wu, S. (2018). Epigallocatechin gallate suppresses hepatic cholesterol synthesis by targeting SREBP-2 through SIRT1/FOXO1 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 448(1–2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3324-x>
- 125.Li, Z., Takino, T., Endo, Y., & Sato, H. (2017). Activation of MMP-9 by membrane type-1 MMP/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis. *Cancer Science*, 108(3), 347–353. <https://doi.org/10.1111/cas.13134>
- 126.Lim, S., & Barter, P. (2014). Antioxidant effects of statins in the management of cardiometabolic disorders. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 21(10), 997–1010. <https://doi.org/10.5551/jat.24398>
- 127.Litvinov, D., Mahini, H., & Garelnabi, M. (2012). Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(11), 523–532. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.103310>
- 128.Liu, D., Xu, L., Dong, H., Chen, G., Huang, Z., Zou, X., Wang, K., Luo, Y., & Lu, F. (2015). Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A novel mechanism of berberine and 8-hydroxy dihydroberberine against hyperlipidemia. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 21(2), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s11655-014-1775-1>
- 129.Liu, X., Suo, R., Chan, C. Z. Y., Liu, T., Tse, G., & Li, G. (2019). The immune functions of PCSK9: Local and systemic perspectives. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19180–19188. <https://doi.org/10.1002/jcp.28612>
- 130.Long, L., Wu, S., Sun, J., Wang, J., Zhang, H., & Qi, G. (2015). Effects of octacosanol extracted from rice bran on blood hormone levels and gene expressions of glucose transporter protein-4 and adenosine monophosphate protein kinase in weaning piglets. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 1(4), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.12.005>
- 131.Lu, H., Howatt, D. A., Balakrishnan, A., Graham, M. J., Mullick, A. E., & Daugherty, A. (2016). Hypercholesterolemia Induced by a PCSK9 Gain-of-Function Mutation Augments Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in C57BL/6 Mice-Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1753–1757. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307613>
- 132.Macchi, C., Sirtori, C. R., Corsini, A., Santos, R. D., Watts, G. F., & Ruscica, M. (2019). A new dawn for managing dyslipidemias: The era of rna-based therapies. *Pharmacological Research*, 150, 104413. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104413>
- 133.MacDonald, T. S., Davis, K. E., Tucker, W. J., & Miketinas, D. C. (2022). Serum Cholesterol Differences Between Statin Users Who Take Dietary Supplements and Those Who Do Not:

- NHANES 2013–2018. *Current Developments in Nutrition*, 7(1), 100007. <https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2022.100007>
134. Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., ... ESC Scientific Document Group. (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 41(1), 111–188. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>
135. Mansour, A. G., Hariri, E., Daaboul, Y., Korjian, S., El Alam, A., Protogerou, A. D., Kilany, H., Karam, A., Stephan, A., & Bahous, S. A. (2017). Vitamin K2 supplementation and arterial stiffness among renal transplant recipients—a single-arm, single-center clinical trial. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*, 11(9), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.07.001>
136. Mansouri, A., Reiner, Ž., Ruscica, M., Tedeschi-Reiner, E., Radbakhsh, S., Bagheri Ekta, M., & Sahebkar, A. (2022). Antioxidant Effects of Statins by Modulating Nrf2 and Nrf2/HO-1 Signaling in Different Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 11(5), 1313. <https://doi.org/10.3390/jcm11051313>
137. Marchitto, N., Sindona, F., Fabrizio, A., Mauti, M., Andreozzi, S., Dalmaso, S., & Raimondi, G. (2018). Effect of new nutraceutical formulation with policosanols, berberine, red yeast rice, cassia nomame, astaxanthine and Q10 coenzyme in patients with low-moderate dyslipidemia associated with intolerance to statins and metabolic syndrome. *Minerva Cardioangiologica*, 66(1), 124–125. <https://doi.org/10.23736/S0026-4725.17.04523-6>
138. Marinangeli, C. P. F., Kassis, A. N., Jain, D., Ebine, N., Cunnane, S. C., & Jones, P. J. H. (2007). Comparison of composition and absorption of sugarcane policosanols. *The British Journal of Nutrition*, 97(2), 381–388. <https://doi.org/10.1017/S0007114507336763>
139. Marrero Delange, D., & González Bravo, L. (2001). Trace determination of 1-octacosanol in rat plasma by solid-phase extraction with Tenax GC and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 762(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00331-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00331-0)
140. Mas, R. (2000). Policosanols: Hypolipidemic, antioxidant, treatment of atherosclerosis. *Drugs Future*, 25(6), 569–86.
141. Mason, R. P., Dawoud, H., Jacob, R. F., Sherratt, S. C. R., & Malinski, T. (2018). Eicosapentaenoic acid improves endothelial function and nitric oxide bioavailability in a manner that is enhanced in combination with a statin. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 103, 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.118>
142. Mazza, A., Lenti, S., Schiavon, L., Zuin, M., D'Avino, M., Ramazzina, E., & Casiglia, E. (2015). Nutraceuticals for Serum Lipid and Blood Pressure Control in Hypertensive and Hypercholesterolemic Subjects at Low Cardiovascular Risk. *Advances in Therapy*, 32(7), 680–690. <https://doi.org/10.1007/s12325-015-0229-x>
143. Mbikay, M., Sirois, F., Simoes, S., Mayne, J., & Chrétien, M. (2014). Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7 human

