

Povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s funkcionalnošću HDL čestica i endotelnom disfunkcijom u bolesnika s metaboličkim sindromom

Klobučar, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:417806>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Klobučar

**Povezanost koncentracije
endotelne lipaze u serumu
s funkcionalnošću HDL čestica
i endotelnom disfunkcijom u bolesnika
s metaboličkim sindromom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Klobučar

**Povezanost koncentracije
endotelne lipaze u serumu
s funkcionalnošću HDL čestica
i endotelnom disfunkcijom u bolesnika
s metaboličkim sindromom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao dio znanstvenog projekta Zaklade za znanost Republike Austrije *Endothelial lipase, HDL and endothelial dysfunction* (FWF grant P 27166-B23), koji je ostvaren međunarodnom suradnjom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Istraživačkog centra za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji (*Gottfried Schatz Forschungszentrum für zelluläre Signaltransduktion, Stoffwechsel und Altern; Medizinische Universität Graz*).

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Vesna Degoricija, dr. med.

Zahvaljujem mentorici, profesorici Vesni Degoriciji, doktorici medicine, za preneseno znanje, pomoć, savjete, suradnju i pružene prilike na mojem profesionalnom i znanstvenom putu.

Zahvaljujem i profesoru Saši Franku i njegovom timu u Istraživačkom centru za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji za pomoć u ostvarenju laboratorijskog dijela ovog istraživanja.

Zahvaljujem članovima svoje obitelji za bezuvjetnu podršku i ljubav u svakom trenutku te cjeloživotno ulaganje u znanje. Njima posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Endotelna disfunkcija	1
1.2. Lipoprotein velike gustoće (HDL)	5
1.3. Endotelna lipaza	8
1.4. Metabolički sindrom.....	12
1.5. Svrha istraživanja (ili Zašto analiziramo metabolički sindrom, endotelnu lipazu, HDL i endotelnu disfunkciju?)	13
2. HIPOTEZA	15
3. CILJEVI RADA	16
3.1. Opći cilj	16
3.2. Specifični ciljevi	16
4. ISPITANICI I METODE	17
4.1. Organizacija istraživanja i ispitanici.....	17
4.2. Priprema ispitanika za sudjelovanje u istraživanju.....	18
4.3. Anamnestički podatci ispitanika i fizikalni pregled	18
4.4. Uzorkovanje krvi ispitanika.....	19
4.5. Procjena endotelne funkcije brahijalne arterije	19
4.6. Obrada uzoraka seruma ispitanika.....	21
4.7. Statističke analize	24
5. REZULTATI.....	25
5.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	25
5.2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji.....	28
5.3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom	31
5.4. Lipidni sadržaj čestica HDL-a	34
5.5. Funkcionalnost HDL-a	37
5.6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika	39
5.7. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a	42
5.8. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a.....	45

5.9. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i pokazatelja funkcionalnosti HDL-a	48
5.10. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i pokazatelja funkcije brahijalne arterije ..	50
5.11. Korelacije serumskih koncentracija sastavnica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije	51
5.12. Korelacije omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije	54
5.13. Korelacije pokazatelja funkcionalnosti HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije	57
6. RASPRAVA.....	60
6.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	60
6.2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji.....	61
6.3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom	63
6.4. Lipidni sadržaj čestica HDL-a	65
6.5. Funkcionalnost HDL-a	65
6.6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika	67
6.7. Korelacije analiziranih pokazatelja	69
6.8. Ograničenja istraživanja	78
7. ZAKLJUČCI.....	80
7.1. Korelacije u skupini zdravih ispitanika	80
7.2. Korelacije u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom	81
8. KRATKI SADRŽAJ	83
9. SUMMARY	84
10. POPIS LITERATURE	85
11. ŽIVOTOPIS	104

PRILOZI

Popis tablica

Popis slika

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABCA1 - engl. *ATP-binding cassette transporter A1*; prijenosnik A1 koji veže adenozin-trifosfat

ABCG1 - engl. *ATP-binding cassette transporter G1*; prijenosnik G1 koji veže adenozin-trifosfat

AE - engl. *arylesterase activity of paraoxonase 1*; arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1

ALT - alanin aminotransferaza

ANGPTL3 - engl. *angiopoietin-like protein 3*; angiopoietinu sličan protein 3

AP - engl. *alkaline phosphatase*; alkalna fosfataza

apo - apolipoprotein

apoBDS - engl. *apolipoprotein B-depleted serum*; serum iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B

AST - aspartat aminotransferaza

C - engl. *cholesterol*; kolesterol

CEC - engl. *cholesterol efflux capacity*; kapacitet za efluks kolesterola

CETP - engl. *cholesteryl ester transfer protein*; prijenosni protein za estere kolesterola

cGMP - ciklički gvanozin-monofosfat

CK - engl. *creatine kinase*; kreatin kinaza

CPMG - Carr-Purcell-Meibom-Gill (sekvenca pulsa u NMR spektroskopiji)

CRP - engl. *C-reactive protein*; reaktivni protein C

2D JRES - engl. *two-dimensional J-resolved* (sekvenca pulsa u NMR spektroskopiji)

DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (medij za kultiviranje stanica)

DNA - engl. *deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinska kiselina

eGFR - engl. *estimated glomerular filtration rate*; procijenjena brzina glomerularne filtracije

EL - endotelna lipaza

ELISA - engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; enzimski imunokemijski test

eNOS - endotelna NO sintaza, endotelna sintaza dušikova monoksida

FMD - engl. *flow-mediated dilation*; vazodilatacija izazvana povećanim protokom krvi

g - akceleracija sile teže

GGT - γ -glutamil transferaza, gama-glutamil transferaza

H - engl. *healthy*; zdravi ispitanik

HDL - engl. *high-density lipoprotein*; lipoprotein velike gustoće

HDL-C - engl. *high-density lipoprotein cholesterol*; kolesterol u sastavu čestica HDL-a

HOMA-IR - engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance* (model za procjenu inzulinske rezistencije)

IDL - engl. *intermediate-density lipoprotein*; lipoprotein srednje gustoće

IL-1 β - interleukin-1 beta

IL-6 - interleukin-6

ITM - indeks tjelesne mase

LCAT - engl. *lecithin/cholesterol acyltransferase*; lecitin:kolesterol-aciltransferaza

LDF - engl. *laser Doppler flowmetry*; mjerenje protoka na temelju Dopplerovog učinka pomoću laserske zrake

LDH - laktat dehidrogenaza

LDL - engl. *low-density lipoprotein*; lipoprotein male gustoće

LDL-C - engl. *low-density lipoprotein cholesterol*; kolesterol u sastavu čestica LDL-a

LpPLA2 - engl. *lipoprotein-associated phospholipase A2*; fosfolipaza A2 vezana na lipoproteine

M - muškarac

MR - magnetska rezonancija

MS - metabolički sindrom

N - engl. *number*; broj

NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*; vazodilatacija izazvana primjenom gliceriltrinitrata

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

NO - dušikov monoksid

NOESY - engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (sekvenca pulsa u NMR spektroskopiji)

NOS - NO sintaza, sintaza dušikova monoksida

PET - pozitronska emisijska tomografija

PL - engl. *phospholipid*; fosfolipid

PON1- paraoksonaza 1

PPR α - engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; alfa receptor koji se aktivira proliferatorom peroksisoma

r - Spearmanov koeficijent korelacije

ROS - engl. *reactive oxygen species*; slobodni radikali kisika

S1P - engl. *sphingosine-1-phosphate*; sfingozin-1-fosfat

SR-BI - engl. *scavenger receptor BI*; receptor hvatač BI

TG - triglicerid

TNF- α - engl. *tumor necrosis factor alpha*; faktor nekroze tumora alfa

U - engl. *unit*; jedinica

VLDL - engl. *very low-density lipoprotein*; lipoprotein vrlo male gustoće

Ž - žena

1. UVOD I SVRHA RADA

Kardiovaskularne bolesti, a osobito ishemijska bolest srca, posljednjih desetljeća predstavljaju najčešći uzrok smrti odraslih osoba u srednje razvijenim i razvijenim zemljama svijeta.¹ U Sjedinjenim Američkim Državama u razdoblju od 2015. do 2020. godine od bolesti srca, kao najčešćeg uzroka smrti, umrlo je više od 600 000 ljudi godišnje.² U Republici Hrvatskoj je 2020. godine od bolesti kardiovaskularnog sustava preminulo više od 22 000 osoba, odnosno 40,0% svih preminulih.³

Kardiovaskularne bolesti, uvidom u statistiku baze podataka *Scopus*, uz onkologiju i kirurgiju, predstavljaju područje medicinske znanosti u kojemu se objavljuje najveći broj znanstvenih radova godišnje (18 790 dokumenata u 2020. godini samo u Sjedinjenim Američkim Državama).⁴ Unatoč tome, a uzevši u obzir navedene epidemiološke podatke, ostaje potreba za daljnjim istraživanjima, posebno u području otkrivanja ranih, klinički asimptomatskih stadija kardiovaskularnih bolesti.

Patofiziološku osnovu najvećeg broja kardiovaskularnih bolesti predstavljaju aterosklerotske promjene stijenke krvnih žila. One su vidljive *in vivo* ultrazvučnim pregledom velikih perifernih arterija, CT angiografijom ili invazivnom angiografijom koronarnih ili perifernih arterija, kao i *ex vivo* na patohistološkom preparatu arterije. Nasuprot tome, endotelna disfunkcija predstavlja ranu i reverzibilnu fazu iste bolesti, koja prethodi strukturnim promjenama stijenke arterija vidljivim ultrazvukom ili angiografijom.⁵

1.1. Endotelna disfunkcija

1.1.1. Endotelne stanice i dušikov monoksid

Lumen krvne žile obložen je slojem endotelnih stanica. Istraživanja njihove funkcije intenzivirala su se od 1980. godine, kada su Furchgott i Zawadski pokazali da je za postizanje očekivane vazodilatacije nakon primjene acetilkolina nužno postojanje neoštećenih endotelnih stanica stijenke arterije.⁶

Danas je poznato da endotelne stanice posreduju izmjenu tvari između stanica i krvi u kapilarama, kontroliraju hemostazu (imaju antikoagulantni, antitrombocitni i fibrinolitički učinak) te upravljaju kontraktilnošću glatkih mišićnih stanica u stijenci krvne žile, čime održavaju tonus stijenke.^{5,7}

Tonus stijenke krvne žile rezultat je trenutnog međuodnosa tvari koje proizvode endotelne stanice, a koje imaju relaksirajuće ili kontraktilno djelovanje na glatke mišićne stanice stijenke. Relaksirajući učinak na glatke mišićne stanice stijenke arterije, odnosno vazodilatacijsko djelovanje, imaju dušikov monoksid (NO), prostaciklin, bradikinin i iz endotelnih stanica izlučen hiperpolarizirajući faktor (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Suprotno, kontraktilni učinak na glatke mišićne stanice stijenke arterije i vazokonstriksijsko djelovanje imaju endotelin-1 i angiotenzin II.^{5,8}

Dušikov monoksid, osim relaksirajućeg učinka na glatke mišićne stanice stijenke krvne žile i posljedične vazodilatacije, uzrokuje inhibiciju agregacije trombocita, sprječava ekspresiju adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica, čime smanjuje adheziju leukocita na stijenku krvne žile; stimulira proizvodnju mitohondrijske DNA i proteina u stanicama stijenke krvne žile, čime kontrolira staničnu proizvodnju slobodnih radikala kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS); smanjuje proliferaciju glatkih mišićnih stanica stijenke krvne žile te inhibira proizvodnju i djelovanje endotelina-1.^{9,10} S obzirom na opisane učinke, NO se smatra ključnim čimbenikom u održavanju funkcije zdravog endotela.

1.1.2. Biokemijska osnova endotelne disfunkcije

Endotelna disfunkcija označava neravnotežu učinaka vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih produkata endotelnih stanica stijenke krvne žile, koja je uzrokovana smanjenom proizvodnjom ili djelovanjem relaksirajućih čimbenika, pri čemu prevladava mehanizam vazokonstrikcije.¹¹ S obzirom na raznolikost opisanih učinaka kojima NO održava urednu funkciju stijenke krvne žile te činjenicu da bradikinin i prostaciklin dio svog vazodilatacijskog učinka ostvaruju posredno preko NO,¹⁰ široko prihvaćena definicija endotelne disfunkcije označava smanjenu raspoloživost NO koji djeluje na stijenku krvne žile.⁹

NO sintaza (NOS) je enzim koji iz L-arginina proizvodi NO i L-citrulin.^{9,12} Njezin izoenzim endotelna NO sintaza (eNOS) proizvodi većinu NO koji ostvaruje opisane učinke na stijenci krvne žile.^{9,10} Smanjena raspoloživost NO i posljedični nastanak endotelne disfunkcije mogu biti uzrokovani smanjenom ekspresijom eNOS, inhibicijom eNOS, nedostatkom ili kemijskom modifikacijom supstrata i kofaktora za enzim, kao i inaktivacijom proizvedenog NO slobodnim radikalima kisika.^{9,10} Učinak sličan endotelnoj disfunkciji može biti uzrokovan i nereaktivnošću glatkih mišićnih stanica stijenke krvne žile na postojeći NO.¹⁰

1.1.3. Endotelna disfunkcija u tjelesnim stanjima i bolestima

Opisani mehanizmi posreduju smanjenu raspoloživost NO koja se razvija starenjem, u postmenopauzalnom periodu kod žena, koja je povezana s pušenjem cigareta te dokazana kod bolesnika s arterijskom hipertenzijom, šećernom bolešću tipa 2, hiperlipidemijom, pretilošću i metaboličkim sindromom.^{10,13-20}

1.1.4. Mjerenje endotelne disfunkcije

Do sada opisane metode kojima je moguće kvantificirati stupanj endotelne disfunkcije su: mjerenje promjene promjera koronarnih arterija nakon intrakoronarne primjene acetilkolina, adozina ili gliceriltrinitrata angiografskom metodom; procjena endotelne funkcije koronarne mikrovaskulature magnetskom rezonancijom (MR) ili pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) nakon primjene o endotelu ovisnog podražaja; venska okluzijska pletizmografija ekstremiteta uz intraarterijsku primjenu acetilkolina; ultrazvučno mjerenje promjene promjera brahijalne arterije u trenutku vazodilatacije izazvane povećanim protokom krvi (engl. *flow-mediated dilation*, FMD); analiza promjene pulsog vala arterije nakon inhalacijske primjene salbutamola i sublingvalne primjene gliceriltrinitrata; mjerenje promjene tonometrijskog signala malih perifernih arterija u trenutku vazodilatacije izazvane povećanim protokom krvi; i mjerenje promjene protoka krvi u malim krvnim žilama kože laserskom metodom koja se temelji na Dopplerovom efektu (engl. *laser Doppler flowmetry*, LDF) nakon primjene acetilkolina iontoforezom ili mikro-kateterom supkutano.^{21,22}

Tehnika procjene endotelne disfunkcije kod ljudi ultrazvučnim mjerenjem promjene promjera brahijalne arterije u trenutku vazodilatacije izazvane povećanim protokom krvi (FMD) utemeljena je ranih 1990.-ih godina.^{23,24,25} Metoda podrazumijeva automatsko i kontinuirano mjerenje promjera brahijalne arterije prikazane ultrazvukom prije, tijekom i nakon okluzije arterijskog i venskog protoka krvi u podlaktici manžetom tijekom pet minuta. Prosječna vrijednost izmjerenih promjera arterije tijekom više srčanih ciklusa prije okluzije uspoređuje se s analognom varijablom nakon okluzije arterije te se računa postotak promjene promjera brahijalne arterije. Priprema ispitanika, oprema i postupak mjerenja detaljno su opisani smjernicama koje su izdali *American College of Cardiology*²⁶ i *American Physiological Society*.²⁷ Važnost uniformnosti tehnike mjerenja i pridržavanja preporuka iz smjernica naglašena je u sistematskim pregledima ovom metodom učinjenih istraživanja.^{28,29}

Metoda se temelji na naglom povećanju smičnog naprežanja (engl. *shear stress*) stijenke arterije protokom krvi nakon prekida vanjske okluzije arterije manžetom, koje uzrokuje otvaranje kanala za kalij na membrani endotelne stanice, izlazak iona kalija iz stanice i njenu hiperpolarizaciju.^{30,31,32} Time se povećava i utok iona kalcija u stanicu, koji aktivira enzim eNOS te time uzrokuje produkciju NO. Smično naprežanje stijenke krvne žile uzrokuje i fosforilaciju eNOS pomoću serin/treonin kinaze Akt, čime se pojačava njezina aktivnost.^{26,33,34} Proizvedeni NO aktivira gvanilat ciklazu u glatkim mišićnim stanicama stijenke krvne žile, čime povećava proizvodnju cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP), koji aktivira protein kinazu G. Protein kinaza G smanjuje koncentraciju iona kalcija u citoplazmi glatke mišićne stanice stijenke krvne žile zaustavljajući njihov utok i povećavajući njihov eksport iz stanice te pohranu u stanična spremišta. O kalciju ovisna miozin kinaza u okolišu s niskom koncentracijom kalcija u citoplazmi ne može fosforilirati miozin. Protein kinaza G također aktivira miozin fosfatazu, koja defosforilira ranije fosforilirani miozin. Time se proces kontrakcije glatke mišićne stanice stijenke krvne žile prekida, a kao vidljivi rezultat biokemijskog procesa, nastaje vazodilatacija.¹⁰

Kod ljudi sa sniženim postotkom dilatacije brahijalne arterije koji se izaziva povećanim protokom krvi (snižen FMD), dodatni uvid u patofiziološke procese u pozadini pruža mjerenje postotka promjene promjera brahijalne arterije nakon sublingvalne primjene gliceriltrinitrata (engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, NMD). Gliceriltrinitrat predstavlja egzogeni izvor NO, koji djeluje izravno na glatke mišićne stanice stijenke krvne žile i uzrokuje *o endotelu neovisnu vazodilataciju*. Snižen postotak dilatacije brahijalne arterije nakon sublingvalne primjene gliceriltrinitrata (snižen NMD) upućuje na smanjenu reaktivnost glatkih mišićnih stanica na NO. Suprotno, snižen FMD i održan NMD upućuju na smanjenu raspoloživost endogenog NO, čija bi proizvodnja trebala biti izazvana povećanim protokom krvi nakon završetka okluzije krvne žile.^{26,35}

