

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 21.6.2017. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom “Značaj određivanja markera sinteze i apsorpcije holesterola kod zdravih ispitanika i pacijenata sa ishemijskom bolešću srca” kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Tamare Gojković, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u sastavu:

1. Dr Zorana Jelić-Ivanović, profesor emeritus, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, mentor, predsednik komisije
2. Dr Slađana Šobajić, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta
3. Dr Dimitra Kalimanovska-Oštrić, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu - Medicinskog fakulteta
4. Dr Aleksandra Zeljković, vanredni profesor, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta
5. Dr Jelena Vekić, docent, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 179 strana, ima 27 tabela, 37 slika i 209 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

Cilj ove doktorske disertacije je bio uspostavljanje i validacija GC-FID metode za određivanje markera sinteze i apsorpcije holestrola, te određivanje koncentracije ovih markera

u uzorcima plazme zdravih ispitanika (KG) i pacijenata sa ishemijskom bolešću srca (IBS). Na osnovu vrednosti ovih markera, cilj studije je bio da se procene obrasci homeostaze holesterola i da se ispita postojanje različitih obrazaca metabolizma holesterola u zavisnosti od patološkog stanja i farmakološkog tretmana. Na osnovu obrazaca homeostaze holesterola cilj je bio proceniti da li u populaciji zdravih osoba postoji podgrupa sa povećanim rizikom za nastanak i razvoj krdovaskularnih bolesti (KVB), odnosno da li je kod pacijenata sa IBS moguće predvideti odgovor na tretman hipolipemicima.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanju je uključeno 110 ispitanika: 47 pacijenata sa potvrđenom dijagnozom IBS koji nisu bili na terapiji hipolipemicima, 32 pacijenta sa IBS koji su bili na terapiji statinima i 31 zdrav ispitanik. Prisustvo IBS je potvrđeno dijagnostičkim postupkom selektivne koronarne angiografije. KG je odabrana nakon detaljnog ispitivanja zdravstvenog stanja, merenja debljine kompleksa intime-medije obe karotidne arterije, ispitivanjem životnih navika, načina ishrane, te ispitivanjem podataka o porodičnoj anamnezi na postojanje KVB kod srodnika prvog stepena. Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona, slučaj-kontrola studija, a planirano je i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U cilju analize povezanosti dislipidemije i IBS, kod svih ispitanika određeni su standardni biohemijski parametri, koji su uključivali određivanje koncentracije kreatinina, uree, mokraćne kiseline i albumina, rutinskim metodama, u cilju procene funkcije bubrega. Zatim, enzimskom metodom je određena koncentracija glukoze, a hemiluminescentnim enzim-immunoesejem (ECLIA) na biohemijskom analizatoru određena je koncentracija insulina natašte i procenjen je nivo insulinske rezistencije računanjem HOMA-IR indeksa (homeostazni model procene insulinske rezistencije). U svrhu procene lipidnog statusa, enzimskim metodama određene su koncentracije ukupnog holesterola (UH), holesterola sadržanog u lipoproteinima niske gustine (*engl. low-density lipoprotein* - LDL-h), holesterola sadržanog u lipoproteinima visoke gustine (*engl. high-density lipoprotein* - HDL-h) i triglicerida (TG), a imunoturbidimetrijskim metodama određene su masene koncentracije apolipoproteina (apoA-I i apoB-100). Takođe, svim učesnicima u studiji izmerene su i koncentracije C-reaktivnog proteina visoke osetljivosti (*engl. high-sensitivity C-reactive protein* – *hsCRP*) imunoturbidimetrijskom metodom, u svrhu procene inflamacije niskog

stepena. Spektrofotometrijski je određena koncentracija malondialdehida (MDA) kao parametra oksidativnog stersa. Aktivnosti lecitin: holesterol acil transferaze (*engl. Lecithin-cholesterol acyltransferase* - LCAT) i holesterol estar transfernog proteina/enzima (*engl. Cholesterylester transfer protein* - CETP), takođe su izmerene. Svim ispitanicima u studiji metodom enzimskog imunoeseja (ELISA) određena je masena koncentracije fosfolipaze A2 udružene sa lipoproteinom (Lp-PLA2). Metodom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom (*engl. Gas Chromatography – Flame Ionization Detector* - GC-FID) određen je procentualni udeo pojedinih masnih kiselina u ukupnom masnokiselinskom sastavu plazme. Za sveobuhvatan uvid u sastav i veličinu LDL i HDL čestica, određivana je zastupljenost pojedinačnih subfrakcija lipoproteina niske i visoke gustine elektroforetskom metodom. Uzorci *pool*-a seruma i plazme korišćeni su za ispitivanja u postupku validacije metode za određivabnje markera sinteze (dezmosterola i latosterola) i markera apsorpcije holesterola (kampesterola, stigmasterola i β -sitosterola). Ovi markeri jednim imenom se nazivaju neholesterolski steroli (NHS). NHS su određeni u uzorcima plazme sve tri grupe ispitanika GC-FID metodom. Obrasci homeostaze holesterola su procenjeni na osnovu koncentracija dezmosterola, latosterola i β -sitosterola.