- hepatocytes in culture. *FEBS Open Bio*, 4, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.003>
144. Menéndez, R., Marrero, D., Más, R., Fernández, I., González, L., & González, R. M. (2005). In vitro and in vivo study of octacosanol metabolism. *Archives of Medical Research*, 36(2), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.12.006>
145. Milasan, A., Dallaire, F., Mayer, G., & Martel, C. (2016). Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. *Scientific Reports*, 6, 27862. <https://doi.org/10.1038/srep27862>
146. Miñana, G., Núñez, J., Bayés-Genís, A., Revuelta-López, E., Ríos-Navarro, C., Núñez, E., Chorro, F. J., López-Lereu, M. P., Monmeneu, J. V., Lupón, J., Sanchis, J., & Bodí, V. (2020). Role of PCSK9 in the course of ejection fraction change after ST-segment elevation myocardial infarction: A pilot study. *ESC Heart Failure*, 7(1), 118–123. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12533>
147. Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
148. Momtazi, A. A., Banach, M., Pirro, M., Katsiki, N., & Sahebkar, A. (2017). Regulation of PCSK9 by nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 120, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.023>
149. Montserrat-de la Paz, S., García-Giménez, M. D., Ángel-Martín, M., Pérez-Camino, M. C., & Fernández Arche, A. (2014). Long-chain fatty alcohols from evening primrose oil inhibit the inflammatory response in murine peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.012>
150. Moriguchi Watanabe, L., Bueno, A. C., de Lima, L. F., Ferraz-Bannitz, R., Dessordi, R., Guimarães, M. P., Foss-Freitas, M. C., Barbosa, F., & Navarro, A. M. (2022). Genetically determined variations of selenoprotein P are associated with antioxidant, muscular, and lipid biomarkers in response to Brazil nut consumption by patients using statins. *The British Journal of Nutrition*, 127(5), 679–686. <https://doi.org/10.1017/S000711452100146X>
151. Münzel, T., Camici, G. G., Maack, C., Bonetti, N. R., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 212–229. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>
152. NACB LMPG Committee Members, Myers, G. L., Christenson, R. H. M., Cushman, M., Ballantyne, C. M., Cooper, G. R., Pfeiffer, C. M., Grundy, S. M., Labarthe, D. R., Levy, D., Rifai, N., & Wilson, P. W. F. (2009). National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: Emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*, 55(2), 378–384. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.115899>
153. Nam, D.-E., Yun, J.-M., Kim, D., & Kim, O.-K. (2019). Policosanol Attenuates Cholesterol Synthesis via AMPK Activation in Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Medicinal Food*, 22(11), 1110–1117. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4491>

154. Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(12), 1487–1499.
155. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
156. Nilsson, J. (2005). CRP—Marker or Maker of Cardiovascular Disease? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(8), 1527–1528. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000174796.81443.3f>
157. Noa, M., Mendoza, S., Más, R., & Mendoza, N. (2003). Effect of Policosanol on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Damage in Sprague-Dawley Rats. *Drugs in R & D*, 4(1), 29–35. <https://doi.org/10.2165/00126839-200304010-00003>
158. Norata, G. D., Tavori, H., Pirillo, A., Fazio, S., & Catapano, A. L. (2016). Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: Beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovascular Research*, 112(1), 429–442. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw194>
159. Nozue, T. (2017). Lipid Lowering Therapy and Circulating PCSK9 Concentration. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 24(9), 895–907. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17012>
160. Ohta, Y., Ohashi, K., Matura, T., Tokunaga, K., Kitagawa, A., & Yamada, K. (2008). Octacosanol Attenuates Disrupted Hepatic Reactive Oxygen Species Metabolism Associated with Acute Liver Injury Progression in Rats Intoxicated with Carbon Tetrachloride. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(2), 118–125. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008017>
161. Oleaga, C., Hay, J., Gurcan, E., David, L. L., Mueller, P. A., Tavori, H., Shapiro, M. D., Pamir, N., & Fazio, S. (2021). Insights into the kinetics and dynamics of the furin-cleaved form of PCSK9. *Journal of Lipid Research*, 62, 100003. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000964>
162. Oliveira, A. M. de, Conserva, L. M., De Souza Ferro, J. N., Brito, F. de A., Lemos, R. P. L., & Barreto, E. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *Grisea* in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1598–1611. <https://doi.org/10.3390/ijms13021598>
163. Orozco-Solano, M., Ruiz-Jimenez, J., & Luque De Castro, M. D. (2010). Characterization of fatty alcohol and sterol fractions in olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7539–7546. <https://doi.org/10.1021/jf100751r>
164. Osadnik, T., Goławski, M., Lewandowski, P., Morze, J., Osadnik, K., Pawlas, N., Lejawa, M., Jakubiak, G. K., Mazur, A., Schwingschackl, L., Gąsior, M., & Banach, M. (2022). A network meta-analysis on the comparative effect of nutraceuticals on lipid profile in adults. *Pharmacological Research*, 183, 106402. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106402>
165. Ou, S., Zhao, J., Wang, Y., Tian, Y., & Wang, J. (2012). Preparation of octacosanol from filter mud produced after sugarcane juice clarification. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.011>
166. Panahi, Y., Ghahrodi, M. S., Jamshir, M., Safarpour, M. A., Bianconi, V., Pirro, M., Farahani, M. M., & Sahebkar, A. (2019). PCSK9 and atherosclerosis burden in the coronary arteries of patients undergoing coronary angiography. *Clinical Biochemistry*, 74, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.09.001>