1.1.5. Tvari s protektivnim djelovanjem na endotelnu funkciju

Za razliku od ranije opisanih tvari s kratkoročnim i parakrinim vazodilacijskim djelovanjem koje izlučuju endotelne stanice stijenke krvne žile (bradikinin, prostaciklin), poznato je da vitamin D, adiponektin, estrogene te čestice lipoproteina velike gustoće (engl. *high-density lipoprotein*, HDL) aktivacijom eNOS povećavaju produkciju NO te imaju dugoročni protektivni učinak na krvne žile.^{10,36}

1.2. Lipoprotein velike gustoće (HDL)

1.2.1. Izgled i struktura čestice HDL-a

Lipoprotein velike gustoće (HDL) predstavlja heterogenu skupinu lipoproteinskih čestica prosječne veličine 8 do 10 nm i gustoće 1,063 do 1,210 kg/L, diskoidnog do kuglastog oblika, koje se nalaze u krvi. Sastoje se od proteina te neesterificiranog kolesterola, estera kolesterola, fosfolipida i triglicerida, koji čine lipidnu komponentu.³⁷

Površinski, hidrofilni sloj čestice HDL-a oblikuju proteini, fosfolipidi i neesterificirani kolesterol, dok se u unutrašnjosti čestice HDL-a nalaze u vodi netopljivi esteri kolesterola i trigliceridi.³⁸

Najpoznatiji proteini u sastavu čestica HDL-a su apolipoproteini (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE i drugi), enzimi (LCAT, PON1) i proteini koji sudjeluju u izmjeni lipida (CETP), no važni su i proteini akutne faze, komponente komplementa (C2, C3), proteini uključeni u hemostazu (protrombin, fibrinogen, antitrombin III, plazminogen) te proteini koji vežu metale ili služe transportu vitamina. Opisano ih je više od 80.^{37,39}

- * Apolipoprotein A-I (apoA-I) je glavni strukturni protein čestice HDL-a, koji čini oko 70% njene proteinske mase. Sadrže ga gotovo sve čestice HDL-a. Aktivira enzim lecitin:kolesterol-aciltransferazu (engl. *lecithin/cholesterol acyltransferase*, LCAT).^{37,40}
- * Apolipoprotein A-II (apoA-II) čini 15-20% proteinske mase HDL-a, no nalazi se u sastavu samo 50-60% svih čestica HDL-a.^{37,41}
- * LCAT je enzim koji katalizira esterifikaciju kolesterola u lipoproteinima prijenosom masne kiseline iz sastava fosfatidilkolina na molekulu kolesterola; pri tome iz fosfatidilkolina nastaje lizofosfatidilkolin. Aktiviraju ga apoA-I i apoC-I. Esterifikacijom kolesterola tek formirana čestica HDL-a poprima kuglasti oblik.^{37,40,42}
- * Paraoksonaza 1 (engl. *paraoxonase 1*, PON1) katalizira hidrolizu homocistein tiolaktona, čime sprječava homocisteinilaciju proteina koja inače ometa njihovu fiziološku funkciju.^{37,43} Također metabolizira perokside fosfolipida i estera kolesterola te time sprječava nakupljanje lipidnih peroksida u česticama lipoproteina male gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL).^{44,45} Enzim je prisutan u samo 5-10% cirkulirajućih čestica HDL-a.⁴⁶

- * Prijenosni protein za estere kolesterola (engl. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP) omogućuje prijenos estera kolesterola iz čestica HDL-a lipoproteinskim česticama koje sadrže apolipoprotein B (apoB) [hilomikroni, lipoprotein vrlo male gustoće (engl. *very low-density lipoprotein*, VLDL), lipoprotein srednje gustoće (engl. *intermediate-density lipoprotein*, IDL), LDL] u zamjenu za trigliceride.^{37,42}

Lipidni sastav čestice HDL-a čine fosfolipidi (fosfatidilkolin, fosfatidilkolin-plazmalogen, lizofosfatidilkolin, lizofosfatidilkolin-plazmalogen, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol i drugi) kao molarno najzastupljenija komponenta, zatim sfingolipidi (sfingomijelin), neesterificirani kolesterol i esteri kolesterola te trigliceridi.^{37,47}

Čestice se HDL-a međusobno razlikuju prema gustoći, veličini, naboju te udjelu pojedinih proteinskih i lipidnih sastavnica, zbog čega ih dijelimo u podrazrede. U literaturi je moguće naći različito imenovane podrazrede, ovisno o metodi koja je korištena za razdvajanje ili određivanje količine i sastava čestica (ultracentrifugiranje, elektroforeza prema veličini ili naboju čestice, elektroimunodifuzija, nuklearna magnetska rezonancija).³⁷

1.2.2. Životni ciklus čestice HDL-a i uloge u metabolizmu lipida

Formiranje čestice HDL-a počinje sintezom apolipoproteina A-I u stanicama jetre i stijenke crijeva. Protein ABCA1 (engl. *ATP-binding cassette transporter A1*, ABCA1) omogućuje prijenos fosfolipida i neesterificiranog kolesterola iz hepatocita na apoA-I, kao nezreli oblik čestice HDL-a.^{42,48} ApoA-I aktivira enzim LCAT koji katalizira esterifikaciju kolesterola u čestici HDL-a, čime ona poprima kuglasti oblik.^{37,40,42} Protein CETP omogućuje prijenos triglicerida iz čestica VLDL-a, IDL-a i LDL-a u sastav čestice HDL-a, uz prijenos estera kolesterola u suprotnom smjeru.^{37,42}

Cirkulirajuće čestice HDL-a naknadno modificiraju enzimi hepatična lipaza i endotelna lipaza. Hepatična lipaza ima jače izražen afinitet za razgradnju triglicerida i slabije izraženu fosfolipaznu aktivnost. Endotelna lipaza razgrađuje primarno fosfolipide, a kapacitet za razgradnju triglicerida joj je manji.^{42,49-51}

Lipoprotein lipaza, koja razgrađuje dominantno trigliceride u sastavu lipoproteina, i čestice HDL-a koje pomoću proteina CTEP preuzimaju trigliceride i daju estere kolesterola, sudjeluju u procesu prijelaza čestica VLDL-a (s najvećim udjelom triglicerida) u čestice IDL-a i konačno LDL-a (s najvećim udjelom kolesterola i estera kolesterola).^{42,52,53}

Čestice LDL-a prenose kolesterol i estere kolesterola do perifernih tkiva, gdje se oni koriste za izgradnju staničnih membrana i proizvodnju steroidnih hormona u nadbubrežnoj žlijezdi i spolnim žlijezdama. Prolaskom krvnim žilama, čestice LDL-a izložene su oksidativnim mehanizmima pa dio kolesterola odlažu i u makrofage smještene u stijenci krvnih žila.⁵⁴ Metabolički put najvećeg broja čestica LDL-a završava endocitozom u hepatocite pomoću membranskih receptora za LDL, gdje se razgrađuju.^{52,53}

Zrele čestice HDL-a interakcijom s membranskim proteinima makrofaga ABCG1 (engl. *ATP-binding cassette transporter G1*, ABCG1) odstranjuju kolesterol odložen u makrofage smještene u stijenci krvne žile.^{55,56} Isti se proces odvija i posredovanjem proteina ABCA1, kada kolesterol preuzimaju nezrele čestice HDL-a koje sadrže apoA-I s tek malom količinom lipida, ili posredovanjem proteina SR-BI (engl. *scavenger receptor BI*, SR-BI).⁴² Proces se naziva efluks kolesterola i početni je korak povratnog transporta kolesterola u jetru (engl. *reverse cholesterol transport*), jedne od važnih funkcija HDL-a.⁵⁷ Povratni transport kolesterola u jetru završava vezanjem čestice HDL-a na receptor SR-BI na membrani hepatocita i prijenosom estera kolesterola u hepatocite, dok preostali dio čestice HDL-a ostaje u krvi. Dio unesenog kolesterola se u hepatocitima u neesterificiranom obliku koristi za izgradnju VLDL-a, a dio služi za proizvodnju žučnih kiselina koje se izlučuju u crijevo.⁴² Osim izoliranog unosa estera kolesterola u hepatocite pomoću SR-BI receptora, postoji i mehanizam endocitoze cijele čestice HDL-a u hepatocit, gdje se ona razgrađuje.^{42,58} Dio apoA-I i čestica HDL-a razgrađuje se u epitelnim stanicama proksimalnog tubula glomerula bubrega, u koje ulaze pomoću membranskog proteina kubilina.^{42,59} Prosječno vrijeme koje čestica HDL-a provede u cirkulaciji je 4 do 6 dana.⁴²

1.2.3. Dodatne uloge čestica HDL-a

Osim ključne uloge u metabolizmu i transportu lipida u organizmu, čestice HDL-a imaju i niz drugih učinaka koji pridonose održavanju homeostaze i funkcije zdravog endotela krvnih žila: antioksidativni, antiinflamatorni, antitrombocitni i antikoagulacijski učinak. Dodatno, HDL povećava produkciju NO, čime amplificira ranije opisane pozitivne učinke NO.^{57,60,61}

Čestice HDL-a ostvaruju svoj antioksidativni učinak pretvaranjem lipidnih hidroperoksida u lipidne hidrokside pomoću apoA-I i apoA-II,^{62,63} a i pomoću enzima PON1, koji razgrađuje perokside fosfolipida i estera kolesterola.^{44,45} To sprječava nakupljanje lipidnih peroksida u česticama LDL-a. Također, HDL sprječava inhibiciju eNOS već oksidiranim česticama LDL-a.⁶⁴

Antiinflamatorno djelovanje čestica HDL-a ogleda se u činjenici da smanjuju citokinima izazvanu ekspresiju adhezijskih molekula na površini endotelne stanice stijenke krvne žile, a time i interakciju leukocita s endotelom te transmigraciju monocita u subendotelni prostor stijenke krvne žile.⁶⁵⁻⁶⁸ Dodatno, čestice HDL-a izravno smanjuju aktivaciju monocita i neutrofila.⁶⁹

Antitrombotični učinak čestica HDL-a odvija se na više razina: smanjuju izlučivanje čimbenika aktivacije trombocita i tromboksana A₂ iz endotelne stanice, smanjuju aktivaciju trombocita izravnim djelovanjem na njihove strukture te povećavaju izlučivanje NO i prostaciklina iz endotelne stanice stijenke krvne žile, koji također imaju vlastito antitrombotično djelovanje.⁶⁹

Čestice HDL-a svoje antikoagulacijsko djelovanje realiziraju izravnim inaktivacijom tkivnog faktora, inhibicijom kompleksa tkivnog faktora i faktora VIIa te inaktivacijom faktora Va.⁶¹

Učinak povećanja proizvodnje NO, čestice HDL-a ostvaruju izravnim aktivacijom eNOS pomoću SR-BI i S1P₃ receptora u kaveolama endotelne stanice stijenke krvne žile,^{70,71} kao i sprječavanjem inhibicije eNOS oksidiranim česticama LDL-a.⁶⁴

Dodatno, čestice HDL-a svojim neizravnim djelovanjem preveniraju hiperglikemiju: pojačavaju sekreciju inzulina iz β -stanica pankreasa, sprječavaju apoptozu istih stanica, olakšavaju ulazak glukoze u stanice skeletnog mišića i potiču stvaranje glikogena.⁶⁹

Iz navedenoga je vidljivo da se dodatna djelovanja čestica HDL-a podudaraju s ranije opisanim djelovanjem NO. Čestice HDL-a sudjeluju u održavanju funkcija zdravog endotela izravnim, vlastitim djelovanjem, ali i neizravno, pojačavanjem produkcije NO. Redundantnost mehanizama upućuje na važnost endotelne funkcije u održavanju homeostaze u organizmu.

1.3. Endotelna lipaza

Endotelna lipaza (EL) je, uz lipoprotein lipazu i hepatičnu lipazu, enzim iz obitelji lipaza s afinitetom za razgradnju triglicerida. Za razliku od lipoprotein lipaze i hepatične lipaze, endotelna lipaza, uz afinitet za razgradnju triglicerida, ima i izraženiju fosfolipaznu aktivnost (omjer afiniteta prema razgradnji triglicerida i fosfolipida iznosi 2:3).^{49,50,72}

S obzirom da čestice HDL-a, u usporedbi s drugim lipoproteinima, u sastavu imaju najveći udio fosfolipida i najmanji udio triglicerida,⁵² endotelna lipaza predstavlja važan modifikator njihove koncentracije i strukture s utjecajem na metabolizam.^{72,73}

1.3.1. Životni ciklus i osnovni učinci endotelne lipaze

Endotelnu lipazu proizvode endotelne stanice stijenke krvnih žila koje opskrbljuju jetru, pluća, bubrege, štitnu žlijezdu i placentu.^{49,50} Osim u endotelnim stanicama, eksprimirana je i u glatkim mišićnim stanicama stijenke zdrave arterije, a dodatno i u makrofazima u stijenci aterosklerotski promijenjene humane arterije.^{74,75}

Dio u krv izlučenih molekula endotelne lipaze u interakciji je preko heparan sulfatnih proteoglikana s endotelnim stanicama stijenke krvne žile.⁷⁶

Svojom fosfolipaznom aktivnošću, endotelna lipaza razlaže fosfolipid fosfatidilkolin u sastavu lipoproteinskih čestica, oslobađajući pri tome zasićene i nezasićene masne kiseline.⁷⁷ Ima najveći afinitet za čestice HDL-a jer one sadrže najviše fosfolipida u usporedbi s drugim lipoproteinskim česticama.⁵² Endotelna lipaza ostvaruje fosfolipazni učinak i na česticama VLDL-a, IDL-a te LDL-a,⁷⁸ ali je slabije izražen zbog manjeg udjela fosfolipida i većeg udjela sfingomijelina u sastavu tih lipoproteina u usporedbi s česticama HDL-a.^{52,79}

Iako u manjoj mjeri nego fosfolipide, endotelna lipaza razlaže i trigliceride u sastavu lipoproteinskih čestica oslobađajući masne kiseline. To se odnosi na trigliceride u sastavu čestica HDL-a i u sastavu trigliceridima bogatih lipoproteina (hilomikroni, VLDL, IDL).^{78,80}

Osim enzimske lipolitičke aktivnosti, endotelna lipaza neenzimskim učinkom sudjeluje u vezivanju čestica lipoproteina na stanicu. Opisana "vezna" funkcija endotelne lipaze važna je za selektivni unos estera kolesterola iz čestica HDL-a u jetru i za unos cijelih čestica HDL-a u stanicu.^{81,82} Endotelna lipaza pospješuje i adheziju upalnih stanica na stanice stijenke krvne žile pomoću heparan sulfatnih proteoglikana.⁸³

Sfingomijelin, protein ANGPTL3 (engl. *angiopoietin-like protein 3*, ANGPTL3) i apoA-II inhibiraju funkciju endotelne lipaze, a proprotein konvertaze ju fragmentiraju i inaktiviraju.^{76,79,84-86}

1.3.2. Rezultantni učinci endotelne lipaze na strukturu, veličinu, koncentraciju i funkciju čestica HDL-a

Endotelna lipaza razlaže fosfatidilkolin u sastavu čestica HDL-a, pri čemu oslobađa zasićene i nezasićene masne kiseline.⁷⁷ Posljedično smanjuje sadržaj fosfolipida u česticama HDL-a i serumsku koncentraciju fosfolipida u sastavu HDL-u.^{87,88,89}

Pospješujući unos estera kolesterola iz čestice HDL-a preko SR-BI receptora u jetru, endotelna lipaza smanjuje sadržaj kolesterola u česticama HDL-a i serumsku koncentraciju kolesterola u sastavu HDL-a.^{82,87,89}

Hidrolizom triglicerida endotelna lipaza smanjuje njihov sadržaj u česticama HDL-a.⁸⁰

Pod utjecajem endotelne lipaze dolazi do smanjenja koncentracije apoA-I u serumu, maseno i funkcionalno glavnog proteina HDL čestice.^{87,89} Ona ne uzrokuje disocijaciju apoA-I od čestice HDL-a,⁹⁰ nego povećava unos apolipoproteina u česticama HDL-a u jetru i bubreg, gdje se razgrađuju.⁸⁷

Razina hidrolize fosfolipida u sastavu čestice HDL-a proporcionalna je smanjenju veličine čestice HDL-a.⁹⁰ Kao posljedica, djelovanjem endotelne lipaze, smanjuje se koncentracija velikih i povećava se koncentracija malih čestica HDL-a.^{73,87,89}

Povećana koncentracija endotelne lipaze povezana je sa smanjenjem ukupne koncentracije čestica HDL-a.⁸⁹ Endotelna lipaza svojom "veznom" aktivnošću i bez posredovanja SR-BI receptora pospješuje unos cijelih čestica HDL-a u stanice jetre i bubrega, gdje se razgrađuju.^{82,87} Smatra se da je za povećani klirens čestica HDL-a važna i prethodna promjena njihove strukture pod utjecajem endotelne lipaze.⁷³

Dosadašnja istraživanja o utjecaju endotelne lipaze na kapacitet HDL-a za efluks kolesterola daju proturječne rezultate. Studije učinjene *in vitro* i *in vivo* na miševima pokazale su da endotelna lipaza uzrokuje poboljšanje kapaciteta HDL-a za efluks kolesterola koji je posredovan proteinom ABCA1.^{91,92} Pretpostavlja se da je opisani učinak posredovan "veznom" aktivnošću endotelne lipaze, koja pospješuje kontakt čestice HDL-a s endotelnim stanicama stijenke krvne žile, kao i lipolitičkom aktivnošću endotelne lipaze, koja uzrokuje remodelaciju čestice HDL-a i omogućuje joj lakši prolazak kroz sloj endotelnih stanica stijenke krvne žile do makrofaga smještenih subendotelno.⁹³ Pri tome endotelna lipaza nije povezana s ekspresijom ABCA1 proteina koji posreduje efluks.^{73,91} Istovremeno je pokazano i da endotelna lipaza smanjuje kapacitet HDL-a za efluks kolesterola posredovan proteinom SR-BI.⁹² *In vivo* učinjena istraživanja na miševima i ljudima koja nisu diferencirala proteine koji posreduju efluks, pokazuju da endotelna lipaza, unatoč očekivanoj promjeni strukture čestica HDL-a, ili nema utjecaj ili uzrokuje smanjenje kapaciteta HDL-a za efluks kolesterola.^{88,89,94}

