

# Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora

---

Macan, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:382105>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Macan, Marija (2012) *Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora [The influence of antilipid drugs on esterases, lipids and leptin in rats]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/1560>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Macan**

**Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze,  
lipide i leptin u biološkom materijalu  
štakora**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Macan**

**Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze,  
lipide i leptin u biološkom materijalu  
štakora**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Kliničkom zavodu za kemiju Medicinskog i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pri Kliničkoj bolnici «Sestre milosrdnice» i Istraživačkom centru GlaxoSmithKline u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Vlasta Bradamante.

Pokusi su financijski potpomognuti od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (znanstveni projekt broj 108-0000000-0013 «Serumske esteraze, leptin, lipidi i antilipidni lijekovi»).

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Vlasti Bradamante na pruženoj potpori, kao i na uloženom trudu i energiji. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jasni Lovrić, znanstvenoj savjetnici dr. sc. Božici Radić te znanstvenom suradniku dr. sc. Pašku Konjevodi na suradnji i korisnim savjetima. Doc. dr. sc. Nadi Vrkić i dr. sc. Striboru Markoviću zahvaljujem za stručnu pomoć pri provođenju dijela biokemijskih metoda. Velika zahvala dipl. ing. biokem. gospođi Željki Roci za cjelokupnu pomoć pri izvođenju pokusa i uvijek ugodnu suradnju. Prof. dr. sc. Damiru Babiću zahvaljujem se za razumijevanje i moralnu podršku. Osobito se zahvaljujem svojoj obitelji, posebno Mariju i Sari, na velikom strpljenju, odricanju i na podršci u svakom smislu te riječi.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1.0 UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1 Lipidi i lipoproteini.....	1
1.1.1 Kolesterol i triacilgliceroli.....	1
1.1.2 Lipoproteini kao prijenosnici kolesterola i triacilglicerola u plazmi.....	2
1.1.3 Hiperlipoproteinemije.....	4
1.2 Oksidacijski stres i ateroskleroza.....	6
1.2.1 Oksidacijski stres.....	6
1.2.2 Ateroskleroza.....	7
1.3 Esteraze.....	9
1.3.1 Paraoksonaza 1.....	9
1.3.1.1 Paraoksonaza 1 i ateroskleroza.....	11
1.3.2 Butirilkolinesteraza.....	13
1.3.2.1 Butirilkolinesteraza i ateroskleroza.....	15
1.4 Leptin.....	16
1.5 Antilipidni lijekovi.....	18
1.5.1 Statini.....	18
1.5.1.1 Učinci statina na lipide.....	19
1.5.1.2 Ne-lipidni učinci statina.....	21
1.5.2 Fibrati.....	22
1.5.2.1 Učinci fibrata na lipide.....	23
1.5.2.2 Ne-lipidni učinci fibrata.....	23
1.6 Svrha rada.....	25
2.0 HIPOTEZA.....	26
3.0 CILJEVI RADA.....	27
4.0 MATERIJALI I METODE.....	28
4.1 Životinje.....	28
4.2 Ispitivane supstancije.....	28
4.3 Postupci sa životinjama.....	28

4.3.1 Kontrolne skupine životinja.....	28
4.3.2 Eksperimentalne skupine životinja.....	29
4.3.3 Primjena antilipidnih lijekova.....	29
4.3.4 Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala.....	30
4.4 Biokemijske metode.....	30
4.4.1 Određivanje koncentracije lipida i glukoze u plazmi.....	30
4.4.2 Određivanje katalitičke aktivnosti paraoksonaze 1 u serumu.....	30
4.4.3 Određivanje katalitičke aktivnosti paraoksonaze 1 u jetri.....	31
4.4.4 Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u plazmi.....	31
4.4.5 Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u jetri.....	32
4.4.6 Određivanje koncentracije malondialdehida u plazmi.....	32
4.4.7 Određivanje koncentracije malondialdehida u srcu, jetri, bubregu i mozgu .....	32
4.4.8 Određivanje koncentracije leptina u plazmi.....	33
4.5 Analiza podataka.....	33
5.0 REZULTATI.....	34
5.1 Atorvastatin - pokus I.....	34
5.1.1 Učinci atorvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri .....	34
5.1.2 Učinci atorvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi.....	40
5.1.3 Učinci atorvastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu.....	41
5.1.4 Učinci atorvastatina na koncentraciju leptina u plazmi.....	45
5.2 Pravastatin - pokus II.....	46
5.2.1 Učinci pravastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri.....	46
5.2.2 Učinci pravastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi.....	52
5.2.3 Učinci pravastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu.....	53
5.2.4 Učinci pravastatina na koncentraciju leptina u plazmi.....	57
5.3 Simvastatin (dvije doze) - pokus III.....	58
5.3.1 Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri.....	58
5.3.2 Učinci simvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi.....	63

5.3.3	Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu.....	64
5.3.4	Učinci simvastatina na koncentraciju leptina u plazmi.....	69
5.4	Simvastatin (jedna doza) – pokus IV.....	70
5.4.1	Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu...70	
5.5	Gemfibrozil – pokus V.....	76
5.5.1	Učinci gemfibrozila na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri.....	76
5.5.2	Učinci gemfibrozila na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi.....	81
5.5.3	Učinci gemfibrozila na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu.....	82
5.5.4	Učinci gemfibrozila na koncentraciju leptina u plazmi.....	87
6.0	RASPRAVA.....	88
7.0	ZAKLJUČCI.....	97
8.0	SAŽETAK.....	99
9.0	SUMMARY.....	100
10.0	LITERATURA.....	101
11.0	ŽIVOTOPIS.....	115
12.0	PRILOZI.....	116
12.1	Popis tablica.....	116
12.2	Popis slika.....	117



## POPIS OZNAKA I KRATICA

ABCA 1 - A1 prijenosnik koji veže ATP

ABCG1 - G1 prijenosnik koji veže ATP

AChE - acetilkolinesteraza

apoA-I - apoprotein A-I

apoA-II - apoprotein A-II

apoA-IV - apoprotein A-IV

apoB-48 - apoprotein B-48

apoB-100 - apoprotein B-100

apoC-I - apoprotein C-I

apoC-II - apoprotein C-II

apoC-III - apoprotein C-III

apoE - apoprotein E

ATOR - atorvastatin

ATP- adenzin trifosfat

BuChE - butirilkolinesteraza

CETP - proteinski nosač kolesterol-estera

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

GEM - gemfibrozil

HDL - lipoproteini velike gustoće

HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodikov peroksid

ICAM-1 - međustanična adhezijska molekula 1

IDL - lipoproteini srednje gustoće

LCAT - lecitin-kolesterol acil transferaza

LDL - lipoproteini male gustoće

LPL - lipoproteinska lipaza

MCP-1 - kemotaktični protein monocita-1

MIP-1 $\alpha$  - upalni protein makrofaga-1 $\alpha$

MDA - malondialdehid

MDA+4-HDA - malondialdehid i 4-hidroksialkenali

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina

PAF-AH - acetilhidrolaza čimbenika aktivacije trombocita

PON - paraoksonaza

PON1 - paraoksonaza 1

PON2 - paraoksonaza 2

PON3 - paraoksonaza 3

PPAR - peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor

PRAV - pravastatin

RNS - reaktivni dušikovi spojevi

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

Scap - protein koji aktivira odvajanje SREBP-a

SIMV - simvastatin

SR-B1 - receptor hvatač B-klase

SREBP - protein koji veže regulacijski element sterola

TBARS - reaktivni spojevi s tiobarbiturnom kiselinom

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta – beta

VCAM-1 - adhezijska molekula krvožilne stanice 1

## 1.0 UVOD I SVRHA RADA

### 1.1 LIPIDI I LIPOPROTEINI

Lipidi su sastavni dio živih organizama. U plazmi se nalaze slobodni i esterificirani kolesterol (ili esteri kolesterola), triacilgliceroli (trigliceridi) i fosfolipidi. S obzirom na činjenicu da su lipidi netopljivi u vodi, problem njihovog prijenosa u vodenoj krvnoj plazmi riješen je spajanjem nepolarnih lipida (triacilgliceroli i esteri kolesterola) s amfipatskim lipidima (fosfolipidima i kolesterolom) i proteinima (apoproteini, apolipoproteini) u čestice koje se nazivaju lipoproteini.

#### 1.1.1 Kolesterol i triacilgliceroli

Kolesterol koji se nalazi u organizmu dijelom u njemu i nastaje (endogeni kolesterol), a dijelom se unosi hranom (egzogeni kolesterol). Endogenom sintezom se kolesterol stvara iz acetata u brojnim stanicama tijela, a najveća količina nastaje u jetri. Spajanjem tri molekule acetata nastaje 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA), koji djelovanjem HMG-CoA-reduktaze prelazi u mevalonsku kiselinu. Pretvorba u mevalonat je reakcija koja ograničava brzinu sinteze endogenog kolesterola. Mevalonat se nizom reakcija pretvara u konačni produkt, kolesterol. Kolesterol sintetiziran u jetri dijelom prelazi u krv, dijelom se razgrađuje u primarne žučne kiseline koje pomažu otapanje kolesterola u žuči, a dijelom se izlučuje nepromijenjen u žuč. Putem žuči kolesterol dopijeva u tanko crijevo. Dakle, kolesterol koji se nalazi u lumenu tankog crijeva dvojakog je porijekla. Predstavlja mješavinu endogeno sintetiziranog te putem žuči izlučenog i hranom unesenog egzogenog kolesterola. U tankom se crijevu kolesterol varijabilno reapsorbira i vraća u jetru (enterohepatička cirkulacija), a ostali se dio iz tijela izlučuje stolicom (1).

Kolesterol u organizmu ima brojne važne funkcije: izgrađuje stanične membrane, prekursor je žučnih kiselina i steroidnih hormona te kao sastavni dio serumskih lipoproteina sudjeluje u transportu triacilglicerola u plazmi (1).

U plazmi se kolesterol prenosi u sastavu lipoproteina. U plazmi ljudi, lipoproteini male gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) su glavni prijenosnici kolesterola i estera kolesterola, a omogućuju i njihov unos u različita tkiva. U plazmi štakora glavni prijenosnici kolesterola i estera kolesterola su lipoproteini velike gustoće (engl. *high density lipoproteins*, HDL) (2, 3).

Pri uklanjanju viška kolesterola iz tkiva glavnu ulogu imaju HDL čestice koje ga vraćaju u jetru, što se naziva i povratnim prijenosom kolesterola (4, 5).

Prekomjerna količina kolesterola u organizmu je posljedica njegovog povećanog unosa ili stvaranja te smanjenog izlučivanja iz tijela. Isto tako prekomjerna količina kolesterola u organizmu može biti posljedica rijetkih genetskih poremećaja povezanih sa smanjenim koncentracijama HDL

čestica. Bez obzira na uzrok prekomjerne količine kolesterola u organizmu, najvažnija štetna posljedica njegovog nakupljanja je poticanje aterogeneze (1).

Triacilgliceroli su esteri glicerola i masnih kiselina. Slično kolesterolu, i triacilgliceroli u organizmu su dvojakog porijekla: endogeni koji se stvaraju u jetri i egzogeni koji se unose hranom. Za razliku od kolesterola, triacilgliceroli služe prvenstveno kao izvor energije.

Najvažniji prijenosnici triacilglicerola u ljudskoj plazmi su hilomikroni, lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoproteins*, VLDL) i lipoproteini srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoproteins*, IDL), dok u krvi štakora najveći dio triacilglicerola prenose HDL čestice (2, 3).

### 1.1.2 Lipoproteini kao prijenosnici kolesterola i triacilglicerola u plazmi

Lipoproteini su makromolekule koje u krvi prenose lipide (kolesterol i triacilglicerole) udružene s apoproteinima. Kuglastog su oblika. S obzirom na gustoću čestica pri ultracentrifugiranju (gustoća lipoproteina se smanjuje povećanjem udjela lipida prema proteinima) i njihovu elektroforetsku pokretljivost dijele se na gore spomenute VLDL, IDL, LDL i HDL čestice te hilomikrone.

Lipidna komponenta lipoproteina čini hidrofobnu jezgru koja sadržava nepolarne lipide (triacilgliceroli i esterificirani kolesterol) i hidrofilni površinski sloj polarnih lipida (fosfolipidi i neesterificirani kolesterol). Na površini lipoproteina se nalaze i apoproteini, proteini čiji nepolarni dijelovi dopiru i do jezgre lipoproteinskih čestica. U sastavu pojedinih lipoproteina mogu biti jedan ili više različitih apoproteina. Glavne funkcije apoproteina su osiguravanje strukturne stabilnosti molekula lipoproteina, vezanje za specifične receptore na površini stanica, nakon čega se lipoproteini unose u stanice gdje se kataboliziraju, a služe i kao kofaktori u enzimskim procesima koji reguliraju metabolizam lipoproteina. Različite vrste apoproteina sudjeluju i u određivanju funkcije pojedinih lipoproteina (1, 5).

Hilomikroni su najveće lipoproteinske čestice. Sintetiziraju se u epitelnim stanicama tankog crijeva. Sadržavaju lipide, od čega oko 85% čine hranom uneseni triacilgliceroli i kolesterol koji čini oko 10% ukupne mase čestica hilomikrona, kao i vitamine topljive u masti te različite apoproteine. Od apoproteina hilomikroni sadržavaju najvećim dijelom apoprotein B-48 (apoB-48), te apoprotein A-I (apoA-I) i apoprotein A-IV (apoA-IV) koji se sintetiziraju u crijevu, te apoproteine apoprotein E (apoE), apoprotein C-I (apoC-I), apoprotein C-II (apoC-II) i apoprotein C-III (apoC-III) koje hilomikroni dobivaju od HDL čestica nakon ulaska hilomikrona u plazmu. Limfom i krvlju hilomikroni dolaze u kapilare masnog i mišićnog tkiva gdje uz pomoć apoC-II dolaze u dodir s lipoproteinskom lipazom (LPL), enzimom na površini endotelnih stanica, koji hidrolizira triacilglicerole iz hilomikrona. Hidrolizom nastale masne kiseline i monogliceroli prolaze kroz endotelne stanice krvnih žila i ulaze u masne stanice gdje se reesterificiraju u triacilglicerole, ili u mišićne stanice gdje se oksidiraju i služe kao izvor energije. Ostalne čestice hilomikrona predaju HDL

česticama dio kolesterola, fosfolipida i apoA-I te odlaze u jetru. U jetri se preostali dio triacilglicerola iz sastava hilomikrona dalje smanjuje djelovanjem jetrene lipaze, a preostali dio hilomikrona se interakcijom između apoE hilomikrona i receptora za LDL te proteina srodnog receptoru za LDL unosi u hepatocite koji ih razgrađuju (5). Potrebno je međutim naglasiti da metabolizam hilomikrona u jetri nije značajan.

Triacilgliceroli stvoreni u jetri čine glavni sastojak jezgre VLDL čestica, koje su glavni prijenosnik triacilglicerola iz jetre u ekstrahepatična tkiva. Osim triacilglicerola, VLDL lipoproteini sadržavaju estere kolesterola i fosfolipide. Glavni im je apoprotein B-100 (apoB-100), a sadržavaju i apoE, apoC-I, apoC-II i apoC-III. Manji dio apoE i apoC se ugrađuju u VLDL čestice prije sekrecije iz jetre, a veći dio nakon izlaska VLDL lipoproteina iz jetre. VLDL čestice krvlju stižu do kapilara u kojima se triacilgliceroli iz njihovog sastava hidroliziraju djelovanjem LPL. Ostalne čestice VLDL se nakon hidrolize triacilglicerola nazivaju IDL česticama. IDL lipoproteini u svojem sastavu sadrže uglavnom estere kolesterola i ostatke endogeno sintetiziranih triacilglicerola, dok su od apoproteina najviše zastupljeni apoB-100, apoE, apoC-II i apoC-III. Jedan dio preostalih VLDL i IDL čestica se nakon vezanja za površinu hepatocita pomoću apoB-100 i apoE receptora i ulaska u jetru metabolizira, dok se drugi dio IDL čestica djelovanjem LPL i jetrene lipaze pretvara u LDL. Istovremeno se apoproteini (apoA, apoE i apoC) iz IDL čestica redistribuiraju u HDL lipoproteine (5).

LDL čestice su najvećim dijelom sastavljene od esterificiranog kolesterola i apoB-100. Većina LDL čestica se iz plazme uklanja vezanjem za LDL receptore različitih stanica, osobito hepatocita (oko 75%), a unutarstanično oslobođeni kolesterol postaje izvor za ugradnju u stanične membrane, sintezu steroida itd. Regulacija izražaja LDL receptora i posljedično koncentracije LDL čestica u krvi je kompleksan proces koji je reguliran SREBP (proteini koji vežu regulacijski element sterola; engl. *sterol regulatory element binding proteins*, SREBPs) transkripcijskim čimbenicima. SREBP-ovi su obitelj proteina koji reguliraju transkripciju gena uključenih u stanični unos i metabolizam kolesterola i drugih lipida (6). U spomenuti regulacijski proces je uključen i protein koji aktivira odvajanje SREBP-a (engl. *SREBP cleavage activating protein*, Scap) (7) od hrapave endoplazmatske mrežice i usmjerava ga prema jezgri u kojoj potiče izražaj gena za LDL receptore.

LDL čestice postaju izrazito aterogene ukoliko dođe do njihove oksidacijske modifikacije. Preuzimaju ih makrofazi pomoću svojih receptora (tzv. stanice „čistači“), nakon čega se pretvaraju u tzv. pjenušave stanice, što zajedno s oštećenjem endotelnih stanica krvnih žila predstavlja početni korak u nastanku ateroskleroze (5, 8).

HDL čestice preuzimaju slobodni (neesterificirani) kolesterol iz stanica u kojima ga ima u suvišku, kao i iz stanica u aterosklerotičnim nakupinama arterijske stijenke, odnosno makrofaga. Prijenos kolesterola iz membrana makrofaga u HDL može biti posredovan difuzijom te putem prijenosnika koji vežu ATP (engl. *adenosine triphosphate*, adenzin trifosfat), A1 (ABCA1) i G1 (ABCG1) (engl. *ATP-binding cassette transporters*, ABC) (4, 5, 6). ABC prijenosnici su članovi obitelji prijenosnih proteina koji se za vezanje supstrata koriste hidrolizom ATP-a, omogućujući

prijenos supstrata kroz membranu. U HDL-u se kolesterol većim dijelom esterificira pomoću enzima lecitin-kolesterol acil transferaze (engl. *lecithin-cholesterol acyl transferase*, LCAT) u estere kolesterola koji se zbog svoje hidrofobnosti smještaju u jezgru HDL čestica. HDL lipoproteini dakle djeluju zaštitno i sprečavaju razvoj ateroskleroze skupljajući na sebe kolesterol s mjesta gdje ga ima u suvišku i prenoseći ga u ostatne čestice VLDL, IDL, LDL i hilomikrona uz pomoć proteinskog nosača kolesterol-estera (engl. *cholesterol-ester transfer protein*, CETP) u zamjenu za triacilglicerole. Ostalne čestice VLDL, IDL, LDL i hilomikrona zajedno s kolesterol-esterom ulaze endocitozom u jetru. Značajan je još jedan sustav prijenosnika, tzv. receptora hvatača B-klase (engl. *scavenger receptor type I, class B*, SR-B1), koji ubrzavaju ulazak kolesterol estera iz HDL-a bogatog triacilglicerolima u jetru, bez internalizacije i razgradnje lipoproteina (5, 9, 10).

U sastavu HDL je od apoproteina najviše zastupljen apoA-I, a u manjem se udjelu nalaze i apoA-II, apoE, apoC-I, apoC-II, apoC-III (5). HDL čestice djeluju i antioksidacijski tako što vežu na sebe oksidirane produkte lipida (hidroperoksid, F2-izoprostan i lizofosfatidilkolin) iz LDL čestica i staničnih membrana (11, 12), što HDL lipoproteine čini glavnim prenositeljima produkata oksidacije lipida u plazmi (11, 13). Prijenosom oksidiranih lipidnih produkata iz LDL u HDL čestice sprečava se unos produkata oksidacije lipida u makrofage (14) i pokretanje lančane reakcije nastanka reaktivnih oblika kisika i dušika (slobodni radikali i reaktivni ne-radikalni oblici) (engl. *reactive oxygen species*, ROS i engl. *reactive nitrogen species*, RNS). ROS i RNS mogu uzrokovati oštećenje lipida, proteina i nukleinskih kiselina (15), kao i prekomjerno poticanje procesa zgrušavanja krvi (16). Potrebno je naglasiti da su i ovi procesi značajni za nastanak ateroskleroze. Oksidirani produkti lipida u sastavu HDL čestica se mogu metabolizirati pomoću strukturnih sastavnica HDL, apoA-I, apoA-II, paraoksonaze 1 (PON1), paraoksonaze 3 (PON3) te acetilhidrolaze čimbenika aktivacije trombocita (engl. *platelet activating factor acetyl-hydrolase*, PAF-AH). Također, HDL čestice prenose oksidirane produkte lipida u jetru gdje se razgrađuju (17). Normalne HDL čestice, osim antioksidacijskog, imaju i antitrombotsko te protuupalno djelovanje (18, 19). Ukoliko se funkcija HDL lipoproteina poremeti, kao što je to slučaj pri jakoj upalnoj reakciji ili djelovanju oksidansa, ovi lipoproteini mogu izgubiti svoje povoljno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (9, 17, 20).

### 1.1.3 Hiperlipoproteinemije

Hiperlipoproteinemije (dislipidemije, hiperlipidemije) su skupina poremećaja metabolizma lipida odnosno lipoproteina. Označavaju povećanu koncentraciju pojedinih lipoproteina u krvi. Nastaju kao posljedica ubrzane sinteze ili usporene razgradnje lipoproteinskih čestica.

Zbog poremećenog metabolizma lipoproteina može doći do razvoja hiperkolesterolemije, hipertriacilglicerolemije ili miješane hiperlipoproteinemije, odnosno istodobnog povećanja koncentracije i kolesterola i triacilglicerola u krvi.

Tradicionalno se hiperlipoproteinemije s obzirom na vrstu lipida i lipoproteina čija je koncentracija u plazmi dominantno povišena prema Fredricksonu dijele u pet tipova (Tablica 1.1).

Tablica 1.1 Podjela hiperlipoproteinemija prema Fredricksonu.

Tip hiperlipoproteinemije	↑ Lipoproteini	↑ Lipidi
I	Hilomikroni	triacilgliceroli
IIa	LDL	kolesterol
IIb	LDL+VLDL	kolesterol+triacilgliceroli
III	IDL	triacilgliceroli+kolesterol
IV	VLDL	triacilgliceroli
V	VLDL+hilomikroni	triacilgliceroli+kolesterol

Etiološki se hiperlipoproteinemije dijele na primarne i sekundarne. Primarne su uzrokovane prirođenim, nasljednim greškama metabolizma lipoproteina. To su primjerice porodična hiperkolesterolemija, porodična hipertriacilglicerolemija, porodični defekt apoB-100, porodični nedostatak LPL i druge. Sekundarne hiperlipoproteinemije nastaju kao popratna pojava nekih drugih poremećaja, kao što su: šećerna bolest, nefrotski sindrom, pretilost, alkoholizam, sistemni eritematozni lupus, monoklonske gamopatije, hepatitis ili se mogu javiti kao nuspojava korištenja različitih lijekova (kortikosteroida, diuretika i drugih) (21).

Hiperlipoproteinemije su jedan od najbolje istraženih faktora rizika za razvoj ateroskleroze. Najveću važnost za razvoj ateroskleroze i njenih posljedica u skupini hiperlipoproteinemija ima povećana plazmatska koncentracija LDL čestica, iako neki autori ukazuju na činjenicu kako je i hipertriacilglicerolemija važan čimbenik u nastanku ateroskleroze (5, 22, 23).

LDL čestice djeluju aterogeno iz dva razloga. Prvi važan razlog je da se kolesterol iz njihovog sastava odlaže u stijenke arterija (5, 10). Drugi, izrazito značajan razlog, je oksidacijska modifikacija LDL čestica u promijenjenim uvjetima. U normalnim uvjetima LDL lipoproteini sadržavaju malu količinu oksidiranih lipidnih produkata (11). Međutim, u stanjima u kojima je potaknuta pojava oksidacijskog stresa (šećerna bolest, hipertenzija itd.), LDL čestice postaju izrazito podložne oksidacijskoj modifikaciji čime se njihova aterogenost dodatno povećava (5, 24). Važnu ulogu LDL u nastanku ateroskleroze su potvrdile brojne kliničke studije (25, 26, 27, 28, 29).

Što se tiče hipertriacilglicerolemije kao provokativnog čimbenika u razvoju ateroskleroze, dosadašnja su istraživanja ukazala na značajnu povezanost hipertriacilglicerolemije s povećanim rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti. Međutim još uvijek nije u potpunosti jasno da li povećana koncentracija triacilglicerola u plazmi može biti neovisni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (5, 22, 23). Najveću povezanost s rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti predstavlja umjereno povećanje koncentracije triacilglicerola u krvi koje se često javlja u okviru metaboličkog sindroma, što uključuje rezistenciju na inzulin, pretilost, hipertenziju, smanjenu koncentraciju HDL čestica u krvi i prokoagulantno stanje (5).

Istraživanja provedena *in vitro* i *in vivo* su pokazala da osim aterogenog djelovanja LDL i triacilglicerola, i druge lipoproteinske čestice, tj. IDL i VLDL, neovisno o drugim čimbenicima rizika potiču razvoj ateroskleroze (30, 31, 32, 33).

HDL lipoproteini, kako je spomenuto ranije, sudjeluju u sprečavanju nastanka ateroskleroze. Različita istraživanja provedena u životinja i ljudi su ukazala da postoji obrnuto proporcionalni odnos funkcije odnosno koncentracije HDL čestica i rizika razvoja ateroskleroze (34, 35, 36).

Neosporno je da u cilju sprečavanja razvoja ateroskleroze i njenih klinički najvažnijih kasnih posljedica, a to su koronarna bolest srca s infarktom miokarda te infarkt mozga, hiperlipoproteinemije treba liječiti farmakološkim mjerama. To su i pokazale poznate kliničke studije poput WOSCOPS (26), Heart Protection Study (27), Scandinavian Simvastatin Survival Study (28) i PROSPER (29).

## 1.2 OKSIDACIJSKI STRES I ATEROSKLEROZA

### 1.2.1 Oksidacijski stres

Biološki je sustav bogat ROS i RNS, visoko reaktivnim molekulama ili atomima koje djeluju prooksidacijski. U ovu skupinu se ubrajaju slobodni radikali, molekule ili atomi koji u svojoj vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona koji sami zauzimaju atomsku ili molekulsku orbitalu, te reaktivne neradikalne tvari koje izazivaju oksidaciju molekula, ali ne zadovoljavaju definiciju slobodnog radikala. ROS i RNS karakterizira niska specifičnost prema supstratu, velika reaktivnost i kratko vrijeme poluživota. Specifičnost reagiranja im je to manja što im je reaktivnost veća (37, 38).

S obzirom na biokemijsku vrstu razlikuju se slobodni radikali i neradikali ROS i RNS. Tako se u skupini ROS nalaze slobodni radikali (superoksidni, hidroksilni, peroksilni radikali i drugi) i neradikali (vodikov peroksid, ozon, hipokloritna kiselina i ostali). Skupina RNS se također može podijeliti na slobodne radikale (dušikov(II) oksid, dušikov(IV) oksid) i neradikale (nitritna kiselina, dušikov(III) oksid, peroksinitritna kiselina, alkilni peroksinitrit i drugi). Osim ROS i RNS, u prooksidacijske molekule se ubrajaju i tvari poput biološki značajnih iona prijelaznih metala (željeza, bakra) (39, 40).

U zdravom organizmu ROS i RNS nastaju neprekidno kao posljedica brojnih normalnih neenzimatskih (mitohondrijski respiracijski lanac, autooksidacija malih molekula, homolitičko cijepanje i druge) te enzimatskih biokemijskih reakcija (reakcije sa ksantin-oksidadom, monoaminooksidazom, peroksisomalnim oksidazama i druge) (39). ROS i RNS mogu oštetiti različite biološke strukture: lipide, nukleinske kiseline i proteine. Djelovanjem na lipide nastaju oksidirani produkti lipida koji se zbog nestabilnosti dalje razlažu na kompleksnu skupinu tvari. Procjena hidroperoksida, primarnih produkata oksidacije lipida je teško provediva zbog male stabilnosti i reaktivne prirode ovih tvari. Zato se procjena lipidne oksidacije obično provodi određivanjem sekundarnih produkata oksidacije kao što je malondialdehid (MDA). Danas se pretpostavlja da osim svojeg direktnog toksičnog djelovanja na različite stanične strukture, ROS i RNS uzrokuju nastanak i drugih produkata oksidacije



lipida, poput reaktivnih aldehida i alkenala, koji se smatraju sekundarnim glasnicima i modulatorima unutarstaničnog širenja oksidacijskog stresa (41, 42).

Zbog potencijalno velike mogućnosti nastajanja ROS i RNS, u organizmu postoje vrlo djelotvorni mehanizmi antioksidacijske zaštite različitim antioksidansima. Antioksidansi su tvari koje u maloj količini i u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje oksidansa. Neki od antioksidansa su primjerice tvari koje katalitički uklanjaju ROS i RNS (superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza), proteini koji vežu prooksidanse poput iona željeza ili bakra (haptoglobin, transferin, hemopeksin), ili molekule koje su dobri hvatači slobodnih radikala (vitamin C, bilirubin) i drugi (37, 39).

U zdravom organizmu postoji ravnoteža između djelovanja ROS i RNS koji potiču oksidaciju i antioksidacijske obrane. Ravnoteža se može poremetiti zbog povećanog djelovanja oksidansa i/ili zbog smanjenog učinka antioksidansa. Stanje u kojem posljedično dolazi do pomaka oksidacijsko-redukcijskih procesa u stanicama prema oksidaciji naziva se oksidacijski stres. Oksidacijski stres može nastati na razini stanice, tkiva ili cijelog organizma. Iako je najčešće patološka pojava, oksidacijski stres može biti i fiziološka pojava. Fiziološki se oksidacijski stres javlja primjerice tijekom svrsishodnih imunoloških reakcija, a patološki tijekom šoka, sepse, imunoloških i drugih poremećaja. Razliku između fiziološkog i patološkog oksidacijskog stresa čine njegove posljedice za makromolekule (nukleinske kiseline, bjelančevine, ugljikohidrate, masti), odnosno pojedine stanice, ali i organizam u cjelini (39).

Smatra se da ROS i RNS sudjeluju u nastanku brojnih klinički važnih patoloških stanja, kao što su: bolesti srca i krvnih žila (ateroskleroza, hipertenzija), bolesti središnjeg živčanog sustava (Parkinsonova bolest), bolesti pluća (emfizem, utjecaj pušenja, bronhopulmonalna displazija), probavnog sustava (pankreatitis), šećerna bolest, bolesti bubrega (nefrotoksičnost metalnim ionima i aminoglikozidima) i drugo (39, 43, 44, 45).

Uloga ROS i RNS u razvoju ateroskleroze je predmet različitih istraživanja. Tako neki autori smatraju da je za razvoj mnogih čimbenika odgovornih za razvoj ateroskleroze (hiperkolesterolemija, šećerna bolest, hipertenzija, pušenje) presudno upravo povećano stvaranje ROS i RNS i posljedično nastanak oksidacijskog stresa (46). Do sada objavljeni rezultati niza istraživanja upućuju na činjenicu da oksidacijski stres može poticati nastanak ateroskleroze na različite načine. Neki od načina su već ranije spomenuti (poremećaj funkcije endotelnih stanica krvnih žila, oksidacija LDL čestica, stvaranje „pjenušavih stanica“), dok će drugi poput poticanja umnažanja glatkih mišićnih stanica i fibroblasta, sprečavanja sinteze vazodilatatora dušičnog oksida i drugo (11, 24, 46, 47, 48, 49) biti spomenuti u tekstu o aterosklerozi.

### 1.2.2 Ateroskleroza

Ateroskleroza je kompleksni proces oštećenja krvožilnog sustava koji u prvom redu zahvaća velike i srednje velike arterije. Započinje u ranom djetinjstvu i sporo napreduje, a klinički se manifestira obično u srednjoj životnoj dobi ili kasnije (50). Njezina točna učestalost nije poznata.

Dostupni epidemiološki podaci se odnose na kliničke manifestacije ateroskleroze, odnosno njene najvažnije posljedice koje su ranije spomenute (str. 6).

Ateroskleroza je multifaktorijalna bolest koja nastaje kompleksnom kombinacijom i interakcijom genskih i okolišnih čimbenika kao što su dob, spol, nasljeđe te poremećaja kao što su: arterijska hipertenzija, šećerna bolest, pretilost, hiperlipoproteinemija, poremećaj prehrane i pušenje (8, 21). Morfološki je karakterizirana lokaliziranim suženjem lumena arterija vezivno-masnim zadebljanjima intime koje se nazivaju pruge, plakovi odnosno ateromi (51). Novija istraživanja ukazuju da je nastanak ateroskleroze posredovan upalnim procesima te djelovanjem ROS i RNS na stijenku arterije. Započinje oštećenjem strukture odnosno funkcije endotelnih stanica krvnih žila, a nastavlja se složenom interakcijom stanica iz krvi (leukocita i trombocita) i stanica unutar stijenke žile (endotelne i glatke mišićne stanice te fibroblasti). Oštećenje endotela može biti izazvano kemijski (hiperkolesterolemija, pušenje, produkti neenzimske glikozilacije u šećernoj bolesti), mehanički (hipertenzija), a moguće i infektivnim čimbenicima (8, 47, 51). Oštećene endotelne stanice gube svoju regulacijsku funkciju u različitim fiziološkim procesima, kao što su kontrola vazodilatacije i vazokonstrikcije, inhibicija odnosno stimulacija umnažanja i migracije glatkih mišićnih stanica, te trombogenezu i fibrinolizu (24, 47).

Kao reakcija na oštećenje endotela krvnih žila, endotelne stanice luče posrednike upalne reakcije (interleukin 1, faktor tumorske nekroze) te pojačano izražavaju adhezijske molekule na svojoj površini (adhezijske molekule krvožilne stanice, engl. *vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1, međustanične adhezijske molekule 1, engl. *inter-cellular adhesion molecule 1*, ICAM-1 te E-selektin). Posljedično započinje migracija monocita i limfocita T iz krvi u subendotelni prostor, gubi se normalno izražena antikoagulacijska aktivnost endotelnih stanica i potiče se agregacija trombocita (5, 47). U oštećenim stanicama endotela povećava se i proizvodnja ROS i RNS (43, 46) te se osigurava put ulasku oksidiranih lipoproteinskih čestica u subendotelni prostor. Povećana koncentracija LDL u krvi kao i njihova pojačana oksidacijska modifikacija uz poticanje apoptoze endotelnih stanica još više omogućuju ulazak oksidiranih LDL čestica u subendotelni prostor (24), gdje se vežu za proteoglikane i dobivaju dodatne produkte oksidacije lipida što im još više pojačava aterogeno djelovanje (48). U ranom stupnju ateroskleroze, LDL čestice potiču: izlučivanje kemotaktičkih tvari koje privlače monocite iz krvi i njihovu pretvorbu u makrofage, aktivaciju limfocita u subendotelnom prostoru te migraciju glatkih mišićnih stanica iz mišićnog sloja stijenke u intimu krvne žile. Ukoliko se uzročni čimbenik oštećenja i nastali upalni proces ne uklone, oštećenje tkiva se nastavlja i pojačava uz razvoj kronične upale. Oksidirani LDL i arterijska hipertenzija ometaju sintezu vazodilatatora dušičnog oksida, a stimuliraju proizvodnju vazokonstriktora poput endotelina. Tako nastaje paradoksalna vazokonstrikcija i spazam arterije sužene ateromom (47). Opisani mehanizmi dovode do razvoja ranog stupnja ateroskleroze (tzv. masna pruga) u kojem dominiraju lipidima prepunjeni makrofazi i koji je u početku reverzibilan (51). Ukoliko se upalni proces nastavlja, slijed zbivanja dovodi do stvaranja fibroateroma, povećavanja aterosklerotičnih promjena i posljedično do suženja lumena krvne žile.

Zbog suženja lumena krvne žile tkivo koje zahvaćena žila opskrbljuje postaje ishemično, te može doći i do razvoja infarkta. Aterosklerotični plakovi mogu i kalcificirati čime stijenka krvne žile izrazito gubi elastičnost, sklona je rupturi i postaje izvorom embolusa (8, 21, 51).

### 1.3 ESTERAZE

Esteraze se s obzirom na njihovu interakciju s organofosfornim spojevima dijele na A-esteraze i B-esteraze. A-esteraze hidroliziraju organofosforne spojeve, dok B-esteraze organofosforni spojevi inhibiraju. U A-esteraze se ubrajaju arildialkilfosfataza (paraoksonaza, PON) i diizopropilfluorofosfataza. U skupinu B-esteraza pripadaju karboksil esteraze i karboksil ester hidrolaze (acetilkolinesteraza i pseudokolinesteraza ili butirilkolinesteraza, BuChE) (52).