- 167.Park, J., Kwon, O. S., Cho, S. Y., Paick, J.-S., & Kim, S. W. (2017). Chronic administration of atorvastatin could partially ameliorate erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *PloS One*, *12*(2), e0172751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172751>
- 168.Paseban, M., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Mechanisms of statin-induced new-onset diabetes. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(8), 12551–12561. <https://doi.org/10.1002/jcp.28123>
- 169.Peng, J., Liu, M.-M., Jin, J.-L., Cao, Y.-X., Guo, Y.-L., Wu, N.-Q., Zhu, C.-G., Dong, Q., Sun, J., Xu, R.-X., & Li, J.-J. (2020). Association of circulating PCSK9 concentration with cardiovascular metabolic markers and outcomes in stable coronary artery disease patients with or without diabetes: A prospective, observational cohort study. *Cardiovascular Diabetology*, *19*(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01142-0>
- 170.Penson, P. E., & Banach, M. (2020). The Role of Nutraceuticals in the Optimization of Lipid-Lowering Therapy in High-Risk Patients with Dyslipidaemia. *Current Atherosclerosis Reports*, *22*(11), 67. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00887-z>
- 171.Penson, P. E., Pirro, M., & Banach, M. (2020). LDL-C: Lower is better for longer—even at low risk. *BMC Medicine*, *18*(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01792-7>
- 172.Perović-Blagojević, I., Ignjatović, S., Macut, Đ., Kotur-Stevuljević, J., Božić-Antić, I., Vekić, J., Bjekić-Macut, J., Kastratović-Kotlica, B., Andrić, Z., & Ilić, D. (2018). Evaluation of a summary score for dyslipidemia, oxidative stress and inflammation (the DOI score) in women with polycystic ovary syndrome and its relationship with obesity. *Journal of Medical Biochemistry*, *37*(4), 476–485. <https://doi.org/10.2478/jomb-2018-0008>
- 173.Pirro, M., Mannarino, M. R., Bianconi, V., Simental-Mendía, L. E., Bagaglia, F., Mannarino, E., & Sahebkar, A. (2016). The effects of a nutraceutical combination on plasma lipids and glucose: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, *110*, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.021>
- 174.Pirro, M., Vetrani, C., Bianchi, C., Mannarino, M. R., Bernini, F., & Rivellesse, A. A. (2017). Joint position statement on “Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia” of the Italian Society of Diabetology (SID) and of the Italian Society for the Study of Arteriosclerosis (SISA). *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *27*(1), 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.11.122>
- 175.Pisciotta, L., Bellocchio, A., & Bertolini, S. (2012). Nutraceutical pill containing berberine versus ezetimibe on plasma lipid pattern in hypercholesterolemic subjects and its additive effect in patients with familial hypercholesterolemia on stable cholesterol-lowering treatment. *Lipids in Health and Disease*, *11*, 123. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-123>
- 176.Pokhrel, B., Yuet, W. C., & Levine, S. N. (2023). PCSK9 Inhibitors. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448100/>
- 177.Profumo, E., Buttari, B., Saso, L., & Rigano, R. (2014). Pleiotropic effects of statins in atherosclerotic disease: Focus on the antioxidant activity of atorvastatin. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *14*(22), 2542–2551. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141203130324>
- 178.Pugh, J. N., Sparks, A. S., Doran, D. A., Fleming, S. C., Langan-Evans, C., Kirk, B., Fearn, R., Morton, J. P., & Close, G. L. (2019). Four weeks of probiotic supplementation reduces GI