Čestica HDL-a modificirana endotelnom lipazom *in vitro* sama je manje podložna oksidaciji i ima veći kapacitet zaštite čestice LDL-a od oksidacije, u usporedbi s kontrolnom česticom HDL-a.⁸⁰ Utjecaj endotelne lipaze na sadržaj proteina PON1 u česticama HDL-a i njegovu arilesteraznu aktivnost razlikuje se u analizama *in vitro* i *in vivo*, pri čemu je *in vivo* kod miševa pod utjecajem endotelne lipaze zabilježen povećan sadržaj PON1 u HDL-u i povećana arilesterazna aktivnost PON1.⁴⁶

Endotelnom lipazom modificirane čestice HDL-a učinkovitije aktiviraju eNOS u usporedbi s kontrolnim česticama HDL-a, što je posredovano S1P (engl. *sphingosine-1-phosphate*, sfingozin-1-fosfat) receptorima.^{95,96}

Dodatno, remodelacija čestice HDL-a endotelnom lipazom povećava njezin kapacitet za PPR α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPR α) signalnim putem posredovano smanjenje ekspresije adhezijskih molekula na endotelnim stanicama koje su stimulirane citokinima.⁹⁷ Unatoč tome, opisano je da sama endotelna lipaza svojom neenzimskom, "veznom" aktivnošću, posredovanom heparan sulfatnim proteoglikanima, pospješuje adheziju monocita na stijenku krvne žile,⁸³ kao i unos neoksidiranih i oksidiranih čestica LDL-a u makrofage.^{98,99} Postojanjem opisanih suprotstavljenih mehanizama regulacije adhezije molekula na endotelne stanice stijenke krvne žile pod utjecajem endotelne lipaze, može se objasniti činjenica da kod ljudi s genetski uvjetovanim potpunim gubitkom funkcije endotelne lipaze nije opisana značajna razlika u ekspresiji adhezijskih molekula u odnosu na kontrolne ispitanike.⁸⁸

1.3.3. Čimbenici koji utječu na ekspresiju endotelne lipaze

Proupalni citokini, faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-6 (IL-6), povećavaju ekspresiju endotelne lipaze u kultiviranim endotelnim stanicama.^{93,100} Angiotenzin II *in vitro* stimulira ekspresiju endotelne lipaze u glatkim mišićnim stanicama stijenke krvne žile, a lipopolisaharid u makrofazima.^{98,101}

Osim biokemijskih čimbenika, ekspresiju endotelne lipaze u kultiviranim endotelnim stanicama stijenke krvne žile povećavaju sile smičnog naprezanja i cikličkog rastezanja.¹⁰⁰ Smično je naprezanje stijenke inače u krvnoj žili uzrokovano ubrzanim protokom krvi, a cikličko rastezanje povišenim hidrostatskim tlakom krvi.

Statini smanjuju ekspresiju endotelne lipaze u endotelnim stanicama i makrofazima, kao i njezinu fosfolipaznu aktivnost.^{76,102}

1.3.4. Patološka stanja u kojima je povećana koncentracija endotelne lipaze

U pretilih ljudi bez drugih kroničnih bolesti zabilježena je povećana koncentracija endotelne lipaze u serumu. Veći indeks tjelesne mase (ITM), veća količina visceralnog masnog tkiva i veći opseg struka povezani su s većom koncentracijom endotelne lipaze u serumu.^{103,104} Pretpostavljeni patofiziološki mehanizam povećanja koncentracije endotelne lipaze je njena povećana ekspresija pod utjecajem citokina i drugih upalnih čimbenika koje izlučuju stanice masnog tkiva.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Povećana ekspresija endotelne lipaze dokazana je u stijenci aorte štakora s hipertenzijom.¹⁰¹ Poznato je da su više vrijednosti krvnog tlaka kod ljudi povezane s većom serumskom koncentracijom endotelne lipaze.¹⁰⁴ Patofiziološki mehanizam porasta koncentracije endotelne lipaze predstavlja povećanje njene ekspresije posredovano angiotenzinom II te povećanim silama smičnog naprezanja i rastezanja koje djeluju na stijenku krvne žile.^{100,101}

Kod ljudi sa šećernom bolešću tipa 2 koji nisu liječeni inzulinom zabilježena je povećana koncentracija endotelne lipaze u serumu u usporedbi s ljudima koji ne boluju od šećerne bolesti.¹⁰⁹ Povećana koncentracija glukoze u krvi natašte i veća vrijednost pokazatelja HOMA-IR (engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*), kao mjera inzulinske rezistencije, povezani su s povećanom serumskom koncentracijom endotelne lipaze kod ljudi.¹⁰⁴ Patofiziološki mehanizam koji objašnjava povećanu koncentraciju endotelne lipaze kod bolesnika sa šećernom bolešću nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da proupalni citokin TNF- α svojim djelovanjem inhibira signalnu kaskadu inzulinskog receptora, uzrokujući pri tome inzulinsku rezistenciju.^{110,111} Inzulinskom rezistencijom uzrokovana hiperglikemija izaziva glikaciju proteina u plazmi, koji pospješuju produkciju proupalnih citokina u makrofazima.¹¹² Isti citokini pojačavaju i ekspresiju endotelne lipaze.¹⁰⁰ Inzulin *in vitro* smanjuje ekspresiju endotelne lipaze u humanim endotelnim stanicama aorte.¹⁰⁹

Kod ljudi koji boluju od metaboličkog sindroma zabilježena je veća koncentracija endotelne lipaze u serumu u usporedbi sa zdravim ljudima.¹¹³

1.4. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom predstavlja skupinu rizičnih čimbenika za razvoj kardiovaskularnih bolesti koji se često pojavljuju istovremeno, a uključuje pretilost, hipertrigliceridemiju, smanjenu serumsku koncentraciju kolesterola u sastavu čestica HDL-a (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*, HDL-C), arterijsku hipertenziju i hiperglikemiju. Dijagnostičke je

kriterije definirala radna skupina s predstavnicima više međunarodnih udruženja koja se bave kardiovaskularnim bolestima.¹¹⁴

Patofiziološku osnovu metaboličkog sindroma predstavljaju pretilost, kronična upala, inzulinska rezistencija i endotelna disfunkcija.¹¹⁵

Bolesnici s metaboličkim sindromom imaju dvostruko veći rizik obolijevanja od infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog infarkta u usporedbi s pojedincima bez metaboličkog sindroma.¹¹⁶

Prevalencija metaboličkog sindroma u odrasloj populaciji Sjedinjenih Američkih Država iznosila je 2016. godine 35%.¹¹⁷ U Hrvatskoj oko 40% populacije starije od 40 godina koja posjećuje liječnike obiteljske medicine boluje od metaboličkog sindroma.¹¹⁸

1.5. Svrha istraživanja (ili Zašto analiziramo metabolički sindrom, endotelnu lipazu, HDL i endotelnu disfunkciju?)

Metabolički sindrom predstavlja povećani rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti uzrokovanih aterosklerotskim promjenama stijenke krvnih žila kod ljudi.¹¹⁶

Kako je ranije opisano, povećan opseg struka i visceralna pretilost, povišene vrijednosti krvnog tlaka i hiperglikemija, kao sastavnice metaboličkog sindroma, kod ljudi su povezani s povećanom koncentracijom endotelne lipaze u serumu.^{103,104} Dodatno, koncentracija endotelne lipaze u serumu je veća kod bolesnika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdravu populaciju.¹¹³

S obzirom da je metaboličkom sindromu, prema definiciji i populacijskoj učestalosti, pridružena i niska serumska koncentracija HDL-C,¹¹⁴ te uzevši u obzir prethodno definirane učinke endotelne lipaze na HDL na molekularnoj razini, nameće se ideja da bi endotelna lipaza mogla biti dominantan modifikator strukture i funkcije HDL-a u serumu bolesnika s metaboličkim sindromom.

Budući da su dosadašnjim istraživanjima endotelne lipaze *in vitro* i *in vivo* opisani njeni protektivni,^{46,80,91,93,95-97} ali i potencijalno proaterogeni učinci na stijenku krvnih žila^{83,88,89,94,98,99} koje postiže modifikacijom strukture i funkcije čestica HDL-a te svojim "veznim" djelovanjem, zanimljivo je razmišljati predstavlja li povećana koncentracija endotelne lipaze u serumu bolesnika s metaboličkim sindromom protektivni ili rizični čimbenik za razvoj endotelne disfunkcije kao ranog stadija ateroskleroze.

Svrha ovog istraživanja je razjasniti povezanost endotelne lipaze s koncentracijom, strukturom i funkcijom čestica HDL-a u metaboličkom sindromu. Dodatna analiza povezanosti endotelne lipaze i čestica HDL-a s pokazateljima funkcije endotela stijenke krvne žile kod bolesnika s metaboličkim sindromom mogla bi pridonijeti i razrješenju dvojbi oko dominantnog djelovanja endotelne lipaze u organizmu, kao protektivnog ili rizičnog čimbenika za razvoj endotelne disfunkcije i aterogenezu.

2. HIPOTEZA

Koncentracija endotelne lipaze u serumu povezana je s koncentracijom, sastavom i funkcionalnošću čestica HDL-a te pokazateljima endotelne disfunkcije kod bolesnika s metaboličkim sindromom.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opisati povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s koncentracijom, sastavom i funkcionalnošću čestica HDL-a te s ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD) u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

3.2. Specifični ciljevi

- (1) Odrediti i usporediti koncentraciju endotelne lipaze u serumu, serumske koncentracije lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a, pokazatelje lipidnog sadržaja čestica HDL-a te pokazatelje funkcionalnosti čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.
- (2) Odrediti i usporediti ultrazvučne pokazatelje funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.
- (3) Opisati i usporediti povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu sa serumskom koncentracijom lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a, pokazateljima lipidnog sadržaja čestica HDL-a i pokazateljima funkcionalnosti čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.
- (4) Opisati i usporediti povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.
- (5) Opisati i usporediti povezanost serumske koncentracije lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a, pokazatelja lipidnog sadržaja čestica HDL-a i pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a s ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Organizacija istraživanja i ispitanici

Istraživanje je organizirano kao opservacijska, presječna, translacijska studija, u koju je uključeno ukupno 130 ispitanika, 65 zdravih ispitanika i 65 ispitanika s metaboličkim sindromom. Svi su ispitanici bili u dobnom rasponu između 45 i 65 godina.

Metabolički sindrom definiran je pomoću pet međunarodno usklađenih dijagnostičkih kriterija:¹¹⁴

- * povećan opseg struka (≥ 102 cm za muškarce i ≥ 88 cm za žene, kao populacijski prilagođeni kriteriji),
- * povećana koncentracija triglicerida u serumu ($\geq 1,7$ mmol/L) ili već započeto liječenje fibratima, nikotinskom kiselinom ili visokom dozom ω -3 masnih kiselina ($\geq 3,0$ g/dan),
- * smanjena koncentracija HDL-C u serumu ($\leq 1,0$ mmol/L za muškarce i $\leq 1,3$ mmol/L za žene) ili već započeto liječenje fibratima ili nikotinskom kiselinom,
- * povišena vrijednost krvnog tlaka (sistolički krvni tlak ≥ 130 mmHg i dijastolički krvni tlak ≥ 85 mmHg) ili već započeto liječenje antihipertenzivima zbog ranije povišenih vrijednosti krvnog tlaka,
- * povećana koncentracija glukoze u serumu natašte ($\geq 5,6$ mmol/L) ili već započeto liječenje lijekovima koji snižavaju koncentraciju glukoze u krvi.

Za dijagnozu metaboličkog sindroma potrebno je zadovoljiti tri ili više navedenih kriterija.

Postojanje bilo koje kronične bolesti bilo je isključni kriterij za zdrave ispitanike. Isključni kriteriji za ispitanike s metaboličkim sindromom bili su: ranije preboljeli infarkt miokarda, kardiomiopatija, uznapredovala bubrežna insuficijencija (procijenjena brzina glomerularne filtracije, engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR ≤ 29 mL/min/1,73 m²), ciroza jetre (stadij B i C prema Child-Pugh klasifikaciji), maligne i autoimunosne bolesti. Svako akutno infektivno ili upalno stanje, kao i preosjetljivost povezana s korištenjem gliceriltrinitrata bili su isključni kriteriji za obje skupine ispitanika.

Klinički dio istraživanja proveden je u Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu u razdoblju od kolovoza 2018. do rujna 2019. godine. Laboratorijski dio istraživanja učinjen je u Istraživačkom centru za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji

(Gottfried Schatz Forschungszentrum für zelluläre Signaltransduktion, Stoffwechsel und Altern; Medizinische Universität Graz).

Etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu (EP-13125/17-4), Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog sveučilišta u Grazu u Austriji (31-532 ex 18/19) odobrila su provođenje istraživanja. Svakom je ispitaniku, prije početka bilo kojeg istraživačkog postupka, objašnjen plan i svrha istraživanja te mu je predan pisani primjerak Obavijesti za ispitanika. Nakon razjašnjavanja eventualnih dodatnih pitanja, svaki je ispitanik pročitao i potpisao obrazac Informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Dobre kliničke prakse¹¹⁹ i Deklaracije iz Helsinkija.¹²⁰

4.2. Priprema ispitanika za sudjelovanje u istraživanju

Ispitanicima je savjetovano da tijekom 8 do 12 sati prije sudjelovanja u istraživanju ne konzumiraju hranu, slatka pića i pripravke s kofeinom; da ne puše cigarete, da izbjegavaju izraženiju tjelesnu aktivnost i da ne uzmu vazoaktivne lijekove ili pripravke vitamina koje inače koriste tijekom 24 sata prije sudjelovanja u istraživanju.

4.3. Anamnestički podatci ispitanika i fizikalni pregled

Za svakog su ispitanika na početku istraživačkog protokola zabilježeni važni demografski podatci (dob, spol), anamnestički podatci o preboljelim i do sada poznatim kroničnim bolestima (arterijska hipertenzija, šećerna bolesti tipa 1 ili 2, hiperkolesterolemija, hipertrigliceridemija, stanje nakon preboljelog infarkta miokarda ili učinjene perkutane intervencije na koronarnim arterijama, kardiomiopatija, fibrilacija atrijska, stanje nakon preboljelog cerebrovaskularnog infarkta, aterosklerotska bolest perifernih arterija, stanje nakon preboljele flebotromboze ili tromboflebitisa, stanje nakon preboljele embolije plućne arterije, bubrežna insuficijencija, bolesti jetre, maligne bolesti, autoimunosne bolesti), anamnestički podatci o tjelesnim funkcijama i navikama (menstruacijski ciklus kod žena, tjedna razina tjelesne aktivnosti, pušenje cigareta), podatak o lijekovima i ostalim pripravcima koje ispitanik uzima te o postojanju alergije na lijekove.

Proveden je fizikalni pregled svakog ispitanika s mjerenjem vitalnih pokazatelja (krvni tlak, frekvencija srca), tjelesne mase, tjelesne visine i opsega struka. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao $tjelesna\ masa\ [kg]/(tjelesna\ visina\ [m])^2$.

4.4. Uzorkovanje krvi ispitanika

Svakom je ispitaniku izvađen uzorak venske krvi (36 mL) iz površinske vene desne podlaktice u VACUETTE® spremnike (VACUETTE® *Z Serum Clot Activator*, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija). Nakon čuvanja uzorka krvi tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran (1800 g) tijekom 10 minuta na temperaturi 4°C. Dobiveni serum pohranjen je na temperaturi -80°C, do trenutka provođenja laboratorijskih analiza u Istraživačkom centru Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji. Transport svih prikupljenih zamrznutih uzoraka seruma od Zagreba do Graza učinjen je u spremniku ugljikova (IV) oksida u krutom stanju na istoj temperaturi.

Tijekom 15 minuta nakon uzorkovanja krvi za laboratorijske analize ispitanik je mirovao u ležećem položaju, u svrhu pripreme za ultrazvučnu procjenu endotelne funkcije brahijalne arterije. Neposredno prije ultrazvučnih mjerenja, ispitaniku je izmjerena vrijednost krvnog tlaka na desnoj ruci.