Fiziološka funkcija PON i BuChE nije u potpunosti razjašnjena tako da je i danas predmet brojnih istraživanja u ljudi i pokusnih životinja.

#### 1.3.1 Paraoksonaza 1

Paraoksonaza 1 (arildialkilfosfataza, EC 3.1.8.1, PON1) je enzim čija aktivnost i stabilnost ovise o kalciju. Ime enzima potječe od njegove sposobnosti da metabolizira paraokson, aktivni metabolit insekticida parationa. Ima osobine esteraze i laktonaze, te osim paraoksiona metabolizira i druge triestere fosforne kiseline kao što su diazinon, bojne otrove (sarin, soman), zatim aromatske estere (fenil-acetat i naftil-acetat) te tvari laktanske strukture kao što su primjerice neki lijekovi (simvastatin i lovastatin). PON1 dakle sudjeluje u neutralizaciji okolišnih čimbenika koji blokiraju acetilkolinesterazu kao i u metabolizmu lijekova, što pokazuje da PON1 ima značajno mjesto u farmakologiji i toksikologiji. Kako je njena katalitička aktivnost promijenjena u bolestima različitih organskih sustava, posebice kardiovaskularnog, današnja istraživanja idu u smjeru određivanja njezinog preventivnog i dijagnostičkog značenja (53, 54, 55, 56).

PON1 je dokazana u različitim organima, kao što su pluća, bubreg i mozak, ali se najvećim dijelom sintetizira u jetri nakon čega se izlučuje u krv. U cirkulaciji se enzim veže uglavnom za HDL lipoproteinske čestice koje su primarni serumski nosači za PON1. HDL čestice potiču sekreciju i aktivnost te omogućavaju stabilnost PON1, pri čemu važnu ulogu imaju i lipidna i proteinska sastavnica ovih lipoproteina (57, 58). Osim vezanja s HDL lipoproteinima, PON1 je u manjem, ali značajnom dijelu identificirana u sastavu hilomikrona (59) i VLDL čestica ljudskog seruma (60). Deakin i sur. su također ustanovili da VLDL lipoproteini *in vitro* potiču sekreciju PON1 iz hepatocita i osiguravaju njezinu stabilnost, ali manje učinkovito nego HDL (60).

Brojni čimbenici mogu utjecati na aktivnost PON1. Do sada je istraživana utjecaj genetskih polimorfizama, spola, dobi, prehrane, lijekova, različitih životnih navika (pušenje, alkohol), patoloških stanja i drugih čimbenika na katalitičku aktivnost PON1 (53, 61, 62).

Genetski polimorfizam PON1 je odgovoran za postojanje izoenzima PON1 koji mogu imati različitu katalitičku aktivnost. U ljudi je dokazana velika varijabilnost u katalitičkoj aktivnosti plazmatske PON1 što bi se moglo pripisati upravo polimorfizmu PON1 (61, 63, 64).

Dob je važan čimbenik koji utječe na aktivnost PON1. U ljudi je aktivnost prije rođenja vrlo niska, a nakon rođenja se postupno povećava te između 6 i 15 mjeseci dostiže plato na kojem ostaje dugi niz godina. U starijih osoba se aktivnost PON1 smanjuje (62). U štakora se, slično kao u ljudi, katalitička aktivnost PON1 postupno povećava nakon okota te dostiže plato u dobi od tri tjedna, nakon čega ostaje konstantna (65).

Spol je još jedan čimbenik koji utječe na katalitičku aktivnost PON1. Tako je aktivnost PON1 veća u ženki štakora u odnosu na mužjake. Slično je i u ljudi gdje je uočena veća aktivnost PON1 u žena nego u muškaraca (61, 66).

Različiti sastojci prehrane mogu također modulirati aktivnost PON1, bilo da je smanjuju ili povećavaju (53, 61). Tako je aktivnost PON1 u serumu miševa soja B6 hranjenih tri mjeseca aterogenom prehranom bila smanjena za 60% te praćena sličnim smanjenjem PON1 glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) u jetri (67) u odnosu na kontrolu. Kudchodkar i sur. su dokazali da je serumska aktivnost PON1 bila statistički značajno povećana u štakora hranjenih trioleinom, smanjena u štakora hranjenih ribljim uljem, a nepromijenjena u onih hranjenih tripalmitinom u usporedbi sa kontrolom (68). Suprotno tome, veliki unos povrća u ljudi uzrokuje značajno smanjenje aktivnosti PON1 (69).

Većina provedenih studija ukazuje da umjerena konzumacija etanola povećava, dok njegov prekomjeran unos smanjuje aktivnost PON1 (70, 71). Pušenje inhibira katalitičku aktivnost PON1 (61).

Različiti lijekovi mogu utjecati na aktivnost PON1 u ljudi i životinja. Najčešće je ispitivan utjecaj antilipidnih lijekova na PON1, a rezultati do sada provedenih *in vitro* i *in vivo* istraživanja su uglavnom kontradiktorni. U pokusu provedenom *in vitro* u kulturi stanica je dokazano da fenofibrat povećava, dok simvastatin, pravastatin i fluvastatin smanjuju katalitičku aktivnost PON1 (72). Sličan utjecaj statina na aktivnost PON1 u plazmi štakora dokazan je u pokusima Beltowskog i sur. (73). Obje doze fluvastatina (2 i 20 mg/kg/dan) primijenjene štakorima tijekom 3 tjedna su smanjile aktivnost PON1 u srcu, bubregu i jetri, dok je samo veća doza smanjila PON1 aktivnost u plazmi (73). U istom istraživanju je pravastatin u dozama od 4 i 40 mg/kg/dan/tri tjedna primjene smanjio aktivnost PON1 u jetri, srcu i bubregu štakora, ali nije utjecao na katalitičku aktivnost enzima u plazmi. Učinci fluvastatina i pravastatina na katalitičku aktivnost enzima u ovim pokusima nisu bili statistički značajni (73). Ista grupa autora je u pokusima sa cerivastatinom (doze od 0,03 i 0,3 mg/kg/dan tijekom 3 tjedna) dokazala da obje doze ovog statina smanjuju katalitičku aktivnost PON1 u plazmi štakora, ali kao i u prethodnom pokusu ne statistički značajno (2). Primjena simvastatina u bolesnika s porodičnom hiperkolesterolemijom u dozi od 20 mg dnevno tijekom 4 mjeseca je dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije LDL čestica i oksidiranih lipida te do statistički značajnog

povećanja aktivnosti PON1 u plazmi (55). Ispitivanja koja su proveli Balogh i sur. (2001) su pokazala da je gemfibrozil u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 u dnevnoj dozi od 1200 mg tijekom tri mjeseca primjene doveo do statistički značajnog smanjenja koncentracije triacilglicerola te do statistički značajnog povećanja koncentracije HDL čestica i aktivnosti PON1 u serumu (74).

Katalitička aktivnost PON1 u životinja i ljudi može biti smanjena u različitim patološkim stanjima. Tako je aktivnost PON1 je smanjena u serumu štakora sa šećernom bolesti izazvanom primjenom streptozotocina (75). U ljudi je uočeno smanjenje katalitičke aktivnosti PON1 u serumu osoba sa šećernom bolesti (56), u serumu bolesnika sa kroničnim zatajenjem bubrega (76), bolesnika sa hiperlipoproteinemijom (77), bolesnika sa Alzheimerovom bolesti (54), bolesnika sa kroničnim bolestima jetre (cirozom i kroničnim hepatitisom) (78), sa bolestima štitnjače (79) i drugo (61).

#### 1.3.1.1 Paraoksonaza 1 i ateroskleroza

Posljednjih je godina PON1 bila predmetom brojnih istraživanja zbog naznaka da bi u životinja i ljudi mogla sudjelovati u sprečavanju nastanka ateroskleroze (53, 67, 80, 81, 82). Povoljni učinci PON1 u usporavanju razvoja ateroskleroze moraju se promatrati kao zajednički rezultat interakcije PON1 s endotelnim stanicama, makrofazima i lipoproteinskim česticama.

Pretpostavlja se da bi PON1 mogla utjecati na proces nastanka ateroskleroze svojim izravnim antioksidacijskim i vjerojatno neizravnim protuupalnim djelovanjem.

Na protuupalno djelovanje PON1 su ukazali Watson i sur. na temelju rezultata *in vitro* pokusa u kojem je PON1 značajno smanjila sposobnost oksidiranih LDL čestica da potaknu vezanje monocita za endotelne stanice i njihovu migraciju kroz endotelne stanice u usporedbi s kontrolom (83). Pretpostavili su da je protuupalno djelovanje PON1 zapravo posljedica njene sposobnosti da metabolizira oksidirane lipide u sastavu LDL (83). Opisani rezultati Watsona i sur. su sukladni s rezultatima Macknessa i sur. (1991) koji su dokazali da PON1 *in vitro* sprečava oksidaciju lipida u LDL česticama izazvanu s  $\text{Cu}^{2+}$  kao i stvaranje reaktivnih spojeva s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) (84). Desetak godina kasnije (2004) su Mackness i sur. u svojem drugom pokusu pokazali da PON1 smanjuje oksidiranim LDL česticama potaknuto stvaranje posrednika upale kemotaktičnog proteina monocita-1 (engl. *monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1) u kulturi ljudskih endotelnih stanica. Na temelju tih rezultata Mackness i sur. su zaključili da PON1 ne djeluje na upalu direktno, nego da je protuupalni učinak zapravo posljedica metaboliziranja oksidiranih lipida u LDL česticama putem samog enzima (85).

Rozenberg i sur. su dokazali da se nakon prijenosa humane PON1 u kulturu peritonealnih makrofaga miševa s genetskim nedostatkom PON1 smanjuje aktivnost makrofaga, a time i njihovo oksidacijsko djelovanje na nekoliko načina: smanjenjem koncentracije peroksida za 47%, smanjenjem sposobnosti izlučivanja superoksidnog aniona za 69%, te statistički značajnim povećanjem koncentracije glutaciona (81). Osim hidrolize oksidiranih lipida u sastavu LDL čestica (84), Aviram i sur. su dokazali da PON1, ovisno o koncentraciji, *in vitro* inhibira i oksidaciju HDL lipoproteina te da

uzrokuje hidrolizu oksidiranih lipida i  $H_2O_2$  (86). U istom istraživanju je dokazano da dodatak PON1 oksidiranim HDL česticama povećava izlazak kolesterola iz makrofaga za 40% u usporedbi s učinkom oksidiranih HDL čestica bez PON1. Međutim sama PON1 bez HDL čestica je bila bez ikakvog učinka na makrofage. Rezultati ovih pokusa ukazuju na sposobnost PON1 da metabolizira oksidirane lipide i  $H_2O_2$ , te na nužnost postojanja kompleksa PON1 i HDL čestica u poticanju izlaska kolesterola iz makrofaga (86). Na osnovi svojih i drugih istraživanja, Aviram i sur. su šest godina kasnije zaključili da PON1 štiti makrofage od oksidacijskog stresa i sprečava njihovu pretvorbu u takozvane «pjenušave stanice» (87), tako da: 1. hidrolizira oksidirane lipide u lipoproteinima plazme i makrofazima, 2. smanjuje ulazak oksidiranih LDL čestica u makrofage i 3. u makrofazima smanjuje sintezu kolesterola (87). U prilog ovim rezultatima ide i *in vitro* provedeni pokus Efrata i sur. koji ukazuje na specifično vezanje PON1 za membranu makrofaga (88).

Već je ranije spomenuto da je nužan kontakt između PON1 čestica i HDL-a. Međutim, prisutnost PON1 je ustanovljena i u drugim lipoproteinskim česticama. Deakin i sur. su utvrdili da je PON1 u serumu humanog podrijetla u manjoj, ali značajnoj količini vezana za VLDL čestice, te da VLDL lipoproteini u kulturi stanica mogu potaknuti i izlučivanje PON1 iz stanica (60). U istom su istraživanju autori uočili da PON1 u sastavu VLDL sprečava oksidaciju lipida u ovim lipoproteinskim česticama (60). PON1 se u manjoj količini nalazi i u hilomikronima, a postprandijalni hilomikroni *in vitro* mogu spriječiti oksidaciju LDL čestica što bi se, prema mišljenju autora, barem djelomično moglo pripisati djelovanju PON1 (59).

S obzirom na rezultate do sada objavljenih opisanih istraživanja kao i na činjenicu da su u plazmi HDL čestice glavni prenositelji potencijalno toksičnih oksidiranih lipida koji nastaju u tim, ali i u drugim lipoproteinskim česticama (11), može se zaključiti da PON1 prema svim plazmatskim lipoproteinima ispoljava antioksidacijski učinak. Međutim mora se naglasiti da jedino u LDL česticama PON1 nije fizički identificirana. Točan mehanizam djelovanja PON1 na oksidaciju lipida u LDL česticama *in vivo* do sada nije objašnjen. Za sada se pretpostavlja da se oksidirani lipidi iz LDL prenose na HDL čestice kao glavno spremište toksičnih tvari, gdje se metaboliziraju pomoću PON1 i drugih sastavnica HDL čestica koje imaju antioksidacijsko djelovanje, poput apoA-I i paraoksonaze 3 (PON3) (67). Rezultati *in vitro* pokusa Avirama i sur. su pokazali da postoji određena interakcija između PON1 i LDL čestica. Dokazali su da se aktivnost PON1 tijekom njezinog antioksidacijskog djelovanja na LDL česticama, a to je sprečavanje njihove oksidacijske modifikacije, istovremeno smanjuje (89), te da je pad enzimske aktivnosti veći od njenog antioksidacijskog učinka. Stoga su pretpostavili da je pad aktivnosti PON1 vjerojatno posljedica interakcije enzima s nekim od produkata oksidacije lipida u LDL česticama (89).

Na važnost PON1 u prevenciji ateroskleroze su ukazali i rezultati istraživanja provedenog u miševa s genetskim nedostatkom PON1. Primjena aterogene prehrane u ovih životinja izazvala je značajno jače aterosklerotske promjene nego u miševa u kojih je aktivnost PON1 bila uredna (82).

Mackness i sur. su uočili da primjena ljudske PON1 u miševa s metaboličkim sindromom značajno umanjuje nastanak ateroskleroze (80).

Današnja saznanja ukazuju na važnost homocisteina kao čimbenika rizika u razvoju ateroskleroze (90). PON1 u plazmi ljudi sprečava štetno djelovanje povećane koncentracije homocisteina (90).

U ljudi je uočeno da je aktivnost PON1 u krvi obrnuto proporcionalna s rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti. Niske katalitičke aktivnosti PON1 su izmjerene u bolesnika s aterosklerozom, hiperlipoproteinemijama i šećernom bolesti (87). Aktivnost PON1 te koncentracije HDL, apo A-I i apo A-II bile su statistički značajno smanjene u serumu bolesnika sa hiperlipoproteinemijom (77) te u bolesnika nakon infarkta miokarda (91). Ayub i sur. su pretpostavili da bi smanjena serumska aktivnost PON1 mogla prethoditi razvoju samog infarkta (91). Rezultati jedne prospektivne epidemiološke studije provedene u muškaraca su pokazali da je smanjena katalitička aktivnost PON1 neovisni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (92).

U obitelji paraoksonaza se osim PON1 ubrajaju i paraoksonaza 2 (PON2) i PON3 koje se danas sve intenzivnije istražuju. PON2 se nalazi u stanicama različitih tkiva, a pretpostavlja se da djeluje kao stanični antioksidans. Na takvu pretpostavku ukazuju rezultati *in vitro* pokusa Ng-a i sur. (93), koji su pokazali da se nakon inkubacije kulture stanica s prekomjernim izražajem PON2 i oksidiranih LDL čestica količina oksidiranih lipida u istima smanjuje, kao što se smanjuje i sklonost LDL-a prema kemotaksiji monocita (93). PON3 se, slično kao i PON1, sintetizira uglavnom u jetri nakon čega se izlučuje u krv gdje poput PON1 kruži u kompleksu s HDL česticama. PON3 također djeluje antioksidacijski, a prema rezultatima pokusa na uzorcima seruma kunića, antioksidacijski učinak PON3 usmjeren prema LDL česticama je bio djelotvorniji od istog učinka PON1 (94).

### 1.3.2 Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (BuChE, EC 3.1.1.8, acilkolin acilhidrolaza, pseudokolinesteraza, nespecifična esteraza) je enzim koji se ubraja u skupinu kolinesteraza. U ovu skupinu enzima se osim BuChE ubraja i prava ili specifična kolinesteraza (acetilkolinesteraza, eritrocitna kolinesteraza, acetilkolinhidrolaza, EC 3.1.1.7., AChE). BuChE i AChE se razlikuju s obzirom na svoje fizikalno-kemijske značajke, lokalizaciju i funkciju. BuChE se sintetizira u jetri nakon čega se izlučuje u krv. Osim u plazmi i jetri, aktivnost BuChE je u manjoj mjeri dokazana u masnom tkivu, tankom crijevu, plućima, srcu, mozgu i drugim tkivima (95).

Do sada su u organizmu sisavaca utvrđene farmakološka i toksikološka, ali ne i fiziološka uloga BuChE. Tako BuChE hidrolizira farmakološke pripravke koji u svojoj strukturi sadrže estere, uključujući niz estera kolina, među kojima su prirodni (acetilkolin) i sintetski (butirilkolin, butiriltiokolin, propioniltiokolin te klinički važan sukcinilkolin). Za razliku od AChE koja najbrže hidrolizira acetilkolin, BuChE mnogo brže hidrolizira butirilkolin. BuChE sudjeluje i u metabolizmu kokaina, heroina, te brojnih lijekova poput acetilsalicilne kiseline (96).

Od estera kolina, od kliničkog je značenja hidroliza sukcinilkolina, dikolinskog estera sukcinilne kiseline koji djeluje kao nekompetitivni blokator živčano-mišićne spojnice, a u klinici se koristi za izazivanje relaksacije poprečno prugastih mišića. Osobe kod kojih je aktivnost BuChE smanjena ili u potpunosti nedostaje nemaju nikakav uočljiv fiziološki poremećaj. Međutim, u slučaju primjene sukcinilkolina, smanjena katalitička aktivnost BuChE će dovesti do produljene mišićne relaksacije koja može trajati satima i životno ugroziti bolesnika (97). Stoga je u kliničkoj praksi vrlo važno znati da li je smanjena katalitička aktivnost promijenjena u kvalitativnom ili kvantitativnom smislu. Već je odavno poznato da je sinteza BuChE (odnosno njezina katalitička aktivnost) pod utjecajem određenih parova gena. Ukoliko se dokaže da je neka osoba genotipski homozigot za atipični enzim (koji hidrolizira sukcinilkolin vrlo sporo), ili posjeduje pritajeni, takozvani «silent» gen koji uopće ne potiče sintezu BuChE, onda govorimo o kvalitativno promijenjenoj katalitičkoj aktivnosti enzima. Neka osoba može imati normalni genotip za BuChE, ali je katalitička aktivnost kvantitativno promijenjena. U kvantitativnom smislu na aktivnost BuChE mogu utjecati dob, spol, prehrana, patološka stanja ili lijekovi i još mnogi drugi čimbenici (98).

S obzirom na dob, katalitička aktivnost BuChE se povećava nakon rođenja tijekom prvih nekoliko godina te dostiže plato na kojem ostaje održana do oko 50. godine života, nakon čega se smanjuje. U odraslih osoba je neznajčajno veća u muškaraca u odnosu na žene (99, 100).

Na aktivnost BuChE osim toga mogu djelovati i drugi čimbenici, poput prehrane, kao i neka patološka stanja. Tako je u pretilih miševa i u miševa sa šećernom bolesti aktivnost BuChE u serumu i jetri povećana, što se može pripisati visoko kaloričnoj prehrani životinja (101). Aktivnost BuChE se povećala i u serumu i srcu štakora sa šećernom bolesti uzrokovanom primjenom aloksana (102).

Promjene BuChE su uočene u bolesnika s različitim neoplazmama. Tako se primjerice u bolesnika sa karcinomom pluća te u bolesnika s novotvorinama stanica hematopoetskog sustava ustanovilo umnažanje gena koji kodiraju sintezu BuChE (103, 104), a White i sur. su izmjerili smanjenu aktivnost BuChE u bolesnika sa različitim malignim neoplazmama, poput malignih tumora želuca, debelog crijeva, prostate i drugih (96, 105).

Unazad desetak godina se proučava uloga BuChE u patogenezi Alzheimerove bolesti (106, 107). U mozgu bolesnika s Alzheimerovom bolesti dolazi do gubitka kolinergičkih neurona te smanjenja koncentracije acetilkolina i aktivnosti AChE, dok je aktivnost BuChE povećana (106).

Različiti lijekovi, u prvom redu iz skupine antilipidnih lijekova, mogu modulirati katalitičku aktivnost BuChE, s često kontradiktornim rezultatima. Darvesh i sur. su na temelju rezultata svoje *in vitro* studije objavili da lovastatin i simvastatin statistički značajno smanjuju aktivnost BuChE, dok su mevastatin i pravastatin bili bez utjecaja na aktivnost enzima (106). Kunec-Vajić i sur. su uočili da primjena fenofibrata statistički značajno, a primjena nikotinske kiseline blago povećava aktivnost BuChE u plazmi i jetri štakora (108). U studiji provedenoj u bolesnika sa šećernom bolesti i hipertriacilglicerolemijom je primjena benzafibrata dovela do statistički značajnog smanjenja aktivnosti BuChE i koncentracije triacilglicerola u plazmi, dok je primjenom pravastatina došlo do



smanjenja aktivnosti BuChE, triacilglicerola i LDL koje nije bilo statistički značajno (109). Osim ispitivanja utjecaja antilipidnih lijekova, istraživani su i učinak nekih drugih lijekova na katalitičku aktivnost BuChE. Tako su, primjerice, glukokortikoidi izazvali statistički značajan pad aktivnosti BuChE u plazmi i jetri štakora (110).

#### 1.3.2.1 Butirilkinolinesteraza i ateroskleroza

Smatra se da BuChE sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u regulaciji koncentracije kolina u plazmi (111). U studijama Lawrencea i Melnicka povezanost BuChE i LDL čestica je dokazana histokemijski i imunoelektroforetski, uz pretpostavku da LDL može stvoriti fizičku, relativno nestabilnu vezu s BuChE i na taj način inhibirati katalitičku aktivnost enzima (112). Kutty i sur. su poduprli pretpostavku povezanosti LDL i BuChE na temelju dokaza vezanja fosforilkolina, polarne grupe lecitina i osnovne sastavnice lipoproteina, za estersko i anionsko mjesto BuChE, čime se katalitička aktivnost BuChE blokira (113). Na temelju nalaza smanjenog stvaranja LDL te povećanog stvaranja HDL čestica u zamoraca tretiranih neostigminom, inhibitorom kolinesteraze, Kutty i sur. su iznijeli smjelu hipotezu prema kojoj LDL nastaje iz VLDL u prisutnosti BuChE. Isto tako su pretpostavili da ukoliko je aktivnost BuChE inhibirana, VLDL prelazi u HDL (114). U kunića tretiranih organofosforinim insekticidom diklorvosom u serumu se smanjila aktivnost BuChE u korelaciji sa smanjenjem koncentracije ukupnog kolesterola i LDL lipoproteina, dok se koncentracija HDL čestica povećala (115). Inhibicijom aktivnosti BuChE u štakora, svinja i ljudi se smanjila koncentracija triacilglicerola u plazmi (116). U jednog su bolesnika nakon slučajne ingestije parationa izmjerene izrazito smanjene aktivnost BuChE i koncentracija LDL te povećana koncentracija HDL čestica. Tijekom oporavka je uočen paralelni porast katalitičke aktivnosti BuChE i koncentracije LDL čestica, dok je koncentracija HDL u krvi pala (114).

Posljednjih godina se ponovno intenzivnije istražuje uloga BuChE u metabolizmu lipida i lipoproteina kao i njena povezanost s metaboličkim sindromom. Tako je u bolesnika sa šećernom bolesti tipa dva i/ili aterijskom hipertenzijom uočena pozitivna korelacija između aktivnosti BuChE te koncentracije triacilglicerola i ukupnog kolesterola, a negativna između aktivnosti BuChE i koncentracije HDL u plazmi (117). Stojanov i sur. su u zdravih muškaraca i žena uočili pozitivnu korelaciju između katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi i tjelesne mase, kao i koncentracije triacilglicerola, ukupnog i LDL-kolesterola, dok je korelacija između aktivnosti BuChE i koncentracije HDL bila negativna (118). Rustemeijer i sur. su zaključili da se u bolesnika sa šećernom bolesti tipa dva i hipertriacilglicerolemijom aktivnost BuChE može smatrati biljekom sinteze triacilglicerola (109). Na temelju ovih zapažanja većina se autora uglavnom slaže da se aktivnost BuChE može koristiti kao biljeg metaboličkog sindroma, iako se za sada ne može zaključiti da li je povećana aktivnost BuChE posljedica metaboličkog sindroma ili prethodi njegovom nastanku (119).

Suprotno tome, Sridhar i sur. su u bolesnika sa šećernom bolesti uočili negativnu korelaciju između aktivnosti BuChE te koncentracije ukupnog i LDL- kolesterola u serumu. U njihovoj studiji

aktivnost BuChE nije značajno korelirala sa bilo kojim drugim biokemijskim parametrom (120). U pokusu provedenom u kulturi stanica inhibicija aktivnosti BuChE nije djelovala na sintezu triacilglicerola (121).

#### 1.4 LEPTIN

Leptin (grčki leptos=mršav) je protein odnosno hormon s učincima na energetske homeostazu, endokrine i reproduktivne funkcije, te imunološki sustav kojeg izlučuju stanice bijelog masnog tkiva. U početku se smatralo da se leptin sintetizira samo u bijelom masnom tkivu. Noviji podaci međutim ukazuju da se leptin sintetizira i u smeđem masnom tkivu, želucu, placenti, folikulima jajnika, nekim organima fetusa kao što su srce i kost (121, 123). Usprkos dokaza o sintezi leptina u različitim tkivima, masno tkivo ostaje i dalje glavno mjesto njegove sinteze. Postoji direktna korelacija između koncentracije leptina u plazmi i količine masnog tkiva u organizmu. Sekretiju leptina iz adipocita povećavaju prekomjerni unos hrane, prehrana sa visokim udjelom masti, glukokortikoidi, inzulin, testosteron, hormoni štitnjače te izlaganje hladnoći, a smanjuju manji unos hrane i povećana aktivnost simpatičkog živčanog sustava. Učinak katekolamina na sintezu leptina primarno je posredovan  $\beta$ 3-receptorima, koji su dominantni u masnom tkivu štakora. Agonisti  $\beta$ 3-receptora izrazito potiskuju ekspresiju gena za leptin i smanjuju koncentraciju cirkulirajućeg leptina (124, 125).

Od kliničkog je značenja činjenica da koncentracije leptina u serumu pokazuju umjeren cirkadijalni ritam, te da se vršna koncentracija leptina u krvi postiže u noći. U to vrijeme izmjerene koncentracije leptina u plazmi su približno 30 do 100% veće od onih mjerenih u jutro ili rano popodne. Cirkadijalni ritam zajedno s utjecajem hrane treba uzeti u obzir pri uzimanju uzoraka krvi za određivanje koncentracije leptina (125).

Jedan ili više izoformnih oblika receptora za leptin su nađeni u većini tkiva, uključivo i bijelo masno tkivo. U masnom tkivu leptin ima autokrino ili parakrino djelovanje. Pod utjecajem leptina se u adipocitima smanjuje sinteza masnih kiselina i triacilglicerola, a povećava se oksidacija lipida (126). Osim lokalnog djelovanja na adipocite, leptin se izlučuje u krv te cirkulira dijelom u slobodnom obliku, a dijelom vezan za proteine plazme, i to najvećim dijelom za HDL čestice. Krvlju se leptin prenosi do svojih receptora na stanicama drugih tkiva te tako djeluje na neurone u hipotalamusu, limfocite T, monocite, enterocite, stanice gušterače, endotelne i druge stanice (126, 127, 128). Posljedično leptin modulira niz procesa, kao što su: unos hrane, metabolizam glukoze i inzulina, upala, krvni tlak, imunološke reakcije, reproduktivna funkcija, aktivnost simpatičkog živčanog sustava, hematopoeza, stvaranje novih krvnih žila i drugi. Npr. leptin inhibira izlučivanje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače te stimulira agregaciju trombocita (126).

Do sada objavljeni rezultati istraživanja ukazuju da leptin ima brojne učinke na kardiovaskularni sustav. Neki od ovih učinaka su antiaterogeni, a neki proaterogeni. Antiaterogeni učinci su npr. leptinom potaknut gubitak tjelesne mase (leptin djelovanjem na hipotalamus suprimira unos hrane, a potiče potrošnju energije), ili leptinom potaknuto stvaranje novih krvnih žila i njihovo

širenje povećanim stvaranjem dušikovog oksida. Leptin povećava izlučivanje natrija putem bubrega i potiče metabolizam estera kolesterola u makrofazima (124, 129, 130). Proaterogeni učinci leptina, naročito ako se radi o stanju hiperleptinemije, mogu biti posredovani povećanjem krvnog tlaka putem aktivacije simpatičkog živčanog sustava i poticanjem proizvodnje endotelina-1 u endotelnim stanicama te stimulacijom umnažanja i migracije glatkih mišićnih stanica u stijenci krvnih žila (131). Pitanja koja se odnose na poticanje upalne reakcije i oksidacijskog stresa leptinom su kontroverzna (124, 132, 133, 134). S obzirom da se receptori za leptin nalaze na različitim stanicama (126, 128), pretpostavlja se da može potaknuti pokretanje gotovo svakog koraka u nastanku ateroskleroze, te da vjerojatno djeluje sinergistički s ostalim čimbenicima rizika bitnim za razvoj ateroskleroze. Pretpostavlja se da u pretilih osoba povećana koncentracija leptina u plazmi barem dijelom pridonosi poticanju upale i oksidacijskog stresa (135). Klinička ispitivanja su pokazala da povećana koncentracija leptina u plazmi pozitivno korelira s rizikom razvoja srčanog i moždanog infarkta te debljinom intime i medije zajedničke karotidne arterije (136, 137), zbog čega koncentraciju leptina u plazmi smatraju i neovisnim prognostičkim čimbenikom kardiovaskularnog pobola i smrtnosti (136, 137).

Proaterogeno djelovanje leptina pokušava se objasniti konceptom rezistencije receptora za leptin i mutacija gena za leptin (138). Isto je tako moguće da razvoj rezistencije na djelovanje leptina dovodi do gubitka energetske homeostaze u organizmu s jedne strane i održavanja nepovoljnih učinaka leptina, poput stimulacije simpatičkog živčanog sustava s druge strane (128).

Učinci leptina na lipide su velikim dijelom kontroverzni. Smatra se da leptin povećava oksidaciju masnih kiselina u jetri i smanjuje količinu triacilglicerola u hepatocitima. Posljedica ovih procesa su poticanje nastanka oksidacijskog stresa, te smanjeno izlučivanje triacilglicerola i VLDL-a iz jetre. Pod utjecajem leptina slične metaboličke promjene događaju se i u adipocitima, tj. smanjuje se sinteza triacilglicerola i povećava oksidacija lipida u adipocitima (126). S obzirom da su u plazmi čovjeka glavni prijenosnici triacilglicerola VLDL, a u štakora HDL čestice, leptin bi svojim djelovanjem na lipide, prvenstveno u jetri i masnom tkivu, mogao utjecati na sastav i koncentraciju lipida plazme (2, 139). Isto tako leptin potiče metabolizam estera kolesterola u makrofazima (130).

Vrlo je malo podataka o utjecaju leptina na PON1. Do sada objavljeni rezultati pokazuju kako povećana koncentracija leptina u plazmi uzrokuje pad aktivnosti PON1 (140). Isto tako je malo podataka o istraživanju odnosa između koncentracije leptina i aktivnosti BuChE.

Podaci o utjecaju antilipidnih lijekova na plazmatsku koncentraciju leptina u životinja pokazuju da su atorvastatin i gemfibrozil izazvali njegov pad, dok je klofibrat bio bez učinka na leptin (141, 142, 143).

Na temelju nalaza da atorvastatin (40 mg/dan tijekom 8 tjedana) u pretilih bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 uzrokuje pad koncentracije leptina u krvi, Von Eynatten i sur. su zaključili da smanjenje koncentracije leptina u stanju hiperleptinemije predstavlja dodatni povoljni pleiotropni učinak atorvastatina (145). Suprotni rezultati su dobiveni u ispitivanjima Andoa i sur. (146). Dokazano

je da niti atorvastatin niti pravastatin u dozama od 10 mg/dan tijekom 16 tjedana primjene nisu doveli do promjene koncentracije leptina u serumu bolesnika sa hiperkolesterolemijom, iako su pridonijeli normalizaciji poremećenog lipidnog profila. Pretpostavili su da atorvastatin i pravastatin nisu utjecali na koncentraciju leptina zbog dviju činjenica. Prva je da su u studiji sudjelovale uglavnom osobe normalne tjelesne težine, a druga da je korištena dnevna doza primjenjenih antilipidnih lijekova bila mala (146). U studiji koju su proveli Gannagé-Yared i sur. je pokazano da primjena pravastatina (40 mg dnevno tijekom 12 tjedana) osobama s normalnom koncentracijom kolesterola u krvi nije imala nikakav učinak na koncentraciju leptina u serumu (147). U pretilih osoba sa šećernom bolesti tipa 2 i hipertriacilglicerolemijom koje su imale povećanu koncentraciju leptina u krvi, primjena 250 mg fenofibrata dnevno tijekom 3 mjeseca je dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije leptina u serumu (148). S druge strane, nakon primjene fenofibrata osobama s metaboličkim sindromom u dozi od 200 mg dnevno tijekom 12 tjedana koncentracije leptina u plazmi su ostale nepromijenjene (149).

Većina istraživanja provedenih u životinja i ljudi pokazuju da antilipidni lijekovi smanjuju koncentraciju leptina u krvi u stanjima hiperleptinemije, a bez utjecaja su u slučaju normalne koncentracije cirkulirajućeg leptina (140). Wanders i sur. smatraju da je za sada teško donijeti definitivne zaključke o prirodi utjecaja antilipidnih lijekova na leptin zbog malog broja istraživanja u kojima je ispitan odnos antilipidnih lijekova i leptina u čovjeka i životinja bez poremećaja u metabolizmu lipida (140).

## 1.5 ANTILIPIDNI LIJEKOVI

Antilipidni lijekovi se primjenjuju u liječenju bolesnika s hiperlipoproteinemijama u kojih prethodnim provođenjem nefarmakoloških mjera liječenja nije postignuta normolipidemija. Nekoliko je vrsta antilipidnih lijekova u upotrebi: statini, fibrati, ionski izmjenjivači, nikotinska kiselina i drugi. Danas se iz ove skupine lijekova najčešće koriste statini i fibrati. Statini su lijekovi koji se koriste u liječenju bolesnika s hiperlipoproteinemijama u kojima je dominantan poremećaj hiperkolesterolemija, a fibrati u onih sa hipertriacilglicerolemijom.

### 1.5.1 Statini

U ovom odlomku su prikazane zajedničke kemijske i farmakokinetičke karakteristike statina kao skupine, uz napomenu da su u eksperimentalnom dijelu ove disertacije korištena 3 statina (atorvastatin - ATOR, pravastatin – PRAV i simvastatin - SIMV).

Statini su najučinkovitiji lijekovi koji se danas koriste za liječenje hiperkolesterolemija. Svi oni su strukturni analozi 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A-reduktaze (HMG-CoA-reduktaze), na čemu se temelji i njihov reverzibilni inhibicijski učinak na HMG-CoA-reduktazu. Prvi prototip statina ispitan u ljudi, koji je pokazao potencijalno terapijsko djelovanje istovjetno za cijelu skupinu, je bio

kompaktin (kasnije preimenovan u mevastatin). Predstavlja metabolit plijesni *Penicillium citrinum*. Iako mevastatin nikada nije bio registriran, svi današnji statini nastali su kao strukturni derivati mevastatina. Prvi statin odobren za terapijsku uporabu u ljudi bio je lovastatin (nekada poznat pod nazivom mevinolin), a dobiven je fermentacijom iz gljivice *Aspergillus terreus*. Pravastatin i simvastatin su kemijski modificirani derivati lovastatina, dok su atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin i pitavastatin strukturno različiti sintetski spojevi. Lovastatin i simvastatin su predlijekovi s laktonskim prstenom, koji se u jetri metaboliziraju u aktivne oblike, tj.  $\beta$ -hidroksi kiseline. Aktivni oblik simvastatina je mevinolinska kiselina. Svi ostali ranije spomenuti statini primjenjuju se u aktivnoj formi (5, 150).