- symptoms during a marathon race. *European Journal of Applied Physiology*, 119(7), 1491–1501. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04136-3>
179. Qian, Y.-W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T. P., Bensch, W. R., Li, W., Ehsani, M. E., Lu, D., Konrad, R. J., Eacho, P. I., Moller, D. E., Karathanasis, S. K., & Cao, G. (2007). Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *Journal of Lipid Research*, 48(7), 1488–1498. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700071-JLR200>
180. Quintana-Villamandos, B., Pazó-Sayós, L., González Del Pozo, I., Rodríguez-Rodríguez, P., Bellón, J. M., Pedraz-Prieto, Á., Pinto, Á. G., & González, M. C. (2020). OXY-SCORE: A new perspective for left ventricular hypertrophy diagnosis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 11, 2040622320936417. <https://doi.org/10.1177/2040622320936417>
181. Raal, F., Panz, V., Immelman, A., & Pilcher, G. (2013). Elevated PCSK9 levels in untreated patients with heterozygous or homozygous familial hypercholesterolemia and the response to high-dose statin therapy. *Journal of the American Heart Association*, 2(2), e000028. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.000028>
182. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Douidi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927–946.
183. Rasmussen, S. T., Andersen, J. T., Nielsen, T. K., Cejvanovic, V., Petersen, K. M., Henriksen, T., Weimann, A., Lykkesfeldt, J., & Poulsen, H. E. (2016). Simvastatin and oxidative stress in humans: A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Redox Biology*, 9, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.007>
184. Ray, K. K., Raal, F. J., Kallend, D. G., Jaros, M. J., Koenig, W., Leiter, L. A., Landmesser, U., Schwartz, G. G., Lawrence, D., Friedman, A., Garcia Conde, L., Wright, R. S., & ORION Phase III investigators. (2023). Inclisiran and cardiovascular events: A patient-level analysis of phase III trials. *European Heart Journal*, 44(2), 129–138. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac594>
185. Reeskamp, L. F., Tromp, T. R., Defesche, J. C., Grefhorst, A., Stroes, E. S., Hovingh, G. K., & Zurbier, L. (2020). Next-generation sequencing to confirm clinical familial hypercholesterolemia. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2047487320942996. <https://doi.org/10.1177/2047487320942996>
186. Reeskamp, L. F., Tromp, T. R., & Hovingh, G. K. (2021). PCSK9 as predictor for recurrent cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *European Journal of Preventive Cardiology*, 28(3), 270–271. <https://doi.org/10.1177/2047487319886140>
187. Richter, R. J., & Furlong, C. E. (1999). Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics*, 9(6), 745–753.
188. Ridker, P. M., Rifai, N., Bradwin, G., & Rose, L. (2016). Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels and the risk of first cardiovascular events. *European Heart Journal*, 37(6), 554–560. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv568>
189. Rodrigues, M. J., Custódio, L., Lopes, A., Oliveira, M., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Martins, A., Rauter, A. P., Varela, J., & Barreira, L. (2017). Unlocking the in vitro anti-

- inflammatory and antidiabetic potential of *Polygonum maritimum*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1348–1357. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1301493>
190. Rodríguez, M. D., & Garcia, H. (1998). Evaluation of peri- and post-natal toxicity of Policosanol in rats. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 18(1), 1–7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6866\(1998\)18:1<1::aid-tcm1>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6866(1998)18:1<1::aid-tcm1>3.0.co;2-k)
191. Rodríguez-Pérez, C., Ramprasath, V. R., Pu, S., Sabra, A., Quirantes-Piné, R., Segura-Carretero, A., & Jones, P. J. H. (2016). Docosahexaenoic Acid Attenuates Cardiovascular Risk Factors via a Decline in Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Plasma Levels. *Lipids*, 51(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4099-4>
192. Rong, Y., Dong, S.-S., Hu, W.-X., Guo, Y., Chen, Y.-X., Chen, J.-B., Zhu, D.-L., Chen, H., & Yang, T.-L. (2021). DDRS: Detection of drug response SNPs specifically in patients receiving drug treatment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 3650–3657. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.026>
193. Rosenson, R. S., Hegele, R. A., Fazio, S., & Cannon, C. P. (2018). The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(3), 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.054>
194. Ruscica, M., Pavanello, C., Gandini, S., Gomaschi, M., Vitali, C., Macchi, C., Morlotti, B., Aiello, G., Bosisio, R., Calabresi, L., Arnoldi, A., Sirtori, C. R., & Magni, P. (2018). Effect of soy on metabolic syndrome and cardiovascular risk factors: A randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 57(2), 499–511. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1333-7>
195. Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott, S. D., Murphy, S. A., Kuder, J. F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S. M., Sever, P. S., & Pedersen, T. R. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 376(18), 1713–1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615664>
196. Sadick, H., Naim, R., Gössler, U., Hörmann, K., & Riedel, F. (2005). Angiogenesis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: VEGF165 plasma concentration in correlation to the VEGF expression and microvessel density. *International Journal of Molecular Medicine*, 15(1), 15–19.
197. Sadighara, M., Amirshardost, Z., Minaiyan, M., Hajhashemi, V., Naserzadeh, P., Salimi, A., Seydi, E., & Pourahmad, J. (2017). Toxicity of Atorvastatin on Pancreas Mitochondria: A Justification for Increased Risk of Diabetes Mellitus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120(2), 131–137. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12656>
198. Sahebkar, A., Serban, M.-C., Gluba-Brzózka, A., Mikhailidis, D. P., Cicero, A. F., Rysz, J., & Banach, M. (2016). Lipid-modifying effects of nutraceuticals: An evidence-based approach. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(11–12), 1179–1192. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.04.007>
199. Sahebkar, A., Simental-Mendía, L. E., Guerrero-Romero, F., Golledge, J., & Watts, G. F. (2015). Effect of statin therapy on plasma proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) concentrations: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 17(11), 1042–1055. <https://doi.org/10.1111/dom.12536>
200. Saint-John, M., & McNaughton, L. (1986). *Octacosanol ingestion and its effects on metabolic responses to submaximal cycle ergometry, reaction time and chest and grip strength*.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Octacosanol-ingestion-and-its-effects-on-metabolic-Saint-John-Mcnaughton/661dcc79ceb9a06e7f1126ca4ba268677e68c1fc>