4.5. Procjena endotelne funkcije brahijalne arterije

4.5.1. Smjernice i preporuke

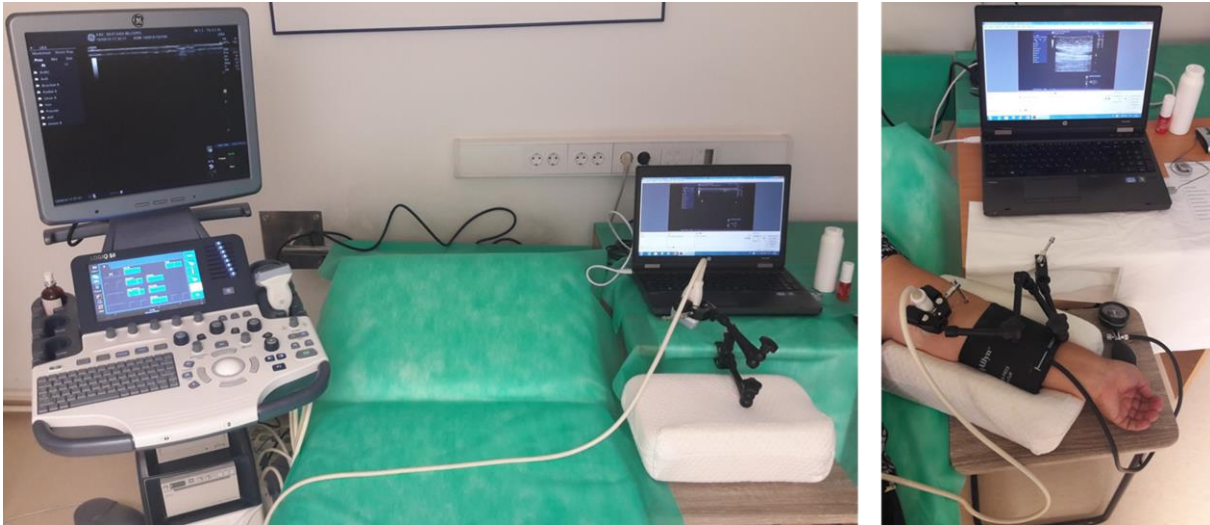
Ultrazvučna procjena endotelne funkcije brahijalne arterije učinjena je prema važećim smjernicama i preporukama koje su izdali *International Brachial Artery Reactivity Task Force*, *American College of Cardiology* 2002. godine²⁶ i *American Physiological Society* 2011. godine.^{27,29}

4.5.2. Oprema

Za prikaz brahijalne korišten je ultrazvučni aparat *Logiq S8* (*General Electric Medical Systems*, Milwaukee, Wisconsin, SAD) i linearna sonda frekvencije 10,0 MHz. Ultrazvučni je prikaz arterije u stvarnom vremenu projiciran na računalo i kontinuirano sniman tijekom pretrage. Promjer brahijalne arterije u svim vremenskim intervalima opisanim istraživačkim protokolom mjeren je na snimljenom prikazu brahijalne arterije automatski i kontinuirano pomoću kompjutorske aplikacije *FloWave.US* v. 0.2.0 (Coolbaugh CL, *Vanderbilt University Institute of Imaging Science*, Nashville, Tennessee, SAD),¹²¹ uz podršku programa *MATLAB R2013a* (*The MathWorks, Inc.*, Natick, Massachusetts, SAD).

Tijekom mjerenja ispitanik leži na krevetu za pregled. Lijeva je ruka položena na stalak za ruku s posebno oblikovanim jastukom, pod kutom od 90° u odnosu na os tijela, u

supinacijskom položaju. Ultrazvučna sonda postavljena je na držač koji je pomičan po svim osima trodimenzionalnog koordinatnog sustava i ima mogućnost fiksiranja sonde u zadanom položaju. Stalak za ruku i držač sonde korišteni su radi smanjenja malih, nevoljnih pokreta ruku ispitanika i ispitivača za vrijeme mjerenja. (Slika 1) Mjesto optimalnog prikaza brahijalne arterije je 2 do 3 cm proksimalno od zgloba lakta, s medijalne strane nadlaktice, na mjestu gdje se palpiraju pulzacije brahijalne arterije. Sva su mjerenja učinjena na longitudinalnom prikazu arterije.



Slika 1. Oprema korištena za procjenu endotelne funkcije brahijalne arterije.

4.5.3. Protokol

Tijekom dvije minute mirovanja kontinuirano je snimljen prikaz brahijalne arterije radi mjerenja bazalnog promjera arterije.

Usljedila je okluzija protoka kroz arteriju napuhivanjem manžete tlakomjera do vrijednosti za 50 mmHg veće od bazalno izmjerenog sistoličkog krvnog tlaka tijekom 5 minuta. Manžeta je postavljena na podlakticu, neposredno ispod lakatnog zgloba, distalno od mjesta prikaza brahijalne arterije ultrazvučnom sondom. Tijekom 30 sekundi prije završetka okluzije i pet minuta nakon otpuštanja manžete tlakomjera kontinuirano je snimljen prikaz brahijalne arterije radi mjerenja njezinog promjera tijekom okluzije, najvećeg promjera nakon otpuštanja manžete i vremena proteklog od otpuštanja manžete do postizanja najvećeg promjera. Postotak promjene promjera arterije nakon otpuštanja manžete izračunat je kao *(najveći promjer arterije nakon otpuštanja manžete - bazalni promjer arterije) / bazalni promjer arterije*. Ta mjera opisana je kao FMD (engl. *flow-mediated dilation*).

Nakon razdoblja oporavka krvne žile u trajanju od 15 minuta, ponovno je kontinuirano snimljen prikaz brahijalne arterije tijekom dvije minute mirovanja radi mjerenja bazalnog promjera arterije (bazalni promjer arterije 2).

Ispitaniku je potom aplicirano 400 µg gliceriltrinitrata (Nitrolingual®) sublingvalno, koji služi kao egzogeni izvor NO i uzrokuje *o endotelu neovisnu vazodilataciju*. Tijekom najmanje 7 minuta nakon primjene lijeka kontinuirano je snimljen prikaz brahijalne arterije radi mjerenja najvećeg promjera brahijalne arterije nakon primjene lijeka i vremena proteklog od primjene lijeka do postizanja najvećeg promjera. Postotak promjene promjera brahijalne arterije nakon primjene gliceriltrinitrata izračunat je kao (*najveći promjer arterije nakon primjene gliceriltrinitrata - bazalni promjer arterije 2*) / *bazalni promjer arterije 2*. Ta mjera opisana je kao NMD (engl. *nitroglycerin-mediated dilation*).

Nakon provedenog testa svaki je ispitanik bio pod nadzorom ispitivača najmanje 15 minuta ili do povratka vrijednosti krvnog tlaka na prvotno izmjerenu vrijednost radi prevencije nastanka neželjenih nuspojava primjene gliceriltrinitrata.

Gliceriltrinitrat nije primijenjen kod 8 zdravih ispitanika zbog nižih vrijednosti krvnog tlaka izmjerenih neposredno prije procjene endotelne funkcije brahijalne arterije (sistolički tlak ≤ 100 mmHg) i rizika od razvitka neželjenih nuspojava lijeka. Zbog toga su bazalni promjer arterije 2, sva mjerenja nakon primjene nitroglicerina i NMD dostupni za 57 zdravih ispitanika i 122 ispitanika ukupno.

4.6. Obrada uzoraka seruma ispitanika

Laboratorijska obrada pohranjenih uzoraka seruma ispitanika učinjena je u Istraživačkom centru za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji.

4.6.1. Standardni biokemijski pokazatelji

Koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-C, triglicerida i reaktivnog proteina C (CRP) izmjerene su pomoću Cobas® c analizatora (*Roche Diagnostics, Hitachi, Tokio, Japan*). Serumaska koncentracija kolesterola u sastavu čestica LDL-a (engl. *low-density lipoprotein cholesterol*, LDL-C) izračunata je prema Friedewaldovoj formuli.¹²²

Koncentracije drugih standardnih biokemijskih pokazatelja, uključujući glukozu, ukupne proteine, albumin, bilirubin, alanin aminotransferazu (ALT), aspartat aminotransferazu

(AST), alkalnu fosfatazu (AP), γ -glutamil transferazu (GGT), laktat dehidrogenazu (LDH), kreatin kinazu (CK), kreatinin, ureju, urat, natrij, kalij i klor, izmjereni su pomoću uređaja Cobas[®] 8000 (*Roche Diagnostics, Hitachi, Tokio, Japan*). EGFR je izračunata prema formuli koju su predložili Levey i suradnici.¹²³ Koncentracija IL-6 određena je elektrokemiluminiscencijskim imunotestom koristeći Cobas[®] e 801 analizator (*Roche Diagnostics, Hitachi, Tokio, Japan*).

4.6.2. Endotelna lipaza

Za mjerenje koncentracije endotelne lipaze korišten je *Human Endothelial Lipase Assay Kit* (*TaKaRa, Takara Bio Europe S.A.S., Saint-Germain-en-Laye, Francuska*).

4.6.3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a i lipidni sadržaj čestica HDL-a

Lipoproteinski profil HDL-a analiziran je NMR (nuklearna magnetska rezonancija) spektrometrom *AVANCE NEO 600 MHz* (*Bruker BioSpin, Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD*), prema *Bruker* IVDr protokolu za analizu podrazreda lipoproteina. Priprema uzoraka seruma obuhvaćala je otapanje, miješanje 330 μ L svakog uzorka s 330 μ L *Bruker* pufera za serum (*Bruker, Rheinstetten, Njemačka*) i prenošenje ukupno 600 μ L mješavine svakog seruma i pufera u 5-milimetarsku cjevčicu na *SampleJet* stalku (*Bruker*). Snimljeni su protonski spektri pri stalnoj temperaturi od 310 K, koristeći standardnu NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) sekvencu pulsa (*Bruker: noesygppr1d*), CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) sekvencu pulsa (*Bruker: cpmgpr1d*) s presaturacijom tijekom vremena relaksacije kako bi se postigla supresija signala vode i standardnu 2D JRES (engl. *two-dimensional J-resolved*) sekvencu pulsa (*Bruker: jresgpprqf*). *Bruker IVDr Lipoprotein Subclass Analysis* (B.I.LISA[™]) metodom je učinjena analiza dobivenih podataka.

Izmjerene veličine opisuju masenu koncentraciju lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a u serumu ispitanika. Primjerice, veličina HDL-TG označava masu triglicerida koji se u serumu nalaze i transportiraju u sastavu čestica HDL-a, mjerenu u miligramima, po jednom decilitru seruma ispitanika. U daljnjem će se tekstu za ovu varijablu upotrebljavati sintagma *serumska koncentracija triglicerida u sastavu čestica HDL-a*, odnosno *serumska koncentracija lipida ili proteina u sastavu čestica HDL-a* za druge analogne varijable.

Budući da jedinični volumen seruma ispitanika može sadržavati različiti broj čestica HDL-a, serumska koncentracija lipida ili proteina u sastavu čestica HDL-a ne oslikava precizno sastav samih čestica HDL-a. U slučaju nepostojanja izravno izmjerenog broja čestica HDL-a u

jediničnom volumenu seruma, serumska koncentracija apolipoproteina A-I (HDL-apoA-I) koristi se kao približna mjera koncentracije čestica HDL-a.^{124,125} Tako je sadržaj čestica HDL-a približno opisan omjerima *serumske koncentracije lipida u sastavu čestica HDL-a* i varijable HDL-apoA-I. Primjerice, veličina HDL-TG/HDL-apoA-I opisuje sadržaj triglicerida u česticama HDL-a, neovisno o broju čestica HDL-a u jediničnom volumenu seruma. U daljnjem će se tekstu za ovu varijablu upotrebljavati sintagma *sadržaj triglicerida u česticama HDL-a*, odnosno *sadržaj lipida u česticama HDL-a* za druge analogne varijable.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

4.6.4. Funkcionalnost HDL-a

Pokazatelji funkcionalnosti HDL-a određeni su u Istraživačkom centru za vaskularnu biologiju, imunologiju i upalu Otto Loewi na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji (*Otto Loewi Forschungszentrum für Gefäßbiologie, Immunologie und Entzündung; Medizinische Universität Graz*).

Kao analog HDL-a, za određivanje njegove funkcionalnosti, korišten je serum ispitanika iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B (engl. *apolipoprotein B-depleted serum*, apoBDS). ApoBDS je pripremljen prikupljanjem supernatanta nastalog centrifugiranjem (10 000 okretaja/min, 20 minuta, 4°C) mješavine 100 µL seruma svakog ispitanika i 40 µL polietilenglikola (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Njemačka).

Arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (engl. *arylesterase activity of paraoxonase 1*, AE) određena je fotometrijski upotrebom 1,5 µL razrijeđenog seruma kojem je odstranjen apoB svakog ispitanika (razrjeđenje 1:10) i 200 µL pufera koji sadrži fenilacetat u koncentraciji 1 mmol/L. Stupanj hidrolize fenilacetata u otopini mjereno je povećanjem apsorbancije otopine pri valnoj duljini od 270 nm. Ponavljanim očitavanjima iznosa apsorbancije u intervalima od 30 sekundi formirana je krivulja i određena promjena apsorbancije/min. Pomoću Beer-Lambertova zakona i korištenjem molarnog apsorpcijskog koeficijenta za fenilacetat izračunata je promjena molarne koncentracije fenilacetata u otopini, a time neizravno i enzimski AE aktivnost. Postupak su ranije detaljno opisali Holzer i suradnici.¹²⁶

Kapacitet za efluks kolesterola (engl. *cholesterol efflux capacity*, CEC) izmjeren je korištenjem J774.2 makrofaga (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Njemačka) kultiviranih u DMEM mediju (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Njemačka).

Makrofazi su postavljeni na pločicu s jažicama (300 000 stanica u jažici) i preliveni medijem s kolesterolom obilježenim tricijem ($[^3\text{H}]$ -kolesterol, 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$). Nakon 12 sati medij je ispran, a makrofazi ispunjeni $[^3\text{H}]$ -kolesterolom su inkubirani tijekom 4 sata s 2,8%-tnom otopinom pripremljenog apoBDS svakog ispitanika. CEC je izračunat kao omjer radioaktivnosti u supernatantu kulture makrofaga i ukupne radioaktivnosti supernatanta i makrofaga zajedno. Postupak je opisan u radovima autora Khera¹²⁷ i Marsche.¹²⁸

Opisanim metodama određena je funkcionalnost (arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 i kapacitet za efluks kolesterola) jediničnog volumena seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B svakog ispitanika. Budući da se koncentracija čestica HDL-a u serumu ispitanika razlikuje, dijeljenjem funkcionalnosti jediničnog volumena apoBDS svakog ispitanika s odgovarajućom koncentracijom apoA-I, koja približno odgovara koncentraciji čestica HDL-a,^{124,125} procijenjena je funkcionalnost čestica HDL-a.

4.7. Statističke analize

Kvalitativne varijable sumarno su prikazane apsolutnim brojem i postotkom. Kvantitativne varijable čija distribucija odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Kvantitativne varijable čija distribucija ne odgovara Gaussovoj opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3). Distribucija kvantitativnih varijabli procijenjena je Shapiro-Wilk testom i uvidom u histogram.

Usporedba kvalitativnih varijabli između skupina zdravih ispitanika (H) i ispitanika s metaboličkim sindromom (MS) učinjena je Fisherovim egzaktnim testom. Usporedba kvantitativnih varijabli između skupina zdravih ispitanika (H) i ispitanika s metaboličkim sindromom (MS) učinjena je t-testom za varijable čija distribucija prati Gaussovu krivulju i Mann-Whitney U testom za varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju.

Spearmanov test korelacije korišten je za utvrđivanje povezanosti dviju kvantitativnih varijabli, a razina povezanosti izražena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (r) i p vrijednošću. Korelacije su učinjene za skupinu zdravih ispitanika i skupinu ispitanika s metaboličkim sindromom posebno.

P vrijednost $<0,05$ smatrana je statistički značajnom u svim analizama.

Računalni program kojim su učinjene statističke analize je R 4.1.0 (*The R Foundation for Statistical Computing*, Beč, Austrija).

5. REZULTATI

5.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

U istraživanje je uključeno ukupno 130 ispitanika, 65 zdravih ispitanika i 65 ispitanika s metaboličkim sindromom.

Na Slici 2 prikazana je struktura obje skupine ispitanika s obzirom na pet kriterija kojima je definiran metabolički sindrom.¹¹⁴

Udio žena u obje skupine bio je 47,7%, a medijan dobi 56,0 (50,0; 59,0) godina u skupini zdravih ispitanika i 57,0 (50,0; 60,0) godina u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom ($p=0,440$).

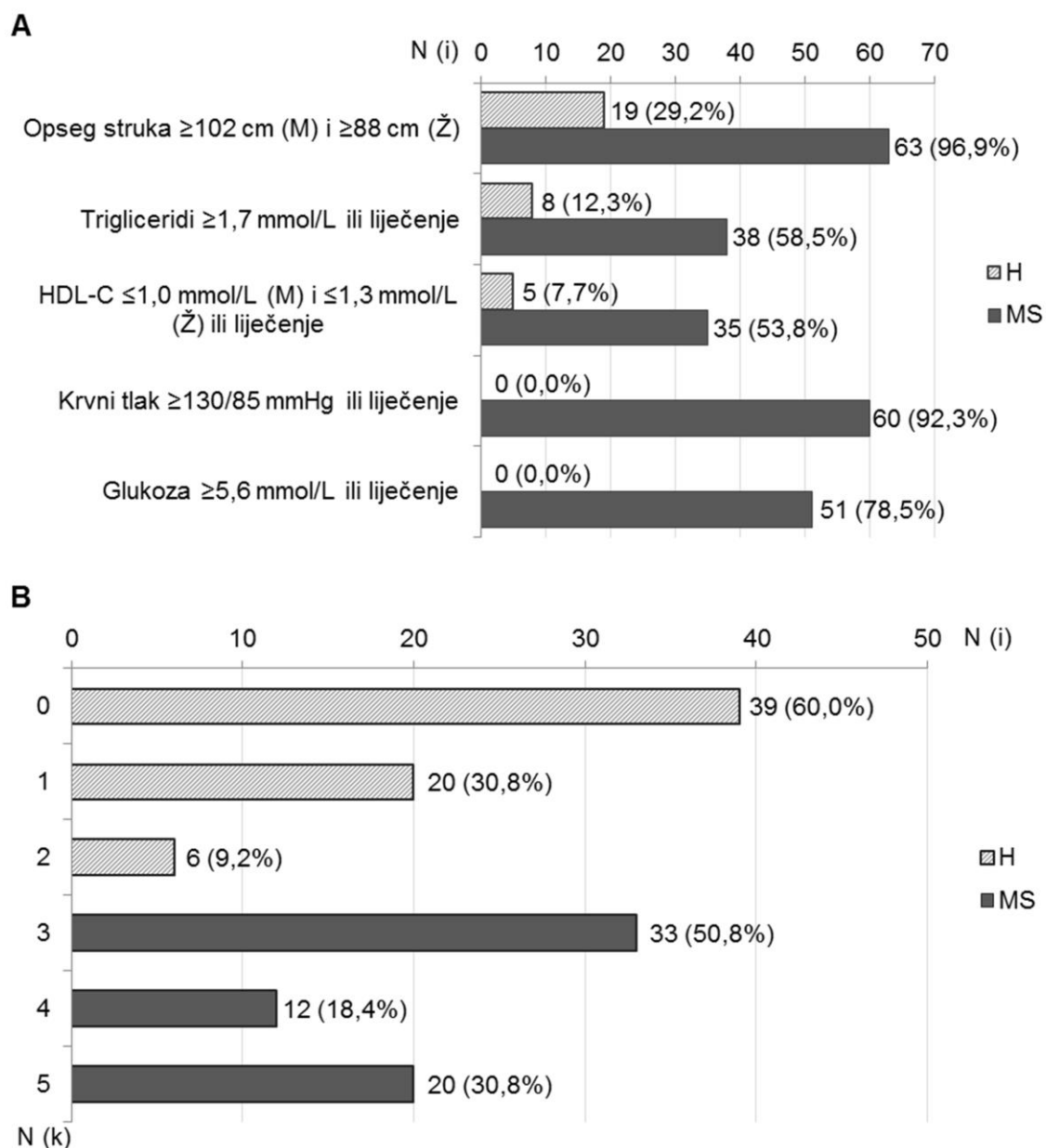
Ispitanici s metaboličkim sindromom imali su značajno veću tjelesnu masu [MS: 98,0 (86,0; 113,5) kg; H: 77,0 (68,0; 88,0) kg; $p<0,001$], indeks tjelesne mase [MS: 32,6 (29,8; 35,9) kg/m²; H: 25,1 (23,7; 28,1) kg/m²; $p<0,001$] i opseg struka (MS: 113,9±13,2 cm; H: 92,2±11,6 cm; $p<0,001$) od zdravih ispitanika, dok se tjelesna visina nije razlikovala među skupinama.