Apsorpcija statina kao skupine je nakon oralne primjene varijabilna (30-85%). Postoji vrlo snažan učinak prvog prolaza lijeka kroz jetru, tako da je sistemska dostupnost statina i njihovih metabolita varijabilna (između 5 i 30% u odnosu na primijenjenu dozu). Metaboliti svih statina, osim onih koji potječu od fluvastatina i pravastatina imaju blagi inhibicijski učinak na HMG-CoA-reduktazu. U plazmi je više od 95% statina i njihovih metabolita vezano na proteine plazme. Iznimka su pravastatin i njegovi metaboliti, koji se vežu samo 50% za proteine plazme. Vršne koncentracije statina u plazmi se postižu između 1-4 sata nakon oralne primjene. Poluvijek eliminacije ishodnih spojeva su između 1-4 sata, osim u slučaju atorvastatina i rosuvastatina, koji imaju poluvijek života oko 20 sati, te simvastatina s poluvijekom eliminacije od 12 sati. Svi statini se metaboliziraju u jetri, a više od 70% metabolita se izluči jetrom i eliminira fecesom. Na nivou mikrosomalnih enzima postoji značajna mogućnost interakcija s drugim lijekovima (5, 150).

U uobičajenim dozama, statini se obično dobro podnose i povezani su s malom učestalosti štetnih učinaka. Najčešći štetni učinci su probavne smetnje, glavobolja, smetnje vida, povećanje transaminaza u krvi, te miopatija (rabdomioliza).

Opravdani su razlozi velikom zanimanju za učinke statina koji se ne odnose samo na njihov terapijski učinak u liječenju određenog tipa hiperlipoproteinemije, nego i na njihove protuupalne, antitrombotičke i druge učinke. Stoga se danas učinci statina dijele na lipidne i ne-lipidne (5).

#### 1.5.1.1 Učinci statina na lipide

Osnovni učinci statina na lipide (engl. *lipid effects*) jesu izrazito smanjenje koncentracije ukupnog kolesterola i LDL, uz slabije izraženo smanjenje vrijednosti koncentracije triacilglicerola, te povećanje koncentracije HDL čestica u plazmi (21). Njihov je glavni mehanizam djelovanja sprečavanje endogene sinteze kolesterola inhibicijom HMG-CoA-reduktaze, te se nazivaju i inhibitorima HMG-CoA-reduktaze. HMG-CoA-reduktaza je enzim koji katalizira pretvorbu 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzima A (HMG-CoA) u mevalonat. Neiskorišteni HMG-CoA se metabolizira u acetil-koenzim A (acetil-CoA) iz kojega je nastao, te nastali acetil-CoA dalje sudjeluje u brojnim procesima biosinteze u tijelu. Kao reakcija na smanjenu količinu kolesterola dostupnog u stanicama, povećava se sinteza specifičnih LDL receptora u stanicama različitih tkiva putem kojih se

kolesterol u povećanoj mjeri uklanja iz plazme. Na taj način se u krvi smanjuju koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola.

Ova zbivanja događaju se u čovjeka, zamorca, ili kunića, dakle bioloških vrsta kod kojih je LDL glavni lipoprotein za prijenos kolesterola, ali ne i u štakora kod kojeg funkciju glavnog prenositelja kolesterola i triacilglicerola u plazmi imaju HDL čestice. Stoga se može postaviti pitanje da li je štakor dobar model za ispitivanje lipidnih učinaka statina.

Poznato je da inhibitori HMG-CoA-reduktaze u štakora na normalnoj prehrani ne uzrokuju smanjenje plazmatskog kolesterola, nego triacilglicerola, i to na način da inhibiraju sekreciju triacilglicerola iz jetre. Na temelju rezultata svojih pokusa, u kojima je ispitivan intenzitet antilipidnog djelovanja atorvastatina, Krause i Newton (151) smatraju da smanjenje koncentracije plazmatskih triacilglicerola nije posljedica nekog nespecifičnog učinka atorvastatina i da se ono ne može odvojiti od sinteze kolesterola. Koristeći svoje rezultate kao i rezultate prethodnih pokusa Khana i sur. (152), te Kama i sur. (153) u kojima je dokazano da se u štakora smanjenje koncentracije triacilglicerola izazvano lovastatinom može smanjiti ili ukinuti primjenom kolesterola, mevalonata ili drugih produkata enzimske reakcije u sintezi kolesterola, zaključili su da je učinak na triacilglicerole ovisan o stupnju inhibicije HMG-CoA-reduktaze. Stoga prevladava mišljenje da je u štakora prisutnost kolesterola nužna za sekreciju VLDL-a iz jetre te također da postoji ravnoteža između kolesteril estera i slobodnog kolesterola. Potonji je također važan za sekreciju VLDL-a. Prema tome normolipidemični štakori se mogu koristiti za određivanje učinkovitosti lijekova koji su inhibitori HMG-CoA-reduktaze, a podaci dobiveni u štakora koreliraju s učinkovitošću tih lijekova u zamoraca ili kunića, u kojih je LDL glavni lipoprotein za prijenos kolesterola. Treba spomenuti da statini i u čovjeka inhibiraju sekreciju triacilglicerola, odnosno VLDL čestica iz hepatocita, ali je taj učinak manje izražen nego u štakora.

Unazad pet godina definitivno je prihvaćeno da su učinci statina na lipide, barem djelomično, posredovani i aktivacijom specifičnih peroksisomnim proliferatorom aktiviranih receptora (engl. *peroxisome proliferator activated receptor*, PPAR) podtipova alfa (PPAR $\alpha$ ) i gama (PPAR $\gamma$ ) (154, 155).

PPAR su transkripcijski faktori aktivirani različitim ligandima, a ubrajaju se u superobitelj nuklearnih hormonskih receptora. U sisavaca su identificirana tri različita izotipa: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  i PPAR $\gamma$  koji se razlikuju s obzirom na tkivnu distribuciju i funkcije. Glavna je uloga PPAR receptora transkripcijska regulacija enzima i drugih proteina koji sudjeluju u održavanju energetske homeostaze u organizmu te regulaciji metabolizma lipida u jetri, srcu, bubrezima i mišićima. Osim toga PPAR receptori sudjeluju u odvijanju razvojnih procesa i cijeljenju tkiva (155). Aktiviraju se različitim endogenim i egzogenim ligandima. Endogeni ligandi koji aktiviraju PPAR receptore su npr. masne kiseline (osobito nezasićene masne kiseline) i eikozanoidi. Od različitih egzogenih liganada ovih receptora od najvećeg su interesa antilipidni lijekovi.

Niz studija dokazalo je pozitivan terapijski učinak statina na smanjenje morbiditeta i mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti (26, 27, 28, 29, 156).

#### 1.5.1.2 Ne-lipidni učinci statina

Ne-lipidni učinci statina (engl. *non-lipid effects*) ili pleiotropni učinci (grč. *pleio* = mnogo i *tropein* = utjecaj) se odnose na niz drugih povoljnih učinaka ove skupine lijekova koji se ne mogu pripisati normalizaciji poremećenog lipidnog profila u plazmi. Mehanizam nastanka korisnih ne-lipidnih učinaka statina nije u potpunosti poznat. Stoga se posljednjih godina intenzivno istražuju djelovanja statina na PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  receptore (154, 155), kao i njihov regulacijski učinak na superobitelj transformirajućeg čimbenika rasta – beta (engl. *transforming growth factor – beta*, TGF- $\beta$ ) koji je važan u tijeku različitih unutarstaničnih signalnih procesa (157).

Neki od ne-lipidnih učinaka statina su poboljšanje funkcije endotelnih stanica krvnih žila (158), povoljno djelovanje na metabolizam glukoze i smanjenje vjerojatnosti nastanka šećerne bolesti (159), povoljan utjecaj na sustav zgrušavanja krvi (160), protuupalno (161), antioksidacijsko djelovanje (162) i drugi. Mnogi od tih ne-lipidnih učinaka su međusobno isprepleteni te ih je teško u eksperimentalnim i kliničkim uvjetima razdvojiti. Stoga se opisuju zajedno.

Na temelju rezultata pokusa provedenih *in vitro* te istraživanja na životinjama i ljudima, smatra se da je sprečavanje oksidacije LDL lipoproteina dodatno pozitivno djelovanje nekih statina u usporavanju razvoja ateroskleroze. Aviram i sur. su ranih devedesetih dokazali da lovastatin ovisno o dozi *in vitro* smanjuje oksidaciju LDL i stvaranje TBARS (163). U štakora je primjena cerivastatina u dozama od 0,03 i 0,3 mg/kg/dan tijekom 3 tjedna dovela do smanjenja oksidacije lipida u plazmi, i to statistički značajno pri većoj dozi (2). Sezer i sur. su ispitali učinak ATOR (5 mg/kg/dan tijekom 8 tjedan) na oksidaciju lipida plazme kunića na aterogenoj prehrani (164). Prema rezultatima pokusa, ATOR je statistički značajno smanjio oksidaciju lipida u odnosu na životinje na aterogenoj prehrani bez ATOR (164). U bolesnika s hiperlipidemijom, ATOR je nakon 6 mjeseci primjene u dozi od 10 mg dnevno statistički značajno smanjio lipidnu oksidaciju u serumu i oštećenje DNK limfocita iz periferne krvi (165).

Točan mehanizam antioksidacijskog djelovanja statina nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja se da bi na molekularnom nivou mogao biti rezultat više pojedinačnih učinaka: 1. sprečavanja nastanka modificiranih (preniliranih) proteina koji sudjeluju u unutarstaničnim signalnim procesima, 2. vezanja za površinu fosfolipida u lipoproteinima čime se sprečava difuzija slobodnih radikala u središte lipoproteinskih čestica gdje su zaštićeni od djelovanja antioksidansa, 3. djelovanje metabolita koji djeluju antioksidacijski te 4. modulacije izražaja nukleinskih kiselina (166). Moguće je da mehanizam (mehanizmi?) antioksidacijskog učinka statina nije strogo odijeljen od mehanizma njihovog učinka na lipide. Smatra se da bi se putem smanjenja količine masnih kiselina i kolesterola u lipoproteinima plazme smanjila i količina supstrata za oksidacijsku modifikaciju (166).

Na temelju *in vitro* simvastatinom i cerivastatinom izazvane inhibicije ekspresije mRNA upalnog proteina makrofaga (engl. *macrophage inflammatory protein*, MIP) -1 $\alpha$ , Bruegel i sur. su dokazali protuupalno djelovanje statina (161). Protuupalno djelovanje su osim toga *in vivo* pokazali lovastatin i simvastatin čijom je primjenom u upalnom eksudatu u miševa smanjena aktivacija leukocita te proizvodnja interleukina-6 i MCP-1 (167).

Danas je dobro poznato da statini smanjuju agregaciju trombocita i njihovo odlaganje u tromb. Također, različiti statini imaju različite učinke na koncentraciju fibrinogena u krvi. Rezultati dvostruko slijepog placebom kontroliranog kliničkog pokusa poznatog pod nazivom JUPITER (*Justification for the use of statins in primary prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin*) su jasno pokazali da je rosuvastatin u dozi od 20 mg dnevno i primijenjen tijekom približno dvije godine smanjio za 43% venska tromboembolička događanja u odnosu na placebo (168). Prema tome može se zaključiti da statini djeluju i antikoagulacijski.

Ne-lipidni učinci statina ukazuju na moguću terapijsku korist upotrebe statina i u normolipidemičnih bolesnika, što potvrđuju i objavljeni rezultati kliničkih studija (156, 169, 170, 171), kao i rezultati upotrebe ovih lijekova u liječenju drugih bolesti poput multiple skleroze (172), Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (173, 174).

### 1.5.2 Fibrati

Godine 1962. Thorp i Waring su objavili kako u štakora etil klorofenoksibutarat smanjuje koncentraciju lipida u krvi. Pet godina kasnije njegov esterski oblik (klofibrat) odobren je u SAD-u kao lijek za liječenje hiperlipidemija. Globalno, ostao je do danas najpropisivaniji antilipidni lijek. Međutim njegova se uporaba dramatično smanjila, nakon što je WHO (engl. *World Health Organisation*, Svjetska zdravstvena organizacija) objavila podatke prema kojima klofibrat usprkos redukcije koncentracije kolesterola od 9%, nije smanjio učestalost fatalnih kardiovaskularnih događanja, ali je zato smanjio učestalost nefatalnih događanja (150). Klofibrat pripada skupini derivata fibrične kiseline, čiji su članovi još gemfibrozil, fenofibrat, ciprofibrat i bezafibrat (5).

Gemfibrozil (GEM) je halogenirana fenoksipentanoična kiselina i strukturno se razlikuje od ostalih članova skupine.

Apsorpcija gemfibrozila iz probavnog sustava je brza i kompletna. Lijek podliježe enterohepatičkoj cirkulaciji. U tkivima životinja, vršne koncentracije gemfibrozila postižu se 1 sat nakon jednokratne primjene, a najveće koncentracije su izmjerene u jetri i bubrezima. Oko 95% gemfibrozila je vezano na proteine plazme. Nije poznat točan metabolizam gemfibrozila, ali se zna da se metabolizira u jetri u 4 glavna metabolita, koji se zajedno s ishodnim lijekom izlučuju u konjugiranoj i nekonjugiranoj formi putem bubrega.

Učinci fibrata se kao kod statina mogu podijeliti na lipidne i ne-lipidne učinke (5).



### 1.5.2.1 Učinci fibrata na lipide

Fibrati su široko korišteni antilipidni lijekovi prvenstveno u dislipidemijama sa hipertriacilglicerolemijom kao dominantnim poremećajem. Smanjuju proizvodnju triacilglicerola u jetri, aktiviraju lipoproteinsku lipazu te smanjuju koncentracije ukupnog, VLDL i LDL kolesterola, a povećavaju koncentraciju HDL čestica u plazmi (175, 176, 177).

Usprkos intenzivnih istraživanja, nisu točno poznati mehanizmi pomoću kojih fibrati utječu na koncentraciju lipoproteinskih čestica. Nedavni pokusi sugeriraju da su mnogi od učinaka ovih spojeva na lipide u plazmi posljedica njihove interakcije s PPAR $\alpha$  receptorima. Fibrati se vežu na spomenute receptore, koji su izraženi primarno u jetri i smeđem masnom tkivu, a u manjoj količini u bubregu, srcu i skeletnoj muskulaturi. Fibrati smanjuju plazmatsku koncentraciju triacilglicerola kroz PPAR $\alpha$  receptorima posredovanu stimulaciju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (178, 179) i smanjenu sintezu apoC-III, te istim receptorima posredovano povećanje sinteze LPL. Povećana aktivnost LPL povećava klirens lipoproteina bogatih triacilglicerolima, isto kao što smanjena jetrena proizvodnja apoC-III povećava klirens VLDL. Fibratima povećana koncentracija HDL čestica rezultat je PPAR $\alpha$  receptorima potaknute sinteze apoA-I i apoA-II, koji povećavaju koncentraciju HDL lipoproteina (5).

Terapijska učinkovitost fibrata u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti dokazana je nizom kliničkih studija (176, 177, 180, 181).

### 1.5.2.2 Ne-lipidni učinci fibrata

Osim povoljnog djelovanja na lipide i lipoproteine, fibrati su posljednjih godina predmetom brojnih istraživanja zbog naznaka da imaju i dodatne, ne-lipidne učinke, koji ne ovise o njihovom djelovanju na lipide.

Tako se sve češće spominje utjecaj gemfibrozila i ostalih fibrata na oksidacijsko-redukcijsku ravnotežu. Naime, u procesu fibratima potaknute proliferacije peroksisoma u hepatocitima i povećanja razgradnje masnih kiselina  $\beta$ -oksidacijom, potiče se i proizvodnja ROS. To su primjerice hidroksilni radikal, superoksidni radikal, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i dušični oksid (178). Velika količina ROS, posebice  $H_2O_2$ , potiče oksidaciju lipida. Proces lipidne oksidacije može biti spriječen djelovanjem antioksidansa (182).

Eksperimentalni podaci o utjecaju fibrata na oksidacijski stres vrlo su različiti i često kontradiktorni. Tako je u štakora primjena fenofibrata u hrani u udjelima 0,005%, 0,05% i 0,5% tijekom 7 dana dovela do smanjenja lipidne oksidacije i koncentracije MDA u plazmi (183). Arnaiz i sur. su uočili da dodatak fenofibrata u hrani tijekom dva tjedna u miševa izaziva povećanu proizvodnju  $H_2O_2$ , koja međutim nije izazvala oksidaciju lipida, vjerojatno zbog istovremenog povećanja koncentracije endogenih antioksidansa ubikvina i glutaciona (184).

Primjena GEM tijekom 6 i 34 dana je u štakora i hrčaka uzrokovala pad koncentracije  $\alpha$ -tokoferola i NAD(P)H:kvinon diaforaze (DT-diaforaze) (185). U drugoj je studiji GEM u dozi od 100

mg/kg/dan tijekom dva primjene u štakora sa šećernom bolesti izazvao statistički značajno poboljšanje lipidnog profila i smanjenje koncentracije oksidiranih lipida u plazmi, ali bez statistički značajnih promjena u aktivnosti antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze i glutation peroksidaze (186). U miševa s eksperimentalno izazvanom šećernom bolesti gemfibrozil je doveo do statistički značajnog smanjenja produkcije superoksida i posrednika upale MCP-1 te regresije aterosklerotskog plaka (187). U bolesnika s hipertriacilglicerolemijom, GEM je u dozi 900 mg/dan tijekom 12 tjedana primjene smanjio koncentraciju triacilglicerola i oksidaciju lipida plazme (188).

Posljednjih se godina otvaraju i pitanja drugih dodatnih učinaka fibrata koji bi bili neovisni o njihovom osnovnom učinku na lipide. Npr. raspravlja se o potencijalnim antimikrobnim učincima derivata fibroične kiseline, njihovim inhibicijskim učincima na zgrušavanje krvi ili stimulacijskim učincima na fibrinolizu. Neki od ne-lipidnih učinaka bi mogli biti modulacija upalnog odgovora i stanične migracije te stabilizacija aterosklerotskog plaka. Iako točan mehanizam nastanka navedenih procesa nije poznat, moguće je da su i oni posredovani aktivacijom PPAR $\alpha$  receptora, ali onih čija je ekspresija ustanovljena na mjestima koja nemaju izravne veze s metabolizmom lipoproteinskih čestica. To su npr. različite stanice arterijske stijenke poput endotelnih stanica, glatkih mišićnih stanica i makrofaga (187).

## 1.6 SVRHA RADA

Svrha ovog rada bila je istražiti i međusobno usporediti djelovanje atorvastatina, pravastatina, simvastatina i gemfibrozila prvenstveno na katalitičku aktivnost PON1, oksidaciju lipida i koncentraciju leptina. Svrha ovog rada bila je i ispitati učinak istih antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost BuChE i pokušati utvrditi mjesto BuChE u metabolizmu lipida. Rezultati ovih istraživanja, poglavito onih koji se odnose na učinke antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost PON1 i oksidaciju lipida odnosno MDA, mogli bi biti prilog spoznajama o korisnoj i racionalnoj primjeni antilipidnih lijekova u bolestima kardiovaskularnog i drugih sustava zbog njihovog antioksidacijskog učinka.

## **2.0 HIPOTEZA**

Višekratna primjena statina i fibrata u biološkom materijalu normolipidemičnih štakora povećava katalitičku aktivnost PON1 te smanjuje katalitičku aktivnost BuChE i koncentracije MDA i leptina. Takvim djelovanjem statini i fibrati pokazuju pleiotropne učinke.

### 3.0 CILJEVI RADA

Ciljevi rada su:

- istražiti utjecaj višekratne primjene atrovastatina, pravastatina, simvastatina na:
  - katalitičku aktivnost PON1 i BuChE u serumu/plazmi i jetri;
  - koncentracije HDL, LDL, ukupnog kolesterola i triacilglicerola u plazmi;
  - vrijednosti koncentracije MDA u plazmi, srcu, jetri i bubregu;
  - koncentraciju leptina u plazmi.
- Istražiti utjecaj višekratne primjene gemfibrozila na:
  - katalitičku aktivnost PON1 i BuChE u serumu/plazmi i jetri;
  - koncentracije HDL, LDL, ukupnog kolesterola i triacilglicerola u plazmi;
  - vrijednosti koncentracije MDA u plazmi, srcu, jetri i bubregu;
  - koncentraciju leptina u plazmi.
- Utvrditi reverzibilnost dobivenih promjena u ispitivanim parametrima nakon perioda oporavka (10 dana nakon prestanka primjene antilipidnih lijekova).

## 4.0 MATERIJALI I METODE

### 4.1 ŽIVOTINJE

Za istraživanja su korištena 192 muška štakora soja Wistar mase 250-350 g i starosti 2-3 mjeseca (vlastiti uzgoj Zavoda za Farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). U istraživanjima su praćene smjernice Zakona o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999). Za obavljanje pokusa na projektu, kojeg je ova disertacija dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 04-76/2007-391).

Životinje su tijekom svih pokusa boravile u prostorijama s kontroliranim laboratorijskim uvjetima i slobodnim pristupom hrani i vodi.

### 4.2 ISPITIVANE SUPSTANCIJE

U eksperimentima su korišteni antilipidni lijekovi: atorvastatin (CAS-134523-00-5) (Sortis® 20, Pfizer, SAD) (ATOR), pravastatin (81093-37-0) (Pravastatin 20, Pliva, Hrvatska) (PRAV), simvastatin (CAS-79902-63-9) (Statex® 20, Pliva, Hrvatska) (SIMV) i gemfibrozil (CAS-25812-30-0) (Elmogan® 600, Lek d.o.o., Slovenija) (GEM) u obliku tableta.

### 4.3 POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA

Provedeno je 5 pokusa, u kojima su životinje bile raspoređene u ukupno 26 skupina, od čega su 10 skupina bile kontrolne (broj životinja po skupini N= 5-8), a 16 skupina eksperimentalne (broj životinja po skupini N= 5-10). Svaki pokus je trajao 31 dan i sastojao se od dva dijela. Prvi dio (tretman) u trajanju od 21 dan se odnosio na primjenu pojedinih statina (ATOR, PRAV, SIMV) ili GEM u eksperimentalnim skupinama, odnosno fiziološke otopine u kontrolnim skupinama štakora, dok je drugi dio u trajanju od 10 dana predstavljao period oporavka, bez primjene antilipidnih lijekova u preostalim eksperimentalnim skupinama odnosno fiziološke otopine u preostalim kontrolnim skupinama životinja.

#### 4.3.1 Kontrolne skupine životinja

Kontrolne skupine štakora su svakodnevno dobile 5 mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne mase *per os* putem gastričke sonde. Katalitičke aktivnosti PON1 i BuChE te koncentracije lipida, MDA i leptina u ovih štakora su predstavljale bazične vrijednosti, na osnovu kojih se zaključivalo da li

je primjena antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama životinja izazvala promjene navedenih parametara.

#### 4.3.2 Eksperimentalne skupine životinja

Ispitivani antilipidni lijekovi su primjenjivani u eksperimentalnim skupinama štakora u obliku suspenzije *per os* putem gastičke sonde. Suspenzije su dobivene miješanjem homogeniziranih tableta pojedinog antilipidnog lijeka i fiziološke otopine. Doze statina (ATOR, PRAV, SIMV) su bile 10 i 50 mg/kg tjelesne mase dnevno, a GEM 50 mg/kg tjelesne mase dnevno. Doza antilipidnog lijeka od 10 mg/kg tjelesne mase u štakora je ekvivalentna humanoj dozi od 1,62 mg/kg tjelesne mase, a doza antilipidnog lijeka od 50 mg/kg tjelesne mase u štakora odgovara humanoj dozi od 8,1 mg/kg tjelesne mase. U svim pokusima je ukupna dnevna doza pojedinih antilipidnih lijekova suspendirana u 5 mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne mase životinja.

#### 4.3.3 Primjena antilipidnih lijekova

Provedena su četiri pokusa sa statinima (ATOR, PRAV, SIMV) i jedan pokus sa GEM.

U prvom pokusu sa ATOR, drugom pokusu sa PRAV i trećem pokusu sa SIMV primijenjene doze svakog statina su bile 10 i 50 mg/kg tjelesne mase životinja dnevno. U četvrtom pokusu je primjenjivan SIMV u jednoj dozi od 10 mg/kg/dan, a u petom GEM u jednoj dozi od 50 mg/kg/dan.

Za provođenje pokusa sa statinima u dvije doze (ATOR-pokus I, PRAV-pokus II, SIMV-pokus III) štakori su u svakom pojedinom pokusu bili nasumce raspoređeni u šest skupina, i to četiri eksperimentalne i dvije kontrolne. Prve dvije, nasumce odabrane eksperimentalne skupine štakora su dobivale ATOR ili PRAV ili SIMV u dozi od 10 mg/kg/dan, dok su ostale dvije eksperimentalne skupine štakora dobivale ATOR ili PRAV ili SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan. U četvrtom pokusu (pokus IV) je SIMV primijenjen samo u dozi od 10 mg/kg/dan, što je zahtijevalo samo dvije eksperimentalne i dvije kontrolne skupine. Isti postupak je bio i u petom pokusu (pokus V), u kojem je primijenjena samo jedna doza GEM (50 mg/kg/dan).

Primjena svih antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama te fiziološke otopine u kontrolnim skupinama životinja se provodila jednom dnevno, svakog dana prije podne između 9 i 10 sati, tijekom 21 dan.

Nakon završene primjene pojedinih antilipidnih lijekova i fiziološke otopine, te 12-satnog noćnog gladovanja, nasumce uzete po jedna eksperimentalna skupina životinja od svake doze i jedna kontrolna skupina iz prvog (ATOR), drugog (PRAV) i trećeg (SIMV) pokusa, žrtvovane su 22. dana. Isti postupak je učinjen sa samo jednom eksperimentalnom i jednom kontrolnom skupinom iz četvrtog pokusa (SIMV, jedna doza) i petog pokusa (GEM, jedna doza). Preostale skupine štakora: po jedna kontrolna i dvije eksperimentalne skupine prethodno tretirane s 10 ili 50 mg statina/kg/dan iz prvog, drugog i trećeg pokusa, jedna kontrolna i jedna eksperimentalna skupina na dnevnoj dozi SIMV od 10 mg/kg iz četvrtog pokusa te jedna kontrolna i jedna eksperimentalna skupina na dnevnoj dozi GEM od

50 mg/kg su zadržane u pokusima još 10 dana (oporavak). Sljedećeg dana po isteku perioda oporavka sve preostale životinje iz svih pokusa su žrtvovane nakon 12-satnog noćnog gladovanja.

#### 4.3.4 Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala

Postupak žrtvovanja svih životinja je provođen nakon noćnog gladovanja. Na dan žrtvovanja u 9.00-10.00 sati ujutro životinje su podvrgnute općoj anesteziji inhalacijom dietil-etera. Žrtvovanje je provedeno postupkom uzimanja venske krvi direktno iz srca do eksangvinacije. Dio tako dobivene krvi pohranjen je u heparinizirane epruvete kako bi se iz plazme izvršila određivanja koncentracije glukoze, lipida, leptina i MDA te aktivnosti BuChE. Lipidi i glukoza u plazmi su mjereni 2-4 sata nakon provedenog postupka žrtvovanja. Uzorci plazme za određivanje koncentracije leptina i MDA pohranjeni su na temperaturi od  $-70^{\circ}\text{C}$ , a za određivanje aktivnosti BuChE na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz drugog dijela krvi za određivanje aktivnosti PON1 priređeni su uzorci seruma koji su zatim pohranjeni na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dijelovi tkiva i to: jetre za mjerenje katalitičke aktivnosti PON1 i BuChE te jetre, srca, mozga i bubrega za određivanje MDA uzeti su i pohranjeni do postupka mjerenja. Uzorci svih tkiva uzetih za određivanje aktivnosti PON1 i BuChE pohranjeni su na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ , a za određivanje koncentracije MDA na temperaturi  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 4.4 BIOKEMIJSKE METODE

#### 4.4.1 Određivanje koncentracije lipida i glukoze u plazmi

Koncentracije lipida i glukoze u plazmi su određivane Olympus AU 2700 automatskim analizatorom pomoću originalnih reagensa (Olympus Diagnostics GmbH, Irish Branch, Lismeehan, Irska). Koncentracije ukupnog kolesterola, triacilglicerola i glukoze su određivane enzimatskim kolorimetrijskim metodama (189, 190, 191). Koncentracija HDL lipoproteinskih čestica je određivana korištenjem metode imuno-inhibicije  $\beta$ -lipoproteinskim antitijelom u prvom koraku te enzimatskim kolorimetrijskim mjerenjem kolesterola u drugom koraku (192). LDL je izračunat iz koncentracije ukupnog kolesterola, triacilglicerola i HDL pomoću Friewaldove formule (193). Koncentracije lipida i glukoze su izražene u mM/L.

#### 4.4.2 Određivanje katalitičke aktivnosti paraoksonaze 1 u serumu

Aktivnost PON1 u serumu je mjerena spektrofotometrijskom metodom hidrolize sintetskog dietil-p-nitrofenil fosfata (paraokson, o,o-dietil-p-nitrofenilfosfat, Sigma Chemical Co., London, UK) kao supstrata. Aktivnost PON1 je određivana mjerenjem brzine hidrolize supstrata u p-nitrofenol.



Reakcijska smjesa za određivanje brzine hidrolize supstrata ukupnog volumena 1100  $\mu\text{L}$  je sadržavala 200  $\mu\text{L}$  0,1 M TRIS pufera (pH 7,4), moderator  $\text{CaCl}_2$  (1 mM u TRIS puferu pH 7,4) i 800  $\mu\text{L}$  1 mM otopine paraoksone u TRIS puferu, nakon čega je dodano 100  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog seruma da započne reakciju. Brzina nastajanja p-nitrofenola je mjerena promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 405 nm i temperaturi  $37^\circ\text{C}$  tijekom 3 minute na M350 CAMSPEC spektrofotometru. Slijepa proba koja je korištena za korekciju spontane hidrolize supstrata je sadržavala opisanu smjesu bez seruma. Katalitička aktivnost PON1 je izračunata po metodi Beltowskog i sur. (73) i izražena kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po mililitru seruma ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ ).

#### 4.4.3 Određivanje katalitičke aktivnosti paraoksonaze 1 u jetri

Otopina za mjerenje priređena je homogenizacijom 100 mg tkiva jetre u fiziološkoj otopini u udjelu 1:10 i centrifugirana pri 4000 g tijekom 20 minuta (Rotofix-32 Hettich, Njemačka). Aktivnost PON1 u jetri je zatim mjerena spektrofotometrijski kako je opisano prethodno u postupku mjerenja aktivnosti PON1 u serumu, s razlikom da je umjesto seruma u reakcijsku smjesu dodano 100  $\mu\text{L}$  supernatanta. Brzina nastajanja p-nitrofenola je mjerena promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 405 nm i temperaturi  $37^\circ\text{C}$  tijekom 3 minute na M350 CAMSPEC spektrofotometru. Slijepa proba koja je korištena za korekciju spontane hidrolize supstrata je sadržavala opisanu smjesu bez supernatanta. Katalitička aktivnost PON1 je izračunata po metodi Beltowskog i sur. (73) i izražena kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu tkiva ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ ).

#### 4.4.4 Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u plazmi

Katalitička aktivnost BuChE u plazmi je mjerena spektrofotometrijski metodom po Ellmanu i sur. (194). Od otopine koja je sadržavala 3 mL 0,1 M fosfatnog pufera i 100  $\mu\text{L}$  0,38 mM 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoične kiseline) (DTNB) uzet je 1 mL otopine za mjerenje, u koju je dodano 50  $\mu\text{L}$  plazme i 100  $\mu\text{L}$  butiriltiokolina (0,9 mM) (Sigma Chem Co., USA) kao supstrata. Za slijepu probu korištena je opisana otopina bez uzorka plazme odgovarajućeg mjernog volumena. Spektrofotometrijsko određivanje linearne brzine reakcije provedeno je mjerenjem promjene apsorbancije tijekom 3 minute pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$  i valnoj duljini od 412 nm na HPV 220-Iskra-Slovenija spektrofotometru. Katalitička aktivnost BuChE izražena je kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po mililitru plazme ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ ) (194).

#### 4.4.5 Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u jetri

Otopina za mjerenje priređena je homogenizacijom 200 mg tkiva jetre u fiziološkoj otopini u omjeru 1:5. Suspenzija je zatim centrifugirana pri 3500 g tijekom 15-20 minuta (Rotofix-32 Hettich, Njemačka). Dobiveni supernatant je korišten za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti BuChE.

S obzirom da tkivo jetre između ostalog sadrži i BuChE i AChE, spektrofotometrijsko se mjerenje provodilo metodom po Ellmanu i sur. (194) na način kako je to prethodno opisano za mjerenje aktivnosti BuChE u plazmi. Pri ovom se postupku, međutim, provode dva koraka: prvo mjerenje koje se izvodi na način opisan za određivanje aktivnosti BuChE u plazmi, pri čemu se umjesto uzorka plazme u otopinu za mjerenje dodaje 50  $\mu$ L supernatanta, te drugo koje se provodi uz dodatak 50  $\mu$ L specifičnog inhibitora aktivnosti BuChE etopropazin hidroklorida (Sigma St. Louis, SAD). Katalitička aktivnost BuChE izračunata je indirektno kao razlika između dva opisana mjerenja te izražena kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu tkiva jetre ( $\mu$ M/min/g) (194).

#### 4.4.6 Određivanje koncentracije malondialdehida u plazmi

Postupak određivanja koncentracije MDA je usvojen prema metodi Anguloa i Botsogloua (195, 196, 197). U 250  $\mu$ L plazme je dodano 25  $\mu$ L 0,2% BHT (2,6 di-ter-butyl-4-metilfenol,  $\geq$ 99,0% (GC) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), u 98% etanolu (Merck, Darmstadt, Njemačka) i 1 mL 15% vodene otopine TCA (trikloroocetna kiselina,  $\geq$ 98,0%, Sigma-Aldrich Inc.). Otopina je zatim centrifugirana (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka) na 4000 g tijekom 15 minuta na 4°C. Deproteinizirani supernatant je spremljen na -70°C do daljnjeg postupka. Pri postupku mjerenja je u 500  $\mu$ L otopine dodano 1 mL TBA 0,375% (tiobarbiturna kiselina,  $\geq$ 98,0%, Sigma-Aldrich) u 0,25 M HCl (37%, Sigma-Aldrich Inc.) te je otopina grijana 15 minuta na 100°C. Uzorci su zatim ohlađeni na sobnu temperaturu te je provedeno mjerenje apsorbancije MDA UV-VIS spektrofotometrom (HPV-220, Iskra, Slovenija) pri valnoj duljini od 535 nm. Koncentracije su izražene kao mikromol ( $\mu$ M) (195).

#### 4.4.7 Određivanje koncentracije malondialdehida u srcu, jetri, bubregu i mozgu

Postupak određivanja koncentracije MDA je usvojen prema metodi Anguloa i Botsogloua (195, 196, 197). 0,2 g tkiva (srce, jetra, bubreg ili mozak) je homogenizirano u 0,15 M KCl ( $\geq$ 99,0%, Sigma-Aldrich Inc.) da se dobije 10% suspenzija. Nakon toga je kao antioksidans dodano 25  $\mu$ L 0,2% BHT (2,6 di-ter-butyl-4-metilfenol,  $\geq$ 99,0% (GC) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), u 98% etanolu (Merck, Darmstadt, Njemačka). Homogenati su zatim centrifugirani (Hettich Universal 32 R,

Tuttligen, Njemačka) na 18890 g tijekom 20 minuta. Nakon toga je dodana 5%-tna vodena otopina TCA (trikloroetna kiselina,  $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich Inc.) u udjelu 1:4 te su uzorci ponovo centrifugirani (Hettich Universal 32 R, Tuttligen, Njemačka) na 1780 g tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja u 500  $\mu\text{L}$  supernatanta dodano je 500  $\mu\text{L}$  TBA 0,375% (tiobarbiturna kiselina,  $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich) u 0,25 M HCl (37%, Sigma-Aldrich Inc.). Dobiveni uzorci grijani su na 100°C tijekom 15 minuta, a zatim ohlađeni na sobnu temperaturu te je provedeno mjerenje apsorbancije MDA UV-VIS spektrofotometrom (HPV-220, Iskra, Slovenija) pri valnoj duljini od 532 nm. Koncentracije MDA u svim uzorcima tkiva su izraženi kao mikromol ( $\mu\text{M}$ ) (197).

#### 4.4.8 Određivanje koncentracije leptina u plazmi

Koncentracija leptina u plazmi je određena upotrebom komercijalnog kita (R&D Systems) prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci plazme razrijeđeni su u puferu standard diluensa. Standard je otopljen u istom puferu, te su napravljena dvostruka razrijeđenja kako bi se dobili standardi za ELISA-u (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). 50  $\mu\text{L}$  RDW1 standarda dodani su u svaku jažicu, te još 50  $\mu\text{L}$  ili razrijeđenog uzorka plazme ili standarda u duplikatima. Nakon inkubacije i ispiranja, dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine konjugata peroksidaze i leptina, nakon čega je postupak inkubacije i ispiranja ponovljen. Zatim je dodano 100  $\mu\text{L}$  supstrata, te nakon inkubacije od 30 minuta reakcija je zaustavljena dodatkom otopine klorovodične kiseline. Optička gustoća (engl. *optic density*, OD) izmjerena je na Wallac spektrofluorimetru pri valnoj duljini 450 nm. Upotrebom GraphPad Prism softvera izračunate su baždarne krivulje, a potom su iz baždarnih krivulja izračunate koncentracije leptina u uzorcima. Koncentracija leptina je izražena kao nanogram po mililitru plazme (ng/mL) (198).