- 201.Saito, M., Kinoshita, Y., Satoh, I., Shinbori, C., Suzuki, H., Yamada, M., Watanabe, T., & Satoh, K. (2007). Ability of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol to reverse diabetes-induced cystopathy in the rat. *European Urology*, *51*(2), 479–487; discussion 487-488. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.06.024>
- 202.Sakamoto, A., Higashikuni, Y., Hongo, M., Imai, Y., Koike, K., Nagai, R., Komuro, I., & Ishizaka, N. (2015). Pioglitazone Reduces Vascular Lipid Accumulation in Angiotensin II-Induced Hypertensive Rat. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *22*(12), 1225–1234. <https://doi.org/10.5551/jat.28977>
- 203.Santangelo, R., Silvestrini, A., & Mancuso, C. (2019). Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *123*, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.042>
- 204.Scheffer, P. G., Schindhelm, R. K., van Verschuer, V. M. T., Groenemeijer, M., Simsek, S., Smulders, Y. M., & Nanayakkara, P. W. B. (2013). No effect of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in patients at high risk for cardiovascular disease. *The Netherlands Journal of Medicine*, *71*(7), 359–365.
- 205.Schlüter, K.-D., Wolf, A., & Schreckenber, R. (2020). Coming Back to Physiology: Extra Hepatic Functions of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Frontiers in Physiology*, *11*, 598649. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.598649>
- 206.Schlüter, K.-D., Wolf, A., Weber, M., Schreckenber, R., & Schulz, R. (2017). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way. *Basic Research in Cardiology*, *112*(6), 63. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0650-1>
- 207.Scholl, C., Lepper, A., Lehr, T., Hanke, N., Schneider, K. L., Brockmöller, J., Seufferlein, T., & Stingl, J. C. (2018). Population nutrikinetics of green tea extract. *PloS One*, *13*(2), e0193074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193074>
- 208.Schulz, R., Schlüter, K.-D., & Laufs, U. (2015). Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Basic Research in Cardiology*, *110*(2), 4. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0463-z>
- 209.Schurgers, L. J., Teunissen, K. J. F., Knapen, M. H. J., Kwaijtaal, M., van Diest, R., Appels, A., Reutelingsperger, C. P., Cleutjens, J. P. M., & Vermeer, C. (2005). Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(8), 1629–1633. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000173313.46222.43>
- 210.Schurgers, L. J., Uitto, J., & Reutelingsperger, C. P. (2013). Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: A crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(4), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.008>

- 211.Schwartz, G. G., Steg, P. G., Szarek, M., Bhatt, D. L., Bittner, V. A., Diaz, R., Edelberg, J. M., Goodman, S. G., Hanotin, C., Harrington, R. A., Jukema, J. W., Lecorps, G., Mahaffey, K. W., Moryusef, A., Pordy, R., Quintero, K., Roe, M. T., Sasiela, W. J., Tamby, J.-F., ... ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. (2018). Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 379(22), 2097–2107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801174>
- 212.Scolaro, B., Nogueira, M. S., Paiva, A., Bertolami, A., Barroso, L. P., Vaisar, T., Heffron, S. P., Fisher, E. A., & Castro, I. A. (2018). Statin dose reduction with complementary diet therapy: A pilot study of personalized medicine. *Molecular Metabolism*, 11, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.005>
- 213.Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., & Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 928–933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>
- 214.Sen Gupta, S., & Ghosh, M. (2017). Octacosanol educes physico-chemical attributes, release and bioavailability as modified nanocrystals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 119, 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.020>
- 215.Serini, S., & Calviello, G. (2020). Omega-3 PUFA Responders and Non-Responders and the Prevention of Lipid Dysmetabolism and Related Diseases. *Nutrients*, 12(5), 1363. <https://doi.org/10.3390/nu12051363>
- 216.Shamloo, M., Granger, M. J., Trautwein, E. A., House, J. D., & MacKay, D. (2020). Genetic basis for prediction of non-responders to dietary plant sterol intervention (GenePredict-PS): A study protocol for a double-blind, placebo-controlled, randomized two-period crossover study. *Trials*, 21, 452. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04364-5>
- 217.Shapiro, M. D., & Fazio, S. (2017). PCSK9 and Atherosclerosis—Lipids and Beyond. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 24(5), 462–472. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17003>
- 218.Shapiro, M. D., Tavori, H., & Fazio, S. (2018). PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. *Circulation Research*, 122(10), 1420–1438. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311227>
- 219.Sharotri, V., Collier, D. M., Olson, D. R., Zhou, R., & Snyder, P. M. (2012). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19266–19274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363382>
- 220.Shea, M. K., O'Donnell, C. J., Hoffmann, U., Dallal, G. E., Dawson-Hughes, B., Ordovas, J. M., Price, P. A., Williamson, M. K., & Booth, S. L. (2009). Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1799–1807. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27338>
- 221.Shen, J., Luo, F., & Lin, Q. (2019). Policosanol: Extraction and biological functions. *Journal of Functional Foods*, 57, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.024>