Nije bilo značajne razlike između skupina prema broju žena s redovitim menstrualnim ciklusom i prema broju ispitanika koji puše cigarete, ali je značajno veći udio zdravih ispitanika prijavio redovitu tjelesnu aktivnost u usporedbi s ispitanicima s metaboličkim sindromom [H: 58 (89,2%); MS: 47 (72,3%); $p=0,025$].

U skupini ispitanika s metaboličkim sindromom, 92,3% ispitanika bolovalo je od arterijske hipertenzije, a 41,5% od šećerne bolesti tipa 2.

Zdravi ispitanici nisu uzimali nikakve lijekove. Dio ispitanika s metaboličkim sindromom od ranije je uzimao lijekove za liječenje kroničnih bolesti koje čine metabolički sindrom, no nisu ih primijenili tijekom 24 sata prije sudjelovanja u istraživanju. Četrdeset ispitanika (61,5%) liječeno je inhibitorima angiotenzin-konvertirajućeg enzima, 23 (35,4%) antagonistima kalcijjskih kanala, 23 (35,4%) antagonistima β -adrenergičnih receptora, 25 (38,5%) diureticima, 23 (35,4%) metforminom i 23 (35,4%) statinima. Lijekovi čije su frekvencije u skupini bile <10 nisu navedeni i analizirani.

Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika detaljnije su prikazane u Tablici 1.



Slika 2. Dio A. Broj ispitanika koji su zadovoljili pojedini kriterij koji definira metabolički sindrom.¹¹⁴ Dio B. Broj ispitanika koji su zadovoljili ukupno 0, 1, 2, 3, 4, ili 5 kriterija koji definiraju metabolički sindrom i njihova raspodjela u skupine.

H (▨)- zdravi ispitanik (engl. *healthy*), M - muškarac, MS (■) - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N (i) - broj ispitanika, N (k) - broj kriterija za metabolički sindrom, Ž - žena.

Tablica 1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	Svi (N=130)	H (N=65)	MS (N=65)	P
Demografske karakteristike				
Dob (<i>godine</i>)	56,0 (50,0; 60,0)	56,0 (50,0; 59,0)	57,0 (50,0; 60,0)	0,440
Spol (žene)	62 (47,7%)	31 (47,7%)	31 (47,7%)	1,000
Tjelesne mjere				
Tjelesna masa (<i>kg</i>)	87,5 (75,2; 102,8)	77,0 (68,0; 88,0)	98,0 (86,0; 113,5)	<0,001
Tjelesna visina (<i>m</i>)	1,74 ± 0,10	1,75 ± 0,10	1,73 ± 0,11	0,243
ITM (<i>kg/m²</i>)	28,8 (25,1; 32,7)	25,1 (23,7; 28,1)	32,6 (29,8; 35,9)	<0,001
Opseg struka (<i>cm</i>)	103,1 ± 16,5	92,2 ± 11,6	113,9 ± 13,2	<0,001
Kronične bolesti				
Arterijska hipertenzija	60 (46,2%)	0 (0,0%)	60 (92,3%)	<0,001
Šećerna bolest tipa 2	27 (20,8%)	0 (0,0%)	27 (41,5%)	<0,001
Aterosklerotska bolest koronarnih arterija	2 (1,5%)	0 (0,0%)	2 (3,1%)	0,496
Fibrilacija atriya	2 (1,5%)	0 (0,0%)	2 (3,1%)	0,496
Cerebrovaskularni infarkt, tranzitorna ishemijska ataka	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	1,000
Aterosklerotska bolest perifernih arterija	4 (3,1%)	0 (0,0%)	4 (6,2%)	0,119
Tromboza dubokih vena	6 (4,6%)	1 (1,5%)	5 (7,7%)	0,208
Embolija plućne arterije	2 (1,5%)	0 (0,0%)	2 (3,1%)	0,496
Funkcije i navike				
Pušenje cigareta	34 (26,2%)	16 (24,6%)	18 (27,7%)	0,842
Tjelesna aktivnost (≥3 puta tjedno)	105 (80,8%)	58 (89,2%)	47 (72,3%)	0,025
Menstruacijski ciklus (žene)	18/62 (29,0%)	12/31 (38,7%)	6/31 (19,3%)	0,161

Kvalitativne varijable su opisane apsolutnim brojem i postotkom, kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su Fisherovim egzaktnim testom, T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

cm - centimetar, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), ITM - indeks tjelesne mase, kg - kilogram, m - metar, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj.

5.2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji



Slika 3. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Medijani koncentracija pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu bili su u obje skupine ispitanika u rasponu klinički urednih vrijednosti. Unatoč tome, izdvajamo statistički značajno veću koncentraciju glukoze ($p < 0,001$), ukupnih proteina ($p = 0,002$), ALT ($p < 0,001$), GGT ($p < 0,001$) i urata ($p < 0,001$) kod ispitanika s metaboličkim sindromom. Medijani koncentracija upalnih pokazatelja također su kod obje skupine ispitanika bili u rasponu vrijednosti koje se u kliničkom radu smatraju urednima, ali ipak značajno veći kod ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima (CRP: $p < 0,001$; IL-6: $p < 0,001$). (Tablica 2)

Koncentracija endotelne lipaze u serumu bila je značajno veća kod ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike ($p = 0,002$). (Tablica 2)

U skladu s definicijom skupina, ispitanici s metaboličkim sindromom imali su statistički značajno veću koncentraciju triglicerida ($p < 0,001$) i značajno manju koncentraciju HDL-C ($p < 0,001$) u serumu u usporedbi sa zdravim ispitanicima, pri čemu su ti pokazatelji mjereni standardnim biokemijskim metodama. (Tablica 2)

Iako bez statistički značajne razlike, medijani koncentracija ukupnog kolesterola i LDL-C određeni standardnim metodama, kod ispitanika s metaboličkim sindromom bili su manji u usporedbi sa zdravim ispitanicima. (Tablica 2) Dvadeset tri ispitanika (35,4%) s metaboličkim sindromom od ranije su liječena statinima. Koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-C značajno su se razlikovale u podskupinama ispitanika s metaboličkim sindromom s ili bez terapije statinom (ukupni kolesterol: $p = 0,001$; LDL-C: $p < 0,001$), s manjim vrijednostima u

podskupini liječenoj statinima. Dodatno, medijani koncentracija ukupnog kolesterola i LDL-C podskupine ispitanika s metaboličkim sindromom i bez terapije statinima [ukupni kolesterol: 5,5 (4,7; 6,3) mmol/L; LDL-C: 3,4 (2,8; 4,0) mmol/L], bili su jednaki ili veći od medijana koncentracija analognih varijabli u skupini zdravih ispitanika.

Važno je naglasiti da se koncentracije triglicerida, HDL-C niti endotelne lipaze nisu značajno razlikovale između podskupina ispitanika s metaboličkim sindromom u ovisnosti o terapiji statinima.

Tablica 2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	Svi (N=130)	H (N=65)	MS (N=65)	P
EL (pg/mL)	353,6 (285,0; 431,2)	345,2 (272,1; 382,9)	367,1 (305,4; 497,0)	0,002
Trigliceridi (mmol/L)	1,3 (0,9; 1,9)	1,0 (0,8; 1,4)	1,6 (1,1; 2,2)	<0,001
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,3 (4,7; 6,1)	5,5 (5,1; 6,0)	5,0 (4,3; 6,2)	0,057
LDL-C (mmol/L)	3,2 (2,5; 3,7)	3,3 (2,8; 3,7)	3,0 (2,3; 3,7)	0,077
HDL-C (mmol/L)	1,4 (1,1; 1,7)	1,6 (1,4; 1,8)	1,2 (1,0; 1,4)	<0,001
Glukoza (mmol/L)	5,3 (4,9; 5,7)	4,9 (4,8; 5,2)	5,7 (5,3; 6,5)	<0,001
Ukupni proteini (g/L)	73,0 (70,0; 76,0)	72,0 (69,0; 75,0)	75,0 (71,0; 77,0)	0,002
Albumin (g/L)	48,0 (46,0; 49,0)	47,0 (46,0; 49,0)	48,0 (45,0; 49,0)	0,465
CRP (µg/mL)	1,8 (0,8; 3,7)	1,2 (0,6; 2,3)	2,4 (1,2; 5,5)	<0,001
IL-6 (pg/mL)	3,0 (2,1; 5,3)	2,3 (1,7; 3,0)	4,1 (2,7; 6,8)	<0,001
Bilirubin (µmol/L)	8,5 (6,0; 11,6)	9,6 (7,4; 13,3)	7,4 (5,5; 10,4)	0,012
AST (U/L)	23,0 (20,0; 27,0)	23,0 (20,0; 25,0)	23,0 (19,0; 32,0)	0,244
ALT (U/L)	24,0 (19,0; 36,0)	22,0 (18,0; 29,0)	30,0 (22,0; 43,0)	<0,001
AP (U/L)	61,0 (51,0; 73,0)	60,0 (49,0; 70,0)	65,0 (52,0; 81,0)	0,065
GGT (U/L)	24,5 (15,2; 38,0)	16,0 (13,0; 30,0)	31,0 (21,0; 44,0)	<0,001
CK (U/L)	124,5 (83,0; 186,8)	115,0 (81,0; 153,0)	133,0 (86,0; 226,0)	0,048
LDH (U/L)	172,0 (150,5; 192,0)	168,0 (147,0; 191,0)	176,0 (158,0; 193,0)	0,365
Ureja (mmol/L)	5,3 (4,5; 6,3)	5,0 (4,2; 6,0)	5,6 (4,8; 6,5)	0,004
Urat (µmol/L)	297,5 (249,9; 345,1)	273,7 (232,0; 327,2)	315,3 (279,7; 362,9)	<0,001
Kreatinin (µmol/L)	77,9 (67,3; 87,6)	77,9 (69,0; 89,4)	76,6 (65,5; 87,0)	0,414
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	88,0 (78,0; 97,1)	87,5 (77,2; 93,6)	88,9 (79,1; 98,0)	0,358
Natrij (mmol/L)	139,0 (138,0; 141,0)	140,0 (138,0; 141,0)	139,0 (138,0; 140,0)	0,041
Kalij (mmol/L)	4,2 (4,1; 4,6)	4,3 (4,1; 4,5)	4,2 (4,1; 4,6)	0,703
Klor (mmol/L)	100,0 (98,2; 102,8)	101,0 (99,0; 103,0)	100,0 (98,0; 101,0)	0,006

Kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

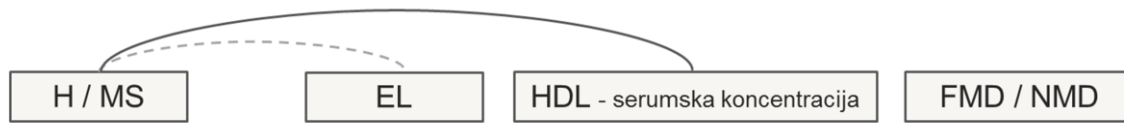
Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

LDL-C izmjeren je kod 60 ispitanika s metaboličkim sindromom i kod 125 ispitanika ukupno. Kreatinin i eGFR izmjereni su kod 64 ispitanika s metaboličkim sindromom i kod 129 ispitanika ukupno.

ALT - alanin aminotransferaza, AP - alkalna fosfataza, AST - aspartat aminotransferaza, CK - kreatin kinaza, CRP - reaktivni protein C, eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije, EL - endotelna lipaza, g - gram, GGT - γ -glutamil transferaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL-C - engl. *high-density lipoprotein cholesterol*, IL-6 - interleukin-6, L - litra, LDH - laktat dehidrogenaza, LDL-C - engl. *low-density lipoprotein cholesterol*, m - metar, µg - mikrogram, min - minuta, mL - mililitar, µmol - mikromol, mmol - milimol, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, pg - pikogram, U - jedinica (engl. *unit*).

5.3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom



Slika 4. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrtkana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

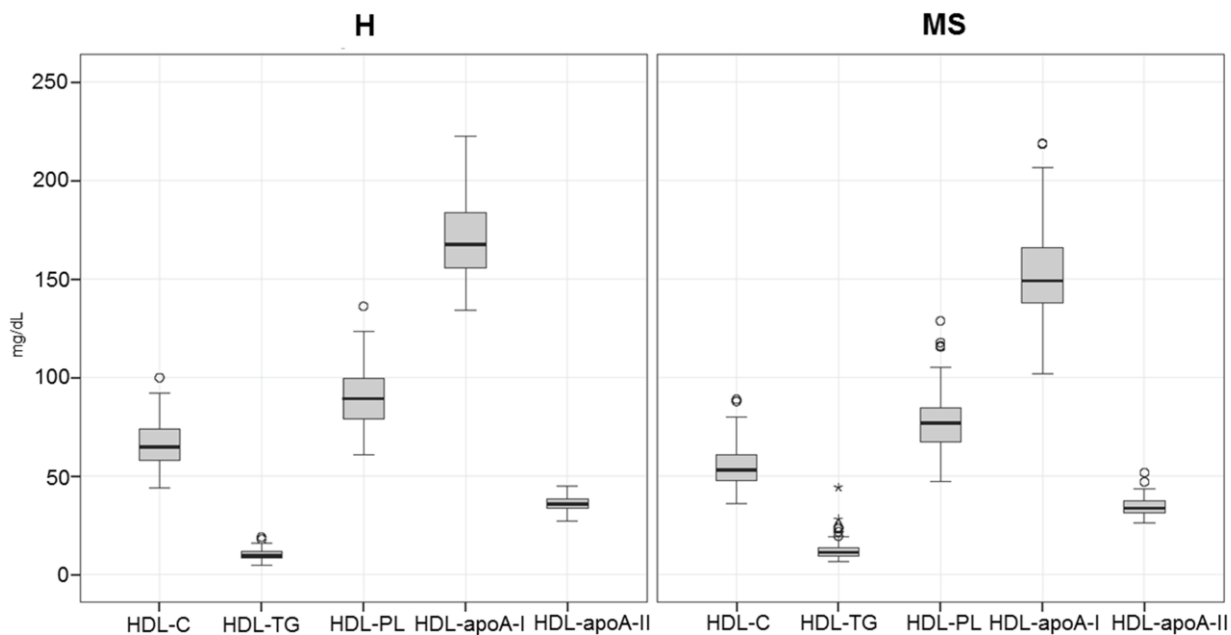
EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Analizirajući serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom, vidljivo je da su proteini, na čelu s apoA-I, bili maseno najzastupljeniji sastojak. Maseni udio svih lipida zajedno bio je manji od masenog udjela proteina. Pri tome su fosfolipidi bili najzastupljenija lipidna sastavnica, slijedio ih je kolesterol, a trigliceridi su bili najmanje zastupljena lipidna sastavnica HDL-a. (Slika 5)

Utvrđeno je da su zdravi ispitanici imali značajno veću serumsku koncentraciju fosfolipida (HDL-PL, engl. *phospholipid*; $p < 0,001$) i kolesterola u sastavu čestica HDL-a (HDL-C, engl. *cholesterol*; $p < 0,001$) u usporedbi s ispitanicima s metaboličkim sindromom. Suprotno, ispitanici s metaboličkim sindromom imali su veću serumsku koncentraciju triglicerida u sastavu čestica HDL-a (HDL-TG, engl. *triglyceride*; $p = 0,006$) u odnosu na zdrave ispitanike.

Serumska koncentracija apolipoproteina A-I u sastavu čestica HDL-a (HDL-apoA-I) je kod zdravih ispitanika također bila veća nego kod ispitanika s metaboličkim sindromom ($p < 0,001$), što indirektno ukazuje i na veću koncentraciju čestica HDL-a u serumu zdravih ispitanika.

Precizan pregled serumskih koncentracija lipidnih i proteinskih sastavnica čestica HDL-a ispitanika prikazan je u Tablici 3.