#### 4.5 ANALIZA PODATAKA

Analiza podataka obavljena je uporabom programa GraphPad Prism for Windows verzija 5.03. Podaci su u tablicama i na grafikonima prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Kod usporedbe dvije skupine korišten je t-test za nezavisne uzorke. Kod usporedbe tri skupine korištena je analiza varijance (ANOVA), te Dunnettov test višestruke usporedbe. Specifičnost Dunnettovog testa je u tome što usporedbu vrši samo prema kontrolnoj skupini. Na taj se način smanjuje broj usporedbi, te izbjegavaju lažno pozitivni rezultati. Svi primjenjeni testovi bili su dvosmjerni, a P vrijednosti manje ili jednake 0,05 su smatrane statistički signifikantnima (199, 200).

## 5.0 REZULTATI

Rezultati su prikazani tablično i grafički. Statistički značajni rezultati označeni su u tablicama podebljano, a na slikama zvjezdicom.

### 5.1 Atorvastatin – pokus I

#### 5.1.1 Učinci atorvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

ATOR je ovisno o dozi i statistički značajno nakon primjene veće doze uzrokovao povećanje katalitičke aktivnosti PON1 u serumu za 10% i 29% ( $p < 0,0386$ ) te u jetri statistički značajno nakon primjene obje doze za 26% ( $p < 0,0030$ ) i 40% ( $p < 0,0030$ ) (Tablica 5.1.1, slike 5.1.1 i 5.1.2).

Nakon prestanka primjene obje doze ATOR i isteka perioda oporavka, aktivnost PON1 u serumu se u odnosu na kontrolu smanjila za 12% i 11%, dok je u jetri ostala statistički značajno povećana za 43% ( $p < 0,0008$ ) nakon primjene ATOR u dozi od 10 mg/kg/dan i za 29% ( $p < 0,0008$ ) nakon primjene ATOR u dozi od 50 mg/kg/dan u odnosu na kontrolu (Tablica 5.1.1, slike 5.1.1 i 5.1.2).

Aktivnost BuChE se ovisno o primjenjenoj dozi ATOR povećala u plazmi za 20% nakon primjene manje doze i statistički značajno za 40% ( $p < 0,0356$ ) nakon primjene veće doze te u jetri statistički značajno primjenom obje doze za 85% ( $p < 0,0001$ ) i 146% ( $p < 0,0001$ ) (Tablica 5.1.1, slike 5.1.3 i 5.1.4).

Nakon perioda oporavka se aktivnost BuChE u životinja tretiranih ATOR u plazmi i jetri smanjila u odnosu na vrijednosti izmjerene odmah nakon završetka tretmana. Tako je u plazmi nakon primjene 10 mg/kg/dan ATOR aktivnost BuChE bila jednaka kontroli, dok je nakon primjene veće doze još uvijek bila povećana za 25% u odnosu na kontrolu. U jetri je nakon primjene obje doze ATOR po isteku perioda oporavka katalitička aktivnost BuChE ostala statistički značajno povećana za 38% ( $p < 0,0210$ ) i 31% ( $p < 0,0210$ ) u odnosu na vrijednosti izmjerene u kontrolnoj skupini životinja (Tablica 5.1.1, slike 5.1.3 i 5.1.4).

Tablica 5.1.1 Učinci atorvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkinesteraze u plazmi i jetri štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Atorvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg/dan	Atorvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg/dan	p-vrijednost ANOVA
PON1 serum μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,21±0,04 (N=6) (100)	0,23±0,04 (N=8) (110)	<b>0,27±0,03</b> (N=7) (129)	0,0386
	Oporavak <sup>3</sup>	0,26±0,04 (N=6) (100)	0,23±0,03 (N=6) (88)	0,23±0,01 (N=6) (89)	0,4047
PON1 jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,38±0,08 (N=6) (100)	<b>0,48±0,03</b> (N=6) (126)	<b>0,53±0,07</b> (N=7) (140)	0,0030
	Oporavak <sup>3</sup>	0,21±0,05 (N=7) (100)	<b>0,30±0,03</b> (N=7) (143)	<b>0,27±0,02</b> (N=6) (129)	0,0008
BuChE plazma μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,05±0,02 (N=7) (100)	0,06±0,01 (N=8) (120)	<b>0,07±0,01</b> (N=7) (140)	0,0356
	Oporavak <sup>3</sup>	0,04±0,01 (N=7) (100)	0,04±0,01 (N=7) (100)	0,05±0,01 (N=6) (125)	0,5781
BuChE jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,13±0,04 (N=6) (100)	<b>0,24±0,04</b> (N=8) (185)	<b>0,32±0,09</b> (N=7) (246)	<0,0001
	Oporavak <sup>3</sup>	0,16±0,03 (N=7) (100)	<b>0,22±0,03</b> (N=6) (138)	<b>0,21±0,05</b> (N=6) (131)	0,0210

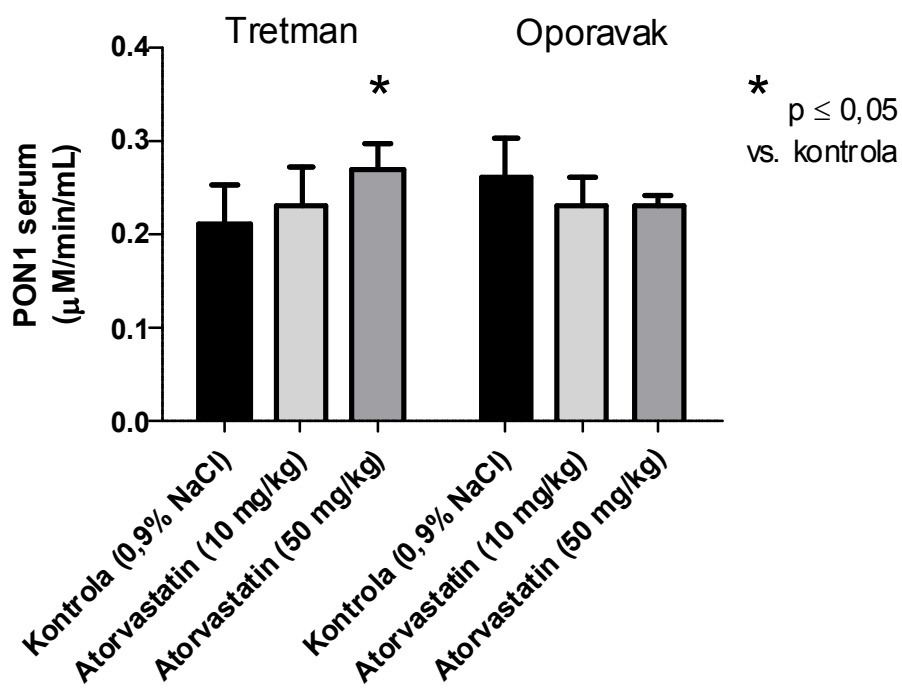
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Atorvastatin je primjenjivan 21 dan.

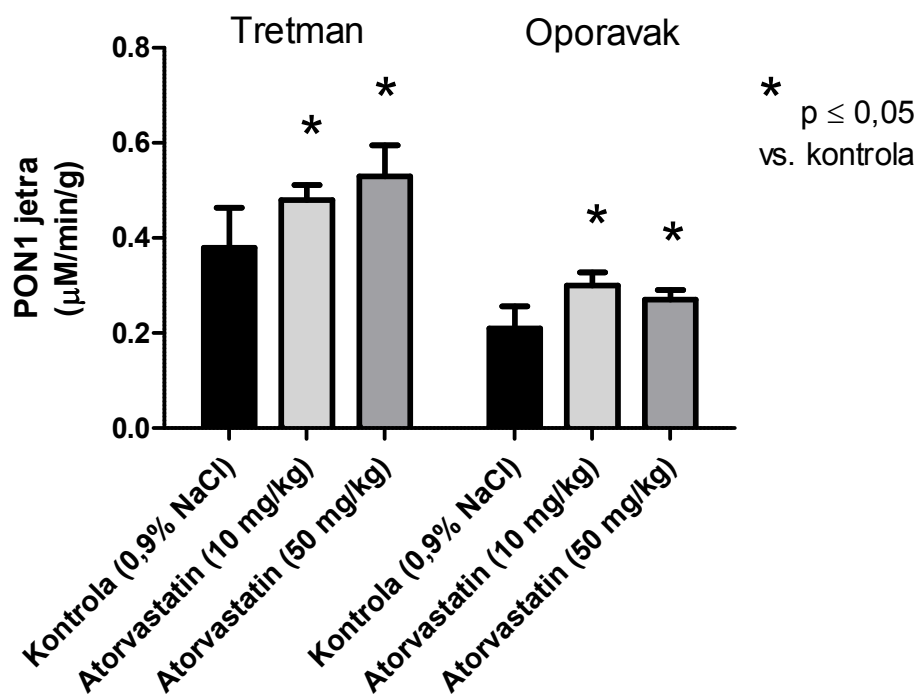
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).



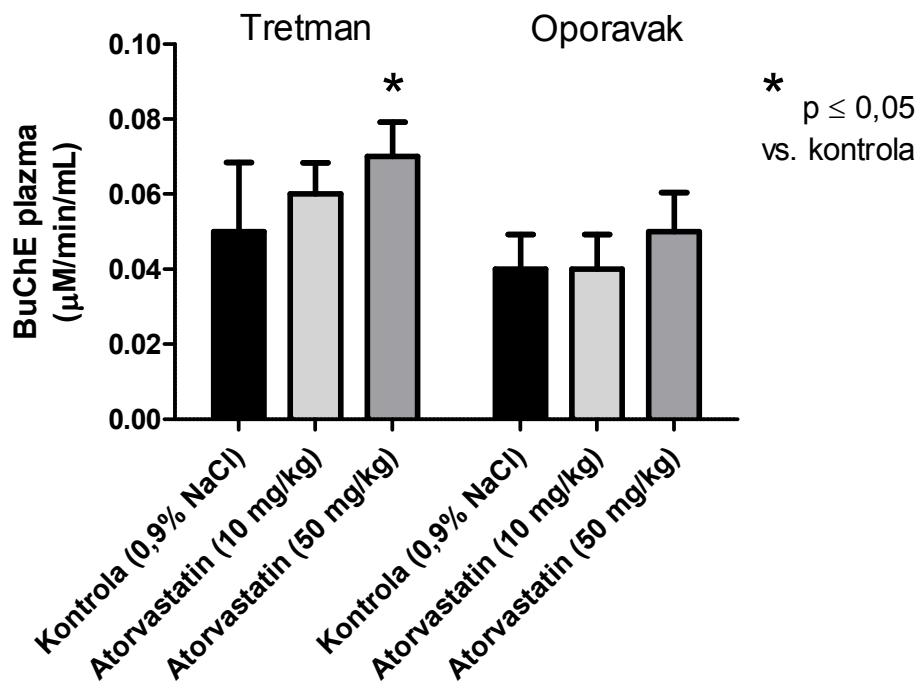
Slika 5.1.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



Slika 5.1.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

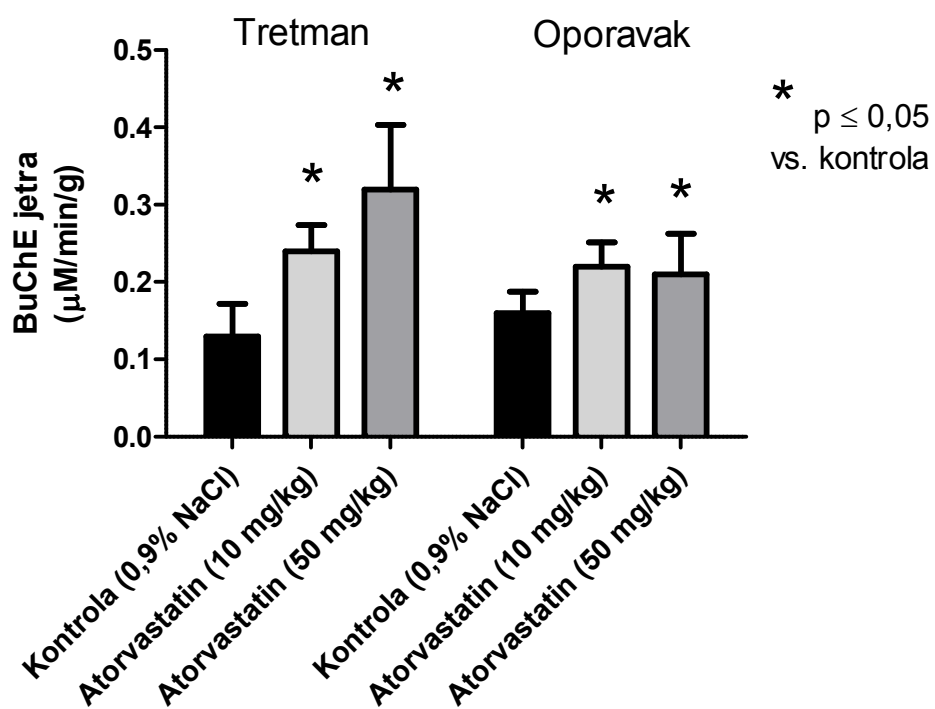
Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.1.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.





Slika 5.1.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana. Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.

### 5.1.2 Učinci atorvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi

ATOR je u obje doze u plazmi uzrokovao povećanje koncentracije ukupnog kolesterola za 24% ( $p < 0,0074$ ) i 8%, HDL za 17% ( $p < 0,0096$ ) i 2% te LDL za 55% ( $p < 0,0086$ ) i 24%, dok su se koncentracije triacilglicerola i glukoze smanjile za 14% i 23% odnosno 12% i 5% (Tablica 5.1.2).

Nakon perioda oporavka u odnosu na kontrolne vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola su nakon primjene obje doze ATOR bile manje za 6% i 2%, koncentracije HDL manje za 11% i 4%, triacilglicerola za 20% i 58% ( $p < 0,0020$ ), dok je koncentracija glukoze bila manja za 13% nakon primjene 10 mg/kg/dan ATOR, a veća za 10% nakon primjene ATOR u dozi od 50 mg/kg/dan. Sličan odnos između veličine primjenjene doze ATOR i koncentracije u plazmi nakon perioda oporavka je zamijećen i u slučaju LDL (Tablica 5.1.2).

Tablica 5.1.2 Učinci atorvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Atorvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Atorvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Ukupni kolesterol mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,32±0,21 (N=7) (100)	<b>1,64±0,15</b> (N=8) (124)	1,43±0,17 (N=7) (108)	0,0074
	Oporavak <sup>3</sup>	1,29±0,14 (N=6) (100)	1,12±0,21 (N=7) (94)	1,26±0,11 (N=6) (98)	0,1687
HDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,98±0,11 (N=7) (100)	<b>1,15±0,09</b> (N=8) (117)	1,00±0,11 (N=7) (102)	0,0096
	Oporavak <sup>3</sup>	0,92±0,06 (N=6) (100)	0,82±0,13 (N=7) (89)	0,88±0,06 (N=6) (96)	0,1638
LDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,38±0,13 (N=7) (100)	<b>0,59±0,13</b> (N=8) (155)	0,47±0,06 (N=7) (124)	0,0086
	Oporavak <sup>3</sup>	0,41±0,10 (N=6) (100)	0,34±0,10 (N=7) (83)	0,49±0,10 (N=6) (120)	0,0483
Triacilgliceroli mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,92±0,24 (N=7) (100)	0,79±0,19 (N=8) (86)	0,71±0,18 (N=7) (77)	0,1801
	Oporavak <sup>3</sup>	1,28±0,40 (N=6) (100)	1,03±0,32 (N=7) (80)	<b>0,54±0,12</b> (N=6) (42)	0,0020
Glukoza mM/L	Tretman <sup>2</sup>	6,34±1,52 (N=7) (100)	5,56±0,91 (N=8) (88)	6,01±1,20 (N=7) (95)	0,4795
	Oporavak <sup>3</sup>	4,73±1,22 (N=6) (100)	4,11±0,62 (N=7) (87)	5,19±1,55 (N=6) (110)	0,2728

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Atorvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

### 5.1.3 Učinci atorvastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu

Objekte doze ATOR su uzrokovale smanjenje koncentracije MDA u srcu za 18% te u jetri za 23% i 14%. U bubregu je primjena 10 mg/kg/dan ATOR izazvala pad koncentracije MDA za 9%, a primjena 50 mg/kg/dan ATOR statistički značajno smanjenje koncentracije MDA od 17% ( $p < 0,0293$ ) (Tablica 5.1.3, slike 5.1.5, 5.1.6 i 5.1.7).

Smanjena vrijednost koncentracije MDA u tkivima se zadržala i nakon 10 dana perioda oporavka u svih životinja tretiranih s obje doze ATOR. Tako je u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini životinja koncentracija MDA nakon perioda oporavka bila smanjena u srcu (18% i 29%), jetri (7% i 2%) i bubregu (4% i 13%) (Tablica 5.1.3, slike 5.1.5, 5.1.6 i 5.1.7).

Tablica 5.1.3 Učinci atorvastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Atorvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Atorvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
MDA srce μM	Tretman <sup>2</sup>	0,17±0,05 (N=7) (100)	0,14±0,03 (N=7) (82)	0,14±0,02 (N=7) (82)	0,1437
	Oporavak <sup>3</sup>	0,17±0,05 (N=7) (100)	0,14±0,02 (N=7) (82)	0,12±0,01 (N=5) (71)	0,0536
MDA jetra μM	Tretman <sup>2</sup>	0,44±0,14 (N=7) (100)	0,34±0,09 (N=7) (77)	0,38±0,01 (N=6) (86)	0,3306
	Oporavak <sup>3</sup>	0,43±0,09 (N=6) (100)	0,40±0,08 (N=7) (93)	0,42±0,09 (N=6) (98)	0,7856
MDA bubreg μM	Tretman <sup>2</sup>	0,23±0,02 (N=7) (100)	0,21±0,03 (N=7) (91)	<b>0,19±0,03</b> (N=7) (83)	0,0293
	Oporavak <sup>3</sup>	0,23±0,02 (N=7) (100)	0,22±0,03 (N=7) (96)	0,20±0,01 (N=7) (87)	0,0675

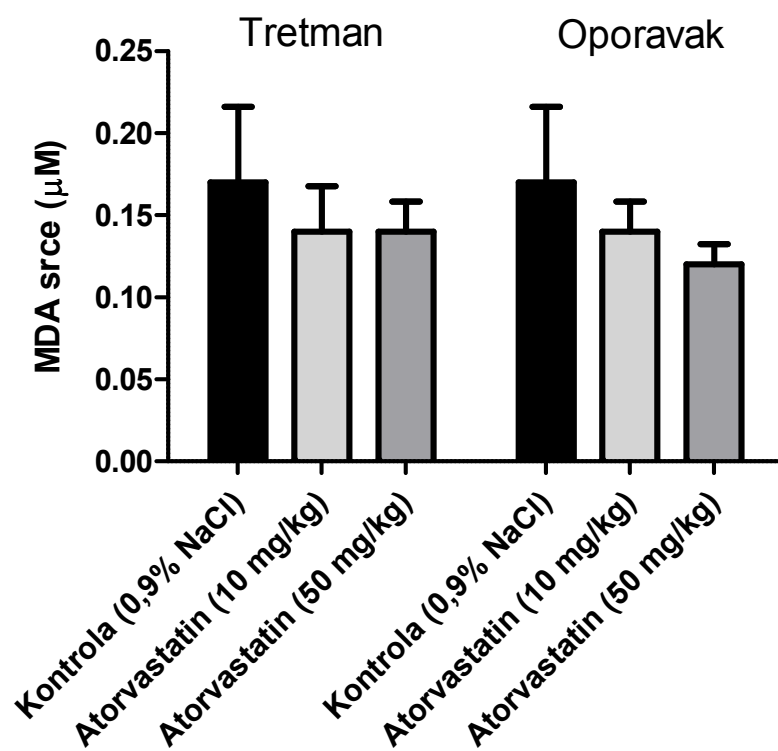
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Atorvastatin je primjenjivan 21 dan.

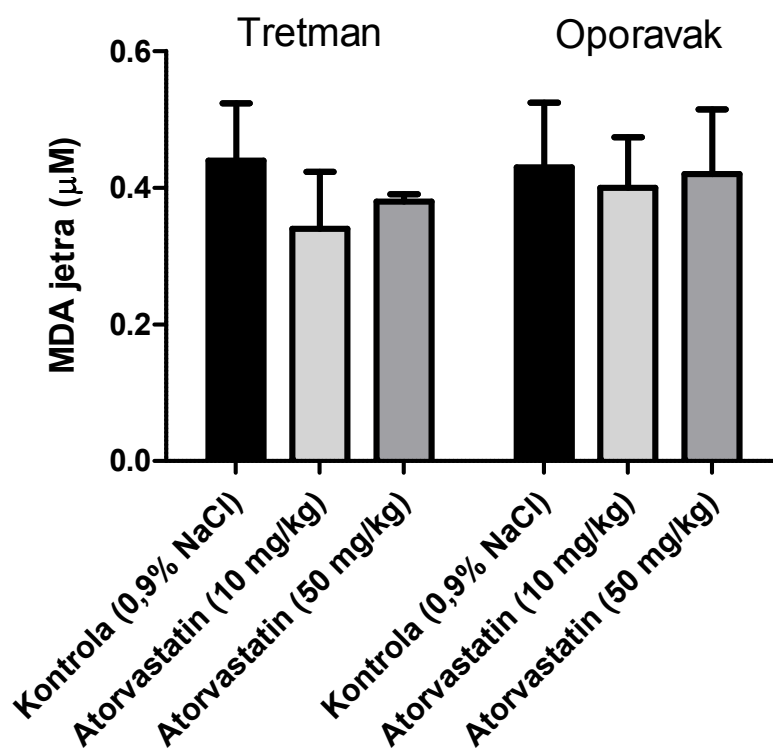
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podebljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).



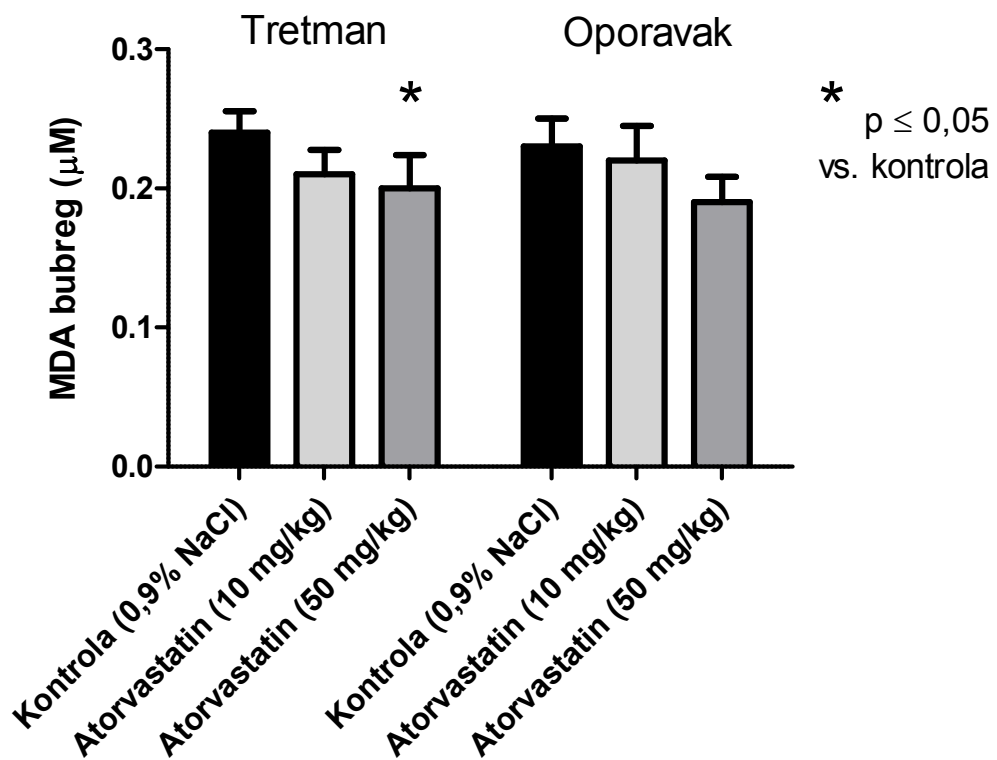
Slika 5.1.5 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.1.6 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.1.7 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

#### 5.1.4 Učinci atorvastatina na koncentraciju leptina u plazmi

Manja doza ATOR je dovela do pada (38%), a veća do porasta koncentracije leptina u plazmi (31%) u odnosu na kontrolu (Tablica 5.1.4).

Nakon perioda oporavka koncentracija leptina u plazmi je bila smanjena u obje eksperimentalne skupine za 33% i 66% (Tablica 5.1.4).

Tablica 5.1.4 Učinci atorvastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Atorvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Atorvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Leptin ng/mL	Tretman <sup>2</sup>	9,34±5,70 (N=7) (100)	5,81±0,65 (N=4) (62)	12,25±5,94 (N=7) (131)	0,1746
	Oporavak <sup>3</sup>	14,10±12,64 (N=7) (100)	9,49±4,60 (N=7) (67)	4,73±2,44 (N=6) (34)	0,1450

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Atorvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

## 5.2 Pravastatin – pokus II

### 5.2.1 Učinci pravastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

U serumu je manja doza PRAV uzrokovala pad katalitičke aktivnosti PON1 za 21%, a veća statistički značajan porast za 21% ( $p < 0,0270$ ). Pod utjecajem 10 i 50 mg/kg/dan PRAV se aktivnost PON1 u jetri u odnosu na kontrolu statistički značajno povećala ovisno o dozi i to za 28% ( $p < 0,0020$ ) primjenom manje doze i za 37% ( $p < 0,0020$ ) primjenom veće doze PRAV (Tablica 5.2.1, slike 5.2.1 i 5.2.2).

Nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana u štakora tretiranih manjom dozom PRAV katalitička aktivnost PON1 u serumu je bila statistički značajno smanjena za 21% ( $p < 0,0131$ ), dok se u skupini koja je dobivala veću dozu smanjila za 7% u odnosu na kontrolu. U jetri je katalitička aktivnost PON1 nakon isteka perioda oporavka bila povećana u odnosu na kontrolu za 15% i 10% (Tablica 5.2.1, slike 5.2.1 i 5.2.2).

Manja doza PRAV je uzrokovala povećanje katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi za 20%, dok veća doza PRAV na aktivnost BuChE u plazmi nije imala nikakav utjecaj. Aktivnost BuChE u jetri se povećala nakon primjene obje doze PRAV i to statistički značajno za 250% nakon primjene 10 mg/kg/dan PRAV ( $p < 0,0141$ ) te za 75% nakon primjene PRAV u dozi od 50 mg/kg/dan (Tablica 5.2.1, slike 5.2.3 i 5.2.4).

Nakon isteka perioda oporavka je aktivnost BuChE u plazmi u odnosu na kontrolu bila za 14% manja u štakora koji su dobivali manju dozu PRAV, dok se u štakora koji su dobivali veću dozu PRAV aktivnost enzima u plazmi u odnosu na kontrolu nije promijenila. Aktivnost BuChE u jetri se nakon perioda oporavka smanjila u odnosu na vrijednosti izmjerene nakon završetka tretmana, te je u štakora koji su dobivali 10 mg/kg/dan PRAV bila za 29% manja, a u onih koji su primali PRAV u dozi od 50 mg/kg/dan za 14% veća u odnosu na kontrolu (Tablica 5.2.1, slike 5.2.3 i 5.2.4).



Tablica 5.2.1 Učinci pravastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkinesteraze u plazmi i jetri štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Pravastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg/dan	Pravastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg/dan	p-vrijednost ANOVA
PON1 serum μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,14±0,01 (N=8) (100)	0,11±0,03 (N=10) (79)	<b>0,17±0,02 (N=6) (121)</b>	0,0270
	Oporavak <sup>3</sup>	0,14±0,02 (N=7) (100)	<b>0,11±0,01 (N=7) (79)</b>	0,13±0,02 (N=8) (93)	0,0131
PON1 jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,60±0,13 (N=7) (100)	<b>0,77±0,09 (N=8) (128)</b>	<b>0,82±0,10 (N=6) (137)</b>	0,0020
	Oporavak <sup>3</sup>	0,60±0,12 (N=7) (100)	0,69±0,15 (N=7) (115)	0,66±0,10 (N=8) (110)	0,4321
BuChE plazma μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,05±0,01 (N=8) (100)	0,06±0,01 (N=9) (120)	0,05±0,01 (N=6) (100)	0,4284
	Oporavak <sup>3</sup>	0,07±0,01 (N=7) (100)	0,06±0,01 (N=8) (86)	0,07±0,01 (N=8) (100)	0,3936
BuChE jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,04±0,05 (N=8) (100)	<b>0,14±0,09 (N=8) (350)</b>	0,07±0,04 (N=7) (175)	0,0141
	Oporavak <sup>3</sup>	0,14±0,12 (N=6) (100)	0,10±0,07 (N=7) (71)	0,16±0,10 (N=8) (114)	0,4319

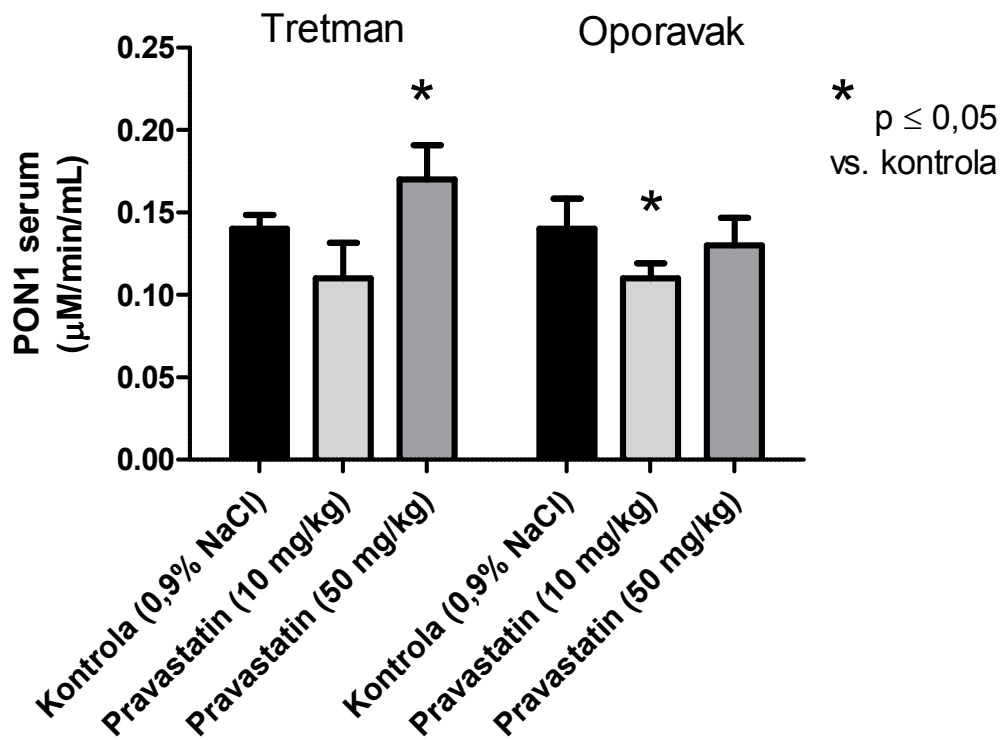
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Pravastatin je primjenjivan 21 dan.

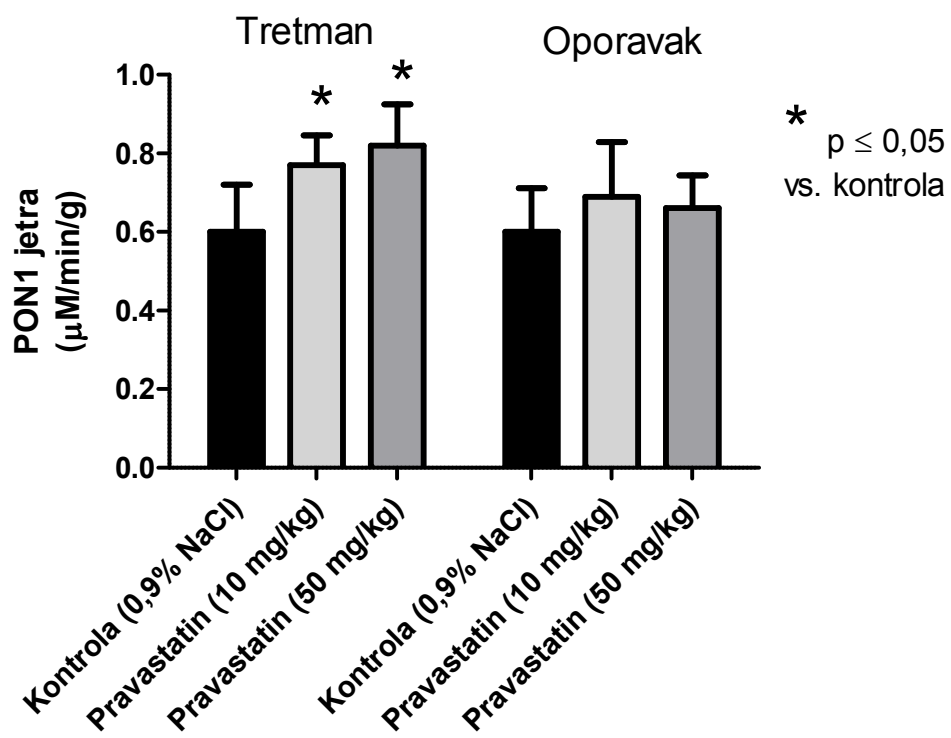
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).



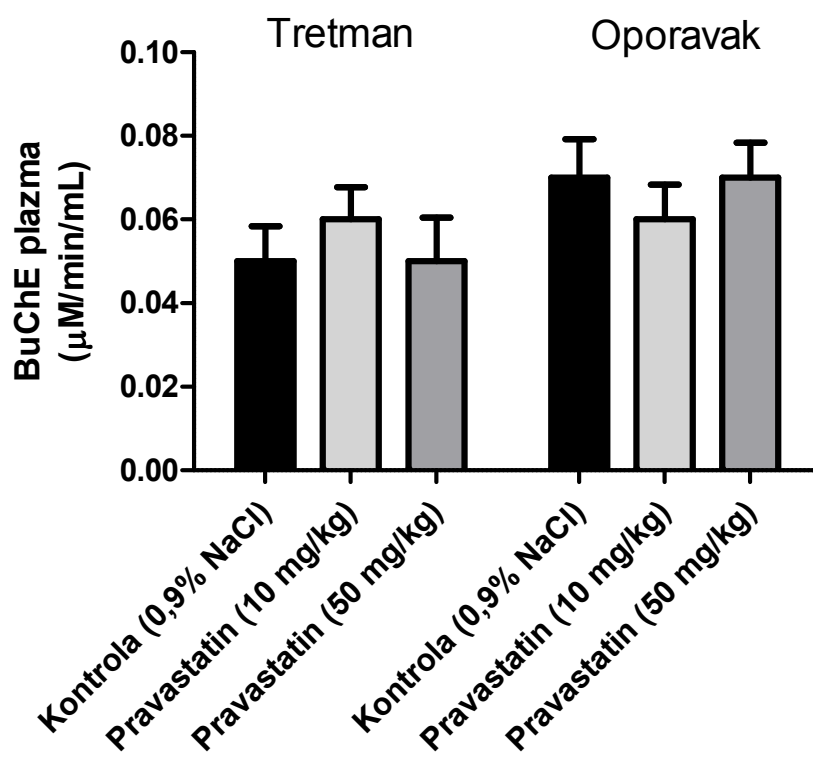
Slika 5.2.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



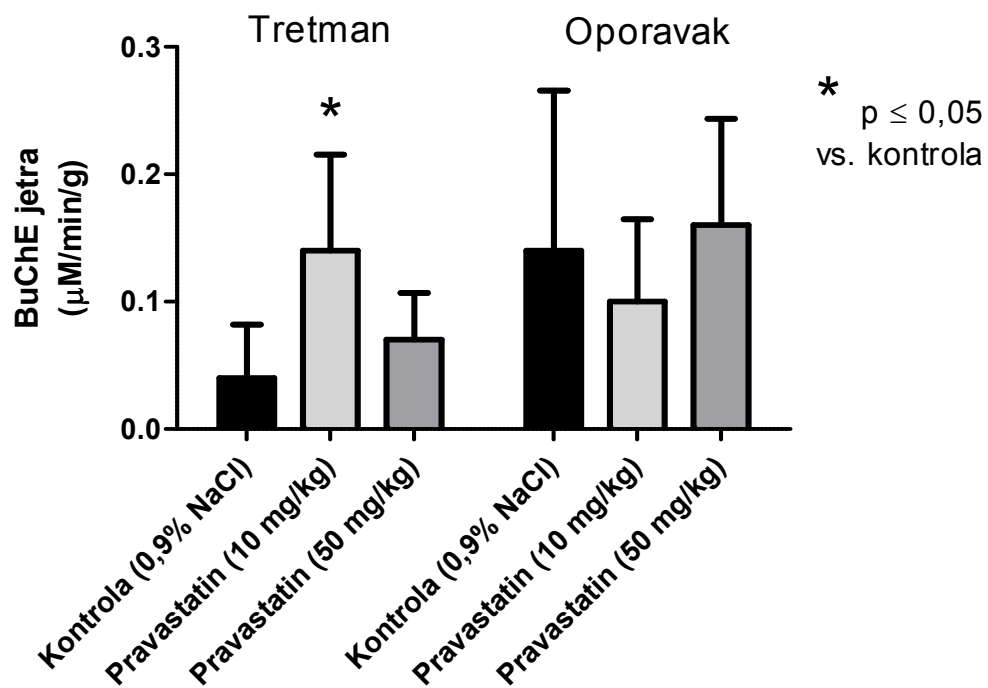
Slika 5.2.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.2.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.2.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

### 5.2.2 Učinci pravastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi

Višekratna primjena 10 i 50 mg/kg/dan PRAV je dovela do pada koncentracije ukupnog kolesterola (15% i 4%), HDL (23%,  $p < 0,0027$  i 1%), LDL (3% i 6%) i triacilglicerola (30%,  $p < 0,0377$  i 11%) te do povećanja koncentracije glukoze u plazmi (31% i 43%) u odnosu na kontrolu (Tablica 5.2.2).