222. Shende, V. R., Wu, M., Singh, A. B., Dong, B., Kan, C. F. K., & Liu, J. (2015). Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver-specific knockdown of HNF1 α in normolipidemic mice. *Journal of Lipid Research*, *56*(4), 801–809. <https://doi.org/10.1194/jlr.M052969>
223. Shimada, Y. J., & Cannon, C. P. (2015). PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) inhibitors: Past, present, and the future. *European Heart Journal*, *36*(36), 2415–2424. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv174>
224. Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
225. Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P., & Gupta, S. C. (2019). Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, *39*(5), 1851–1891. <https://doi.org/10.1002/med.21565>
226. Singh, D. K., Li, L., & Porter, T. D. (2006). Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(3), 1020–1026. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.107144>
227. Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, *71*, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
228. Smith, J. R., Osborne, T. F., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(4), 2306–2310.
229. Sørensen, A. L., Hasselbalch, H. C., Nielsen, C. H., Poulsen, H. E., & Ellervik, C. (2019). Statin treatment, oxidative stress and inflammation in a Danish population. *Redox Biology*, *21*, 101088. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101088>
230. Spigoni, V., Aldigeri, R., Antonini, M., Micheli, M. M., Fantuzzi, F., Fratter, A., Pellizzato, M., Derlindati, E., Zavaroni, I., Bonadonna, R. C., & Dei Cas, A. (2017). Effects of a New Nutraceutical Formulation (Berberine, Red Yeast Rice and Chitosan) on Non-HDL Cholesterol Levels in Individuals with Dyslipidemia: Results from a Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1498. <https://doi.org/10.3390/ijms18071498>
231. Stafford, D. W. (2005). The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *3*(8), 1873–1878. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01419.x>
232. Stander, Z., Luies, L., van Reenen, M., Howatson, G., Keane, K. M., Clifford, T., Stevenson, E. J., & Loots, D. T. (2021). Beetroot juice—A suitable post-marathon metabolic recovery supplement? *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *18*(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00468-8>
233. Stohs, S. J., Chen, O., Ray, S. D., Ji, J., Bucci, L. R., & Preuss, H. G. (2020). Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(6), 1397. <https://doi.org/10.3390/molecules25061397>
234. Sucajtys-Szulc, E., Szolkiewicz, M., Swierczynski, J., & Rutkowski, B. (2016). Up-regulation of liver Pcsk9 gene expression as a possible cause of hypercholesterolemia in

- experimental chronic renal failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 411(1–2), 281–287. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2590-0>
- 235.SUI, G.-G., Xiao, H., LU, X.-Y., & Sun, Z.-L. (2018). Naringin activates AMPK resulting in altered expression of SREBPs, PCSK9, and LDLR to reduce body weight in obese C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02696>
- 236.Tai, M.-H., Chen, P.-K., Chen, P.-Y., Wu, M.-J., Ho, C.-T., & Yen, J.-H. (2014). Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(11), 2133–2145. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400366>
- 237.Tavori, H., Christian, D., Minnier, J., Plubell, D., Shapiro, M. D., Yeang, C., Giunzioni, I., Croyal, M., Duell, P. B., Lambert, G., Tsimikas, S., & Fazio, S. (2016). PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circulation Research*, 119(1), 29–35. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308811>
- 238.Tavori, H., Giunzioni, I., Linton, M. F., & Fazio, S. (2013). Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circulation Research*, 113(12), 1290–1295. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302655>
- 239.Taylor, B. A., & Thompson, P. D. (2016). Statins and Their Effect on PCSK9-Impact and Clinical Relevance. *Current Atherosclerosis Reports*, 18(8), 46. <https://doi.org/10.1007/s11883-016-0604-3>
- 240.Terao, J. (2017). Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, 139, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.021>
- 241.Thippeswamy, G., Sheela, M. L., & Salimath, B. P. (2008). Octacosanol isolated from *Tinospora cordifolia* downregulates VEGF gene expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and its DNA binding activity. *European Journal of Pharmacology*, 588(2–3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.04.027>
- 242.Tissier, F., Farhat, F., Philouze, C., Desfontis, J.-C., Didier, R., Gilard, M., Mallem, M. Y., Mansourati, J., Moisan, C., Pichavant-Rafini, K., Theron, M., & Amérand, A. (2018). Long-term atorvastatin treatment decreases heart maximal oxygen consumption and its vulnerability to in vitro oxidative stress in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(11), 1112–1118. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0085>
- 243.Toth, P. P., Bray, S., Villa, G., Palagashvili, T., Sattar, N., Stroes, E. S. G., & Worth, G. M. (2022). Network Meta-Analysis of Randomized Trials Evaluating the Comparative Efficacy of Lipid-Lowering Therapies Added to Maximally Tolerated Statins for the Reduction of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Journal of the American Heart Association*, 11(18), e025551. <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.025551>
- 244.Veglia, F., Cighetti, G., De Franceschi, M., Zingaro, L., Boccotti, L., Tremoli, E., & Cavalca, V. (2006). Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 11(6), 562–573. <https://doi.org/10.1080/13547500600898623>