Slika 5. Dijagrami s prikazom medijana i interkvartilnih raspona serumskih koncentracija lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, apoA-II - apolipoprotein A-II, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), dL - decilitar, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, mg - miligram, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMR - nuklearna magnetska rezonancija, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

Tablica 3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla (mg/dL)	Svi (N=130)	H (N=65)	MS (N=65)	P
HDL-C	58,6 (51,3; 69,2)	65,2 (57,7; 74,5)	52,7 (47,9; 60,6)	<0,001
HDL1-C	17,2 (13,8; 22,5)	18,4 (15,1; 26,8)	15,7 (12,9; 20,1)	0,001
HDL2-C	8,6 (7,5; 10,2)	9,5 (8,3; 12,6)	8,2 (7,3; 9,7)	0,001
HDL3-C	11,2 (10,0; 13,2)	12,2 (10,7; 13,6)	10,4 (9,6; 11,9)	<0,001
HDL4-C	20,5 (17,2; 23,9)	22,3 (18,2; 24,7)	19,0 (16,0; 22,7)	0,001
HDL-TG	10,5 (9,0; 13,3)	9,9 (8,7; 11,8)	11,4 (9,7; 13,6)	0,006
HDL1-TG	3,3 (2,6; 4,4)	3,0 (2,5; 4,2)	3,6 (2,7; 4,6)	0,326
HDL2-TG	1,8 (1,5; 2,3)	1,6 (1,3; 2,1)	2,0 (1,6; 2,5)	0,001
HDL3-TG	2,3 (1,9; 2,8)	2,1 (1,7; 2,5)	2,7 (2,1; 3,1)	<0,001
HDL4-TG	3,6 (3,0; 4,3)	3,4 (2,5; 3,9)	3,7 (3,3; 4,7)	<0,001
HDL-PL	81,9 (72,1; 93,2)	89,4 (79,2; 99,8)	77,1 (67,5; 84,5)	<0,001
HDL1-PL	20,5 (16,8; 26,5)	22,1 (18,6; 33,9)	18,9 (14,8; 22,9)	0,002
HDL2-PL	13,8 (11,7; 15,9)	14,4 (12,6; 18,6)	13,2 (10,9; 15,4)	0,017
HDL3-PL	18,2 (15,9; 20,6)	19,1 (17,4; 20,9)	17,1 (15,2; 19,6)	0,004
HDL4-PL	28,8 (25,4; 31,8)	29,9 (26,4; 32,7)	26,3 (23,1; 30,7)	0,003
HDL-apoA-I	159,3 (144,5; 178,2)	167,8 (155,7; 183,7)	149,2 (138,1; 166,2)	<0,001
HDL1-apoA-I	26,3 (20,0; 34,7)	27,5 (22,3; 45,4)	24,9 (18,5; 30,1)	0,007
HDL2-apoA-I	18,7 (16,3; 22,1)	19,6 (17,2; 23,3)	17,5 (15,2; 20,6)	0,004
HDL3-apoA-I	30,2 (26,7; 33,3)	30,8 (27,5; 33,5)	28,8 (24,9; 32,5)	0,040
HDL4-apoA-I	79,5 (70,8; 89,0)	81,9 (72,7; 91,1)	75,5 (68,3; 86,5)	0,023
HDL-apoA-II	35,2 (32,2; 38,4)	36,0 (33,6; 38,6)	33,8 (31,5; 37,5)	0,039
HDL1-apoA-II	2,4 (1,9; 3,5)	2,5 (2,1; 4,1)	2,1 (1,6; 3,0)	0,006
HDL2-apoA-II	3,9 (3,2; 4,6)	4,0 (3,5; 4,6)	3,7 (3,0; 4,5)	0,111
HDL3-apoA-II	7,3 (6,5; 8,2)	7,3 (6,9; 8,1)	7,1 (6,3; 8,4)	0,739
HDL4-apoA-II	19,8 (17,5; 22,6)	20,9 (18,4; 23,2)	19,2 (17,0; 21,9)	0,060

Kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

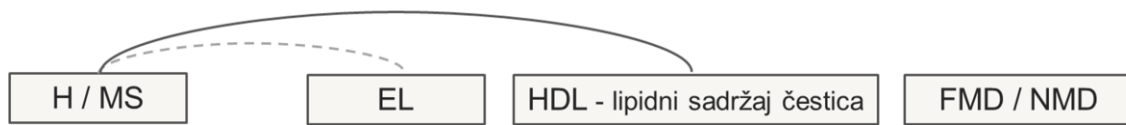
Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, apoA-II - apolipoprotein A-II, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), dL - decilitar, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, mg - miligram, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMR - nuklearna magnetska rezonancija, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

5.4. Lipidni sadržaj čestica HDL-a



Slika 6. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrtkana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Na Slici 7 i u Tablici 4 prikazani su pokazatelji lipidnog sadržaja čestica HDL-a.

Najzastupljenija lipidna sastavnica čestica HDL-a zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom, neovisno o veličini i podrazredu kojem čestice pripadaju, bili su fosfolipidi, slijedio ih kolesterol, a trigliceridi su bili najmanje zastupljeni. (Slika 7)

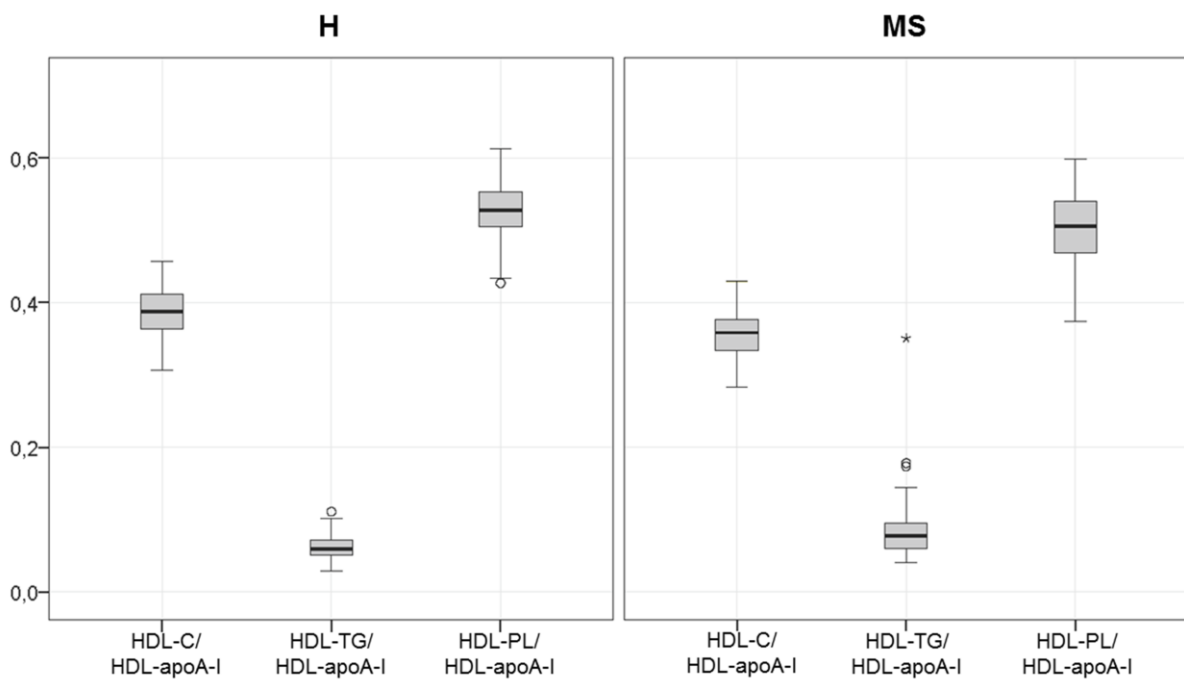
U obje su skupine ispitanika veće, manje guste čestice HDL-a sadržavale više fosfolipida, kolesterola i triglicerida u usporedbi s manjim i gustim česticama HDL-a.

Iako je veća serumaska koncentracija fosfolipida i kolesterola u sastavu čestica HDL-a (HDL-PL, HDL-C) bila izmjerena u prisutnosti većeg broja čestica HDL-a u jediničnom volumenu seruma zdravih ispitanika (Tablica 3), vidljivo je da i su njihove prosječne čestice HDL-a sadržavale više fosfolipida (HDL-PL/HDL-apoA-I; $p=0,002$) i kolesterola (HDL-C/HDL-apoA-I; $p<0,001$) nego prosječne čestice HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom.

Zabilježen značajno veći sadržaj fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a zdravih ispitanika (HDL-PL/HDL-apoA-I; $p=0,002$) temeljio se na značajno većem sadržaju fosfolipida u sastavu malih čestica HDL-a u usporedbi s istim takvim česticama bolesnika s metaboličkim sindromom (HDL4-PL/HDL4-apoA-I; $p=0,001$). Usporedbom velikih čestica HDL-a zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom nije zabilježena značajna razlika u sadržaju fosfolipida (HDL1-PL/HDL1-apoA-I; $p=0,460$). Značajno veći sadržaj kolesterola u prosječnim česticama HDL-a zdravih ispitanika (HDL-C/HDL-apoA-I; $p<0,001$) temeljio se na značajno većem sadržaju kolesterola u sastavu srednje velikih i malih čestica HDL-a u usporedbi s odgovarajućim česticama ispitanika s metaboličkim sindromom (HDL2-C/HDL2-

apoA-I, $p=0,011$; HDL3-C/HDL3-apoA-I, $p<0,001$; HDL4-C/HDL4-apoA-I, $p<0,001$). Nije zabilježena značajna razlika u sadržaju kolesterola usporedbom velikih čestica HDL-a zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom (HDL1-C/HDL1-apoA-I; $p=0,869$).

Prosječne čestice HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom sadržavale su više triglicerida (HDL-TG/HDL-apoA-I) nego prosječne čestice HDL-a zdravih ispitanika ($p<0,001$), a to je vrijedilo i za sve podrazrede čestica HDL-a ($p<0,001$ za sve podrazrede čestica HDL-a).



Slika 7. Dijagrami s prikazom medijana i interkvartilnih raspona omjera koji opisuju lipidni sadržaj prosječnih čestica HDL-a kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

Tablica 4. Omjeri koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	Svi (N=130)	H (N=65)	MS (N=65)	P
HDL-C / HDL-apoA-I	0,370 (0,351; 0,397)	0,387 (0,364; 0,412)	0,358 (0,333; 0,377)	<0,001
HDL1-C / HDL1-apoA-I	0,649 (0,598; 0,712)	0,644 (0,603; 0,690)	0,653 (0,598; 0,720)	0,869
HDL2-C / HDL2-apoA-I	0,478 (0,448; 0,512)	0,495 (0,452; 0,529)	0,472 (0,432; 0,497)	0,011
HDL3-C / HDL3-apoA-I	0,388 (0,370; 0,401)	0,397 (0,385; 0,408)	0,376 (0,358; 0,393)	<0,001
HDL4-C / HDL4-apoA-I	0,258 (0,240; 0,271)	0,264 (0,252; 0,276)	0,245 (0,231; 0,263)	<0,001
HDL-TG / HDL-apoA-I	0,065 (0,056; 0,083)	0,059 (0,051; 0,072)	0,078 (0,060; 0,096)	<0,001
HDL1-TG / HDL1-apoA-I	0,122 (0,095; 0,167)	0,106 (0,084; 0,133)	0,146 (0,114; 0,188)	<0,001
HDL2-TG / HDL2-apoA-I	0,099 (0,079; 0,131)	0,084 (0,068; 0,108)	0,117 (0,091; 0,158)	<0,001
HDL3-TG / HDL3-apoA-I	0,077 (0,065; 0,103)	0,070 (0,060; 0,084)	0,091 (0,073; 0,119)	<0,001
HDL4-TG / HDL4-apoA-I	0,044 (0,037; 0,055)	0,040 (0,034; 0,047)	0,049 (0,041; 0,062)	<0,001
HDL-PL / HDL-apoA-I	0,520 (0,488; 0,545)	0,528 (0,505; 0,553)	0,506 (0,468; 0,539)	0,002
HDL1-PL / HDL1-apoA-I	0,779 (0,739; 0,829)	0,765 (0,735; 0,825)	0,784 (0,741; 0,834)	0,460
HDL2-PL / HDL2-apoA-I	0,736 (0,682; 0,777)	0,735 (0,685; 0,787)	0,736 (0,681; 0,764)	0,694
HDL3-PL / HDL3-apoA-I	0,614 (0,596; 0,633)	0,616 (0,602; 0,635)	0,607 (0,589; 0,632)	0,145
HDL4-PL / HDL4-apoA-I	0,358 (0,337; 0,372)	0,363 (0,353; 0,374)	0,347 (0,330; 0,369)	0,001

Kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMR - nuklearna magnetska rezonancija, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

5.5. Funkcionalnost HDL-a



Slika 8. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Ariesterazna aktivnost paraoksonaze 1 i kapacitet za efluks kolesterola jediničnog volumena seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B bili su statistički značajno veći kod zdravih ispitanika nego kod ispitanika s metaboličkim sindromom ($p=0,030$; $p<0,001$; redom). No, značajne razlike između skupina nije bilo kada je, dijeljenjem s koncentracijom apoA-I u serumu, svaka značajka funkcionalnosti izražena za čestice HDL-a. To ukazuje na važnost broja čestica HDL-a za održavanje funkcionalnosti seruma ispitanika. (Tablica 5)

Tablica 5. Pokazatelji funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjeri koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	Svi (N=129)	H (N=65)	MS (N=64)	P
AE (mmol/min/mL apoBDS)	125,3 (104,5; 145,4)	130,3 (107,5; 151,9)	120,0 (102,1; 135,5)	0,030
AE (mmol/min/mL apoBDS) / HDL-apoA-I	0,759 (0,647; 0,896)	0,741 (0,650; 0,883)	0,769 (0,643; 0,903)	0,614
CEC (%)	18,3 (17,1; 19,9)	18,8 (17,8; 20,3)	17,5 (16,1; 19,5)	<0,001
CEC (%) / HDL-apoA-I	0,113 (0,108; 0,121)	0,112 (0,108; 0,119)	0,115 (0,107; 0,123)	0,277

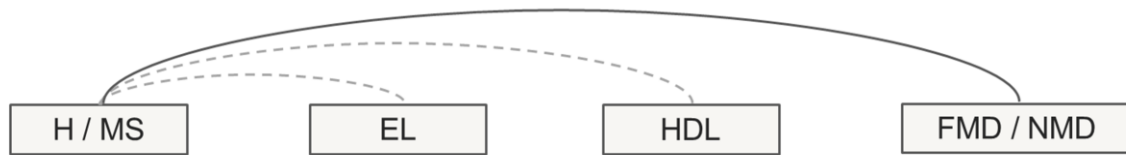
Kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

AE - arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (engl. *arylesterase activity of paraoxonase 1*), apoA-I - apolipoprotein A-I, apoBDS - serum iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B (engl. *apolipoprotein B-depleted serum*), CEC - kapacitet za efluks kolesterola (engl. *cholesterol efflux capacity*), H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, min - minuta, mL - mililitar, mmol - milimol, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, % - postotak.

5.6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika



Slika 9. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

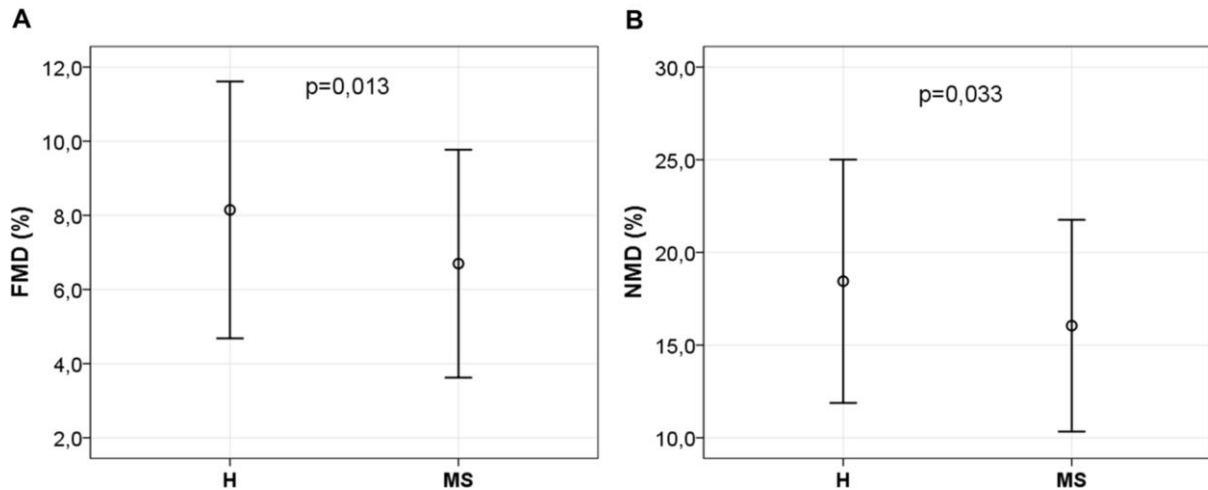
Bazalni promjeri brahijalnih arterija ispitanika s metaboličkim sindromom bili su značajno veći u usporedbi bazalnim promjerima brahijalnih arterija zdravih ispitanika (bazalni promjer arterije 1: $p=0,024$; bazalni promjer arterije 2: $p=0,042$). (Tablica 6)

Nasuprot tome, najveći promjeri brahijalnih arterija ispitanika nakon kompresije manžetom, kao ni apsolutne vrijednosti promjene promjera brahijalnih arterija nakon kompresije manžetom nisu se razlikovali između promatranih skupina. Ipak, postotak promjene promjera brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) bio je značajno veći kod zdravih ispitanika ($p=0,013$). (Slika 10) Razlika između skupina primijećena je i u vremenu proteklom od otpuštanja manžete do postizanja najveće dilatacije brahijalne arterije, sa značajno kraćim vremenom kod zdravih ispitanika ($p<0,001$). (Tablica 6)

Najveći promjeri brahijalnih arterija ispitanika nakon primjene gliceriltrinitrata i apsolutne vrijednosti promjene promjera brahijalnih arterija nakon primjene gliceriltrinitrata nisu se značajno razlikovali između promatranih skupina. No, postotak promjene promjera brahijalne arterije nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) bio je značajno veći kod zdravih ispitanika ($p=0,033$). (Slika 10) Nakon primjene gliceriltrinitrata, kao egzogenog izvora NO, nije zabilježena razlika između skupina u vremenu proteklom od primjene gliceriltrinitrata do postizanja najveće dilatacije brahijalne arterije. (Tablica 6)

Izdvajamo podatak da nije zabilježena statistički značajna razlika u varijablama FMD i NMD u podskupinama ispitanika s metaboličkim sindromom ovisno o redovito korištenoj terapiji

inhibitorima angiotenzin-konvertirajućeg enzima, antagonistima kalcijevih kanala, antagonistima β -adrenergičnih receptora, diureticima, metforminom ili statinima.