U plazmi štakora tretiranih manjom odnosno većom dozom PRAV su nakon perioda oporavka ostale smanjene koncentracije ukupnog kolesterola (12% i 2%) i HDL (10% i 5%) te povećana koncentracija glukoze (21% i 25%). Koncentracija triacilglicerola se u obje tretirane skupine povećala za 3% odnosno 12% u odnosu na kontrolu. Životinje koje su dobivale PRAV u dozi od 10 mg/kg/dan su nakon perioda oporavka imale za 16% manju koncentraciju LDL u odnosu na kontrolu, dok su životinje na većoj dozi nakon perioda oporavka imale LDL gotovo izjednačen s kontrolom (Tablica 5.2.2).

Tablica 5.2.2 Učinci pravastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Pravastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Pravastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Ukupni kolesterol mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,30±0,16 (N=8) (100)	1,10±0,23 (N=10) (85)	1,25±0,07 (N=6) (96)	0,0721
	Oporavak <sup>3</sup>	1,63±0,21 (N=7) (100)	1,44±0,32 (N=8) (88)	1,60±0,17 (N=8) (98)	0,2792
HDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,00±0,12 (N=8) (100)	<b>0,77±0,17</b> (N=10) (77)	0,99±0,07 (N=6) (99)	0,0027
	Oporavak <sup>3</sup>	1,21±0,14 (N=7) (100)	1,09±0,27 (N=8) (90)	1,15±0,14 (N=8) (95)	0,5157
LDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,34±0,09 (N=8) (100)	0,33±0,06 (N=10) (97)	0,32±0,06 (N=6) (94)	0,8902
	Oporavak <sup>3</sup>	0,49±0,10 (N=7) (100)	0,41±0,08 (N=8) (84)	0,50±0,09 (N=8) (102)	0,1142
Triacilgliceroli mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,94±0,22 (N=8) (100)	<b>0,66±0,21</b> (N=8) (70)	0,84±0,14 (N=6) (89)	0,0377
	Oporavak <sup>3</sup>	0,87±0,19 (N=7) (100)	0,90±0,20 (N=8) (103)	0,97±0,22 (N=8) (112)	0,6100
Glukoza mM/L	Tretman <sup>2</sup>	3,33±0,78 (N=8) (100)	4,36±1,32 (N=10)(131)	4,78±1,11 (N=6) (143)	0,0576
	Oporavak <sup>3</sup>	4,88±1,55 (N=7) (100)	5,89±1,23 (N=8)(121)	6,12±2,00 (N=8) (125)	0,3212

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Pravastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podebljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

### 5.2.3 Učinci pravastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu

Primjena manje doze PRAV nije utjecala na koncentraciju MDA u srcu, dok se nakon primjene 50 mg/kg/dan PRAV koncentracija MDA u srcu povećala za 16%. Obje doze PRAV su dovele do smanjenja koncentracije MDA u jetri (17% i 11%) i bubregu (20% i 31%) (Tablica 5.2.3, slike 5.2.5, 5.2.6 i 5.2.7).

Po isteku perioda oporavka je koncentracija MDA u srcu štakora koji su dobivali 10 mg/kg/dan PRAV bila manja za 5%, a u onih koje su dobivale 50 mg/kg/dan PRAV je bila veća za 20% u usporedbi s kontrolom. Koncentracija MDA je nakon perioda oporavka i dalje bila smanjena u odnosu na kontrolu u jetri (21% i 18%) i u bubregu (18% i 12%) (Tablica 5.2.3, slike 5.2.5, 5.2.6 i 5.2.7).

Tablica 5.2.3 Učinci pravastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu štakora.

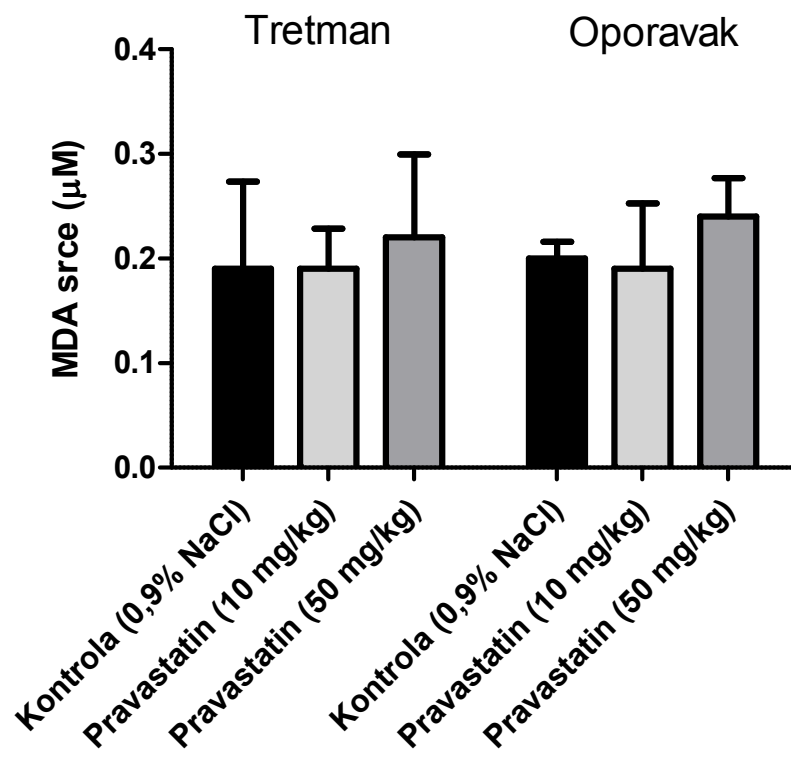
Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Pravastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Pravastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
MDA srce μM	Tretman <sup>2</sup>	0,19±0,10 (N=8) (100)	0,19±0,05 (N=9) (100)	0,22±0,05 (N=4) (116)	0,3581
	Oporavak <sup>3</sup>	0,20±0,01 (N=4) (100)	0,19±0,06 (N=6) (95)	0,24±0,04 (N=7) (120)	0,1371
MDA jetra μM	Tretman <sup>2</sup>	0,36±0,13 (N=8) (100)	0,30±0,13 (N=8) (83)	0,32±0,08 (N=8) (89)	0,5042
	Oporavak <sup>3</sup>	0,34±0,08 (N=6) (100)	0,27±0,09 (N=6) (79)	0,28±0,07 (N=7) (82)	0,4453
MDA bubreg μM	Tretman <sup>2</sup>	0,35±0,10 (N=8) (100)	0,28±0,06 (N=9) (80)	0,24±0,05 (N=5) (69)	0,1717
	Oporavak <sup>3</sup>	0,34±0,07 (N=7) (100)	0,28±0,05 (N=8) (82)	0,30±0,05 (N=7) (88)	0,6936

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Pravastatin je primjenjivan 21 dan.

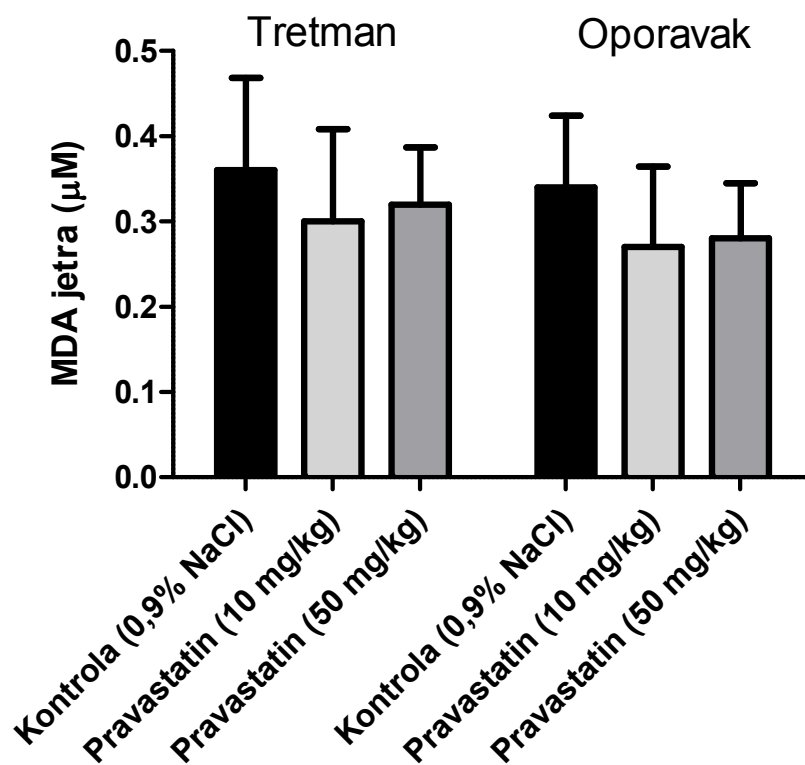
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.



Slika 5.2.5 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

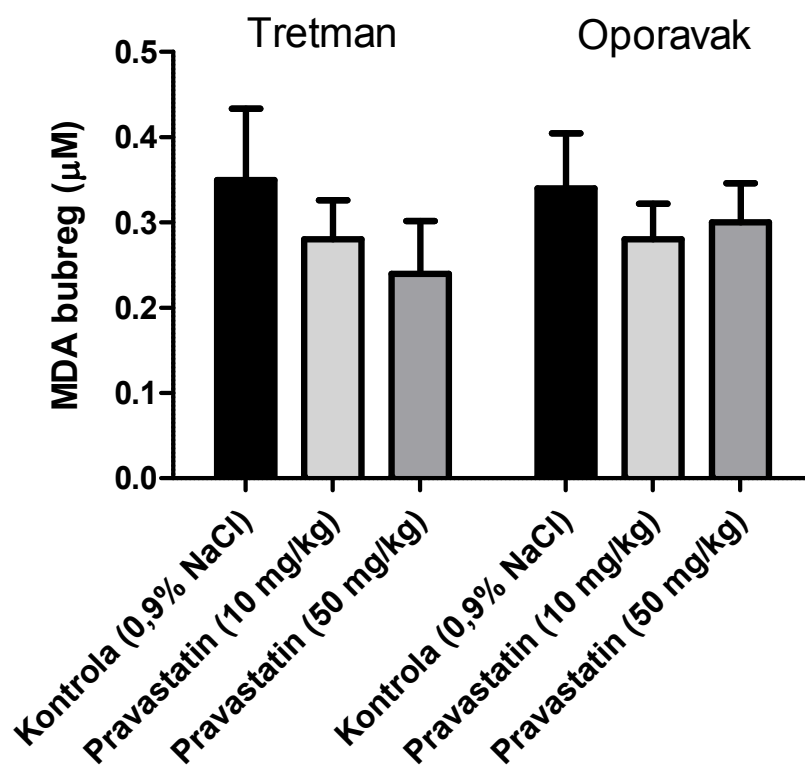
Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.





Slika 5.2.6 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.2.7 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.

#### 5.2.4 Učinci pravastatina na koncentraciju leptina u plazmi

Manja doza PRAV je uzrokovala smanjenje koncentracije leptina u plazmi za 20%, a veća povećanje za 22% (Tablica 5.2.4).

Nakon perioda oporavka je koncentracija leptina u plazmi u odnosu na kontrolu ostala smanjena u životinja koje su dobivale 10 mg/kg/dan PRAV (4%), a još se više i to statistički značajno povećala u onih koje su dobivale PRAV u dozi od 50 mg/kg/dan (235%,  $p < 0,0027$ ) (Tablica 5.2.4).

Tablica 5.2.4 Učinci pravastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Pravastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Pravastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Leptin ng/mL	Tretman <sup>2</sup>	8,12±5,04 (N=7) (100)	6,49±3,10 (N=8) (80)	9,89±4,95 (N=6) (122)	0,3735
	Oporavak <sup>3</sup>	3,32±1,94 (N=7) (100)	3,20±1,64 (N=6) (96)	<b>11,12±6,11</b> (N=5) (335)	0,0027

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Pravastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

### 5.3 Simvastatin (dvije doze) – pokus III

#### 5.3.1 Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

Obje doze SIMV su izazvale statistički značajan pad katalitičke aktivnosti PON1 u serumu za 18% ( $p < 0,0228$ ) te smanjenje aktivnosti PON1 u jetri za 24% i 12% (Tablica 5.3.1, slike 5.3.1 i 5.3.2).

Nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana je aktivnost PON1 u serumu štakora koji su dobivali SIMV u odnosu na kontrolu ostala smanjena za 12% i 4%, dok se u jetri povećala ovisno o dozi SIMV za 35% odnosno za 40% (Tablica 5.3.1, slike 5.3.1 i 5.3.2).

SIMV je u dozama od 10 i 50 mg/kg/dan doveo do povećanja katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi za 29% i 14%, a u jetri za 18% i 43% ( $p < 0,0220$ ) (Tablica 5.3.1, slike 5.3.3 i 5.3.4).

Po isteku perioda oporavka je aktivnost BuChE u odnosu na kontrolu ostala povećana u plazmi (17%) i u jetri (15% i 41%,  $p < 0,0335$ ) (Tablica 5.3.1, slike 5.3.3 i 5.3.4).

Tablica 5.3.1 Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Simvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg/dan	Simvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg/dan	p-vrijednost ANOVA
PON1 serum μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,33±0,07 (N=7) (100)	<b>0,27±0,03</b> (N=8) (82)	<b>0,27±0,03</b> (N=8) (82)	0,0228
	Oporavak <sup>3</sup>	0,25±0,03 (N=7) (100)	0,22±0,04 (N=7) (88)	0,24±0,07 (N=7) (96)	0,5196
PON1 jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,25±0,08 (N=7) (100)	0,19±0,07 (N=8) (76)	0,22±0,11 (N=7) (88)	0,4760
	Oporavak <sup>3</sup>	0,20±0,08 (N=7) (100)	0,27±0,08 (N=7) (135)	0,28±0,08 (N=7) (140)	0,1358
BuChE plazma μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,07±0,01 (N=7) (100)	0,09±0,02 (N=8) (129)	0,08±0,03 (N=8) (114)	0,4952
	Oporavak <sup>3</sup>	0,06±0,01 (N=7) (100)	0,07±0,02 (N=7) (117)	0,07±0,02 (N=7) (117)	0,6212
BuChE jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,28±0,06 (N=7) (100)	0,33±0,08 (N=8) (118)	<b>0,40±0,08</b> (N=8) (143)	0,0220
	Oporavak <sup>3</sup>	0,27±0,06 (N=7) (100)	0,31±0,08 (N=7) (115)	<b>0,38±0,06</b> (N=7) (141)	0,0335

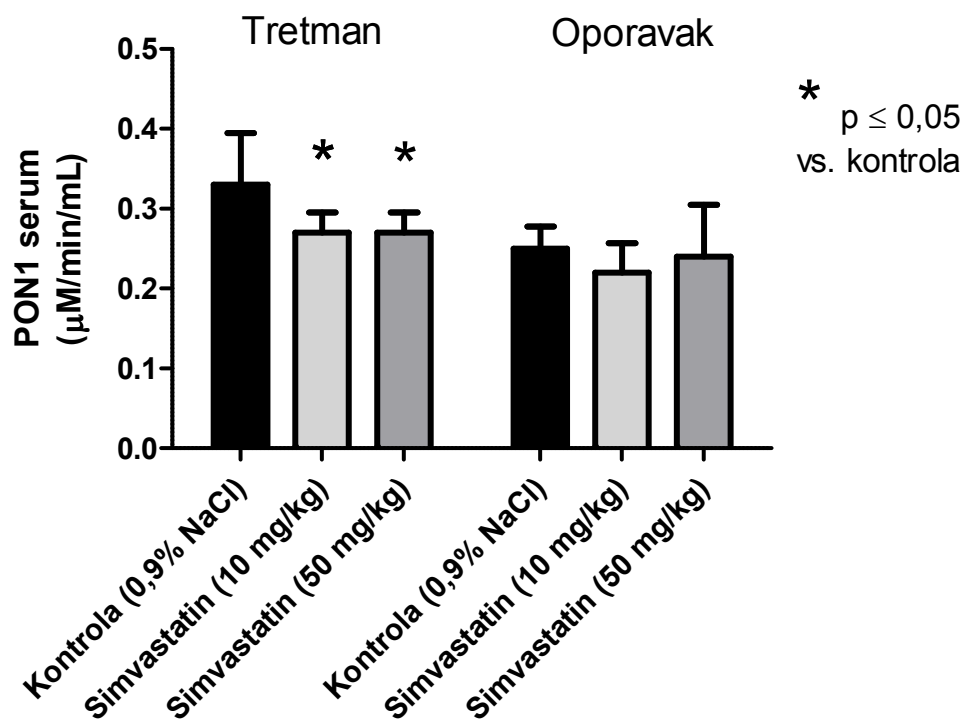
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

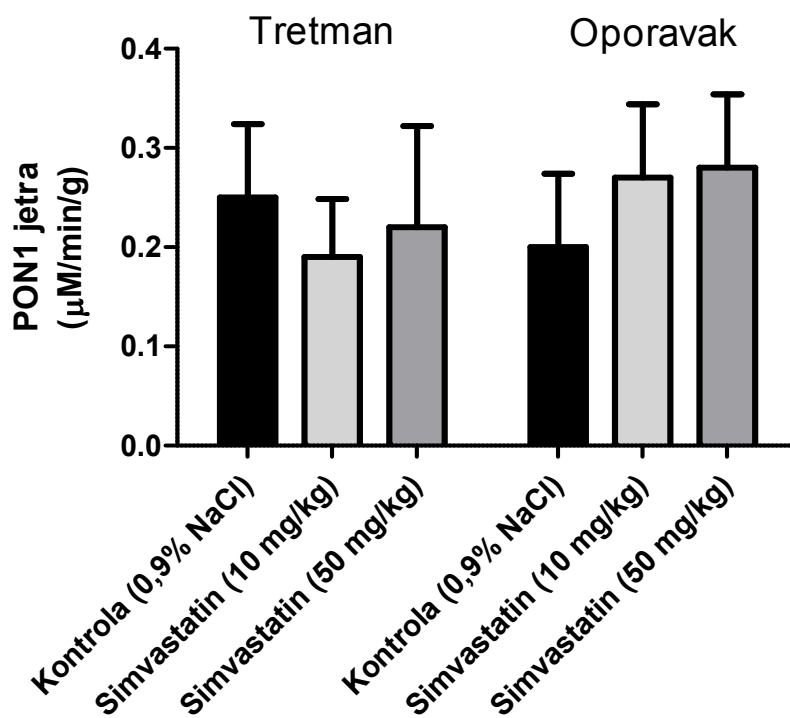
<sup>2</sup> Simvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

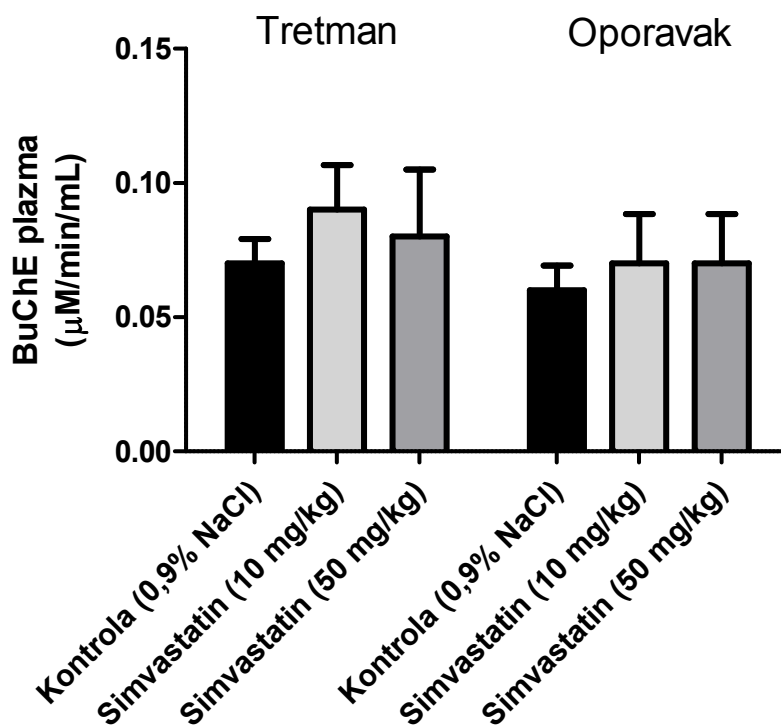


Slika 5.3.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana. Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

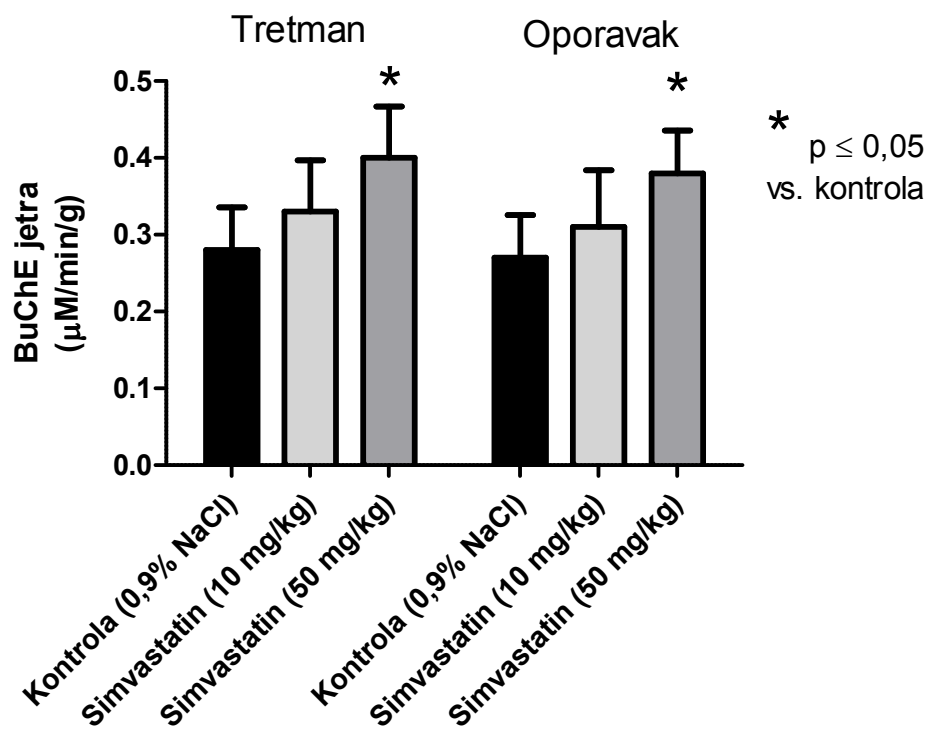


Slika 5.3.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.3.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana. Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.3.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



### 5.3.2 Učinci simvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi

Primjena SIMV u obje doze je u plazmi dovela do smanjenja koncentracije ukupnog kolesterola (14% i 6%), HDL (14%,  $p < 0,0161$  i 13%,  $p < 0,0161$ ), triacilglicerola (18% i 17%) i glukoze (47%,  $p < 0,0180$  i 4%). U štakora u kojih je primjenjivana manja doza SIMV koncentracija LDL je u plazmi bila smanjena za 19%, a u onih koje su dobivale veću dozu koncentracija LDL u plazmi se nije razlikovala od vrijednosti koncentracije izmjerenoj u kontrolnoj skupini životinja (Tablica 5.3.2).

Nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana učinak SIMV na lipide se uglavnom izgubio te su se u odnosu na kontrolu povećale koncentracije LDL (10% i 28%,  $p < 0,0334$ ), glukoze (63% i 72%) i triacilglicerola za 30% samo nakon primjene manje doze SIMV. Koncentracije ukupnog kolesterola i HDL nakon primjene 10 i 50 mg/kg/dan SIMV, kao i triacilglicerola u slučaju primjene SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan su se nakon perioda oporavka gotovo izjednačile sa kontrolom (Tablica 5.3.2).

Tablica 5.3.2 Učinci simvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Simvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Simvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Ukupni kolesterol mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,54±0,22 (N=7) (100)	1,33±0,19 (N=8) (86)	1,44±0,11 (N=8) (94)	0,0959
	Oporavak <sup>3</sup>	1,69±0,21 (N=7) (100)	1,64±0,23 (N=7) (97)	1,68±0,16 (N=7) (99)	0,8960
HDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,08±0,12 (N=7) (100)	<b>0,93±0,11</b> (N=7) (86)	<b>0,94±0,06</b> (N=8) (87)	0,0161
	Oporavak <sup>3</sup>	1,18±0,15 (N=7) (100)	1,13±0,18 (N=7) (96)	1,09±0,13 (N=7) (92)	0,5531
LDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,48±0,12 (N=7) (100)	0,39±0,08 (N=8) (81)	0,48±0,11 (N=8) (100)	0,1455
	Oporavak <sup>3</sup>	0,50±0,06 (N=7) (100)	0,55±0,10 (N=7)(110)	<b>0,64±0,12</b> (N=7)(128)	0,0334
Triacilgliceroli mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,93±0,22 (N=7) (100)	0,76±0,22 (N=8) (82)	0,77±0,19 (N=8) (83)	0,2209
	Oporavak <sup>3</sup>	0,93±0,17 (N=7) (100)	1,12±0,36 (N=7)(130)	0,82±0,24 (N=7) (88)	0,1290
Glukoza mM/L	Tretman <sup>2</sup>	6,94±3,80 (N=7) (100)	<b>3,66±1,09</b> (N=8) (53)	6,64±1,11 (N=8) (96)	0,0180
	Oporavak <sup>3</sup>	5,20±0,81 (N=7) (100)	8,47±2,17 (N=7)(163)	<b>8,93±3,86</b> (N=7) (172)	0,0299

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Simvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podebljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

### 5.3.3 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu

SIMV je u dnevnim dozama od 10 i 50 mg/kg doveo do pada koncentracije MDA u plazmi za 9% i statistički značajno za 39% ( $p < 0,0493$ ), srcu za 13% i 17%, jetri za 36% i 9%, te u bubregu za 21% i 17% (Tablica 5.3.3, slike 5.3.5, 5.3.6, 5.3.7 i 5.3.8).

Nakon perioda oporavka su koncentracije MDA ostale smanjene u plazmi i tkivima svih štakora koji su dobivali SIMV, te su u plazmi bile statistički značajno smanjene za 26% ( $p < 0,0010$ ) i 62% ( $p < 0,0010$ ), u srcu za 31% ( $p < 0,0204$ ) i 27%, u jetri za 14% i 10%, te u bubregu za 16% u obje eksperimentalne skupine (Tablica 5.3.3, slike 5.3.5, 5.3.6, 5.3.7 i 5.3.8).

Tablica 5.3.3 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Simvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Simvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
MDA plazma μM	Tretman <sup>2</sup>	4,71±1,76 (N=7) (100)	4,29±0,94 (N=8) (91)	<b>2,86±1,04</b> (N=6) (61)	0,0493
	Oporavak <sup>3</sup>	4,43±0,72 (N=7) (100)	<b>3,26±1,16</b> (N=7) (74)	<b>1,67±0,36</b> (N=7) (38)	<0,0010
MDA srce μM	Tretman <sup>2</sup>	0,23±0,04 (N=7) (100)	0,20±0,06 (N=8) (87)	0,19±0,04 (N=8) (83)	0,1683
	Oporavak <sup>3</sup>	0,26±0,06 (N=6) (100)	<b>0,18±0,06</b> (N=7) (69)	0,19±0,04 (N=7) (73)	0,0204
MDA jetra μM	Tretman <sup>2</sup>	0,22±0,07 (N=7) (100)	0,14±0,08 (N=7) (64)	0,20±0,04 (N=8) (91)	0,1822
	Oporavak <sup>3</sup>	0,21±0,02 (N=6) (100)	0,18±0,07 (N=5) (86)	0,19±0,06 (N=7) (90)	0,1491
MDA bubreg μM	Tretman <sup>2</sup>	0,24±0,04 (N=7) (100)	0,19±0,03 (N=6) (79)	0,20±0,01 (N=6) (83)	0,0455
	Oporavak <sup>3</sup>	0,25±0,03 (N=6) (100)	0,21±0,03 (N=7) (84)	0,21±0,04 (N=6) (84)	0,1355

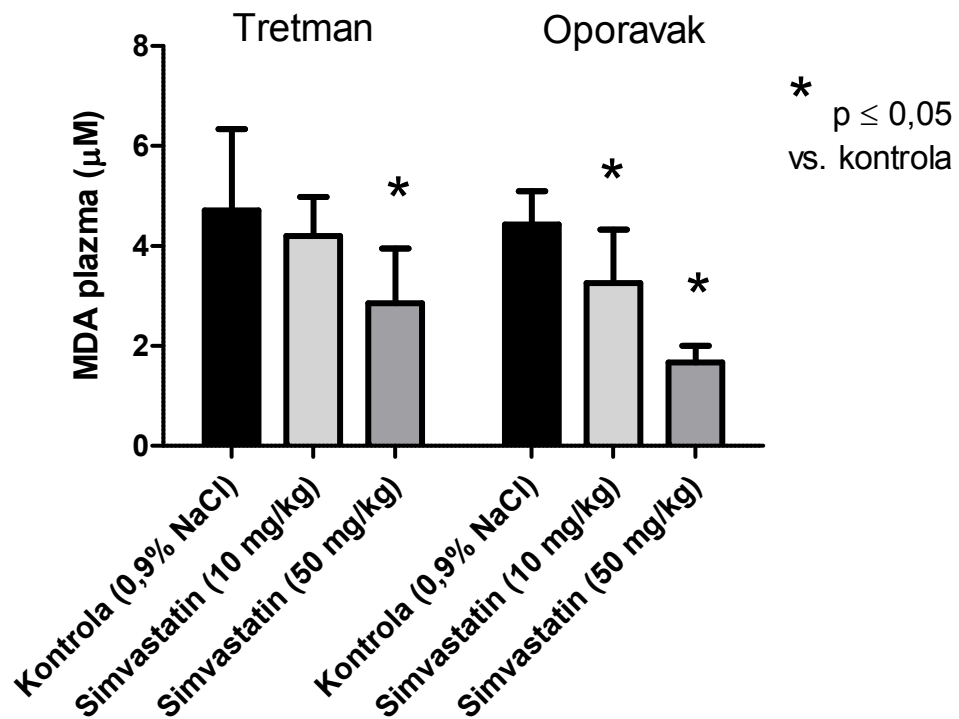
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Simvastatin je primjenjivan 21 dan.

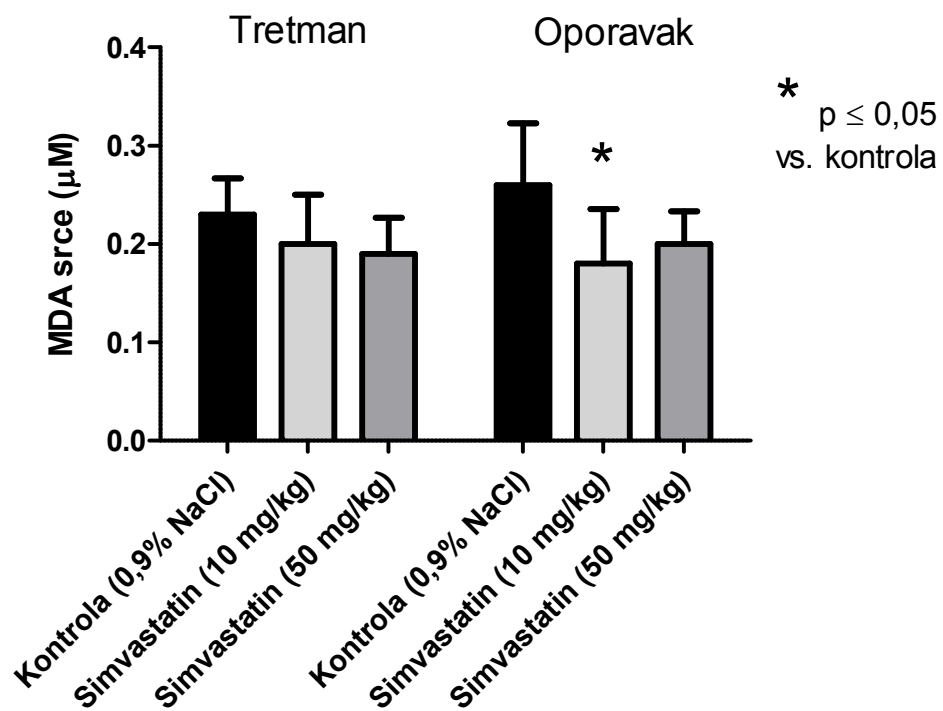
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).



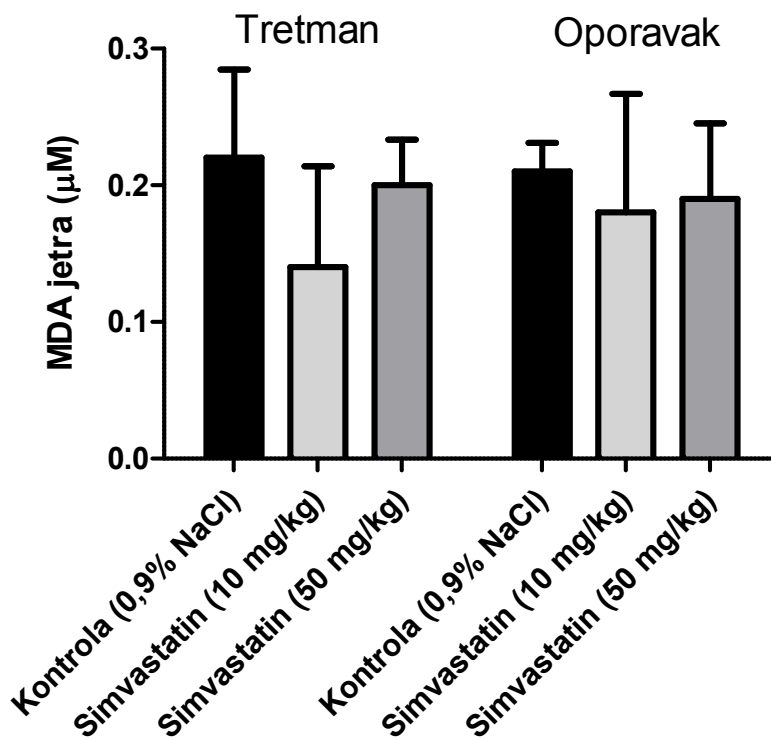
Slika 5.3.5 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



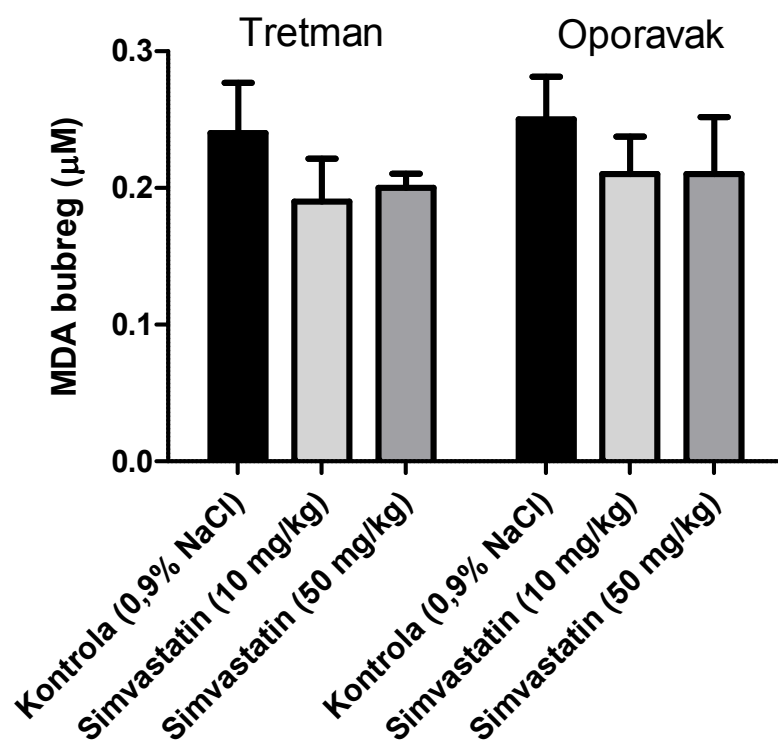
Slika 5.3.6 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.3.7 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.3.8 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.