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski i biohemijski parametri kod sve tri grupe ispitanika. Među grupama izvršena su poređenja po polu, starosti, indeksu telesne mase (ITM), odnosu struka i kuka (S/K), sistolnom pritisku (SP), dijastolnom pritisku (DP), kreatininu, mokraćnoj kiselini, urei, glukozi, insulinu, HOMA IR indeksu, UH, HDL-h, LDL-h, TG, hsCRP i albuminu. Zatim su navedena poređenja koncentracija apoA-I, apo-B100, MDA, kao i aktivnosti LCAT i CETP. Dalje su predstavljeni rezultati ispitivanja karakteristika LDL i HDL subfrakcija. Prikazani su rezultati relativnog udela sedam LDL i pet HDL subklasa u ukupnim LDL i HDL profilima ispitanika kao i procene fenotipova na osnovu dobijenih dominantnih dijametara. Predstavljeni su rezultati zastupljenosti Lp-PLA2, kao i procentualnog udela pojedinih masnih kiselina u ukupnom masnokiselinskom profilu. Za ispitivanja u razlikama kontinuiranih varijabli, u zavisnosti od raspodele, korišćeni su ANCOVA i Quade-ov test, uz korekciju za starost ispitanika. Za poređenje kategoričkih varijabli korišćen je χ^2 test.

Rezultati validacije metode za određivanje NHS sprovedeni su prema preporukama *Food and Drug Administration* (FDA). Prikazani su rezultati sledećih ispitivanja koja su sprovedena u procesu validacije metode: rezultati ispitivanja preanalitičkih faktora uticaja na kvantitativnu analizu NHS, rezultati ispitivanja linearnosti metode za svih pet ispitivanih

NHS-a, rezultati preciznosti i tačnosti metode, kao i rezultati ispitivanja stabilnosti uzoraka, verifikacije metode i limita detekcije i limita kvantifikacije GC-FID metode.

Nakon uspostavljanja metode, određivane su apsolutne i relativne vrednosti (u odnosu na UH) markera sinteze i apsorpcije za sve tri grupe ispitanika, kao i vrednosti odnosa dezmosterola i β -sitosterola, i latosterola i β -sitosterola. U ovoj analizi korišćen je ANCOVA statistički test uz korekciju za starost ispitanika. U cilju ispitivanja povezanosti markera homeostaze holesterola sa osnovnim lipidnim parametrima i veličinom LDL i HDL čestica, sprovedena je *Pearson*-ova korelaciona analiza. Korelaciona analiza obuhvatala je apsolutne i relativne vrednosti NHS, vrednosti UH, LDL-h, HDL-h i TG, kao i dijametar najzastupljenije LDL i HDL subfrakcije i procentualni udeo sdLDL (*engl. small, dense LDL*) i malih HDL čestica. Analiza je sprovedena za svaku grupu ispitanika posebno.

U cilju detaljnije analize, na osnovu vrednosti latosterola i β -sitosterola i dezmosterola i β -sitosterola procenjeni su obrasci homeostaze holesterola, unutar svake ispitivane grupe. Na osnovu obrazaca ispitanici su podeljeni na 4 podgrupe: podgrupu 1 su činili ispitanici čija je homeostaza holesterola opisana kroz sniženu sintezu i sniženu apsorpciju (SS/SA), homeostazu holesterola u podgrupi 2 karakterisala je snižena sinteza i povišena apsorpcija (SS/PA), podgrupu 3 činili su ispitanici koji su imali povišenu sintezu i sniženu apsorpciju (PS/SA), dok su četvrtu podgrupu činili ispitanici čija je homeostaza holesterola okarakterisana povišenom sintezom i apsorpcija (PS/PA). Prikazani su rezultati raspodele koncentracija osnovnih parametara lipidnog statusa, apoA-I, apoB-100, kao i distribucije udela LDL subklasa i dijametra najzastupljenije LDL subklase između podgrupa, a u okviru svake grupe ispitanika. Rezultati su obrađeni korišćenjem ANOVA statističkog testa.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