Slika 10. Dijagrami s prikazom aritmetičke sredine i standardne devijacije postotaka promjene promjera brahijalnih arterija nakon kompresije manžetom (FMD) kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom (dio A); i prikazom aritmetičke sredine i standardne devijacije postotaka promjene promjera brahijalnih arterija nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom (dio B).

Prikazane p vrijednosti predstavljaju T-testom izračunatu razliku vrijednosti varijabli FMD i NMD između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

P vrijednosti $<0,05$ smatrane su statistički značajnima.

FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, % - postotak.

Tablica 6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	Svi (N=130)	H (N=65)	MS (N=65)	P
Bazalna mjerenja 1				
Sistolički krvni tlak (mmHg)	130,0 (120,0; 140,0)	120,0 (115,0; 130,0)	140,0 (130,0; 145,0)	<0,001
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	80,0 (70,0; 80,0)	70,0 (70,0; 80,0)	80,0 (80,0; 80,0)	<0,001
Bazalni promjer arterije 1 (mm)	4,388 ± 0,752	4,240 ± 0,664	4,537 ± 0,809	0,024
Kompresija manžetom				
Tlak kompresije (mmHg)	180,0 (170,0; 190,0)	170,0 (165,0; 180,0)	190,0 (180,0; 195,0)	<0,001
Promjer arterije tijekom kompresije (mm)	4,532 ± 0,779	4,377 ± 0,661	4,686 ± 0,857	0,024
Nakon kompresije				
Vrijeme od otpuštanja manžete do najveće dilatacije (s)	59,0 (47,0; 86,2)	50,0 (41,0; 67,0)	75,0 (56,0; 99,0)	<0,001
Najveći promjer arterije (mm)	4,705 ± 0,768	4,576 ± 0,669	4,834 ± 0,841	0,055
Δ promjer arterije (mm)	0,317 ± 0,138	0,336 ± 0,137	0,297 ± 0,137	0,105
FMD (%)	7,4 ± 3,3	8,1 ± 3,5	6,7 ± 3,1	0,013
Bazalna mjerenja 2				
Bazalni promjer arterije 2 (mm)	4,403 ± 0,761	4,254 ± 0,678	4,534 ± 0,810	0,042
Nakon primjene gliceriltrinitrata				
Vrijeme od primjene gliceriltrinitrata do najveće dilatacije (s)	345,5 (305,8; 402,5)	333,0 (299,0; 397,0)	352,0 (324,0; 426,0)	0,152
Najveći promjer arterije (mm)	5,138 ± 0,805	5,018 ± 0,710	5,243 ± 0,872	0,124
Δ promjer arterije (mm)	0,734 ± 0,228	0,763 ± 0,229	0,709 ± 0,226	0,190
NMD (%)	17,2 ± 6,2	18,4 ± 6,6	16,0 ± 5,7	0,033

Kvantitativne varijable s distribucijom koja odgovara Gaussovoj opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a kvantitativne varijable čija distribucija ne prati Gaussovu krivulju opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (q1; q3).

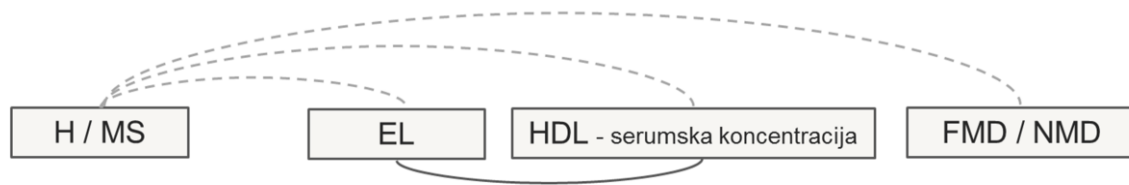
Razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom testirane su T-testom ili Mann-Whitneyjevim U testom, ovisno o tipu varijable.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Promjer arterije tijekom kompresije izmjeren je kod 64 zdrava ispitanika i kod 129 ispitanika ukupno. Bazalni promjer arterije 2 i sva mjerenja nakon primjene nitroglicerina izmjerena su kod 57 zdravih ispitanika i kod 122 ispitanika ukupno.

Δ - promjena, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), mm - milimetar, mmHg - milimetar žive, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, s - sekunda, % - postotak.

5.7. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a



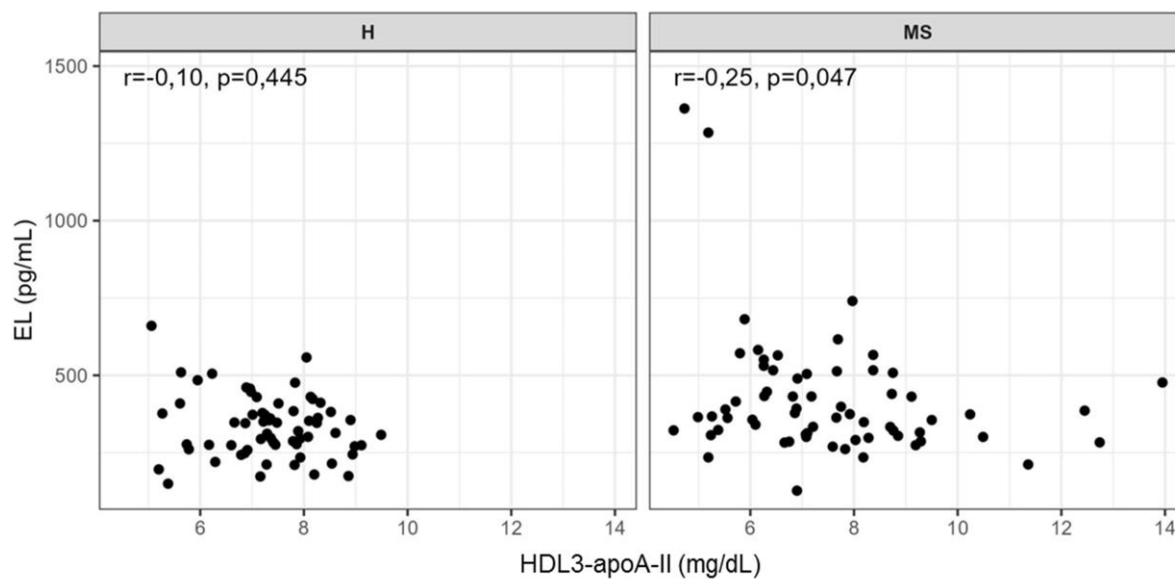
Slika 11. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Analizom korelacija koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a, zabilježena je statistički značajna, ali slaba negativna povezanost koncentracije endotelne lipaze sa serumskom koncentracijom apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine (HDL3-apoA-II) samo u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom ($r=-0,25$, $p=0,047$). (Slika 12)

Detaljni prikaz svih korelacija nalazi se u Tablici 7.



Slika 12. Prikaz korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumske koncentracije apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine (HDL3-apoA-II) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom.

P vrijednosti $<0,05$ smatrane su statistički značajnima.

ApoA-II - apolipoprotein A-II, dL - decilitar, EL - endotelna lipaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, mg - miligram, mL - mililitar, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMR - nuklearna magnetska rezonancija, pg - pikogram, r - Spearmanov koeficijent korelacije.

Tablica 7. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla (mg/dL)	EL (pg/mL)			
	H (N=65)		MS (N=65)	
	r	p	r	p
HDL-C	0,00	0,994	0,11	0,402
HDL1-C	-0,04	0,723	0,23	0,060
HDL2-C	-0,12	0,351	0,02	0,856
HDL3-C	-0,13	0,317	-0,12	0,346
HDL4-C	0,19	0,130	-0,01	0,923
HDL-TG	0,05	0,682	-0,06	0,639
HDL1-TG	-0,06	0,637	0,08	0,520
HDL2-TG	-0,04	0,738	-0,02	0,894
HDL3-TG	0,01	0,914	-0,09	0,456
HDL4-TG	0,13	0,297	-0,16	0,203
HDL-PL	-0,10	0,420	0,01	0,936
HDL1-PL	-0,09	0,454	0,17	0,188
HDL2-PL	-0,19	0,128	-0,03	0,831
HDL3-PL	-0,16	0,208	-0,07	0,565
HDL4-PL	0,10	0,421	-0,08	0,515
HDL-apoA-I	-0,01	0,935	-0,03	0,820
HDL1-apoA-I	-0,08	0,510	0,17	0,185
HDL2-apoA-I	-0,12	0,341	-0,03	0,788
HDL3-apoA-I	-0,11	0,379	-0,18	0,152
HDL4-apoA-I	0,20	0,107	-0,06	0,623
HDL-apoA-II	0,05	0,665	-0,20	0,107
HDL1-apoA-II	-0,19	0,138	-0,13	0,312
HDL2-apoA-II	-0,20	0,116	-0,15	0,229
HDL3-apoA-II	-0,10	0,445	-0,25	0,047
HDL4-apoA-II	0,20	0,107	-0,12	0,344

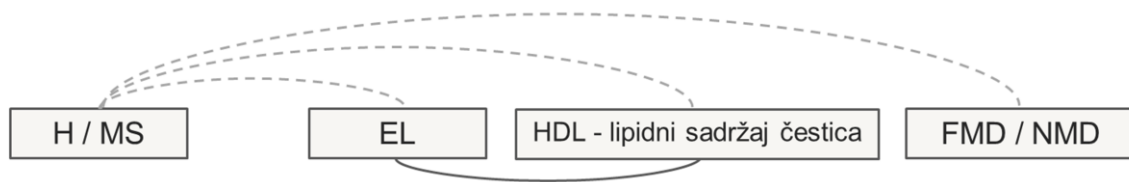
Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, apoA-II - apolipoprotein A-II, C - kolesterol (engl. *cholesterol*); dL - decilitar, EL - endotelna lipaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, mg - miligram, mL - mililitar, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMR - nuklearna magnetska rezonancija, pg - pikogram, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije, TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

5.8. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a

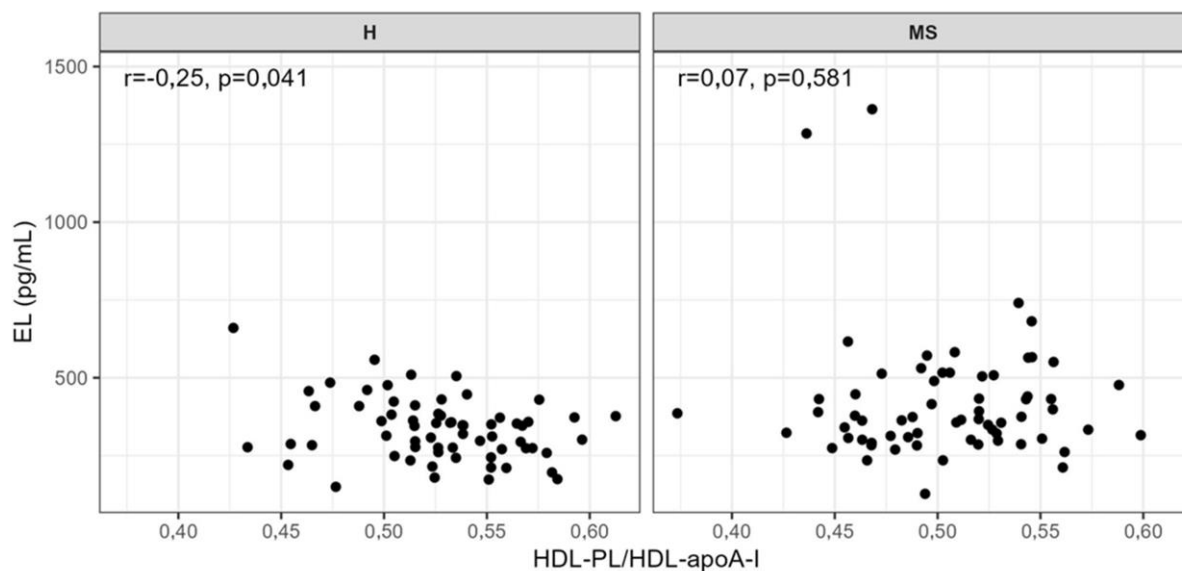


Slika 13. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Iz analize korelacija koncentracije endotelne lipaze u serumu i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a (Tablica 8), izdvajamo negativnu povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a (HDL-PL/HDL-apoA-I) u skupini zdravih ispitanika ($r=-0,25$, $p=0,041$). Analogna povezanost u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom nije utvrđena. (Slika 14)



Slika 14. Prikaz korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a (HDL-PL/HDL-apoA-I) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu s omjerima koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, EL - endotelna lipaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, mL - mililitar, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), pg - pikogram, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije.

Tablica 8. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	EL (pg/mL)			
	H (N=65)		MS (N=65)	
	r	p	r	p
HDL-C / HDL-apoA-I	-0,01	0,907	0,23	0,071
HDL1-C / HDL1-apoA-I	0,21	0,088	0,04	0,727
HDL2-C / HDL2-apoA-I	-0,07	0,599	0,06	0,613
HDL3-C / HDL3-apoA-I	-0,02	0,890	0,03	0,799
HDL4-C / HDL4-apoA-I	0,09	0,488	0,02	0,846
HDL-TG / HDL-apoA-I	-0,02	0,890	-0,02	0,871
HDL1-TG / HDL1-apoA-I	0,03	0,789	0,03	0,830
HDL2-TG / HDL2-apoA-I	-0,02	0,885	0,03	0,783
HDL3-TG / HDL3-apoA-I	0,01	0,938	-0,01	0,943
HDL4-TG / HDL4-apoA-I	0,04	0,759	-0,08	0,501
HDL-PL / HDL-apoA-I	-0,25	0,041	0,07	0,581
HDL1-PL / HDL1-apoA-I	-0,02	0,904	0,00	0,977
HDL2-PL / HDL2-apoA-I	-0,24	0,052	0,04	0,775
HDL3-PL / HDL3-apoA-I	-0,17	0,176	0,00	0,974
HDL4-PL / HDL4-apoA-I	-0,18	0,141	-0,08	0,524

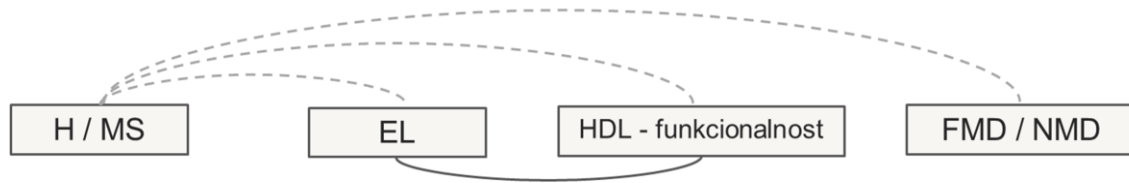
Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), EL - endotelna lipaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, mL - mililitar, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, pg - pikogram, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije, TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

5.9. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i pokazatelja funkcionalnosti HDL-a



Slika 15. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

U ovom istraživanju nije opisana statistički značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s izmjerenim pokazateljima funkcionalnosti jediničnog volumena seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B ili pokazateljima funkcionalnosti čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. (Tablica 9)

Tablica 9. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu s pokazateljima funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjerima koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

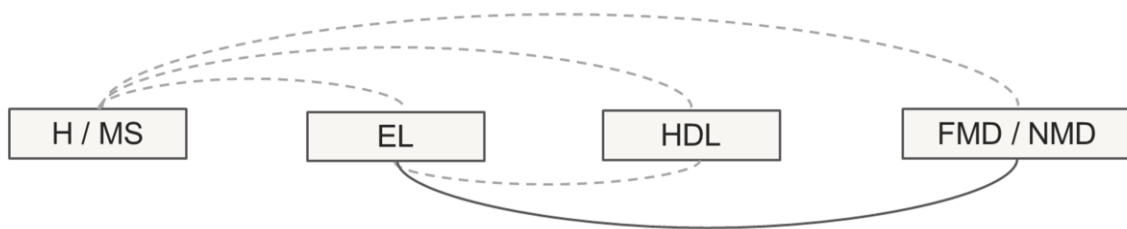
Varijabla	EL (pg/mL)			
	H (N=65)		MS (N=64)	
	r	p	r	p
AE (mmol/min/mL apoBDS)	0,17	0,178	-0,24	0,058
AE (mmol/min/mL apoBDS) / HDL-apoA-I	0,15	0,242	-0,22	0,074
CEC (%)	-0,08	0,529	-0,14	0,282
CEC (%) / HDL-apoA-I	-0,11	0,387	-0,12	0,325

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu s pokazateljima funkcionalnosti seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B i omjerima koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a.

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

AE - arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (engl. *arylesterase activity of paraoxonase 1*), apoA-I - apolipoprotein A-I, apoBDS - serum iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B (engl. *apolipoprotein B-depleted serum*), CEC - kapacitet za efluks kolesterola (engl. *cholesterol efflux capacity*), EL - endotelna lipaza, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, min - minuta, mL - mililitar, mmol - milimol, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, pg - pikogram, r - Spearmanov koeficijent korelacije, % - postotak.