### 5.3.4 Učinci simvastatina na koncentraciju leptina u plazmi

SIMV je nakon primjene u dozama od 10 i 50 mg/kg/dan doveo do smanjenja koncentracije leptina u plazmi za 40% ( $p < 0,0311$ ) i 21% (Tablica 5.3.4).

Nakon perioda oporavka se koncentracija leptina u plazmi u eksperimentalnoj skupini koja je dobivala manju dozu SIMV povećala za 54%, dok je u skupini koja je dobivala veću dozu SIMV ostala za 19% smanjena u odnosu na kontrolu (Tablica 5.3.4).

Tablica 5.3.4 Učinci simvastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Simvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	Simvastatin <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost ANOVA
Leptin ng/mL	Tretman <sup>2</sup>	27,34±9,20 (N=6) (100)	<b>16,36±7,99</b> (N=8) (60)	21,65±3,24 (N=8) (79)	0,0311
	Oporavak <sup>3</sup>	18,37±7,96 (N=8) (100)	28,27±13,78 (N=7) (154)	14,87±10,29 (N=7) (81)	0,0787

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Simvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno (ANOVA, Dunettov test).

## 5.4 Simvastatin (1 doza) – pokus IV

### 5.4.1 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu

Pod utjecajem SIMV se koncentracija MDA statistički značajno smanjila u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu za 18% ( $p < 0,0390$ ), 11% ( $p < 0,0399$ ), 9% ( $p < 0,0221$ ), 13% ( $p < 0,0256$ ) i 40% ( $p < 0,0222$ ) (Tablica 5.4.1, slike 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3, 5.4.4 i 5.4.5).

Vrijednost koncentracije MDA je u životinja koje su dobivale SIMV ostala smanjena i nakon perioda oporavka za 22% ( $p < 0,0204$ ), 17%, 9%, 13% i 21% (Tablica 5.4.1, slike 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3, 5.4.4 i 5.4.5).

Tablica 5.4.1 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Simvastatin <sup>1</sup> 10 mg/kg	p-vrijednost ( <i>t</i> -test)
MDA plazma μM	Tretman <sup>2</sup>	0,39±0,04 (N=8) (100)	<b>0,32±0,04</b> (N=9) (82)	0,0390
	Oporavak <sup>3</sup>	0,40±0,08 (N=8) (100)	<b>0,31±0,05</b> (N=9) (78)	0,0204
MDA srce μM	Tretman <sup>2</sup>	0,18±0,21 (N=8) (100)	<b>0,16±0,02</b> (N=9) (89)	0,0399
	Oporavak <sup>3</sup>	0,18±0,02 (N=8) (100)	0,15±0,02 (N=9) (83)	0,0517
MDA jetra μM	Tretman <sup>2</sup>	0,22±0,02 (N=8) (100)	<b>0,20±0,02</b> (N=9) (91)	0,0221
	Oporavak <sup>3</sup>	0,22±0,02 (N=8) (100)	0,20±0,01 (N=8) (91)	0,0605
MDA bubreg μM	Tretman <sup>2</sup>	0,23±0,02 (N=8) (100)	<b>0,20±0,02</b> (N=9) (87)	0,0256
	Oporavak <sup>3</sup>	0,23±0,03 (N=8) (100)	0,20±0,02 (N=9) (87)	0,1571
MDA mozak μM	Tretman <sup>2</sup>	0,15±0,05 (N=8) (100)	<b>0,09±0,03</b> (N=7) (60)	0,0222
	Oporavak <sup>3</sup>	0,14±0,03 (N=8) (100)	0,11±0,04 (N=9) (79)	0,1069

Relativne promjene (%) su u zagradama.

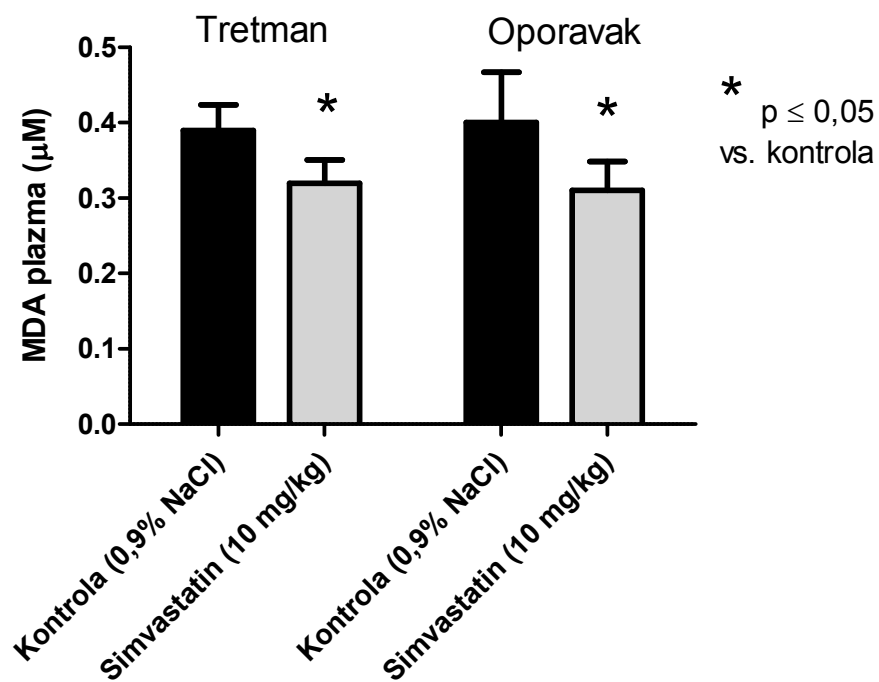
<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Simvastatin je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

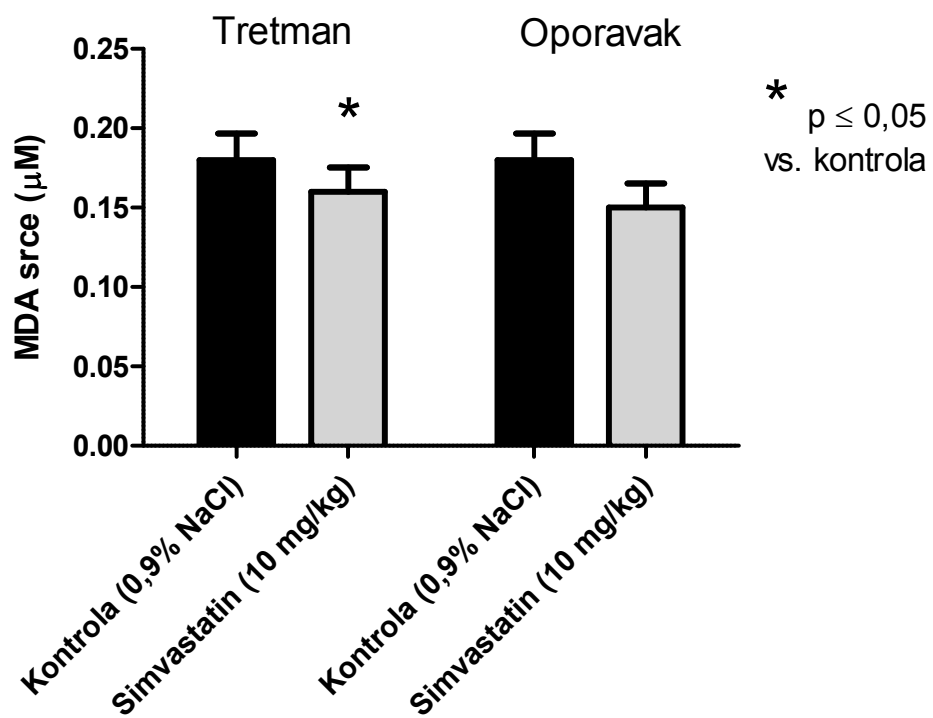
Podebljano – statistički značajno ( $p < 0,05$ ).





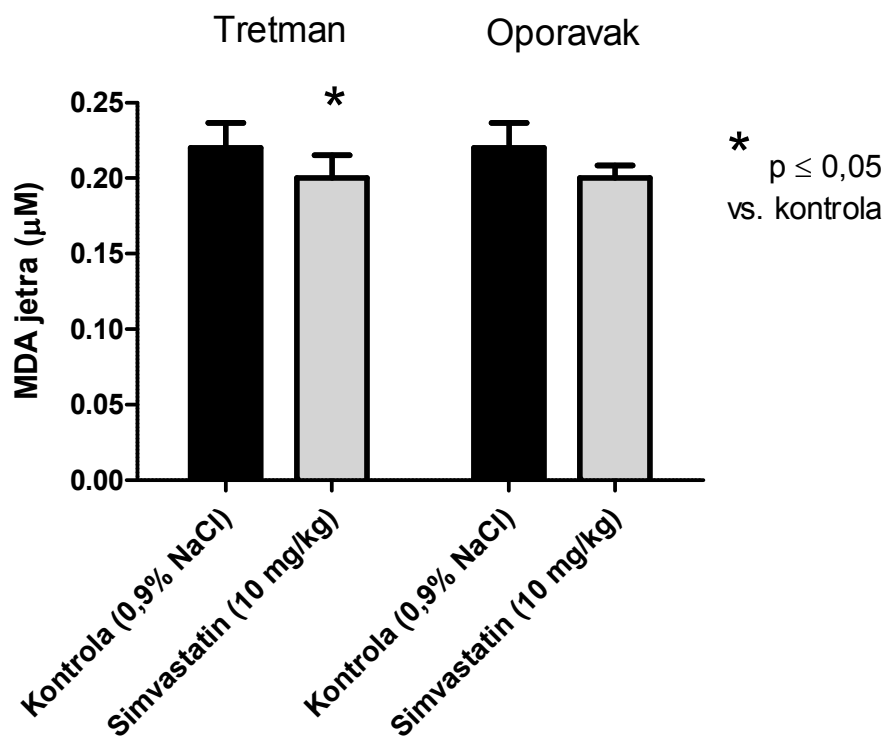
Slika 5.4.1 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



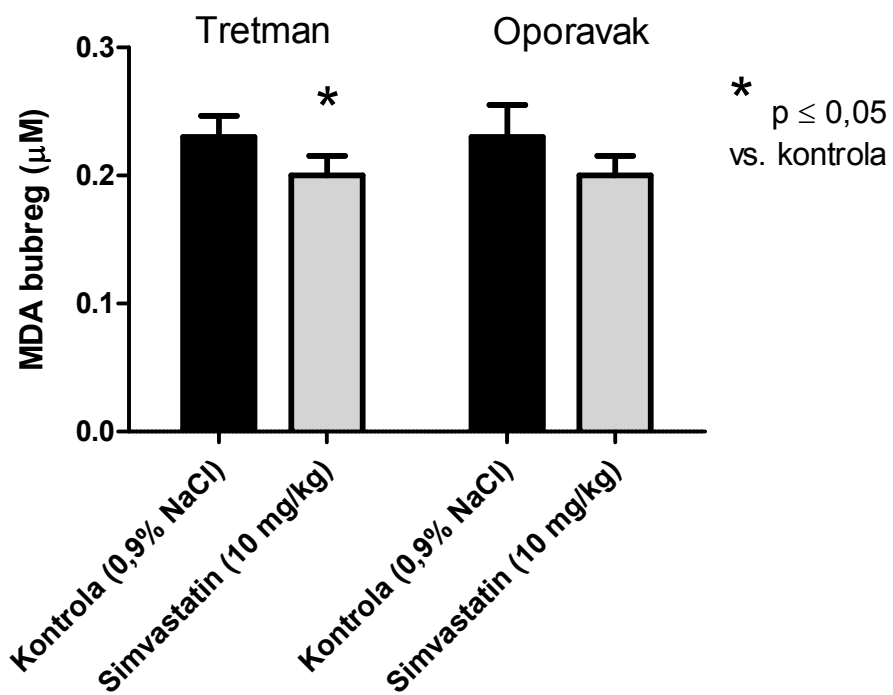
Slika 5.4.2 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



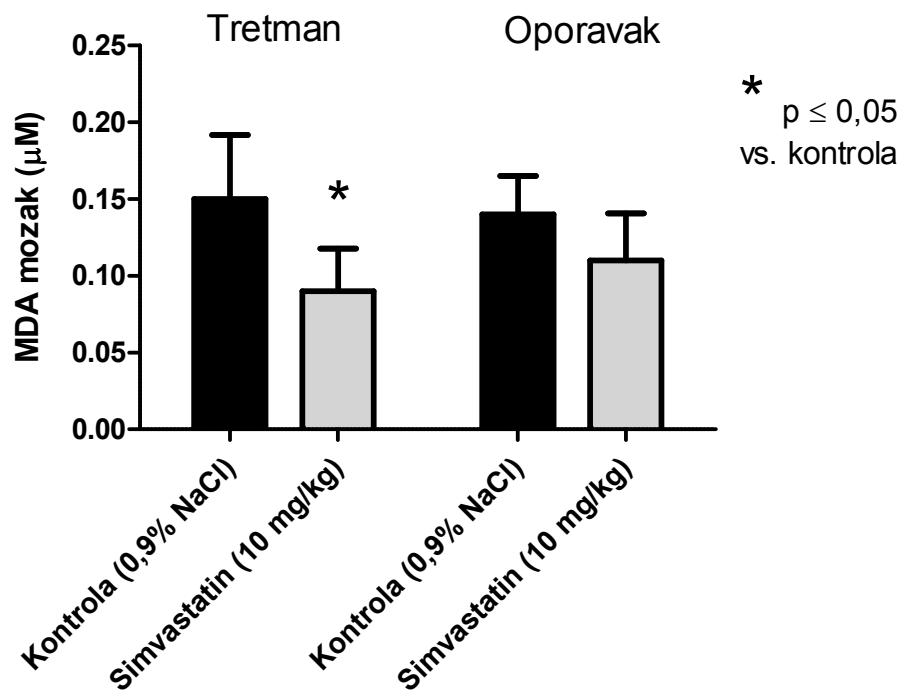
Slika 5.4.3 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



Slika 5.4.4 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



Slika 5.4.5 Koncentracija malondialdehida u mozgu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

## 5.5 Gemfibrozil – pokus V

### 5.5.1 Učinci gemfibrozila na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

GEM nije imao utjecaja na katalitičku aktivnost PON1 u serumu, dok se aktivnost PON1 u jetri pod utjecajem GEM-a u odnosu na kontrolu statistički značajno smanjila za 56% ( $p < 0,0009$ ) (Tablica 5.5.1, slike 5.5.1 i 5.5.2).

Nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana se u štakora koji su dobivali GEM aktivnost PON1 u serumu nije značajno promijenila, a u jetri je aktivnost PON1 bila povećana za 29% u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini (Tablica 5.5.1, slike 5.5.1 i 5.5.2).

Primjena GEM je dovela do porasta aktivnosti BuChE u plazmi (13%) i smanjenja aktivnosti BuChE u jetri (32%) (Tablica 5.5.1, slike 5.5.3 i 5.5.4).

Nakon perioda oporavka se aktivnost BuChE u plazmi i jetri životinja koje su dobivale GEM povećala u odnosu na vrijednosti izmjerene nakon prestanka tretmana, te je u plazmi aktivnost bila za 60% veća, a u jetri statistički značajno veća za 63% u odnosu na kontrolu ( $p < 0,0044$ ) (Tablica 5.5.1, slike 5.5.3 i 5.5.4).

Tablica 5.5.1 Učinci gemfibrozila na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Gemfibrozil <sup>1</sup> 50 mg/kg/dan	p-vrijednost (t-test)
PON1 serum μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,19±0,03 (N=6) (100)	0,20±0,01 (N=7) (105)	0,7530
	Oporavak <sup>3</sup>	0,26±0,01 (N=6) (100)	0,27±0,03 (N=6) (104)	0,7151
PON1 jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,27±0,02 (N=6) (100)	<b>0,12±0,02</b> (N=7) (44)	0,0009
	Oporavak <sup>3</sup>	0,34±0,06 (N=6) (100)	0,44±0,05 (N=7) (129)	0,2289
BuChE plazma μM/min/mL	Tretman <sup>2</sup>	0,08±0,02 (N=6) (100)	0,09±0,04 (N=7) (113)	0,3552
	Oporavak <sup>3</sup>	0,05±0,02 (N=6) (100)	0,08±0,02 (N=6) (160)	0,0534
BuChE jetra μM/min/g	Tretman <sup>2</sup>	0,22±0,09 (N=6) (100)	0,15±0,05 (N=7) (68)	0,1214
	Oporavak <sup>3</sup>	0,19±0,06 (N=6) (100)	<b>0,31±0,06</b> (N=7) (163)	0,0044

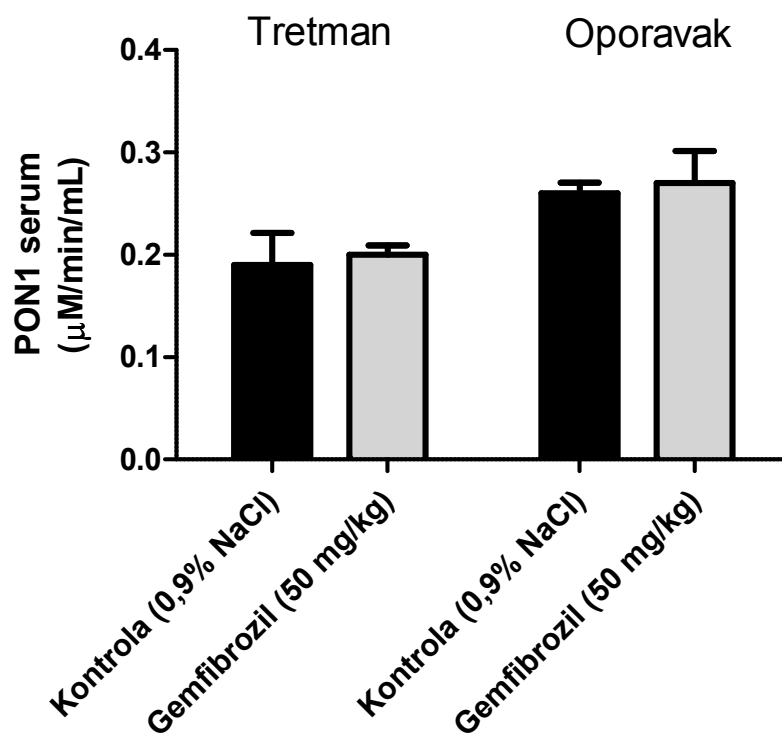
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

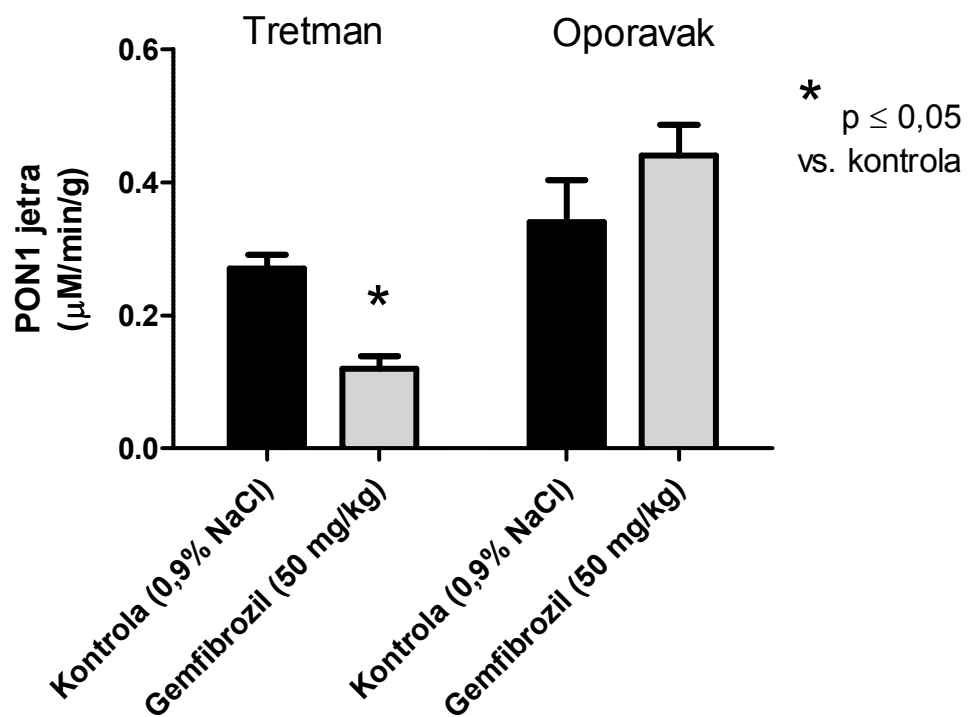
<sup>2</sup> Gemfibrozil je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podobljano – statistički značajno ( $p < 0,05$ ).



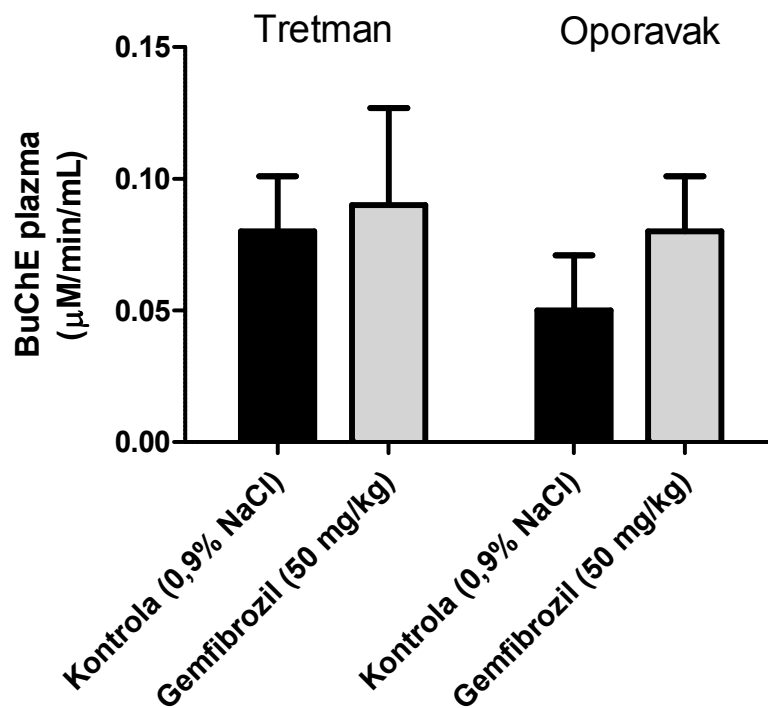
Slika 5.5.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana. Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



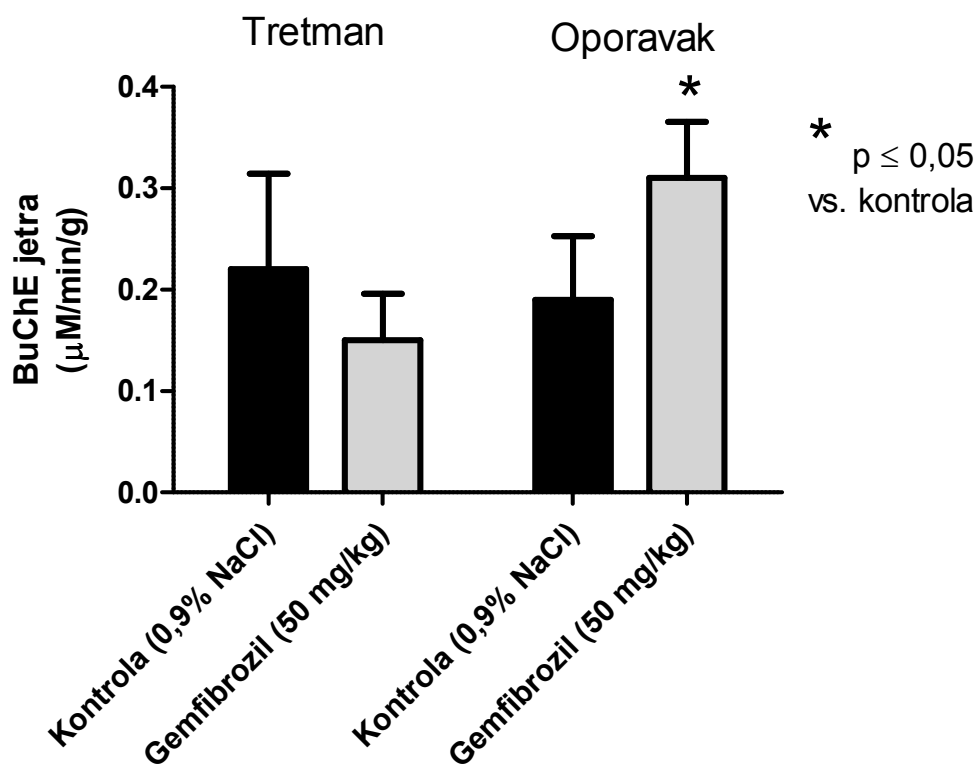
Slika 5.5.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.





Slika 5.5.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana. Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



Slika 5.5.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

### 5.5.2 Učinci gemfibrozila na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi

Štakori koji su dobivali GEM su u plazmi imali statistički značajno veću koncentraciju ukupnog (30%,  $p < 0,0018$ ), HDL (39%,  $p < 0,0005$ ) i LDL kolesterola (37%,  $p < 0,0353$ ), dok se koncentracija triacilglicerola statistički značajno smanjila za 32% ( $p < 0,0020$ ), a glukoze za 24% (Tablica 5.5.2).

Nakon prestanka primjene GEM i isteka 10 dana perioda oporavka zadržale su se statistički značajno povećane vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola i HDL (28%,  $p < 0,0369$  i 35%,  $p < 0,0185$ ), povećana koncentracija LDL (15%) te smanjena koncentracija triacilglicerola (11%) u odnosu na kontrolu, dok se koncentracija glukoze u plazmi s kontrolom izjednačila (Tablica 5.5.2).

Tablica 5.5.2 Učinci gemfibrozila na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Gemfibrozil <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost (t-test)
Ukupni kolesterol mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,64±0,10 (N=6) (100)	<b>2,14±0,08</b> (N=7) (130)	0,0018
	Oporavak <sup>3</sup>	1,44±0,10 (N=6) (100)	<b>1,84±0,13</b> (N=7) (128)	0,0369
HDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,14±0,08 (N=6) (100)	<b>1,59±0,05</b> (N=7) (139)	0,0005
	Oporavak <sup>3</sup>	1,00±0,08 (N=6) (100)	<b>1,35±0,10</b> (N=7) (135)	0,0185
LDL mM/L	Tretman <sup>2</sup>	0,48±0,05 (N=6) (100)	<b>0,66±0,05</b> (N=7) (137)	0,0353
	Oporavak <sup>3</sup>	0,45±0,03 (N=6) (100)	0,52±0,05 (N=7) (115)	0,3038
Triacilgliceroli mM/L	Tretman <sup>2</sup>	1,06±0,06 (N=6) (100)	<b>0,72±0,06</b> (N=7) (68)	0,0020
	Oporavak <sup>3</sup>	1,16±0,20 (N=6) (100)	1,03±0,08 (N=7) (89)	0,5214
Glukoza mM/L	Tretman <sup>2</sup>	7,77±2,81 (N=6) (100)	5,88±0,87 (N=7) (76)	0,1185
	Oporavak <sup>3</sup>	13,35±5,22 (N=6) (100)	13,43±3,48 (N=7) (101)	0,9751

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Gemfibrozil je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podebljano – statistički značajno ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.3 Učinci gemfibrozila na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu

GEM je uzrokovao statistički značajno povećanje koncentracije MDA u plazmi (52%,  $p < 0,0078$ ), srcu (47%,  $p < 0,0001$ ), jetri (42%,  $p < 0,0352$ ) i bubregu (30%,  $p < 0,0001$ ) (Tablica 5.5.3, slike 5.5.5, 5.5.6, 5.5.7 i 5.5.8).

Nakon prestanka primjene GEM i isteka perioda oporavka koncentracija MDA u plazmi, srcu, jetri i bubregu je još uvijek bila povećana (10-74%) u usporedbi s vrijednostima koncentracije izmjenjenim u kontroli, od čega je povećanje bilo statistički značajno u plazmi (74%,  $p < 0,0001$ ) i u srcu (25%,  $p < 0,0113$ ) (Tablica 5.5.3, slike 5.5.5, 5.5.6, 5.5.7 i 5.5.8).

Tablica 5.5.3 Učinci gemfibrozila na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Gemfibrozil <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost (t-test)
MDA plazma μM	Tretman <sup>2</sup>	0,91±0,23 (N=5) (100)	<b>1,38±0,19</b> (N=5) (152)	0,0078
	Oporavak <sup>3</sup>	0,23±0,03 (N=5) (100)	<b>0,40±0,03</b> (N=6) (174)	<0,0001
MDA srce μM	Tretman <sup>2</sup>	0,19±0,01 (N=6) (100)	<b>0,28±0,03</b> (N=6) (147)	<0,0001
	Oporavak <sup>3</sup>	0,20±0,02 (N=5) (100)	<b>0,25±0,03</b> (N=6) (125)	0,0113
MDA jetra μM	Tretman <sup>2</sup>	0,19±0,02 (N=6) (100)	<b>0,27±0,02</b> (N=6) (142)	0,0352
	Oporavak <sup>3</sup>	0,19±0,02 (N=6) (100)	0,22±0,02 (N=6) (116)	1,0000
MDA bubreg μM	Tretman <sup>2</sup>	0,20±0,01 (N=6) (100)	<b>0,26±0,01</b> (N=7) (130)	<0,0001
	Oporavak <sup>3</sup>	0,20±0,01 (N=6) (100)	0,22±0,02 (N=6) (110)	0,0533

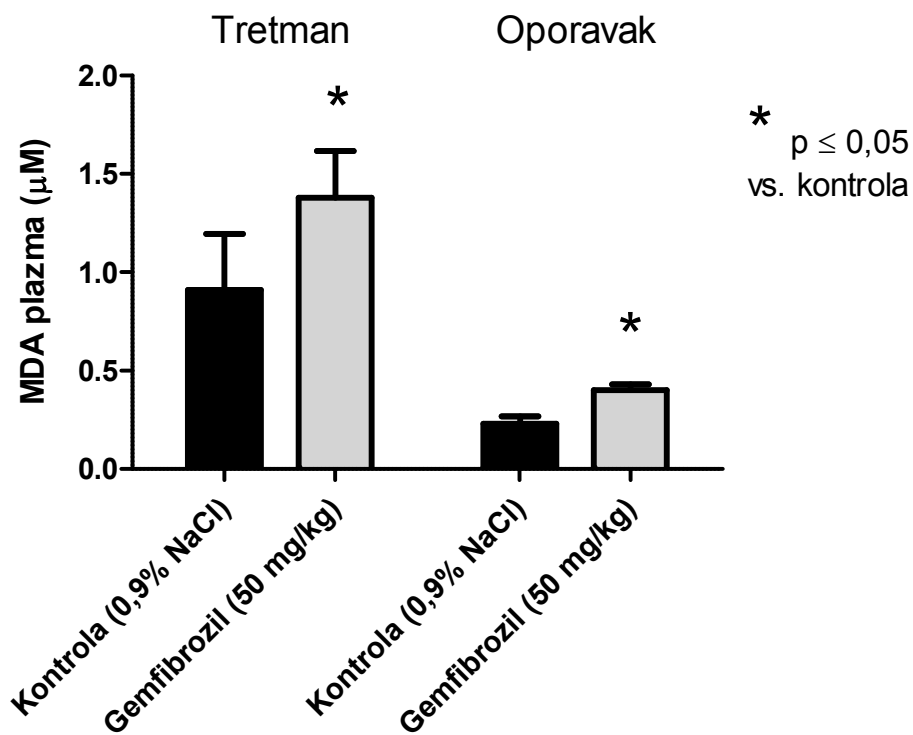
Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Gemfibrozil je primjenjivan 21 dan.

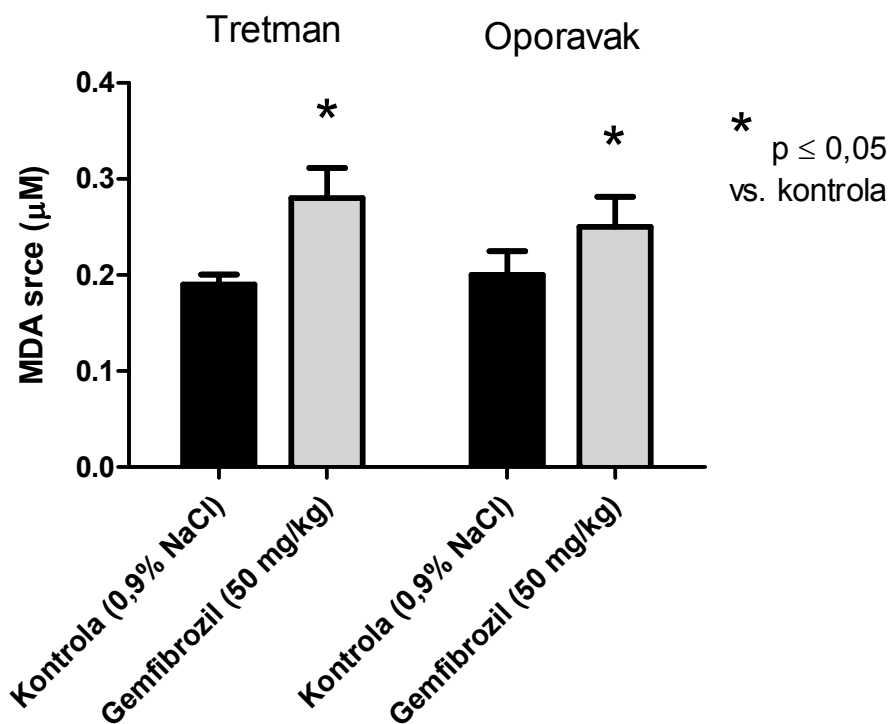
<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

Podebljano – statistički značajno ( $p < 0,05$ ).



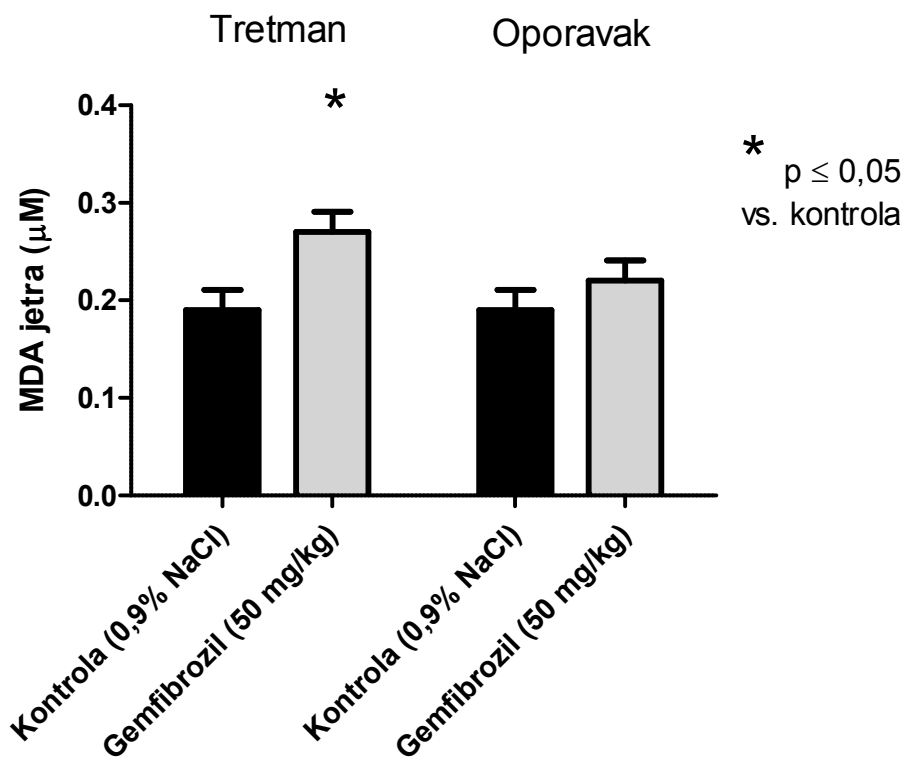
Slika 5.5.5 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



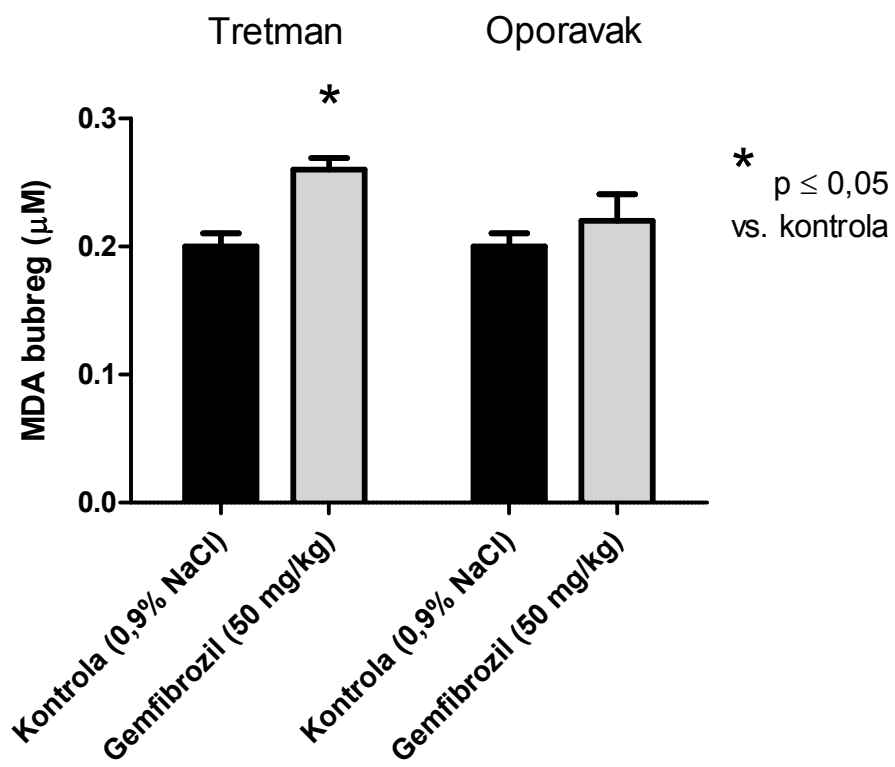
Slika 5.5.6 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



Slika 5.5.7 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.