B. Opis dobijenih rezultata

Obe grupe pacijenata i KG bile su usklađene po polu dok je prosečna starost pacijenata bila veća u odnosu na zdrave ispitanike. Kada su u pitanju parametri lipidnog statusa, koncentracije UH i LDL-h se nisu razlikovale među ispitanicima. Nivoi TG su bili viši u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok su koncentracije HDL-h bile značajno niže kod pacijenata. Koncentracije apoA-I su bile značajno niže u grupi pacijenata bez terapije

statinima u odnosu na KG. Nisu primećene razlike u koncentracijama apoB-100 među ispitivanim grupama. Koncentracije MDA su bile značajno više u grupama pacijenata na terapiji statinima i onih bez terapije statinima u odnosu na KG. Vrednosti MDA se nisu razlikovale između ispitivanih grupa pacijenata. Aktivnosti LCAT i CETPA se nisu razlikovale između ispitivanih grupa. Nisu primećene razlike u zastupljenosti dominantnih dijametara LDL čestica, raspodeli LDL fenotipova, kao i u relativnim zastupljenostima pojedinih LDL subfrakcija između ispitivanih grupa. Poređenje dijametara HDL čestica između sve tri grupe ispitanika pokazalo je da postoje razlike u raspodeli HDL 2 i HDL 3 fenotipova između KG i grupe pacijenata bez terapije statinima u kojoj je HDL 3 fenotip bio zastupljeniji. Rezultati relativne zastupljenosti pojedinih HDL subfrakcija pokazali su višu zastupljenost manjih HDL subfrakcija u grupama pacijenata u odnosu na KG. Pacijenti sa IBS koji nisu bili na terapiji statinima imali su više masene koncentracije Lp-PLA2 u odnosu na pacijente na terapiji i KG. Rezultati ispitivanja masnokiselinskog profila plazme, kod sve tri grupe ispitanika pokazali su da je procentualni udeo palmitinske masne kiseline viši u obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok su vrednosti linolne masne kiseline bile značajno niže u grupama pacijenata u odnosu na KG. Udeo arahidnosnske kiseline bio je viši u grupi pacijenata na terapiji statinima u odnosu na grupu pacijenata bez terapiji i KG. Primećene su i značajno više vrednosti udela dokozaheksaenske kiseline u grupi pacijenata na terapiji u odnosu na grupu pacijenata bez terapije statinima.

Rezultati ispitivanja sprovedenih u okviru validacije metode pokazali su da su serum i plazma adekvatni biološki materijali za kvantifikaciju NHS i da su stabilni 2 meseca na -80 °C. Rezultati ukazuju da je obavezan korak u pripremi uzoraka derivatizacija NHS i njihovo prevođenje u timetil-silil etre. Rezultati ukazuju da je prilikom pripreme uzoraka za određivanje NHS neophodno izbegavati upotrebu plastičnog laboratorijskog posuđa. Prezentovani rezultati su dokazali da su pripremljeni uzorci stabilni 7 dana na -20 °C. Takođe, dokazano je da ciklusi odmrzavanja i zamrzavanja uzorka utiču na stabilnost analita od interesa i da se stabilnost povećava nakon dodavanja komercijalnog antioksidansa (Trolox). Uspostavljena GC-FID metoda za kvantifikaciju NHS kojom se postižu tačni i precizni rezultati je podrazumevala razdvajanje uzoraka na nepolarnoj tridesetometarskoj koloni, uz *splitless* režim injektovanja, pri multilinearom programiranju temperature kolone uz korišćenje helijuma kao nosećeg gasa.

Apsolutne i relativne vrednosti markera sinteze bile su povišene kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok su apsolutne i relativne vrednosti markera apsorpcije bile

značajno niže. Pacijenti na terapiji statinima su imali niže vrednosti markera sinteze i više vrednosti markera apsorpcije u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima. Korelaciona analiza je pokazala da u KG postoji direktna povezanost koncentracija latosterola sa vrednostima UH, LDL-h i TG i inverzna povezanost dezmosterola sa dijametrom LDL čestica. Dobijena je negativna korelacija β -sitosterola sa LDL dijametrom i pozitivna korelacija između relativnih vrednosti kampesterola i β -sitosterola sa udelom sdLDL čestica. U grupi pacijenata na terapiji statinima, rezultati korelacione analize su pokazali pozitivnu vezu između koncentracija dezmosterola i vrednosti TG i udela malih HDL čestica i negativnu vezu sa HDL dijametrom. U ovoj grupi ispitanika, markeri apsorpcije holesterola, kampesterol i β -sitosterol, pokazali su pozitivnu korelaciju sa UH i LDL-h. U grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, primećena je direktna povezanost koncentracija latosterola sa vrednostima UH, LDL-h i HDL-h, kao i inverzna povezanost koncentracija dezmosterola sa LDL dijametrom. Kod pacijenata bez terapije statinima koncentracije kampesterola su pokazale pozitivnu korelaciju sa HDL-h, a negativnu sa HDL dijametrom. Vrednosti β -sitosterola su pokazale pozitivnu korelaciju sa vrednostima HDL-h i udelom malih HDL čestica.