245. Venturelli, A., Brighenti, V., Mascolo, D., & Pellati, F. (2019). A new strategy based on microwave-assisted technology for the extraction and purification of beeswax policosanols for pharmaceutical purposes and beyond. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *172*, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.015>
246. Visseren, F. L. J., Mach, F., Smulders, Y. M., Carballo, D., Koskinas, K. C., Bäck, M., Benetos, A., Biffi, A., Boavida, J.-M., Capodanno, D., Cosyns, B., Crawford, C., Davos, C. H., Desormais, I., Di Angelantonio, E., Franco, O. H., Halvorsen, S., Hobbs, F. D. R., Hollander, M., ... ESC Scientific Document Group. (2021). 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, *42*(34), 3227–3337. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484>
247. Vrablik, M., Tichý, L., Freiburger, T., Blaha, V., Satny, M., & Hubacek, J. A. (2020). Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. *Frontiers in Genetics*, *11*, 574474. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.574474>
248. Waiz, M., Alvi, S. S., & Khan, M. S. (2022). Potential dual inhibitors of PCSK-9 and HMG-R from natural sources in cardiovascular risk management. *EXCLI Journal*, *21*, 47–76. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4453>
249. Wang, P., & Sang, S. (2018). Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors (Oxford, England)*, *44*(1), 16–25. <https://doi.org/10.1002/biof.1410>
250. Wang, S., Cai, R., Yuan, Y., Varghese, Z., Moorhead, J., & Ruan, X. Z. (2017). Association between reductions in low-density lipoprotein cholesterol with statin therapy and the risk of new-onset diabetes: A meta-analysis. *Scientific Reports*, *7*, 39982. <https://doi.org/10.1038/srep39982>
251. Wang, T., Liu, Y., Wang, X., Yang, N., Zhu, H., & Zuo, P. (2010). Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(7), 765–774. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.69>
252. Wang, T., Liu, Y., Yang, N., Ji, C., Chan, P., & Zuo, P. (2012). Anti-parkinsonian effects of octacosanol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-treated mice. *Neural Regeneration Research*, *7*(14), 1080–1087. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.14.006>
253. Ward, N. C., Watts, G. F., & Eckel, R. H. (2019). Statin Toxicity. *Circulation Research*, *124*(2), 328–350. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312782>
254. Welder, G., Zineh, I., Pacanowski, M. A., Troutt, J. S., Cao, G., & Konrad, R. J. (2010). High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *Journal of Lipid Research*, *51*(9), 2714–2721. <https://doi.org/10.1194/jlr.M008144>
255. Wiciński, M., Żak, J., Malinowski, B., Popek, G., & Grzešek, G. (2017). PCSK9 signaling pathways and their potential importance in clinical practice. *The EPMA Journal*, *8*(4), 391–402. <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0106-6>
256. Willeit, P., Kiechl, S., Kronenberg, F., Witztum, J. L., Santer, P., Mayr, M., Xu, Q., Mayr, A., Willeit, J., & Tsimikas, S. (2014). Discrimination and net reclassification of cardiovascular risk with lipoprotein(a): Prospective 15-year outcomes in the Bruneck Study.