Slika 5.5.8 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana.

Rezultati (vrijednosti) su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  S.D.



#### 5.5.4 Učinci gemfibrozila na koncentraciju leptina u plazmi

Primjena GEM nije utjecala na koncentraciju leptina u plazmi (Tablica 5.5.4).

Nakon perioda oporavka se koncentracija leptina u plazmi štakora koji su dobivali GEM povećala za 39% u odnosu na kontrolu (Tablica 5.5.4).

Tablica 5.5.4 Učinci gemfibrozila na koncentraciju leptina u plazmi štakora.

Varijabla	Dio pokusa	Kontrola <sup>1</sup> 0,9% NaCl	Gemfibrozil <sup>1</sup> 50 mg/kg	p-vrijednost (t-test)
Leptin ng/mL	Tretman <sup>2</sup>	15,92±5,03 (N=5) (100)	15,26±4,82 (N=6) (96)	0,8304
	Oporavak <sup>3</sup>	25,66 ±11,52 (N=6) (100)	35,67± 15,78 (N=6) (139)	0,2379

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

<sup>2</sup> Gemfibrozil je primjenjivan 21 dan.

<sup>3</sup> Oporavak je trajao 10 dana.

## 6.0 RASPRAVA

Iz rezultata je vidljivo da su obje doze atorvastatina izazvale tendenciju povećanja katalitičke aktivnosti PON1 u serumu, i to za 10% nakon primjene manje doze te statistički značajno nakon veće doze (29%,  $p < 0,05$ ). Statistički značajno povećanje katalitičke aktivnosti istog enzima nakon primjene obje doze atorvastatina izmjereno je također i u jetri (26% i 40%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 5.1.1, slike 5.1.1 i 5.1.2) u odnosu na kontrolu. Nakon višekratne primjene obje doze simvastatina rezultati su bili suprotni. Tendencija pada aktivnosti enzima u serumu nakon primjene obje doze je bila ista i statistički značajna (za 18%,  $p < 0,05$ ), dok je u jetri tendencija smanjenja aktivnosti PON1 za 24% izmjerena nakon primjene manje te za 12% nakon primjene veće doze simvastatina (Tablica 5.3.1, slike 5.3.1 i 5.3.2). Učinci pravastatina na aktivnost PON1 u serumu su bili različiti s obzirom na primijenjenu dozu. U serumu je manja doza izazvala tendenciju pada aktivnosti PON1 za 21%, a veća statistički značajan porast aktivnosti enzima (21%,  $p < 0,05$ ). U isto vrijeme, obje doze su izazvale statistički značajno povećanje aktivnosti PON1 u jetri (28% manja doza,  $p < 0,05$  i 37% veća doza,  $p < 0,05$ ) (Tablica 5.2.1, slike 5.2.1 i 5.2.2). Prema tome smjer kretanja aktivnosti PON1 u serumu i jetri sličan je nakon primjene atorvastatina i simvastatina, a različit nakon primjene pravastatina. Nakon perioda oporavka statistički značajno veće aktivnosti PON1 izmjerene su u jetri nakon primjene obje doze atorvastatina (43% i 29%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 5.1.1, slika 5.1.2). Aktivnost PON1 u jetri u odnosu na kontrolu je pokazala tendenciju porasta i nakon perioda oporavka u pokusu s obje doze pravastatina za 15% i 10% (Tablica 5.2.1, slika 5.2.2) te simvastatina za 35% i 40% (Tablica 5.3.1, slika 5.3.2).

Atorvastatin je u pokusu I u manjoj dozi statistički značajno povećao koncentraciju ukupnog kolesterola (24%), HDL (17%) i LDL (55%) ( $p < 0,05$ ). Pri primjeni veće doze atorvastatina postoji sklonost povećanju koncentracije LDL čestica (24%), dok su vrijednosti koncentracije ukupnog kolesterola i HDL čestica ostale nepromijenjene (Tablica 5.1.2). Pravastatin je u manjoj dozi statistički značajno smanjio koncentraciju HDL-a (smanjenje od 23% u odnosu na kontrolu,  $p < 0,05$ ) i umjereno smanjio vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola (za 15%) (Tablica 5.2.2), dok je simvastatin u obje doze statistički značajno smanjio samo koncentraciju HDL čestica u plazmi (14% i 13%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 5.3.2). Ono što je uočljivo u ovim rezultatima je da su pad ili porast vrijednosti koncentracije HDL bili praćeni istosmjernim promjenama aktivnosti PON1.

Prema literaturi, i klinički podaci i eksperimentalni podaci dobiveni na životinjama pokazuju da učinci statina na aktivnost PON1 i koncentracije pojedinih lipida plazme nisu jedinstveni. U pokusima na štakorima u trajanju od 3 tjedna cerivastatin, fluvastatin i pravastatin su pokazali različitu sklonost smanjenja plazmatske aktivnosti PON1 (2, 201). Najmanju tendenciju pada aktivnosti PON1 su izazvale obje doze cerivastatina (16,1% kod doze od 0,03 mg/kg dnevno, te 11,6% kod doze 0,3 mg/kg/dan) (2). Mala doza fluvastatina (2 mg/kg/dan), kao i pravastatin u dozama od 4 i 40 mg/kg/dan nisu utjecali na aktivnost PON1, dok je veća doza fluvastatina (20 mg/kg/dan) izazvala pad aktivnosti od 23,6% (201). Suprotno rezultatima u ovoj disertaciji, Beltowski i sur. nakon primjene cerivastatina,

fluvastatina i pravastatina u normolipidemičnih štakora nisu dokazali promjene u koncentracijama HDL i ukupnog kolesterola (2, 201). U hiperkolesterolemičkih kunića je atorvastatin u dozi od 0,3 mg/kg dnevno tijekom 4 tjedna primjene izazvao statistički značajan porast serumske aktivnosti PON1 u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (202).

Klinički podaci o utjecaju statina na PON1 i pojedine lipidne frakcije tijekom njihove primjene u osoba s hiperlipidemijom su kao i u pokusima na životinjama proturječni. Tako je atorvastatin (10 mg dnevno/6 mjeseci) izazvao nekoliko učinaka: statistički značajan pad koncentracije ukupnog i LDL-kolesterola u serumu bez promjene vrijednosti koncentracije triacilglicerola i HDL čestica, sklonost smanjenju citotoksičnog učinka oksidacijskog stresa u limfocitima izoliranim iz periferne krvi pacijenata, te statistički značajno povećanje katalitičke aktivnosti PON1 (165). Suprotne rezultate su pokazali pokusi Tsimihodimosia i sur., koji u bolesnika sa hiperlipidemijom i na terapiji atorvastatinom (20 mg dnevno/4 mjeseca) nisu dokazali promjenu aktivnosti PON1 unatoč korekciji poremećenog lipidnog statusa (203). Učinci simvastatina na aktivnost PON1 su također različiti. Statistički značajan porast aktivnosti PON1 od 20%, te statistički značajan pad koncentracije LDL, ukupnog kolesterola, triacilglicerola i oksidiranih lipida dokazani su u pacijenata s hiperkolesterolemijom nakon primjene simvastatina (20 mg dnevno) tijekom 4 mjeseca (55). U istih pacijenata simvastatin nije utjecao na koncentracije HDL i apo A-I u plazmi (55). U pokusu Balogha i sur. (204) primjena simvastatina u dozi od 20 mg dnevno tijekom mjesec dana u bolesnika s hiperlipoproteinemijom nije izazvala statistički značajne promjene plazmatske koncentracije HDL i aktivnosti PON1. Ista doza simvastatina je u pokusu Muačević-Katanec i sur. (205) u serumu pacijenata s hiperlipoproteinemijom izazvala tendenciju porasta aktivnosti PON1 od 18% na kraju trećeg i šestog mjeseca terapije, bez promjena koncentracije HDL. Na temelju rezultata Balogha i sur. (204) i Muačević-Katanec i sur. (205), čini se da učinci simvastatina na aktivnost PON1 nisu ovisni o dužini njegove primjene. Sličan zaključak, da kratkotrajna primjena simvastatina (40 mg dnevno) ili benzafibrata (400 mg dnevno) tijekom 8 tjedana, ili njihova kombinacija ne utječe na aktivnost PON1 u pacijenata sa šećernom bolesti tipa 2, dokazana je i u pokusima Dullaarta i sur. (206).

Za sada još uvijek nije poznat točan mehanizam djelovanja statina na katalitičku aktivnost PON1. Postoje pretpostavke kojima se mogu pokušati objasniti rezultati dobiveni u ovom radu.

Činjenica je da se PON1 u krvi prenosi najvećim dijelom u sastavu HDL, a manjim dijelom u sklopu hilomikrona (59) i VLDL čestica (60). Isto je tako činjenica da vezanje PON1 za VLDL čestice može postati značajno u stanjima smanjene koncentracije HDL u plazmi (207). S obzirom da HDL, a u manjoj mjeri i VLDL čestice kao i hilomikroni potiču izlučivanje PON1 iz hepatocita, te da joj pružaju okoliš u kojem enzim ima optimalnu stabilnost i katalitičku aktivnost, promjena njihovog sastava i/ili koncentracije u plazmi tijekom primjene statina bi mogla imati utjecaj na aktivnost PON1 u krvi, bilo na način da je povećava ili smanjuje.

Pokus *in vitro* su pokazali da statini potiskuju aktivnost promotorske regije PON1 gena u koncentracijama koje odgovaraju kliničkim podacima (208, 72). U pokusima na kulturi stanica je

dokazano da je upravo simvastatin najaktivniji represor gena za PON1 u odnosu na pravastatin i fluvastatin (72). Stoga se tendencija pada aktivnosti PON1 u serumu i jetri izmjerena nakon primjene obje doze simvastatina u pokusu III može protumačiti upravo njegovim inhibicijskim djelovanjem na promotorsku regiju gena za PON1, tim više što je nakon perioda oporavka u odnosu na kontrolu aktivnost PON1 u jetri pokazala sklonost porasta za 35% i 40% nakon obje doze (Tablica 5.3.1, slike 5.3.1 i 5.3.2). S obzirom na činjenicu da su atorvastatin i pravastatin u pokusima I odnosno II izazvali statistički značajan porast aktivnosti PON1 u jetri (za 26% i 40% te 28% i 37%,  $p < 0,05$ ) (Tablice 5.1.1 i 5.2.1, slike 5.1.2 i 5.2.2), utjecaj pojedinih statina na promotorsku regiju PON1 gena vjerojatno je različit. Različitosti u eksperimentalnim i kliničkim podacima koje se odnose na aktivnost PON1 i koncentracije HDL i LDL mogu se protumačiti na još 2 načina: 1) mogućnosti da je aktivnost serumske PON1 regulirana još nekim drugim genom, uključivo i onima za apoproteine, te 2) smanjenom aktivnost PON1 zbog smanjenja koncentracije oksidiranih lipoproteinskih čestica u krvi tijekom primjene statina.

Moguće objašnjenje za statinima uzrokovanu promjenu aktivnosti PON1 bila bi i aktivacija PPAR $\alpha$  receptora putem inhibicije izoprenilacije određenih signalnih molekula (209). Prema nekim autorima, antilipidni bi lijekovi putem aktivacije PPAR $\alpha$  receptora posredovali promjenu sinteze apoA-I koji kao jedna od komponenti HDL čestica pomažu sekreciju PON1 iz hepatocita te sudjeluju u održavanju stabilnosti i optimalne katalitičke aktivnosti PON1 (57). Ovim bi se procesom dakle posljedično promijenila i aktivnost PON1 u serumu. Beltowski i sur. te Berthou i sur. smatraju da u glodavaca, za razliku od ljudi, PPAR $\alpha$  agonisti inhibiraju sintezu apoA-I u jetri (201, 210). Stoga je moguće, slično pretpostavci Beltowskog i sur., da su u ovom radu simvastatin u obje doze, te pravastatin u manjoj dozi putem aktivacije PPAR $\alpha$  receptora inhibirali sintezu apoA-I, a time i negativno djelovali na aktivnost PON1. Obzirom na činjenicu da atorvastatin nije izazvao smanjenje koncentracije HDL i da nije smanjio aktivnost PON1, moguće je da pojedini predstavnici statina nemaju jednaki agonistički učinak na PPAR $\alpha$  receptore. Ovu pretpostavku potkrepljuju raniji rezultati Steinera i sur. (2001), koji su pokazali da primjena fluvastatina povećava, a ne smanjuje sadržaj apoA-I u jetri štakora (211).

Samo u slučaju simvastatina može se ponuditi još jedan mogući uzrok pada aktivnosti PON1 dobiven u trećem pokusu ovog rada. Budući da PON1 sudjeluje u hidrolizi spojeva s laktonskim prstenom kojima pripada i simvastatin (212), moguće je da je smanjenje katalitičke aktivnosti PON1 koje je dokazano nakon njegove višekratne primjene (pokus III) jednostavno odraz sudjelovanja PON1 u procesu hidrolize ovog antilipidnog lijeka. Prema tome, smanjenje aktivnosti PON1 tijekom primjene statina može biti posljedica združenih različitih mehanizama njihovog djelovanja.

S obzirom na činjenicu da su navedena istraživanja utjecaja statina na aktivnost PON1 provedena u osoba s poremećenim metabolizmom lipida, te da hiperlipidemija sama po sebi uzrokuje oksidacijski stres i smanjuje aktivnost PON1 (77), moguće je da je porast aktivnosti PON1 dokazan u nekih pacijenata na statinima rezultat ne samo njihovog djelovanja na poremećeni status lipida već i

njihovog antioksidacijskog učinka. Smanjenje plazmatske koncentracije LDL lipoproteina, odnosno čestica podložnih oksidacijskoj modifikaciji, izazvano statinima, kao i direktni antioksidacijski učinak tih lijekova (213), mogli bi sinergistički djelovati na porast aktivnosti PON1 u spomenutim kliničkim istraživanjima. Rezultati istraživanja Paragha i sur. koji su uočili da atorvastatin u osoba s hiperkolesterolemijom povećava aktivnost, ali ne i koncentraciju PON1 govori u prilog ove pretpostavke (214).

Poznato je da je MDA indikator oksidacije lipida i oksidacijskog stresa. Rezultati pokusa u ovom radu jasno pokazuju da nakon primjene obje doze atorvastatina postoji tendencija smanjenja koncentracije MDA u srcu (18%), jetri (23% i 14%) i bubregu (9% i 17%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 5.1.3, slike 5.1.5, 5.1.6 i 5.1.7), kao i nakon primjene obje doze pravastatina u jetri (17% i 11%) i u bubregu (20% i 31%) (Tablica 5.2.3, slike 5.2.6 i 5.2.7). Zanimljiv je podatak da u srcu manja doza pravastatina nije promjenila koncentraciju MDA u odnosu na kontrolu, dok je veća doza pokazala tendenciju porasta koncentracije MDA od 16% (Tablica 5.2.3, slika 5.2.5). Antioksidacijski učinak je bio najizraženiji nakon primjene obje doze simvastatina (pokus III), te u ponovljenom pokusu u kojem je primijenjeno samo 10 mg/kg simvastatina dnevno (pokus IV). Pri primjeni manje doze simvastatina u pokusu III uočena je tendencija smanjenja koncentracije MDA u plazmi za 9%, u srcu za 13%, u jetri za 36% i u bubregu za 21% (Tablica 5.3.3, slike 5.3.5, 5.3.6, 5.3.7 i 5.3.8). Pri primjeni veće doze simvastatina u pokusu III izmjereno je statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u plazmi za 39% ( $p < 0,05$ ), dok su vrijednosti MDA u srcu i bubregu pokazivale jednaku tendenciju smanjenja od 17% (Tablica 5.3.3, slike 5.3.5, 5.3.6, 5.3.7 i 5.3.8). Zbog provjere dobivenih rezultata s obje doze simvastatina (pokus III), ponovljen je pokus s manjom dozom od 10 mg/kg/dan (pokus IV), koji je potvrdio prethodno dobivene rezultate. To znači da je statistički značajan pad ( $p < 0,05$ ) koncentracije MDA izmjeren u plazmi (za 18%), srcu (za 11%), jetri (za 9%), bubregu za 13% te u mozgu za 40% u odnosu na kontrolu (Tablica 5.4.1, slike 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3, 5.4.4 i 5.4.5). Nakon perioda oporavka od 10 dana (pokus III), statistički značajno manje koncentracije MDA u odnosu na kontrolu izmjerene su u plazmi nakon primjene manje (za 26%,  $p < 0,05$ ) i veće doze (za 62%,  $p < 0,05$ ) simvastatina (Tablica 5.3.3, slika 5.3.5). Budući da su vrijednosti koncentracije MDA nakon perioda oporavka bile manje i u odnosu na koncentracije MDA izmjerene po završetku primjene lijeka, može se zaključiti da antioksidacijski učinak simvastatina ne iščezava istovremeno s prestankom njegove primjene. Tendencija smanjenja koncentracije MDA nakon perioda oporavka je dokazana i u ponovljenom pokusu s 10 mg/kg simvastatina dnevno (pokus IV), naročito u plazmi za 22%,  $p < 0,05$ , srcu za 17% i u bubregu za 13% (Tablica 5.4.3, slike 5.4.1, 5.4.2 i 5.4.4) te u pokusu s obje doze atorvastatina (pokus I) (osobito u srcu za 18% i 29% te u bubregu za 4% i 13%) (Tablica 5.1.3, slike 5.1.5 i 5.1.7). Obzirom na činjenicu da se danas antioksidacijski učinak statina koristi vrlo često u liječenju nekih akutnih kardiovaskularnih bolesti, ovi rezultati su važni iz više razloga. Prvi je da su sva tri ispitivana statina u većine tkiva pokazala antioksidacijsko djelovanje. Iznimka je pravastatin koji pokazuje naginjanje ka porastu koncentracije MDA u srcu nakon primjene veće doze, uz dodatni porast MDA i

nakon perioda oporavka (Tablica 5.2.3, slika 5.2.5). Stoga se može postaviti pitanje djelotvornog antioksidacijskog učinka pravastatina u kliničkoj primjeni. Drugi je da je doza simvastatina od 10 mg/kg dnevno koja je korištena u ovim pokusima i koja je izazvala statistički značajan pad koncentracije MDA u plazmi i tkivima, ekvivalentna humanoj dozi od 80 mg dnevno. Doza od 80 mg dnevno je najveća doza simvastatina koja se preporuča za primjenu u ljudi. Treći je da antioksidacijsko djelovanje simvastatina ne prestaje istovremeno s prestankom primjene lijeka.

Rezultati pokusa Beltowskog. i sur. koji pokazuju statistički značajan pad koncentracije MDA (za 46,6%) i oksidiranih lipida (za 59,3%) u plazmi štakora nakon primjene cerivastatina u dozi od 0,3 mg/kg/dan tijekom 3 tjedna te izraženi pad koncentracije MDA nakon primjene fluvastatina (19,8% i 30,9%, pri dozama od 2 i 20 mg/kg/dan tijekom 3 tjedna) i pravastatina (za 25,9%, pri dozi od 40 mg/kg/dan tijekom 3 tjedna) podupiru naše rezultate (2, 201). Slične rezultate potvrđuju pokusi Bolayirli i sur., koji su dokazali antioksidacijsko djelovanje atorvastatina u hiperkolesterolemičkih kunića (202). Na temelju međusobnog odnosa aktivnosti PON1 te koncentracije HDL čestica i MDA nakon primjene atorvastatina, pravastatina i simvastatina dobivenih u ovoj disertaciji, proizlazi da je učinak statina na oksidaciju lipida potpuno neovisan o njihovim učincima na koncentraciju lipida i aktivnost PON1.

U ispitivanjima provedenim u ovoj disertaciji su sva tri statina primijenjena u obje doze pokazala sklonost smanjenju koncentracije triacilglicerola u plazmi između 11% i 30%, ali je statistički značajno smanjenje izmjereno samo kod male doze pravastatina (30%,  $p < 0,05$ ) (Tablice 5.1.2, 5.2.2 i 5.3.2). Tendencija pada koncentracije triacilglicerola u plazmi pod utjecajem statina je bila očekivana i odraz je inhibicijskog učinka statina na štakorsku HMG-CoA-reduktazu, što je i ranije spomenuto (Uvod str. 20). Učinci statina na plazmatsku koncentraciju triacilglicerola u rezultatima ovog rada su u skladu s rezultatima Beltowskog i sur. (2, 201) koji su smanjenje koncentracije triacilglicerola u plazmi štakora izmjerili nakon primjene cerivastatina, fluvastatina i pravastatina.

Tendencija povećanja koncentracije LDL čestica u plazmi izmjerena nakon primjene atorvastatina u obje doze (statistički značajan porast za 55% u odnosu na kontrolu nakon manje doze) (Tablica 5.1.2) je bez značenja za štakora, budući da je kolesterol u te biološke vrste esencijalno zastupljen s HDL.

Učinci gemfibrozila na PON1 i MDA bitno se razlikuju od učinaka statina na iste parametre. Gemfibrozil (pokus V) je u jetri izazvao statistički značajan pad aktivnosti PON1 za 56% u odnosu na kontrolu, dok je aktivnost enzima u serumu bila slična kontroli (Tablica 5.5.1, slike 5.5.1 i 5.5.2). U našim pokusima na normolipidemičkim Fisher štakorima (215) gemfibrozil je tijekom tri tjedna primjene (50 mg/kg/dan) izazvao statistički značajan pad aktivnosti PON1 u serumu (za 15%) i u jetri (za 38%) ( $p < 0,05$ ) (215). Slične rezultate dobili smo i u ranijim pokusima na Wistar štakorima, u kojima je gemfibrozil u dozi od 50 mg/kg/dan tijekom 2 tjedna izazvao statistički značajan pad aktivnosti PON1 u plazmi, bez obzira da li su štakori bili na specijalnoj prehrani obogaćenoj ugljikohidratima (216). U pokusima Beltowskog i sur. je dokazano da fenofibrat statistički značajno i

ovisno o dozi u plazmi štakora smanjuje aktivnost PON1, bez promjena koncentracije ukupnog kolesterola ili triacilglicerola (183). Isti su istraživači zaključili je da je pad aktivnosti enzima u stvari potencijalno štetni učinak fenofibrata, koji u kliničkim uvjetima može biti maskiran njegovim korisnim učinkom na profil plazmatskih lipida (183).

Gemfibrozil je u petom pokusu bio bez statistički značajnog utjecaja na katalitičku aktivnost PON1 u serumu, dok je u plazmi istovremeno izazvao statistički značajan porast koncentracije ukupnog kolesterola od 30%, HDL od 39% i LDL od 37% ( $p < 0,05$ ). Potrebno je dodati još i tipičan učinak gemfibrozila na koncentraciju triacilglicerola koja je bila statistički značajno smanjena za 32% ( $p < 0,05$ ) (Tablica 5.5.2). Ipak, neki klinički podaci pokazuju drugačiji odnos između HDL i PON1 tijekom terapije fibratima. Tendencija porasta koncentracije HDL i aktivnosti PON1 uz pad koncentracije triacilglicerola su izmjereni u plazmi bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 i hipertriacilglicerolemijom nakon 3 mjeseca liječenja gemfibrozilom u dnevnoj dozi od 1200 mg (74). Autori su pretpostavili da je sklonost povećanju koncentracije HDL i aktivnosti PON1 posljedica pozitivnog djelovanja gemfibrozila na sintezu apoA-I u jetri (74).

Apoproteini apoA-I i apoE su glavni peptidi u HDL česticama štakora. Budući da je u pokusima Krausea i Newtona (1995) dokazano da gemfibrozil ima direktan stimulacijski učinak na sintezu i sekreciju apoA-I i apoE u jetri, te da zbog toga povećava i koncentraciju HDL u plazmi (151), može se pretpostaviti da je statistički značajan porast vrijednosti plazmatske koncentracije HDL dobiven u pokusu V ove disertacije također direktna posljedica stimulacijskog učinka gemfibrozila na sintezu i sekreciju apoproteina vezanih uz HDL.

Rezultati istraživanja Durringtona i sur. koji su u bolesnika sa hiperlipoproteinemijom tijekom dva mjeseca primjenjivali 400 mg benzafibrata ili 1200 mg gemfibrozila dnevno pokazali su da je u pacijenata došlo do statistički značajnog pada koncentracije triacilglicerola i povećanja koncentracije HDL čestica, ali bez promjene aktivnosti PON1 (217). Zaključili su da, iako su PON1, apoA-I i HDL u korelacijskom odnosu, ta korelacija nije velika i u fiziološkim okvirima može se neovisno mijenjati.

Na temelju gemfibrozilom izazvanog statistički značajnog pada aktivnosti PON1 u jetri dokazanog u ovom radu, kao i na temelju naših ranijih rezultata dobivenih s gemfibrozilom (215, 216) može se pretpostaviti sljedeće. Gemfibrozil i ostali fibrati stimuliraju PPAR $\alpha$  receptore, pa se kao i u slučaju statina, neki od učinaka gemfibrozila mogu tumačiti kroz interakciju s tim receptorima. Poznato je da u glodavaca PPAR $\alpha$  agonisti u jetri induciraju izraženu proliferaciju peroksisoma, što uzrokuje hepatomegaliju,  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, povećano stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oksidacijski stres (182). U pokusu V je dokazano da gemfibrozil uzrokuje statistički značajno povećanje koncentracije MDA u plazmi, jetri, srcu i bubregu (Tablica 5.5.3, slike 5.5.5, 5.5.6, 5.5.7 i 5.5.8). Slični rezultati su dobiveni i u pokusima na Fisher štakorima (215). Tendencija povećanja vrijednosti koncentracije MDA su izmjerene i nakon perioda oporavka (Tablica 5.5.3, slike 5.5.5, 5.5.6, 5.5.7 i 5.5.8). Može se dakle pretpostaviti da je oksidacijski stres izazvan gemfibrozilom uzrokovao oštećenje hepatocita, s

posljedičnom redukcijom sinteze PON1, što je u jetri dokazano statistički značajnim smanjenjem njezine aktivnosti. Pitanje koje se ovdje mora postaviti jest koliko je oksidacijski učinak gemfibrozila dokazan u našim pokusima klinički relevantan. Budući da su glodavci daleko osjetljiviji na agense koji uzrokuju proliferaciju peroksisoma u usporedbi sa psom, rezus majmunom ili čovjekom, za pretpostaviti je da oksidacijski/prooksidacijski učinak gemfibrozila u čovjeka nije toliko izražen kao u glodavaca. Međutim taj se učinak u čovjeka nikako ne bi smio zanemariti.

Prooksidacijsko djelovanje gemfibrozila je dokazano u istraživanjima O'Briena i sur. koji su nakon njegove primjene tijekom 6 i 34 dana u štakora i hrčaka uočili tendenciju smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola i DT-diaforaze (185). Također, jedna je doza GEM od 1200 mg primjenjena *per os* u zdravih dobrovoljaca povećala proizvodnju slobodnih radikala u krvnim makrofazima i polimorfonuklearnim leukocitima u odnosu na kontrolu (218). Ima podataka koji ukazuju na antioksidacijsko djelovanje drugih fibrata, ali ne i gemfibrozila. Tako su Škrha i sur. u plazmi bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 i hipertriacilglicerolemijom nakon 3 mjeseca primjene fenofibrata u dozi od 200 mg dnevno izmjerili statistički značajno smanjenje koncentracije triacilglicerola i MDA (219). Slične rezultate nalazimo i u istraživanju Beltowskog i sur. koji su nakon primjene fenofibrata u dozama od 3, 30 ili 300 mg/kg dnevno tijekom 7 dana u plazmi normolipidemičnih štakora izmjerili statistički značajan i o dozi ovisan pad koncentracije MDA i aktivnosti PON1, bez statistički značajne promjene koncentracije lipida plazme (183). Na osnovi naših dosadašnjih rezultata, kao i rezultata drugih istraživača koji se odnose na oksidacijsko djelovanje gemfibrozila i antioksidacijsko djelovanje fenofibrata, može se zaključiti da su ti učinci direktno ovisni o samom spoju.

Što se tiče učinaka statina i gemfibrozila na aktivnost BuChE u normolipidemičnih štakora, vidljivo je da su statini pokazali sklonost povećanju (ponekad statistički značajno) aktivnosti ovog enzima u plazmi i jetri (od 20% do 60% u odnosu na kontrolu) (Tablice 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1, slike 5.1.3, 5.1.4, 5.2.3, 5.2.4, 5.3.3, 5.3.4), dok se pod utjecajem gemfibrozila aktivnost BuChE u plazmi povećala, a u jetri smanjila (Tablica 5.5.1, slike 5.5.3, 5.5.4). Ovi rezultati su podudarni s rezultatima vrlo malog broja autora (108). Deset dana po prestanku primjene simvastatina i gemfibrozila, aktivnosti BuChE su pokazivale tendenciju povećanja u odnosu na kontrolu, što ukazuje da njihov učinak na aktivnost BuChE ne prestaje odmah (Tablice 5.3.1, 5.5.1, slike 5.3.3, 5.3.4, 5.5.3, 5.5.4).

U pokusima sa statinima i gemfibrozilom u ovom radu ne postoji pozitivan odnos između aktivnosti BuChE i koncentracije triacilglicerola u plazmi. Pozitivna korelacija između koncentracije triacilglicerola i aktivnosti BuChE u plazmi nije dokazana niti u našim ranijim pokusima, u kojima je primjena gemfibrozila tijekom 2 tjedna u dozi od 50 mg/kg/dan Wistar štakorima na normalnoj hrani, kao i onima na visokokaloričnoj izazvala statistički značajan pad koncentracije triacilglicerola, te povećanje aktivnosti BuChE za 3,5 do 5,6 puta (220). Suprotni su podaci iz kliničkih studija. Već je u Uvodu (str. 15 i 16) istaknuto da je u nekoliko njih dokazana pozitivna korelacija između plazmatske koncentracije triacilglicerola i aktivnosti BuChE (109, 117, 118), odnosno aktivnosti BuChE te



koncentracije LDL i ukupnog kolesterola. Isto tako pozitivna korelacija između aktivnosti BuChE, koncentracije triacilglicerola u serumu i stupnja pretilosti ustanovljena je bolesnika s metaboličkim sindromom (119). U istraživanju Alcantara i sur. aktivnost BuChE je neovisno o drugim čimbenicima rizika važnim za razvoj koronarne bolesti srca pozitivno korelirala s koncentracijom triacilglicerola i bila je povećana u bolesnika sa šećernom bolesti (221). Razlika koja postoji između spomenutih podataka iz literature i rezultata dobivenih u ovoj disertaciji može se djelomično objasniti činjenicom da su naši rezultati dobiveni na modelu normolipidemičnih štakora, dok su u kliničkim studijama promjene u aktivnosti BuChE i lipidnog profila promatrane u okviru patološkog stanja. Stoga se može pretpostaviti da su u pokusima u ovom radu promjene u navedenim parametrima direktna posljedica djelovanja lijeka.

Već je ranije spomenuto da u glodavaca PPAR $\alpha$  agonisti u jetri induciraju izraženu proliferaciju peroksisoma, što uzrokuje hepatomegaliju,  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, povećano stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oksidacijski stres (182). Budući da je gemfibrozil agonist PPAR $\alpha$  receptora, njegovom primjenom vjerojatno dolazi do poticanja proliferacije peroksisoma, koja je indirektno odgovorna za izraženu tendenciju porasta aktivnosti BuChE u plazmi štakora. Naime, gemfibrozil preko proliferacije peroksisoma uzrokuje  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, koja se odvija uglavnom u jetri. Butiril-koenzim A (butiril-CoA) koji nastaje tijekom metabolizma masnih kiselina, odgovoran je u prisutnosti kolina za nastanak butirilkolina. Ukoliko se butirilkolin ne razgradi, može svojim snažnim nikotinskim djelovanjem izazvati neželjene toksične učinke (111). Clitherow i sur. su 1980. godine pretpostavili da je glavna biološka uloga BuChE upravo hidroliza butirilkolina na mjestu njegovog nastanka, što omogućuje povratak produkata hidrolize u fiziološki metabolički put (111).

S obzirom na činjenicu da i statini, iako u manjoj mjeri u usporedbi s fibratima, potiču proliferaciju peroksisoma stimulacijom PPAR $\alpha$  receptora (154, 155), a time i  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina (222), za pretpostaviti je da je povećana katalitička aktivnost BuChE u ovom radu također posljedica proliferacije peroksisoma potaknute korištenim statinima. Pitanje je koliko ovi rezultati mogu utjecati na opći stav o povoljnom utjecaju statina na razvoj Alzheimerove bolesti, u kojoj je za sada jedini terapijski cilj inhibicija aktivnosti AChE, a u novije vrijeme i BuChE. Odnosno postavlja se pitanje da li je učinak statina na aktivnost BuChE različit u glodavaca i čovjeka?

Rezultati višekratne primjene statina na vrijednosti koncentracije leptina u plazmi pokazuju da u slučaju manjih doza atorvastatina i pravastatina, te veće doze simvastatina postoji izražena tendencija smanjenja koncentracije plazmatskog leptina. Statistički značajan pad koncentracije leptina u plazmi izmjeren je nakon primjene male doze simvastatina (Tablice 5.1.4, 5.2.4 i 5.3.4). Višekratne primjene većih doza atorvastatina i pravastatina pokazale su tendenciju povećanja koncentracije leptina u plazmi (Tablice 5.1.4 i 5.2.4). Kretanje vrijednosti koncentracije leptina u plazmi 10 dana nakon prestanka primjene svih ispitivanih statina nije pravilno i ne može se izvući neki čvrsti zaključak. Gemfibrozil je izazvao smanjenje koncentracije leptina u plazmi, dok je nakon perioda

oporavka došlo do povećanja vrijednosti njegove koncentracije u plazmi u odnosu na kontrolu (Tablica 5.5.4).

Rezultati pokusa na životinjama drugih istraživača su uglavnom sukladni s rezultatima dobivenim u ovoj disertaciji s gemfibrozilom i statinima u manjoj dozi. Tako su Zhao i sur. ustanovili da je primjena atorvastatina u dozi od 2,5 mg/kg/dan tijekom 6 tjedana u kunića s hiperkolesterolemijom izazvanom specijalnom hranom dovela do pada koncentracije leptina u plazmi za 37,7% (141). Također su dokazali da je ekspresija mRNA leptina u masnom tkivu kunića na hiperkolesterolemičkoj prehrani i atorvastatinu bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolu, odnosno da atorvastatin i u kulturi adipocita ovisno o dozi također inhibira oslobađanje leptina i ekspresiju njegove mRNA. Za sada nije poznat molekularni mehanizam kojim taj lijek inhibira sekreciju leptina. Budući da je u pokusima *in vitro* dokazano da PPAR $\gamma$  receptori mogu imati ulogu u regulaciji metabolizma leptina, i da atorvastatin može aktivacijom PPAR $\gamma$  receptora inhibirati produkciju pro-upalnih citokina u humanim monocitima, Zhao i sur. su pretpostavili da se slično može događati i u adipocitima. Tj. pad koncentracije leptina u plazmi mogao bi se objasniti na način da atorvastatin preko aktivacije PPAR $\gamma$  u adipocitima smanjuje sekreciju leptina i ekspresiju njegove mRNA (141). Navedenom pretpostavkom bi se mogli objasniti i rezultati dobiveni u ovoj disertaciji.