Rezultati raspodele koncentracija osnovnih parametara lipidnog statusa, apoA-I i apoB-100 su pokazali da se u KG izdvaja podgrupa sa povišenom sintezom i smanjenom apsorpcijom (PS/SA), koja ima lošiji lipidni profil u odnosu na SS/SA i SS/PA podgrupe. U grupi pacijenata koji nisu bili na terapiji statinima, izdvajaju se PS/SA i PS/PA kao podgrupe sa lošijim lipidnim profilom u odnosu na SS/SA podgrupu. Slične rezultate pokazala je i distribucija LDL subklasa između podgrupa unutar grupe zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da PS/SA podgrupa ima veću zastupljenost manjih LDL subklasa u odnosu na SS/SA podgrupu.

C. Uporedna analiza rezultata iz doktorske disertacije sa podacima iz literature

U patogenezi ateroma nalazi se veliki broj etioloških faktora, pri čemu se dislipidemija smatra najvažnijim pokretačem aterogenog procesa. Ateroskleroza predstavlja hroničnu, fokalnu bolest intime krvnih sudova, praćenu pojavom plaka i suženjem lumena zahvaćenog krvnog suda i nalazi se u osnovi IBS (1-7). Smernice Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca i mnogih međunarodnih vodiča (2, 8, 9) preporučuju određivanje osnovnih parametara lipidnog statusa za procenu

rizika, postavljanje dijagnoze i praćenje terapije IBS. Takođe, uz lipidne, preporučuje se i određivanje koncentracije proteinskih komponenata lipoproteina, apoB-100 i apoA-I (2, 9). Međutim, noviji pristupi u prevenciji i lečenju dislipidemija smatraju nedovoljnim određivanje parametara lipidnog statusa za sveobuhvatnu procenu rizika (10, 11). U prilog ovim tvrdnjama govore i zabrinjavajući epidemiološki podaci o porastu stope smrtnosti uzrokovane IBS, ali i rezultati sve većeg broja osnovnih istraživanja koja opisuju složene mehanizme nastanka dislipidemije (10-13). Upravo, za bolje razumevanje kompleksnih mehanizama nastanka dislipidemije, fokusi osnovnih istraživanja, ali i kliničke prakse, pomereni su od tradicionalnih ka novijim faktorima rizika. U prilog ovome govore i rezultati ove studije, koji su pokazali da iako među ispitivanim grupama postoji razlika između koncentracija TG, HDL-h i apoA-I, vrednosti UH, LDL-h i apo B-100 se nisu razlikovale.

Uloga oksidativnog stersa u patogenezi aterosklerotskog plaka ogleda se u oksidativnoj modifikaciji LDL čestica. Hemijska modifikacija LDL čestice u reakciji sa malondialdehidom (MDA) je najistraženija oksidativna modifikacija LDL čestica i predstavlja meru delovanja oksidativnog stersa na lipidne parametre. U stanjima povećanog oksidativnog stersa dolazi do ubrzane sinteze oksidovanih formi LDL čestica, te njihovo prisustvo u cirkulaciji odražava progresiju ateroskleroze i može se smatrati biohemijskim markerom rizika za IBS (14). Rezultati ove studije su pokazali povišene vrednosti MDA kod obe grupe pacijenata sa IBS u odnosu na KG, što ide u prilog gore pomenutim navodima.

Iako postoje nedvosmisleni dokazi o inverznoj povezanosti nivoa HDL-h i rizika za KVB, danas se smatra da poseban značaj ima funkcionalnost HDL čestica (15). Biomarkeri funkcionalnosti HDL čestica se trenutno ispituju u brojnim kliničkim studijama i između ostalog podrazumevaju ispitivanja očuvanosti reverznog transporta holesterola u koji su uključeni LCAT i CETP (16). U ovoj studiji nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnostima LCAT i CETP, ali je primećen trend ka većoj aktivnosti CETP u grupi pacijenata koja nije bila na terapiji statinima.