- Journal of the American College of Cardiology*, 64(9), 851–860.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.061>
257. Willems, B. A. G., Vermeer, C., Reutelingsperger, C. P. M., & Schurgers, L. J. (2014). The realm of vitamin K dependent proteins: Shifting from coagulation toward calcification. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(8), 1620–1635.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300743>
258. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49(5), 1304–1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
259. Wu, D., Zhou, Y., Pan, Y., Li, C., Wang, Y., Chen, F., Chen, X., Yang, S., Zhou, Z., Liao, Y., & Qiu, Z. (2020). Vaccine Against PCSK9 Improved Renal Fibrosis by Regulating Fatty Acid β -Oxidation. *Journal of the American Heart Association*, 9(1), e014358.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014358>
260. Xia, X., Peng, Z., Gu, H., Wang, M., Wang, G., & Zhang, D. (2021). Regulation of PCSK9 Expression and Function: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 764038. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.764038>
261. Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Cui, C., Wang, W., & Dong, K. (2018). Modification of soy protein isolate by glutaminase for nanocomplexation with curcumin. *Food Chemistry*, 268, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.059>
262. Yadav, K., Sharma, M., & Ferdinand, K. C. (2016). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors: Present perspectives and future horizons. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 26(10), 853–862.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.05.006>
263. Zazueta, C., Jimenez-Urbe, A. P., Pedraza-Chaverri, J., & Buelna-Chontal, M. (2022). Genetic Variations on Redox Control in Cardiometabolic Diseases: The Role of Nrf2. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3), 507. <https://doi.org/10.3390/antiox11030507>
264. Zeng, X., Su, W., Zheng, Y., He, Y., He, Y., Rao, H., Peng, W., & Yao, H. (2019). Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Naringin in Aged Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 34. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00034>
265. Zhai, Z., Liu, J., Niu, K.-M., Lin, C., Tu, Y., Liu, Y., Cai, L., Liu, H., & Ouyang, K. (2021). Integrated Metagenomics and Metabolomics to Reveal the Effects of Policosanol on Modulating the Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Hyperlipidemic C57BL/6 Mice. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 722055. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.722055>
266. Zhou, Y., Cao, F., Luo, F., & Lin, Q. (2022). Octacosanol and health benefits: Biological functions and mechanisms of action. *Food Bioscience*, 47, 101632.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101632>
267. Zhou, Y., Cao, F., Wu, Q., Luo, Y., Guo, T., Han, S., Huang, M., Hu, Z., Bai, J., Luo, F., & Lin, Q. (2021). Dietary Supplementation of Octacosanol Improves Exercise-Induced Fatigue and Its Molecular Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(27), 7603–7618. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01764>

Биографија

Милица Зрнић Ђирић је рођена 10.7.1985. године у Чачку. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, смер дипломирани фармацеут, уписала је 2004/05. Током студија била је добитник више стипендија за најбоље студенте. Дипломирала је 2010. године (просечна оцена 9,65). Након обављеног стажа, 2012. године је положила стручни испит. Докторске академске студије на Фармацеутском факултету у Београду, модул Броматологија, уписала је 2011/12. Специјалистичке академске студије, студијски програм Фармакотерапија у фармацеутској пракси завршила је 2020. године. Здравствену специјализацију из Санитарне хемије уписала је 2018/19.

Од 2011. године Милица Зрнић Ђирић учествује у припреми и извођењу практичне наставе на Катедри за броматологију на Фармацеутском факултету у Београду на обавезним предметима Броматологија, Дијететика, Контрола здравствене исправности намирница 1 и 2, и на изборним предметима Анализа хране и дијететских производа и Здравствена исправност предмета опште употребе. Такође, учествује у извођењу радионица на специјалистичким академским студијама Фармакотерапија у фармацеутској пракси. Била је члан комисија за одбрану 140 завршних радова.

У периоду 2021–2022 била је ангажована на пројекту III 46009. Тренутно је члан COST акција: CA19105 „EpiLipidNET“ и CA21139 „IMPROVE“, а учествовала је у COST акцији CA17117 „EVBRES“.

Похађала је више летњих школа и стручних едукација у земљи и иностранству, и тренинге (основни и напредни ниво) у области безбедности хране у оквиру програма Европске комисије.

До сада је објавила 5 радова у међународним часописима, 6 радова у националним часописима и 39 саопштења са међународних и националних скупова. Ко-аутор је 1 основног уџбеника и 2 помоћна уџбеника.

Члан је Савеза фармацеутских удружења Србије и Друштва за исхрану Србије.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица Зрнић Ђирић

Број индекса 20/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат суплементације комбинацијом октакозанола и витамина К2 на PCSK9, липидни профил, оксидативни стрес и инфламацију код пацијената на терапији аторвастатином

- 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, 25.8.2023.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Зрнић Ђирић

Број индекса 20/11

Студијски програм Докторске академске студије – модул Броматологија

Наслов рада Ефекат суплементације комбинацијом октакозанола и витамина К2 на PCSK9, липидни профил, оксидативни стрес и инфламацију код пацијената на терапији аторвастатином

Ментори проф. др Иван Станковић и академик проф. др Миодраг Остојић, професор емеритус

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, 25.8.2023.

Изјава о коришћењу

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

Ефекат суплементације комбинацијом октакозанола и витамина К2 на PCSK9, липидни профил, оксидативни стрес и инфламацију код пацијената на терапији аторвастатином

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, 25.8.2023.

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.