Statistički značajno smanjenje koncentracije leptina u serumu Wistar štakora na prehrani s velikim udjelom masti dobiveno nakon primjene gemfibrozila (75 mg/kg/dan) tijekom 28 dana (142) slično je rezultatima s gemfibrozilom u pokusu V. U kontekstu ovih rezultata svakako je važno pitanje da li se i za gemfibrozil, kao i za statine, može pretpostaviti da posjeduje agonističko djelovanje na PPAR $\gamma$  receptore?

Obzirom na pretpostavke da u organizmu leptin ima višestruku ulogu (vidi Uvod str. 17), istražuje se također da li može utjecati i na katalitičku aktivnost PON1. Rezultati istraživanja na ljudima i životinjama ukazuju na međusobno suprotan odnos između koncentracije leptina u plazmi i katalitičke aktivnosti PON1 (223, 224, 225). Rezultati s manjim dozama atorvastatina i pravastatina u ovoj disertaciji također ukazuju na obrnuti odnos između koncentracije plazmatskog leptina i aktivnosti PON1. Kako su pokusi u ovom radu provedeni na normolipidemičkim štakorima, a ne na modelima poput miševa s prirođenim nedostatkom leptina (226), može se pretpostaviti da bi pad koncentracije leptina kao i porast aktivnosti PON1 dobiveni u ovoj disertaciji mogli također predstavljati neke od pleiotropnih učinaka statina.

## 7.0 ZAKLJUČCI

1. Višekratna primjena atorvastatina, pravastatina, simvastatina i gemfibrozila je u plazmi većine normolipidemičnih štakora izazvala povećanje koncentracije HDL lipoproteina i smanjenje koncentracije triacilglicerola, što su karakteristični učinci kako za same lijekove, tako i za životinjsku vrstu.

2. Rezultati pokazuju da između statina i gemfibrozila postoje razlike u njihovim ne-lipidnim učincima koje se odnose na katalitičku aktivnost PON1 i koncentraciju malondialdehida.

3. Atorvastatin u dozama od 10 i 50 mg/kg/dan i pravastatin u dozi od 50 mg/kg/dan su izazvali porast katalitičke aktivnosti PON1 u serumu koji je bio statistički značajan nakon primjene većih doza oba statina. U jetri su manja i veća doza atorvastatina i pravastatina statistički značajno povećale aktivnost PON1. Simvastatin je u obje doze izazvao statistički značajan pad aktivnosti PON1 u serumu.

Gemfibrozil je uzrokovao statistički značajno smanjenje aktivnosti PON1 u jetri. Na katalitičku aktivnost PON1 u serumu gemfibrozil nije imao utjecaja.

4. Učinci atorvastatina, pravastatina, simvastatina i gemfibrozila na sastav lipida plazme štakora su jednim dijelom odgovorni za promjenu katalitičke aktivnosti PON1 u serumu. Pad ili porast vrijednosti koncentracije HDL je bio praćen istosmjernim promjenama aktivnosti PON1 u serumu.

5. Pad katalitičke aktivnosti PON1 u jetri i serumu štakora izazvan simvastatinom može biti posljedica barem još dvaju različitih učinaka tog statina na molekularnom nivou: represije gena koji kontrolira sintezu PON1 te aktivacije PPAR $\alpha$  receptora s posljedičnom inhibicijom sinteze apoA-I u štakora.

Budući da PON1 sudjeluje u hidrolizi spojeva s laktonskim prstenom kojima pripada i simvastatin, moguće je da je smanjenje katalitičke aktivnosti PON1 i odraz sudjelovanja enzima u procesu hidrolize simvastatina.

6. Sva tri ispitivana statina su u većine tkiva pokazala antioksidacijsko djelovanje (pad koncentracije MDA). Najizraženije antioksidacijsko djelovanje u serumu i tkivima je pokazao simvastatin. Antioksidacijsko djelovanje simvastatina ne iščezava istovremeno s prestankom njegove primjene. Ovi rezultati su prilog opravdanoj primjeni simvastatina u klinici u svrhu njegovog antioksidacijskog djelovanja u bolestima kardiovaskularnog i neurološkog sustava.

7. Doza simvastatina od 10 mg/kg dnevno koja je izazvala statistički značajan pad koncentracije MDA u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu ekvivalentna je humanoj dozi od 80 mg dnevno, koja je najveća preporučena doza za primjenu u ljudi.

8. Gemfibrozil je izazvao statistički značajno povećanje koncentracije MDA u plazmi, jetri, srcu i bubregu, što znači da pospješuje oksidacijski stres. Moguće je da oksidacijski stres u jetri uzrokuje oštećenje hepatocita i redukciju sinteze PON1. Oksidacijski stres u plazmi i tkivima je posljedica agonističkog djelovanja gemfibrozila na PPAR $\alpha$  receptore.

9. Učinak statina i fibrata na oksidacijski stres je potpuno suprotan i nije ovisan o njihovim učincima na koncentraciju lipida u plazmi.

10. Statini u plazmi i jetri i gemfibrozil u plazmi normolipidemičnih štakora povećavaju aktivnost BuChE.

11. Za sada se još uvijek smatra da je glavna biološka uloga BuChE hidroliza butirilkolina nastalog tijekom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, što omogućuje povratak produkata hidrolize u fiziološki metabolički put. Stoga je logično da su proliferacija peroksisoma,  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina i povećano stvaranje butirilkolina zbog aktivacije PPAR $\alpha$  receptora izazvane statinima i gemfibrozilom indirektno odgovorne i za povećanje katalitičke aktivnosti BuChE.

12. Svi statini u manjim dozama i gemfibrozil su izazvali pad koncentracije plazmatskog leptina. Kako su pokusi provedeni na normolipidemičkim štakorima, pad koncentracije leptina kao i porast aktivnosti PON1 dobiveni nakon primjene atorvastatina i pravastatina, bi također mogli biti neki od pleiotropnih učinaka antilipidnih lijekova.

13. Većina opisanih učinaka korištenih antilipidnih lijekova nije bila ovisna o dozi.

14. Utjecaj perioda oporavka na sve opisane parametre nije bio jedinstven.

## 8.0 SAŽETAK

Smatra se da esterase paraoksonaza 1 (PON1), putem sprečavanja oksidacije lipoproteina plazme i butirilkolinesteraza (BuChE), svojim sudjelovanjem u metabolizmu kolina i lipoproteina male gustoće, utječu na metabolizam lipida. Pretpostavlja se da i leptin također sudjeluje u metabolizmu lipida. Osim dobro poznatih učinaka antilipidnih lijekova na lipide, sve važniji postaju njihovi ne-lipidni (pleiotropni) učinci. Stoga su ciljevi ovog rada bili ispitati i usporediti djelovanje višekratne primjene atorvastatina, pravastatina, simvastatina i gemfibrozila na esterase, lipide, malondialdehid i leptin. Sva istraživanja su provedena na normolipidemičkim Wistar štakorima. Atorvastatin i pravastatin su izazvali porast, a simvastatin pad katalitičke aktivnosti serumske i jetrene PON1. Promjene u koncentracijama lipida plazme bile su karakteristične kako za same primjenjene lijekove tako i za korištenu životinjsku vrstu. Svi statini su smanjili koncentraciju malondialdehida (antioksidacijski učinak), osobito simvastatin. Suprotno je bilo u životinja tretiranih gemfibrozilom, tj. rezultati su jasno pokazali da isti lijek smanjuje aktivnost PON1 u jetri i povećava koncentraciju malondialdehida (oksidacijski učinak). Statini su povećali aktivnost BuChE u plazmi i jetri, a gemfibrozil u plazmi. Smanjenje plazmatske koncentracije leptina je izmjereno nakon primjene gemfibrozila i manjih doza statina. Prema ovim rezultatima, statini pokazuju bolje pleiotropne učinke od gemfibrozila, naročito kada je u pitanju njihov antioksidacijski učinak.

## 9.0 SUMMARY

The influence of antilipid drugs on esterases, lipids and leptin in rats.

Marija Macan, 2011.

It is believed that paraoxonase 1 (PON1) and butyrylcholinesterase (BuChE) are important in the lipid metabolism. PON1 is supposed to be able to prevent the oxidation of plasma lipoproteins. BuChE might be included in the metabolism of choline and LDL. It seems that leptin is also involved in the lipid metabolism. Beside well-known lipid effects expressed by antilipid drugs, some studies indicate their other important non-lipid (pleiotropic) effects. Therefore the aims of this study were to investigate the influence of multiple applications of atorvastatin, pravastatin, simvastatin and gemfibrozil on esterases, lipids, malondyaldehyde and leptin. All studies were performed on normolipidemic Wistar rats. Atorvastatin and pravastatin increased, and simvastatin decreased PON1 activity in serum and liver. All changes on plasma lipids were typical for the used drugs and treated animals. All of the statins decreased the malondyaldehyde concentration (antioxidative effect), simvastatin in particular. The opposite effects were found in animals treated by gemfibrozil, i.e. the decrease of PON1 activity in liver and increase of malondyaldehyde concentration (oxidative effect). Statins caused the increase of BuChE activity in plasma and liver, while gemfibrozil raised its activity in plasma. The low concentration of plasma leptin was measured after the administration of gemfibrozil and also of low doses of statins. According to these results, when compared with gemfibrozil, statins show preferable pleiotropic, especially antioxidative effects.

## 10.0 LITERATURA

1. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ i sur. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci* 2009;5:474-488.
2. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. Cerivastatin modulates plasma paraoxonase/arylesterase activity and oxidant-antioxidant balance in the rat. *Pol J Pharmacol* 2002;54:143-150.
3. Gatto LM, Lyons MA, Brown AJ, Samman S. Trans fatty acids affect lipoprotein metabolism in rats. *J Nutr* 2002;132:1242-1248.
4. van der Velde AE. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J Gastroenterol* 2010;16:5908-5915.
5. Brunton LL, Chabner MA, Knollman BC. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. McGraw-Hill, New York 2011.
6. Murray R, Rodwell V, Bender D. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th Edition. LANGE Basic Science. McGraw-Hill 2011.
7. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* 2008;8:512-521.
8. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999;340:115-126.
9. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D i sur. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:155-161.
10. Ohashi R, Mu H, Wang X i sur. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Q J Med* 2005;98:845-856.
11. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Pro Natl Acad Sci USA* 1992;89:10316-10320.
12. Klimov AN, Kozhevnikova KA, Kuzmin AA i sur. On the ability of high density lipoproteins to remove phospholipid peroxidation products from erythrocyte membranes. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:300-304.
13. Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM i sur. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res* 2009;50:716-722.
14. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z i sur. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277:38503-38516.
15. Navab M, Hama SY, Cooke CJ i sur. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: Step 1. *J Lipid Res* 2000;41:1481-1494.

16. Valiyaveetil M, Podrez EA. Platelet hyperreactivity, scavenger receptors and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7:218-221.
17. Podrez EA. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:719-725.
18. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA i sur. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95:764-772.
19. Toth PP. Should we target HDL cholesterol level in lowering cardiovascular risk? *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:667-672.
20. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ i sur. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009;50:S145-S149.
21. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž i sur. *Interna medicina*. 4 izdanje. Naklada Ljevak. Zagreb 2008.
22. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G i sur. Triglycerides and the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2007;115:450-458.
23. Varbo A, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A i sur. Nonfasting triglycerides, cholesterol, and ischaemic stroke in the general population. *Ann Neurol* 2011;69:628-634.
24. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Chem Biochem* 1997;272:20963-20966.
25. Deedwania P, Singh V, Davidson M. Low high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular disease risk: An analysis of statin clinical trials. *Am J Cardiol* 2009;104:3E-9E.
26. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I i sur. za West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
27. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
28. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.
29. Sheperd J, Blauw GJ, Murphy MB i sur. za PROSPER. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1623-1630.
30. Nordestgaard BG, Lewis B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extent of aortic atherosclerosis in the St. Thomas's Hospital rabbit strain. *Atherosclerosis* 1991;87:39-46.
31. Niemi J, Mäkinen VP, Heikkonen J i sur. Estimation of VLDL, IDL, LDL, HDL2, apoA-I, and apoB from the Friedewald inputs-apoB and IDL, but not LDL, are associated with mortality in type 1 diabetes. *Ann Med* 2009;41:451-461.



32. VanderLaan PA, Reardon CA, Thisted RA, Getz GS. VLDL best predicts aortic root atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *J Lipid Res* 2009;50:376-385.
33. Ren J, Grundy SM, Liu J i sur. Long-term coronary heart disease risk associated with very-low-density lipoprotein cholesterol in Chinese: the results of a 15-Year Chinese Multi-Provincial Cohort Study (CMCS). *Atherosclerosis* 2010;211:327-332.
34. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990;85:1234-1241.
35. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1988;8:737-741.
36. Vergeer M, Hoenboom AG, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 2010;51: 2058-2073.
37. Suntres ZE. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage. *J Toxicol* 2011;2011:152474.
38. Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2011;2011:809696.
39. Lovrić J, Žarković N, Klepac R i sur. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Medicinska naklada Zagreb 2002.
40. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;88:1243-1276.
41. Hensley K, Robinson KA, Prasad Gabbita S i sur. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Rad Biol Med* 2000;28:1456-1462.
42. Schulaev V, Oliver DJ. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. *New Tools for Reactive Oxygen Species Research. Plant Physiol* 2006;141:367-372.
43. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-1070.
44. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B i sur. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol* 2011;8:10.
45. Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:1817-1829.
46. Harrison D, Griendling K, Landmesser U i sur. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91:7A-11A.
47. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:27-32.
48. Han CY, Pak YK. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 1999;31:165-173.

49. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST i sur. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004;45:993-1007.
50. Kougias P, Chai H, Lin PH i sur. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication on vascular disease. *J Surg Res* 2005;126:121-129.
51. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th edition. Saunders, Elsevier, Philadelphia, USA 2010.
52. Aldridge WN. Serum esterase I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method to their determination. *Biochem J* 1953;53:110-117.
53. Soran H, Younis NN, Charlton-Menys V, Durrington P. Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:265-274.
54. Paragh G, Balla P, Katona E i sur. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002;252:63-67.
55. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F i sur. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-2119.
56. Mackness B, Durrington PN, Boulton AJ i sur. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest* 2002;32:259-264.
57. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1986-1984.
58. Moren X, Deakin S, Liu ML i sur. HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res* 2008;49:1246-1253.
59. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005;180:55-61.
60. Deakin S, Moren X, James RW. Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis* 2005;179:17-25.
61. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 2011;81:337-344.
62. Seres I, Paragh G, Deschene E i sur. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol* 2004;39:59-66.
63. Hassewander O, Savage DA, McMaster D i sur. Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int* 1999;56:289-298.
64. Senti M, Tomas M, Vila J i sur. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase 1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001;156:443-449.
65. Karanth S, Pope C. Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci* 2000;58:282-289.

66. Wehner JM, Murphy-Erdosh C, Smolen A, Smolen TS. Genetic variation in paraoxonase activity and sensitivity to disopropylphosphofluoridate in inbred mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;28:317-320.
67. Shih DM, Lingjie G, Hama S i sur. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996;97:1630-1639.
68. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr* 2000;130:2427-2433.
69. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M i sur. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002;160:425-432.
70. Debord J, Dantoine T, Bollinger JC i sur. Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem Biol Interact* 1998;113:105-115.
71. Rao MN, Marmillot P, Gong M i sur. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 2003;52:1287-1294.
72. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-956.
73. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methyl-glutarylcoenzyme A reductase inhibitors (statins) on tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:121-127.
74. Balogh Z, Seres I, Haranghi M i sur. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604-610.
75. Patel BN, Mackness MI, Harty DW i sur. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta* 1990;1035:113-116.
76. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP i sur. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2082-2088.
77. Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987;33:587-588.
78. Ferre N, Camps J, Prats E i sur. Serum paraoxonase activity: a new additional test for improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem* 2002;48:261-268.
79. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol* 2004;60:75-80.
80. Mackness B, Quarck R, Verreth W i sur. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1545-1550.
81. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 2005;181:9-18.
82. Shih DM, Gu L, Xia YR i sur. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-287.

83. Watson AD, Berliner JA, Hama SY i sur. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-2891.
84. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-154.
85. Mackness B, Hine D, Liu Y i sur. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;18:680-683.
86. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL i sur. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest* 1998;101:1581-1590.
87. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-1316.
88. Efrat M, Aviram M. Macrophage paraoxonase 1 (PON) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:105-110.
89. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S i sur. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoproteins and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.
90. Perla-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB J* 2010;24:931-936.
91. Ayub A, Mackness MI, Arrol S i sur. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:330-335.
92. Mackness B, Durrington P, McElduff P i sur. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003;107:2775-2779.
93. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A i sur. Paraoxonase-2 is an ubiquitously expressed protein with antioxidant properties, and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low-density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-44449.
94. Draganov DI, Stetson PL, Watson C i sur. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:33435-33442.
95. Coté CJ, Lerman JL, Todres D. A practice of anesthesia for infants and children. Saunders Elsevier, Philadelphia 2009.
96. Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 2003;28:54-61.
97. Viby- Mogensen J. Succinylcholine neuromuscular blockade in subject homozygous for atypical plasma cholinesterase. *Anesthesiology* 1981;55:428-434.
98. La Du BN, Bartels CF, Nogueria CP i sur. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin Biochem* 1990;23:423-431.

99. Abou-Hatab K, O'Mahoney MS, Patel S, Woodhouse K. Relationship between age and plasma esterases. *Age and Ageing* 2001;30:41-45.
100. Calderon-Margalit R, Adler B, Abramson JH i sur. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged men and women in Jerusalem. *Clin Chem* 2006;52:845-852.
101. Kean KT, Kutty KM, Huang SN, Rajendra J. A study of pseudocholinesterase induction in experimental obesity. *J Am Coll Nutr* 1986;5:253-261.
102. Dave KR, Katyare SS. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterase in the rat. *J Endocrinol* 2002;175:241-250.
103. Brass N, Rácz A, Heckel D i sur. Amplification of the genes BCHE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1997;57:2290-2294.
104. Lapidot-Lifson Y, Prody C, Ginzberg D i sur. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4715-1719.
105. White BV, Wetstone H, Lamotta R. Serum cholinesterase activity in malignant neoplasms. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1958;69:176-181.
106. Darvesh S, Martin E, Walsh R, Rockwood K. Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clin Biochem* 2004;37:42-49.
107. Kaduszkiewicz H, Zimmermann T, Beck-Bornholdt HP, van den Bussche H. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ* 2005;331:321-327.
108. Kunec-Vajić E, Bernat N, Muičević-Katanec D. Effect of hypolipidemic drugs on cholinesterase activity in the rat. *General Pharmacology* 1992;23:217-219.
109. Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ i sur. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in type II diabetes mellitus? *Clin Sci* 2001;101:29-35.
110. Lucić Vrdoljak A, Bradamante V, Radić B i sur. Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. *Acta Pharm* 2005;55:175-185.
111. Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature* 1963;199:1000-1001.
112. Lawrence SH, Melnick PJ. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, immunoelectroforetic and quantitative studies. *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine* 1961;107:998-1001.
113. Kutty KM, Rowden G, Coc AR. Interrelationship between serum beta-lipoprotein and cholinesterase. *Can J Biochem* 1973;51:883-887.
114. Kutty KM, Jacob JC, Hutton CJ i sur. Serum beta lipoprotein: studies in a patient and in a guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. *Clin Biochem* 1975;8:379-383.
115. Ryhanen R, Herranen J, Korhonen K i sur. Relationship between serum lipids, lipoproteins and pseudocholinesterase during organophosphate poisoning in rabbits. *Int J Biochem* 1984;16: 687-690.

116. Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal* 1994;8:247-250.
117. Lunkes GI, Stefanello F, Lunkes DS i sur. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;72:28-32.
118. Stojanov M, Stefanović A, Džingalašević G i sur. Butyrylcholinesterase activity in young men and women: association with cardiovascular risk factors. *Clin Biochem* 2011;44:623-626.
119. Randell EW, Mathews MS, Zhang H i sur. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2005;38:799-805.
120. Sridhar GR, Nirmala G, Apparao A i sur. Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach. *Lipids Health Dis* 2005;8:4-18.
121. Randell EW, Rogers B, Smith E. Production of butyrylcholinesterase by Caco-2 cells: lack of relationship with triglyceride production. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1327-1332.
122. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;60: 329-339.
123. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines-novel link between inflammation and vascular function. *J Physiol Pharmacol* 2006;57: 505-528.
124. Rahmouni K, Haynes WG. Leptin and cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:225-244.
125. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50:1511-525.
126. Peelman F, Waelput W, Iserentant H i sur. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res* 2004;43:283-301.
127. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272: 6093-6096.
128. Mark AL, Correia MLG, Rahmouni K, Haynes WG. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *J Hypertens* 2002;20:1245-1250.
129. Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 2001;50:955-961.
130. O'Rourke L, Yeaman SJ, Sheperd PR. Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes* 2001;50:955-961.
131. Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 2010;7: 22-9.
132. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;189:47-60.
133. Boulomié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 1999;13:1231-1238.
134. Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassman R i sur. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells *in vitro*. *Circ Res* 2002;90:711-718.

135. Wu B, Fukuo K, Suzuki K i sur. Relationships of systemic oxidative stress to body fat distribution, adipokines and inflammatory markers in healthy middle-aged women. *Endocr J* 2009;56:773-782.
136. Söderberg S, Ahrén B, Jansson JH i sur. Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction. *J Int Med* 1999;246:409-418.
137. Ciccone M, Vettor R, Pannacciulli N i sur. Plasma leptin is independently associated with intima-media thickness of the common carotid artery. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:805-810.
138. Wauman J, Tavernier J. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front Biosci* 2011;17: 2771-93.
139. Huang W, Dedousis N, Bandi A i sur. Liver triglyceride secretion and lipid oxidation metabolism are rapidly altered by leptin *in vivo*. *Endocrinology* 2006;147:1480-1487.
140. Wanders D, Plaisance EP, Judd RL. Pharmacological effects of lipid-lowering drugs on circulating adipokines. *World J Diabetes* 2010;1:116-128.
141. Zhao SP, Wu ZH. Atorvastatin reduces serum leptin concentration in hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 2005;360:133-140.
142. Törüner F, Akbay E, Cakir N i sur. Effects of PPARgamma and PPARalpha agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm Metab Res* 2004;36:226-230.
143. Kochan Z, Karbowska J, Swierczynski J. Effect of clofibrate on malic enzyme and leptin mRNAs level in rat brown and white adipose tissue. *Horm Metab Res* 1999;31:538-542.
145. Von Eynatten M, Schneider JG, Hadziselimovic S i sur. Adipocytokines as a novel target for the anti-inflammatory effect of atorvastatin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:754-755.
146. Ando H, Sugimoto K, Yanagihara H i sur. Effects of atorvastatin and pravastatin on glucose tolerance, adipokine levels and inflammatory markers in hypercholesterolaemic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:1012-1017.
147. Gannagé-Yared MH, Azar RR, Amm-Azar M i sur. Pravastatin does not affect insulin sensitivity and adipocytokines levels in healthy nondiabetic patients. *Metabolism* 2005;54:947-951.
148. Damci T, Tatliagac S, Osar Z, Ilkova H. Fenofibrate treatment is associated with better glycemic control and lower serum leptin and insulin levels in type 2 diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Eur J Intern Med* 2003;14:357-360.
149. Belfort R, Berria R, Cornell J, Cusi K. Fenofibrate reduces systemic inflammation markers independent of its effects on lipid and glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:829-836.
150. American Society of Health-System Pharmacists. AHFS drug information 2010. Bethesda, Maryland, USA 2010.

151. Krause BR, Newton RS. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. *Atherosclerosis* 1995;117:237-244.
152. Khan B, Wilcox HG, Heimberg M. Cholesterol is required for secretion of very-low-density lipoprotein by rat liver. *Biochem J* 1989;258:807-816.
153. Kam NTP, Albright E, Mathur S, Field FJ. Effect of lovastatin on acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase (ACAT) activity and the basolateral-membrane secretion of newly synthesized lipids by CaCo-2 cells. *Biochem J* 1990;272:427-433.
154. Roglans N, Sanguino E, Peris C i sur. Atrovastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:232-239.
155. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T i sur. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 2007;100:1442-1451.
156. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN i sur. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:685-696.
157. Ma S, Ma CCH. Recent development in pleiotropic effects of statins on cardiovascular disease through regulation of transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:167-175.
158. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG i sur. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 2007;14: 243-248.
159. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N i sur. Pravastatin and the development of diabetes mellitus. Evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001;103:357-362.
160. Kocić I, Racek-Król B, Wapniarska I i sur. Antiplatelet effect of statins is augmented in diabetic rabbits. *Pharmacol Rep* 2010;62:410-413.
161. Bruegel M, Teupser D, Haffner I i sur. Statins reduce macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  expression in human activated monocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:1144-1149.
162. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. CLINICAL REVIEW 145. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1451-1458.
163. Aviram M, Dankner G, Cogan U i sur. Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters fluidity and uptake by macrophages: *in vivo* and *in vitro* studies. *Metabolism* 1992;41:229-235.
164. Sezer ED, Sozmen EY, Nart D, Onat T. Effect of atorvastatin therapy on oxidant-antioxidant status and atherosclerotic plaque formation. *Vasc Health Risk Manag* 2011;7:333-343.
165. Harangi M, Seres I, Varga Z i sur. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:685-691.



166. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Risk* 2003;10:181-189.
167. Diomedea L, Albani D, Sottocorno M i sur. *In vivo* anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001;13:27-1332.
168. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FAH i sur. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;360: 1851-861.
169. Jukema JW, Bruschke AVG, van Boven AJ i sur. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. *Circulation* 1995; 91:2528-2540.
170. Sacks FM, Pfeffer MA, Move LA i sur. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996;335:1001-1009.
171. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH i sur. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195-2207.
172. Abou-Raya A, Abou Raya S, Helmii M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:670-680.
173. Sano M, Bell KL, Galasko D i sur. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. *Neurology* 2011;77:556-563.
174. Samii A, Carleton BC, Etminan M. Statin use and the risk of Parkinson disease: a nested case control study. *J Clin Neurosci* 2008;15:1272-1273.
175. Staels B, Dallongeville J, Auwrex J i sur. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998;98:2088-2093.
176. Rubbins HB, Robins SJ, Collins D i sur. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 1999;341:410-418.
177. Robins SJ, Collins D, Wittes JT i sur. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT, a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:1585-1591.
178. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302:93-109.
179. Grundy SM, Vega GL. Fibrates: effects on lipids and lipoprotein metabolism. *Am J Med* 1987;83:9-20.
180. Keech A, Simes RJ, Barter P i sur. Effects of long term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1849-1861.
181. Frick MH, Elo O, Happa L i sur. Helsinki heart study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-1245.

182. Arnaiz SL, Travacio M, Monserrat AJ i sur. Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:175-180.
183. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON1) activity. *J Phys Pharm* 2002;53:463-475.
184. Arnaiz SL, Travacio M, Monserrat AJ i sur. Chemiluminiscence and antioxidant levels during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1997;1360:222-228.
185. O'Brien ML, Twaroski TP, Cunningham ML i sur. Effects of peroxisome proliferators on antioxidant enzymes and antioxidant vitamins in rats and hamsters. *Toxicol Sci* 2001;60:271-278.
186. Ozansoy G, Akin B, Aktan F, Karasu C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. *Moll Cell Biochem* 2001;216:59-63.
187. Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. Gemfibrozil decreases atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. *Diabetologia* 2006;49:766-774.
188. Chen MF, Wang TD, Yeh HT i sur. Gemfibrozil potentiates oxidative resistance of high-density lipoprotein in hypertriglyceridemic patients. *Eur J Clin Invest* 2001;31:707-713.
189. Allain CC, Poon LS, Chang CSG i sur. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
190. Shepard MD, Whiting MJ. Falsley low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the triglyceride method with modified Trienders chromogen. *Clin Chem* 1990;36:325-329.
191. Czok R, Barthelmai W. Enymatische Bestimmungen der Glucose, Kiquor und Ham. *Klin Wschr* 1962;40:585-589.
192. Bachorik PS. Measurement of low density lipoprotein cholesterol. In: Rifai N, Warnic RG, Dominiczok H (eds). *Handbook of lipoprotein testing*. AACC Press, Washington, 1991.
193. Friewald WR, Levy RI, Fridrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
194. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
195. Angulo AJ, Romera JM, Ramirez M, Gil A. Effects of storage conditions on lipid oxidation in infant formulas based on several protein sources. *J Am Oi Chem Soc* 1998;75:1603-1607.
196. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE i sur. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Agric Food Chem* 1994;42:1931-1937.
197. Lovrić J, Mesić M, Macan M i sur. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Period Biol* 2008;110:63-68.

198. Zhang ZJ, Yao ZJ, Liu W i sur. Effects of antipsychotics on fat deposition and changes in leptin and insulin levels. Magnetic resonance imaging study of previously untreated people with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2004;184: 58–62.
199. GraphPad Software, San Diego, CA, USA. <http://www.graphpad.com/>, accessed 7 September 2011.
200. Rowe P. *Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences*; Wiley: Chichester, UK, 2007.
201. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methyl-glutarilcoenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol* 2002;54:661-671.
202. Bolayirli IM, Aslan M, Balci H i sur. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci* 2007;81:121-127.
203. Tsimihodimos V, Karabina SAP, Tambaki AP i sur. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:306-311.
204. Balogh Z, Fueleop P, Seres I i sur. Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. *Clin Drug Invest* 2001;21:505-510.
205. Muačević-Katanec D, Bradamante V, Poljičanin T i sur. Clinical study on the effect of simvastatin on paraoxonase activity. *Arzneimittelforschung* 2007;57:647-653.
206. Dullaart RP, de Vries R, Voorbij HA i sur. Serum paraoxonase-1 activity is unaffected by short-term administration of simvastatin, bezafibrate, and their combination in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2009;39:200-203.
207. Boisfer E, Stengel D, Pastier D i sur. Antioxidant properties of HDL in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Lipid Res* 2002;43:732-741.
208. Corsini A, Bellosta S, Baetta R i sur. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 1999;84:413-428.
209. Martin G, Duez H, Blanquart C i sur. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR $\alpha$  and induces HDL apo A-I. *J Clin Invest* 2001;107:1423-1432.
210. Berthou L, Duverger N, Emmanuel F i sur. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;97:2406-2416.
211. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ i sur. Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with simvastatin. *Toxicol Lett* 2001;120:369-377.
212. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369:78-88.
213. Manfredini V, Biancini GB, Vanzin CS i sur. Simvastatin treatment prevents oxidative damage to DNA in whole blood leukocytes of dyslipidemic type 2 diabetic patients. *Cell Biochem Funct* 2010;28:360-366.

214. Paragh G, Torocsik D, Seres I i sur. Effect of short term treatment with simvastatin and atorvastatin on lipids and paraoxonase activity in patients with hyperlipoproteinaemia. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1321-1327.
215. Macan M, Konjevoda P, Lovrić J i sur. The influence of gemfibrozil on malondialdehyde level and paraoxonase 1 activity in Wistar and Fisher rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;108:428-435.
216. Macan M, Vrkić N, Lucić Vrdoljak A i sur. Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta Biochim Pol* 2010;57:321-326.
217. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D i sur. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesterol ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217-225.
218. Scatena R, Nocca G, De Sole P i sur. The priming effect of gemfibrozil on reactive oxygen metabolism of phagocytic leukocytes. An intriguing side effect. *Clin Chim Acta* 1997;226:173-183.
219. Škrha J, Štulc T, Hilgertova J i sur. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004;493:183-189.
220. Bradamante V, Vrkić N, Lucić A i sur. Interrelated effects of high sucrose diet and gemfibrozil on butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in rats. *Period Biol* 2005;107:189-193.
221. Alcântara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M i sur. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:399-404.
222. Hashimoto F, Ishikawa T, Hamada S, Hayashi H. Effect of gemfibrozil on lipid biosynthesis from acetyl-CoA derived from peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1213-1221.
223. Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003;170:21-29.
224. Koncsos P, Seres I, Harangi M i sur. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatr Res* 2010;67:309-313.
225. McMahon M, Skaggs BJ, Sahakian L i sur. High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1619-1624.
226. Zhang Y, Proenca R, Maffei M i sur. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432.

## 11.0 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.4.1977. godine u Zadru. Opću gimnaziju sam pohađala u Zadru od 1991. do 1995. kada sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2001. godine sam stekla naziv doktora medicine. Tijekom 2002. i 2003. godine sam obavljala pripravnički staž u KB Merkur. 2003. godine sam položila stručni ispit za doktora medicine. Tijekom 2003. i 2004. godine sam bila zaposlena na Sveučilišnoj klinici za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma «Vuk Vrhovac» u Zagrebu na radnom mjestu odjelnog liječnika. Od lipnja 2004. do prosinca 2006. godine sam bila zaposlena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak-asistent na znanstvenom projektu prof. dr. sc. Vlaste Bradamante (znanstveni projekt broj 108-0000000-0013 «Serumske esteraze, leptin, lipidi i antilipidni lijekovi»). Od 2004. do 2007. godine sam pohađala znanstveni poslijediplomski studij «Biomedicina i zdravstvo» na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od prosinca 2006. do prosinca 2010. sam specijalizirala patološku anatomiju u KBC Zagreb. Specijalistički ispit iz patološke anatomije sam položila u prosincu 2010. godine. Zaposlena sam u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb na radnom mjestu specijalist patolog.

## 12.0 PRILOZI

### 12.1 Popis tablica:

Tablica 1.1 Podjela hiperlipoproteinemija prema Fredricksonu (str. 5).

Tablica 5.1.1 Učinci atorvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora (str. 35).

Tablica 5.1.2 Učinci atorvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora (str. 40).

Tablica 5.1.3 Učinci atorvastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu štakora (str. 41).

Tablica 5.1.4 Učinci atorvastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora (str. 45).

Tablica 5.2.1 Učinci pravastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora (str. 47).

Tablica 5.2.2 Učinci pravastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora (str. 52).

Tablica 5.2.3 Učinci pravastatina na koncentraciju malondialdehida u srcu, jetri i bubregu štakora (str. 53).

Tablica 5.2.4 Učinci pravastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora (str. 57).

Tablica 5.3.1 Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora (str. 58).

Tablica 5.3.2 Učinci simvastatina na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora (str. 63).

Tablica 5.3.3 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu štakora (str. 64).

Tablica 5.3.4 Učinci simvastatina na koncentraciju leptina u plazmi štakora (str. 69).

Tablica 5.4.1 Učinci simvastatina na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri, bubregu i mozgu štakora (str. 70).

Tablica 5.5.1 Učinci gemfibrozila na katalitičku aktivnost paraoksonaze 1 u serumu i jetri i butirilkolinesteraze u plazmi i jetri štakora (str. 76).

Tablica 5.5.2 Učinci gemfibrozila na koncentraciju lipida i glukoze u plazmi štakora (str. 81).

Tablica 5.5.3 Učinci gemfibrozila na koncentraciju malondialdehida u plazmi, srcu, jetri i bubregu štakora (str. 82).

Tablica 5.5.4 Učinci gemfibrozila na koncentraciju leptina u plazmi štakora (str. 87).

## 12.2 Popis slika:

Slika 5.1.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 36).

Slika 5.1.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 37).

Slika 5.1.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 38).

Slika 5.1.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 39).

Slika 5.1.5 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 42).

Slika 5.1.6 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 43).

Slika 5.1.7 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene atorvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 44).

Slika 5.2.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 48).

Slika 5.2.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 49).

Slika 5.2.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 50).

Slika 5.2.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 51).

Slika 5.2.5 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 54).

Slika 5.2.6 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 55).

Slika 5.2.7 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene pravastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 56).

Slika 5.3.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 59).

Slika 5.3.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 60).

Slika 5.3.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 61).

Slika 5.3.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 62).

Slika 5.3.5 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 65).

Slika 5.3.6 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 66).

Slika 5.3.7 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 67).

Slika 5.3.8 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 68).

Slika 5.4.1 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 71).

Slika 5.4.2 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 72).

Slika 5.4.3 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 73).

Slika 5.4.4 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 74).

Slika 5.4.5 Koncentracija malondialdehida u mozgu štakora nakon primjene simvastatina tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 75).

Slika 5.5.1 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u serumu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 77).

Slika 5.5.2 Katalitička aktivnost paraoksonaze 1 u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 78).

Slika 5.5.3 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 79).

Slika 5.5.4 Katalitička aktivnost butirilkolinesteraze u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 80).

Slika 5.5.5 Koncentracija malondialdehida u plazmi štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 83).

Slika 5.5.6 Koncentracija malondialdehida u srcu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 84).

Slika 5.5.7 Koncentracija malondialdehida u jetri štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 85).

Slika 5.5.8 Koncentracija malondialdehida u bubregu štakora nakon primjene gemfibrozila tijekom 3 tjedna te nakon perioda oporavka u trajanju od 10 dana (str. 86).