Mnoge prethodne studije su pokazale da različite subfrakcije koje čine LDL i HDL familiju lipoproteina imaju različite metaboličke i funkcionalne osobine, te posledično imaju različit uticaj na razvoj KVB (17). Među svim subpopulacijama, sdLDL čestice imaju istaknutu ulogu u nastanku i razvoju ateroskleroze, kako zbog njihovog smanjenog klirensa i lakšeg prodora u subendotelni prostor, tako i zbog povećane sklonosti ka oksidativnoj modifikaciji (18). Nasuprot tome, međusobni odnosi između veličine i funkcije HDL čestica još uvijek nisu u potpunosti definisani, iako postoji sve više dokaza da manje HDL čestice

imaju smanjen protektivni potencijal (19). Rezultati prikazane studije su pokazali razliku u zastupljenosti LDL fenotipova u ispitivanim grupama. Utvrđeno je da je zastupljenost fenotipa LDL A kod zdravih ispitanika veća u odnosu na obe grupe pacijenata. U obe grupe pacijenata, zastupljenosti LDL A i LDL B fenotipova su bile gotovo podjednake. Relativne zastupljenosti pojedinih subfrakcija u ukupnom LDL profilu se nisu razlikovale između ispitivanih grupa. Detaljnija analiza HDL profila pokazala je razlike u zastupljenosti HDL fenotipova između posmatranih grupa. U grupi pacijenata primećena je veća zastupljenost HDL 3 fenotipa, u odnosu na KG, što ukazuje da kod pacijenata češće preovlađuje populacija HDL čestica manjeg dijametra. Rezultati ove studije su pokazali da je značajno veći udeo manjih subklasa, HDL 3b i HDL 3c, zastupljen kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG. Ovi rezultati govore u prilog teoriji da manje HDL čestice ne poseduju protektivne, antiaterogene sposobnosti (19).

Pored svega navedenog, savremena literatura navodi da je za potpuno razumevanje metabolizma holesterola neophodno sagledati proces homeostaze holesterola i mehanizme njene regulacije uzimajući u obzir relevantne fiziološke procese kao što su sinteza i apsorpcija holesterola (10). Koncentracije endogenih sterola, koji predstavljaju prekursore u sintetskim putevima holesterola (dezmosterol i latosterol), pokazatelji su efikasnosti endogene sinteze holesterola, dok egzogeni fitosteroli (kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol) služe kao surogat-markeri apsorpcije u gastrointestinalnom traktu (11). Kod zdravih osoba, procesi sinteze i apsorpcije su u ravnoteži, dok kod pacijenata sa IBS dolazi do narušavanja ravnoteže i njenog ponovnog uspostavljanja nakon uvođenja terapije statinima. Poremećaj homeostaze holesterola, koji se javlja na nivou sinteze ili apsorpcije, može biti povezan sa razvojem hiperholesterolemije, ateroskleroze, te posledično IBS (11, 20, 22). Očekivano, rezultati ove studije su pokazali da su apsolutne i relativne vrednosti markera sinteze bile povišene kod obe grupe pacijenata u odnosu na KG, dok su apsolutne i relativne vrednosti markera apsorpcije bile značajno niže. Kod zdravih osoba, snižena sinteza i povišena apsorpcija ukazuju na očuvanu homeostazu holesterola. U grupi pacijenta na terapiji statinima primećene su niže vrednosti markera sinteze i više vrednosti markera apsorpcije u odnosu na pacijente koji nisu bili na terapiji statinima, što je najverovatnije direktna posledica terapije.

Upotrebom savremenih hromatografskih tehnika, mogućnosti detekcije i kvantifikacije NHS otvorile su nova vrata u pogledu razumevanja kompletnog metabolizma holesterola. Međutim, i pored njihovog značajnog dijagnostičkog potencijala (23-26), metode za odedivanje NHS pokazuju široku varijabilnost. Rezultati ove studije pokazali su da je

postavljena metoda tačna i precizna i da je zadovoljila FDA kriterijume (27). Takođe, prikazani rezultati ukazuju na različite preanalitičke faktore uticaja (stabilnost uzoraka i uticaj plastifikatora) prilikom kvantifikacije NHS i mogućnosti njihovog uklanjanja.

Poznato je da zasićene i nezasićene masne kiseline (MK), kroz svoje metaboličke produkte, ostvaruju različite proinflamatorne i antiinflamatorne efekte. ω -3 MK imaju vazodilatatorno, antiinflamatorno i antitrombotsko dejstvo, čime se potvrđuje višestruka korist njihove suplementacije kod pacijenata sa IBS [28]. Takođe, određivanjem masnokiselinskog profila plazme, moguće je dobiti detaljniju analizu njihove raspodele unutar TG, estara holesterola i slobodne frakcije (29, 30). U *in vitro* studijama na ćelijskim linijama pokazano je da statini pojačavaju aktivnost δ 5- i δ 6-desaturaza koje su uključene u metabolizam MK. Kako kao proizvodi ovih enzimskih reakcija nastaju arahidonska, eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina, time statini mogu da dovedu do promena u masnokiselinskom profilu plazme (31). Rezultati ove studije su pokazali da se kod pacijenata na terapiji statinima povećava procentualni udeo zastupljenosti masnih kiselina koje su proizvodi aktivnosti desaturaza. Pored ovog efekta, terapija statinima ostvaruje i druge plejotropne efekte. Literaturni podaci navode da je aktivnost Lp-PLA2 povezana sa nestabilnošću plaka i ukazuju da statini svojim plejotropnim efekom smanjuju njenu aktivnost (32). Rezultati ove studije su u skladu sa tim navodima i pokazuju smanjenu aktivnost Lp-PLA2 kod pacijenata na terapiji statinima.

D. Zaključak- obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Danas je poznat veliki broj etioloških faktora u nastanku ateroskleroze, a otkriven je i veliki broj biohemijskih markera i dijagnostičkih postupaka koji omogućavaju ranu detekciju promena na krvnim sudovima, te pravovremeni i adekvatan tretman. Takođe, na tržištu je dostupan veliki broj lekova, koji deluju na metaboličke procese koji su posredno ili neposredno uključeni u napredovanje ateroma (10). Ipak, stope incidence, prevalencije i morbiditeta uzrokovanih IBS su zabrinjavajuće (1, 2). Poznato je da je LDL-h glavna lipidna komponenta koja direktno utiče na aterogenezu, ali i da su vrednosti LDL-h nedovoljne za predviđanje rizika za nastanak KVB (10, 11). Iz tog razloga je od presudnog značaja ispitivanje kompletnog metabolizma holesterola, kako kroz procese njegove sinteze i apsorpcije, tako i kroz njegovu distribuciju među različitim lipoproteinskim partikulama.

Danas postoji veliko interesovanje za načinom adekvatne procene homeostaze holesterola i mehanizmima njenog održavanja (10, 11, 20, 21). Kako navodi Kuksis, merenje NHS je korisno za procenu homeostaze holesterola. Glavni izvori NHS prisutnih u plazmi su prekursori u putevima biosinteze holesterola, kao i namirnice bogate fitosterolima koji se apsorbuju u jejunum. Ova kompleksna mešavina steroidnih struktura, dovodi do problema prilikom njihove izolacije, identifikacije i kvantifikacije (33). Smatra se da su problemi metodološke prirode glavni razlog izbegavanja uvođenja ovih metoda u širu kliničku praksu. U ovoj studiji po prvi put su ispitani različiti preanalitički faktori uticaja na određivanje koncentracije NHS. Rezultati ove studije navode da su stabilnost uzorka, kao i ciklusi odmrzavanja i zamrzavanja mogući izvori grešaka prilikom određivanja koncentracija NHS. Takođe, ova studija je po prvi put opisala uticaj upotrebe plastičnog laboratorijskog posuđa na proces derivatizacije NHS, koji se smatra važnim korakom u pripremi uzoraka, jer obezbeđuje adekvatnu separaciju analita od interesa.

U objavljenim studijama koje su se bavile procenom homeostaze holesterola, koristeći koncentracije NHS, predložene su različite modele za procenu homeostaze holesterola (10, 11, 20-24). Kako navode Matthan i saradnici, određivanje koncentracija NHS pre otpočinjanja terapije hipolipemicima, može biti značajan podatak u predviđanju odgovora na terapiju, a kasnije i u praćenju efekata preporučene terapije (20, 21). U ovom istraživanju prvi put su u našoj populaciji obrasci homeostaze holesterola opisana korišćenjem medijalnih vrednosti markera sinteze i apsorpcije holesterola. Na osnovu vrednosti dezmosterola, latosterola i β -sitosterola ispitanici su u ovoj studiji svrstani u kategorije dobrih ili loših sintetizera, odnosno dobrih ili loših apsorbera. Unutar svake ispitivane grupe, između podgrupa poređene su vrednosti osnovnih parametara lipidnog statusa, apoA-I, apoB-100 i raspodele LDL čestica. Rezultati studije su pokazali da je, na osnovu ovako dobijenih obrazaca homeostaze holesterola, moguće izdvojiti podgrupu zdravih osoba koja ima povišenu sintezu i smanjenu apsorpciju holesterola i pokazali su da te osobe imaju lošiji lipidni profil, a time i veći rizik za razvoj KVB.

Poznato je da Lp-PLA2 sudeluje u procesima progresije ateroma, hidrolizujući estarske veze na sn-2 poziciji fosfolipida, pri čemu su nastali produkti uključeni u endotelnu disfunkciju, inflamaciju plaka i formiranje nekrotičnog jezgra unutar plaka, što sve doprinosi napredovanju aterosklerotskog procesa (32). Lp-PLA2 je predložena za novi biomarker, visoko specifičan za vaskularnu inflamaciju, povezan sa vulnerabilnošću plaka (32, 34). Mnoge studije su dokazale da je značajno smanjuje aktivnost Lp-PLA2 kod pacijenata sa IBS

u poređenju sa placebo, pokazatelj bolje prognoze bolesti (35). Rezultati ove disertacije su pokazali da su masene koncentracije Lp-PLA2 bile niže kod pacijenata sa IBS koji su bili na terapiji statinima, u odnosu na one koji nisu bili na terapiji, što govori u prilog gore pomenutim plejotropnim efektima statina.

Kako navode literaturni podaci, plejotropni efekat statina ostvaruje se i kroz promene aktivnosti desaturaza, što dovodi do promena u masnokiselinskom profilu plazme, te povećanog stvaranja arahidonske, eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline. Takođe, međusobni udeli zasićenih i nezasićenih MK, kao i ω -3 i ω -6 MK kod pacijenata na terapiji statinima, objašnjavaju plejotropne efekte terapije na metaboličke puteve desaturacije i elongacije masnih kiselina. Rezultati ove studije su pokazali razlike u masnokiselinskim profilima plazme između pacijenata na terapiji statinima i onih koji nisu bili na terapiji, te veće udele gore pomenutih MK u grupi pacijenata na tretmanu hipolipemicima.

Rezultati ove studije ukazali su na postojanje značajne veze između procesa sinteze i apsorpcije holesterola i raspodele holesterola među LDL lipoproteinskim subklasama. Ispitivanje obrazaca homeostaze holesterola i sastava i veličine LDL čestica omogućuje detaljniji uvid u metabolizam holesterola i pokazuje koji su procesi doveli do narušavanja homeostaze, što je značajan podatak za sprovođenje blagovremene i adekvatne terapije.

Literatura:

1. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5:927.
2. Ašanin M., Beleslin B., et al. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. Beograd, 2012.
3. Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B. Kardiologija. Zavod za Udžbenike, Beograd 2011.
4. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J.* 1996;131:379-84.
5. Kreienberg PB, Darling RC, Fowkes FG. The Epidemiology and Etiology of Atherosclerosis. *Vascular Surgery.* 2006:1-8.
6. Siasos G, Tsigkou V, Kokkou E, Oikonomou E, Vavuranakis M, Vlachopoulos C, Verveniotis A, Limperi M, Genimata V, G Papavassiliou A, Stefanadis C.

- Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Curr Med Chem*. 2014;21:3936-48.
7. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev*. 2010;9:142-52.
 8. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, De Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:447-54.
 9. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32:1769-818.
 10. van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368:1-6.
 11. Wu WF, Wang QH, Zhang T, Mi SH, Liu Y, Wang LY. Gas chromatography analysis of serum cholesterol synthesis and absorption markers used to predict the efficacy of simvastatin in patients with coronary heart disease. *Clin Biochem*. 2013;46:993-8.
 12. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016;4:256.
 13. Hobbs FD, Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra U, Cosyns B, Deaton C. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2016;37:2315-81.
 14. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15:316-28.
 15. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, Hindy G, Hólm H, Ding EL, Johnson T, Schunkert H. Plasma HDL

cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012;380:572-80.

16. von Eckardstein A, Kardassis D, editors. High density lipoproteins: from biological understanding to clinical exploitation. Springer Cham. Heidelberg, New York, Dordrecht, London; 2015
17. Rizzo M, Perez-Martinez P, Nikolic D, Montalto G, Lopez-Miranda J. Emerging approaches for the treatment of hypertriglyceridemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14:1869-73.
18. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM*. 2006 Jan 1;99(1):1-4.
19. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis*. 2016;251:454-9.
20. Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Sex-specific differences in the predictive value of cholesterol homeostasis markers and 10-year cardiovascular disease event rate in Framingham Offspring Study participants. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e005066.
21. Matthan NR, Resteghini N, Robertson M, Ford I, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Jukema JW, Lichtenstein AH, Schaefer EJ, PROSPER Group. Cholesterol absorption and synthesis markers in individuals with and without a CHD event during pravastatin therapy: insights from the PROSPER trial. *J Lipid Res*. 2010;51:202-9.
22. Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, Jones PJ. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev*. 2006;64:385-402.
23. H.H. Son, S.H. Kim, J.Y. Moon, B.C. Chung, M.J. Park, M.H. Choi. Serum sterol profiling reveals increased cholesterol biosynthesis in childhood obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;149:138–45.
24. H.S. Seo, M.H. Choi. Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;153 72–9.

25. N. Wang, L. Yvan-Charvet, D. Lütjohann, M. Mulder, T. Vanmierlo, T.W. Kim, A.R. Tall. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* 2008;22:1073–82.
26. Lupattelli, S. De Vuono, E. Mannarino, Patterns of cholesterol metabolism: pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovas.* 2011;21: 620–27.
27. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2001.
28. Ooi EM, Watts GF, Ng TW, Barrett PH. Effect of dietary fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients.* 2015;7:4416-25.
29. Ito MK. Long-chain omega-3 fatty acids, fibrates and niacin as therapeutic options in the treatment of hypertriglyceridemia: a review of the literature. *Atherosclerosis.* 2015;242:647-56.
30. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. *Nutr Res.* 2004;24:761-72.
31. Risé P., Ghezzi S., Priori I., Galli C. Differential modulation by simvastatin of the metabolic pathways in the n-9, n-6 and n-3 fatty acid series, in human monocytic and hepatocytic cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:1095-100
32. Bostan M, Avni UH, Yildirmiş S, Malkoç M, Atak M, Demir A, Yılmaz A, Uđurlu Y, Karadađ Z, Duman H, İtirođlu Ö. Pleiotropic effects of HDL subfractions and HDL-associated enzymes on protection against coronary artery disease. *Acta Cardiol.* 2015;70:333-40.
33. Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A.* 2001;935:203-36.
34. Jansen H, Samani NJ, Schunkert H. Mendelian randomization studies in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2014;35:1917-24.
35. White HD, Simes J, Stewart RA, Blankenberg S, Barnes EH, Marschner IC, Thompson P, West M, Zeller T, Colquhoun DM, Nestel P. Changes in lipoprotein-associated phospholipase A2 activity predict coronary events and partly account

for the treatment effect of pravastatin: results from the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease study. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000360.

E. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Gojkovic, T.**, Vladimirov, S., Spasojevic-Kalimanovska, V., Zeljkovic, A., Vekic, J., Kalimanovska-Ostric, D., Djuricic, I., Sobajic, S. and Jelic-Ivanovic, Z. Can non-cholesterol sterols and lipoprotein subclasses distribution predict different patterns of cholesterol metabolism and statin therapy response? *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:447-57. (IF 3,556; rang časopisa M21 (7/30) u kategoriji Medical Laboratory Technology);
2. **Gojkovic T**, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Arsenijevic J, Djuricic I, Sobajic S, Jelic-Ivanovic Z. Preanalytical and analytical challenges in gas chromatographic determination of cholesterol synthesis and absorption markers. *Clin Chim Acta.* 2018;478:74-81. (IF 2,926; rang časopisa M21 (8/30) u kategoriji Medical Laboratory Technology).

F. Mišljenje i predlog

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Istraživanje homeostaze holesterola, razumevanje njenih obrazaca, kao i faktora koji dovode do njenog narušavanja kod pacijenata sa IBS, predstavlja prvo kliničko ispitivanje ovih biomarkera u našoj populaciji, koje doprinosi boljem razumevanju ukupno metabolizma holesterola u razvoju IBS. Rezultati ove doktorske disertacije imaju značaj u primeni NHS u laboratorijskoj proceni rizika za nastanak i razvoj IBS kod zdravih osoba, kao i u predviđanju odgovora na terapiju i praćenje efekata terapije hipolipemicima kod pacijenata sa IBS. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorija M21).

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi

dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Značaj određivanja markera sinteze i apsorpcije holesterola kod zdravih ispitanika i pacijenata sa ishemijskom bolešću srca**“, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Tamare Gojković.

Beograd 14.9.2017.

dr Zorana Jelić-Ivanović
profesor emeritus
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta

dr Slađana Šobajić
redovni profesor
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta

dr Dimitra Kalimanovska-Oštrić
redovni profesor
Univerziteta u Beogradu-Medicinskog fakulteta

dr Aleksandra Zeljković
vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr Jelena Vekić
docent
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutski fakultet