5.10. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i pokazatelja funkcije brahijalne arterije



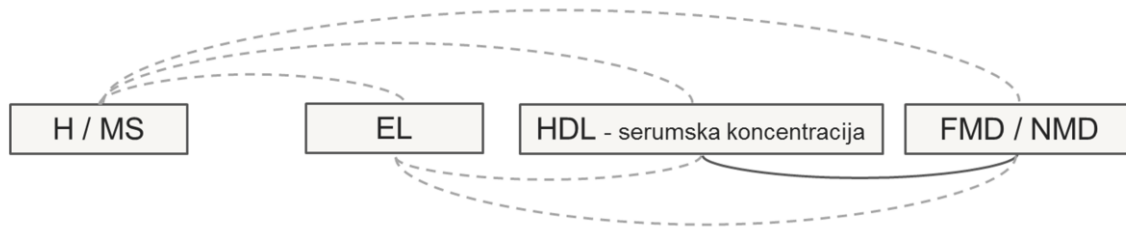
Slika 16. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrkana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Spearmanovim testom korelacije nije opisana značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i analiziranih pokazatelja funkcije brahijalne arterije određenih ultrazvukom, FMD (HV: $r=0,22$, $p=0,084$; MS: $r=0,19$, $p=0,139$) i NMD (HV: $r=0,20$, $p=0,133$; MS: $r=0,07$, $p=0,561$), niti u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

5.11. Korelacije serumskih koncentracija sastavnica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije



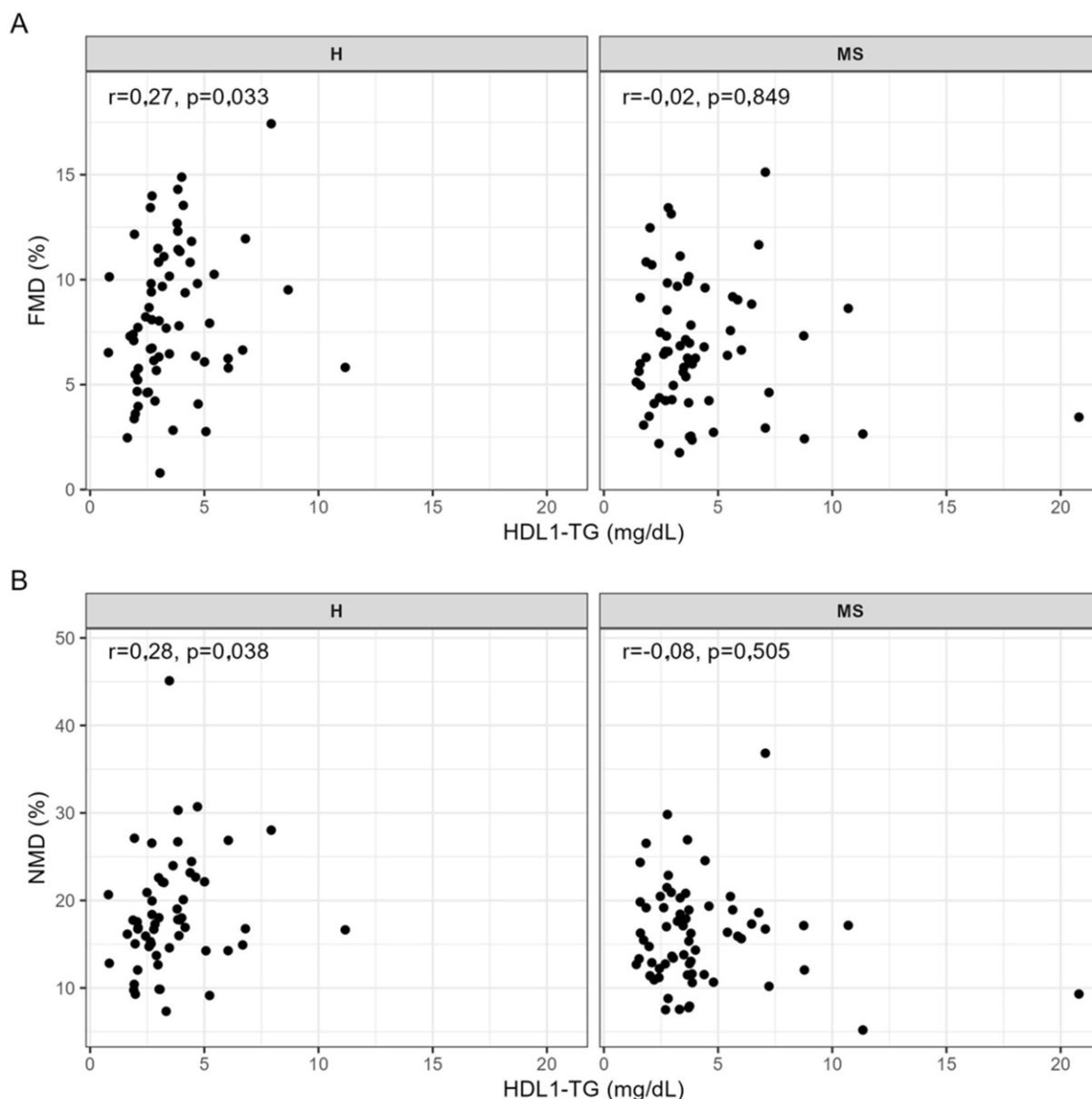
Slika 17. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Testiranjem korelacija serumskih koncentracija sastavnica HDL-a izmjerenih NMR spektrometrom i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije, utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost serumске koncentracije triglicerida u sastavu velikih, manje gustih čestica HDL-a (HDL1-TG) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD: $r=0,27$, $p=0,033$) i nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD: $r=0,28$, $p=0,038$). Opisana povezanost postoji samo u skupini zdravih ispitanika, a izostaje u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. (Slika 18)

Pregled svih korelacija serumskih koncentracija sastavnica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije u zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom nalazi se u Tablici 10.



Slika 18. Prikaz korelacija serumske koncentracije triglicerida u sastavu velikih, manje gustih čestica HDL-a (HDL1-TG) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) (dio A); i s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) (dio B) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

P vrijednosti $<0,05$ smatrane su statistički značajnima.

DL - decilitar, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, mg - miligram, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, NMR - nuklearna magnetska rezonancija, r - Spearmanov koeficijent korelacije, TG - triglicerid (engl. *triglyceride*), % - postotak.

Tablica 10. Korelacije serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla (mg/dL)	FMD (%)				NMD (%)			
	H (N=65)		MS (N=65)		H (N=57)		MS (N=65)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
HDL-C	0,14	0,276	0,03	0,810	0,07	0,605	-0,02	0,854
HDL1-C	0,14	0,266	-0,03	0,827	0,11	0,436	-0,08	0,509
HDL2-C	0,09	0,454	-0,06	0,626	0,09	0,512	-0,05	0,697
HDL3-C	0,04	0,723	-0,05	0,693	0,07	0,610	-0,01	0,922
HDL4-C	-0,03	0,804	0,01	0,910	-0,12	0,354	-0,05	0,683
HDL-TG	0,11	0,366	-0,02	0,869	0,20	0,131	-0,09	0,495
HDL1-TG	0,27	0,033	-0,02	0,849	0,28	0,038	-0,08	0,505
HDL2-TG	0,12	0,328	-0,01	0,947	0,23	0,085	-0,05	0,721
HDL3-TG	0,03	0,788	-0,02	0,864	0,20	0,146	-0,04	0,726
HDL4-TG	-0,04	0,781	-0,05	0,713	0,02	0,854	-0,14	0,269
HDL-PL	0,14	0,254	-0,03	0,784	0,13	0,347	0,01	0,929
HDL1-PL	0,15	0,237	-0,05	0,672	0,15	0,262	-0,03	0,837
HDL2-PL	0,16	0,215	-0,07	0,554	0,13	0,333	0,00	1,000
HDL3-PL	0,10	0,429	-0,06	0,611	0,11	0,405	0,02	0,879
HDL4-PL	-0,06	0,632	0,04	0,772	-0,12	0,383	0,02	0,857
HDL-apoA-I	0,16	0,196	-0,04	0,763	0,12	0,393	-0,06	0,610
HDL1-apoA-I	0,19	0,129	0,00	0,988	0,16	0,243	0,01	0,930
HDL2-apoA-I	0,18	0,146	-0,07	0,575	0,12	0,366	0,00	0,975
HDL3-apoA-I	0,10	0,436	-0,10	0,412	0,14	0,316	-0,03	0,793
HDL4-apoA-I	-0,05	0,699	0,04	0,734	-0,12	0,368	-0,06	0,652
HDL-apoA-II	-0,01	0,919	-0,06	0,656	0,07	0,625	-0,11	0,376
HDL1-apoA-II	0,14	0,253	-0,01	0,951	0,20	0,140	0,02	0,867
HDL2-apoA-II	0,17	0,173	-0,01	0,941	0,20	0,129	0,03	0,805
HDL3-apoA-II	-0,04	0,732	-0,03	0,786	0,19	0,146	-0,02	0,881
HDL4-apoA-II	-0,11	0,382	-0,02	0,852	-0,13	0,318	-0,11	0,370

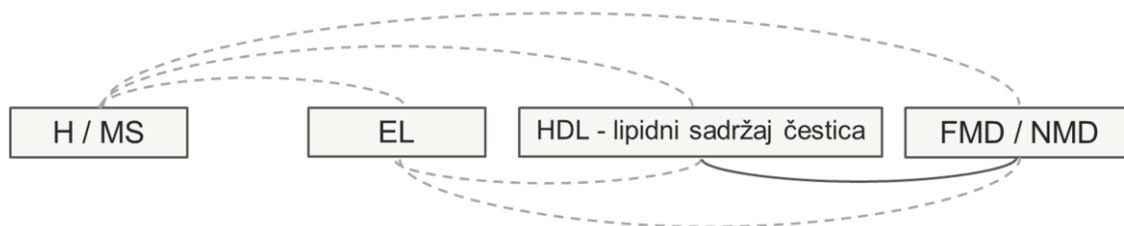
Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, apoA-II - apolipoprotein A-II, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), dL - decilitar, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, mg - miligram, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, NMR - nuklearna magnetska rezonancija, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije, TG - triglicerid (engl. *triglyceride*), % - postotak.

5.12. Korelacije omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije



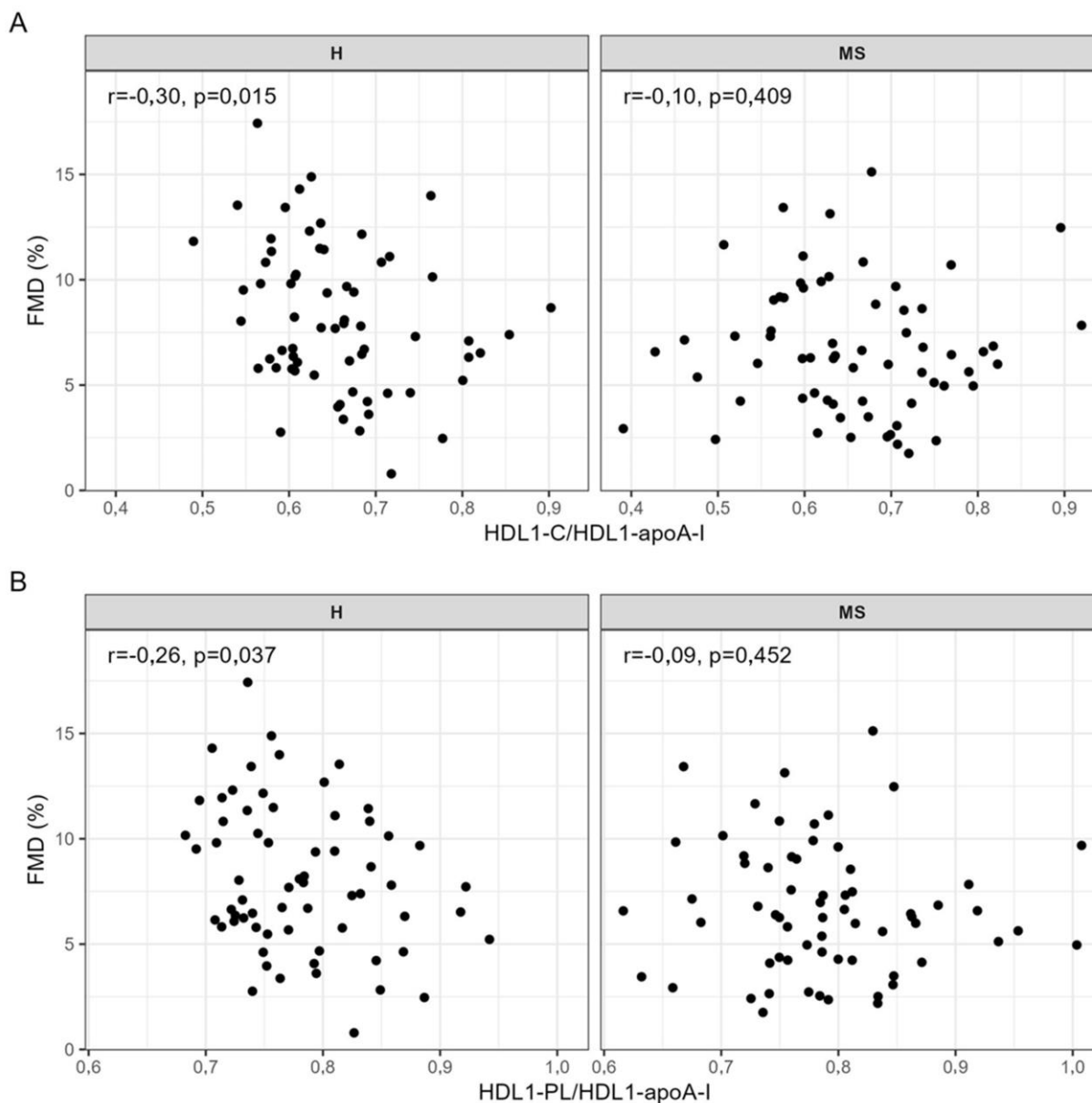
Slika 19. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

Tablica 11 pokazuje pregled korelacija omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

Iz rezultata izdvajam značajnu negativnu povezanost sadržaja kolesterola i fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera i male gustoće s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) kod zdravih ispitanika (HDL1-C/HDL1-apoA-I: $r=-0,30$, $p=0,015$; HDL1-PL/HDL1-apoA-I: $r=-0,26$, $p=0,037$). Značajnost povezanosti istih varijabli izostaje kod ispitanika s metaboličkim sindromom. Povezanost sadržaja istih lipidnih sastavnica čestica HDL-a i postotka dilatacije brahijalne arterije nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) nije zabilježena niti u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. (Slika 20)



Slika 20. Prikaz korelacije sadržaja kolesterola u česticama HDL-a velikog promjera i male gustoće (HDL1-C/HDL1-apoA-I) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom (dio A); i korelacije sadržaja fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera i male gustoće (HDL1-PL/HDL1-apoA-I) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom (dio B).

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD).

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije, % - postotak.

Tablica 11. Korelacije omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	FMD (%)				NMD (%)			
	H (N=65)		MS (N=65)		H (N=57)		MS (N=65)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
HDL-C / HDL-apoA-I	0,05	0,708	0,05	0,672	-0,01	0,937	0,06	0,622
HDL1-C / HDL1-apoA-I	-0,30	0,015	-0,10	0,409	-0,16	0,220	-0,15	0,228
HDL2-C / HDL2-apoA-I	0,01	0,949	-0,03	0,838	0,01	0,940	-0,17	0,187
HDL3-C / HDL3-apoA-I	-0,12	0,350	0,10	0,412	-0,11	0,419	-0,03	0,831
HDL4-C / HDL4-apoA-I	-0,04	0,781	-0,05	0,708	-0,09	0,510	-0,01	0,926
HDL-TG / HDL-apoA-I	0,02	0,844	-0,03	0,801	0,08	0,536	-0,07	0,559
HDL1-TG / HDL1-apoA-I	0,03	0,833	-0,01	0,923	0,06	0,637	-0,10	0,413
HDL2-TG / HDL2-apoA-I	0,01	0,966	-0,03	0,815	0,09	0,500	-0,10	0,417
HDL3-TG / HDL3-apoA-I	-0,02	0,896	-0,04	0,731	0,08	0,565	-0,05	0,674
HDL4-TG / HDL4-apoA-I	-0,07	0,600	-0,05	0,709	0,07	0,595	-0,05	0,707
HDL-PL / HDL-apoA-I	0,08	0,519	0,00	0,988	0,10	0,457	0,11	0,403
HDL1-PL / HDL1-apoA-I	-0,26	0,037	-0,09	0,452	-0,12	0,362	-0,02	0,881
HDL2-PL / HDL2-apoA-I	0,05	0,711	-0,02	0,861	0,11	0,422	0,01	0,937
HDL3-PL / HDL3-apoA-I	-0,06	0,652	0,05	0,690	0,01	0,952	0,17	0,174
HDL4-PL / HDL4-apoA-I	-0,02	0,905	0,07	0,595	0,06	0,640	0,15	0,246

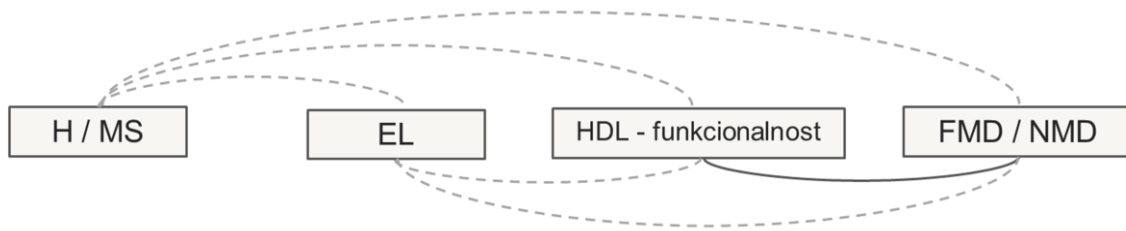
Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

Podrazredi čestica HDL-a 1 do 4 označavaju njihovu gustoću: 1 - gustoća 1,063-1,100 kg/L; 2 - gustoća 1,100-1,112 kg/L; 3 - gustoća 1,112-1,125 kg/L; 4 - gustoća 1,125-1,210 kg/L.

ApoA-I - apolipoprotein A-I, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, kg - kilogram, L - litra, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), r - Spearmanov koeficijent korelacije, TG - triglicerid (engl. *triglyceride*), % - postotak.

5.13. Korelacije pokazatelja funkcionalnosti HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije



Slika 21. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Puna linija - trenutno analizirani odnosi varijabli, iscrktana linija - ranije analizirani odnosi varijabli.

EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*.

U ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna povezanost pokazatelja funkcionalnosti jediničnog volumena seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B ili pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a s ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD) u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. (Tablica 12)

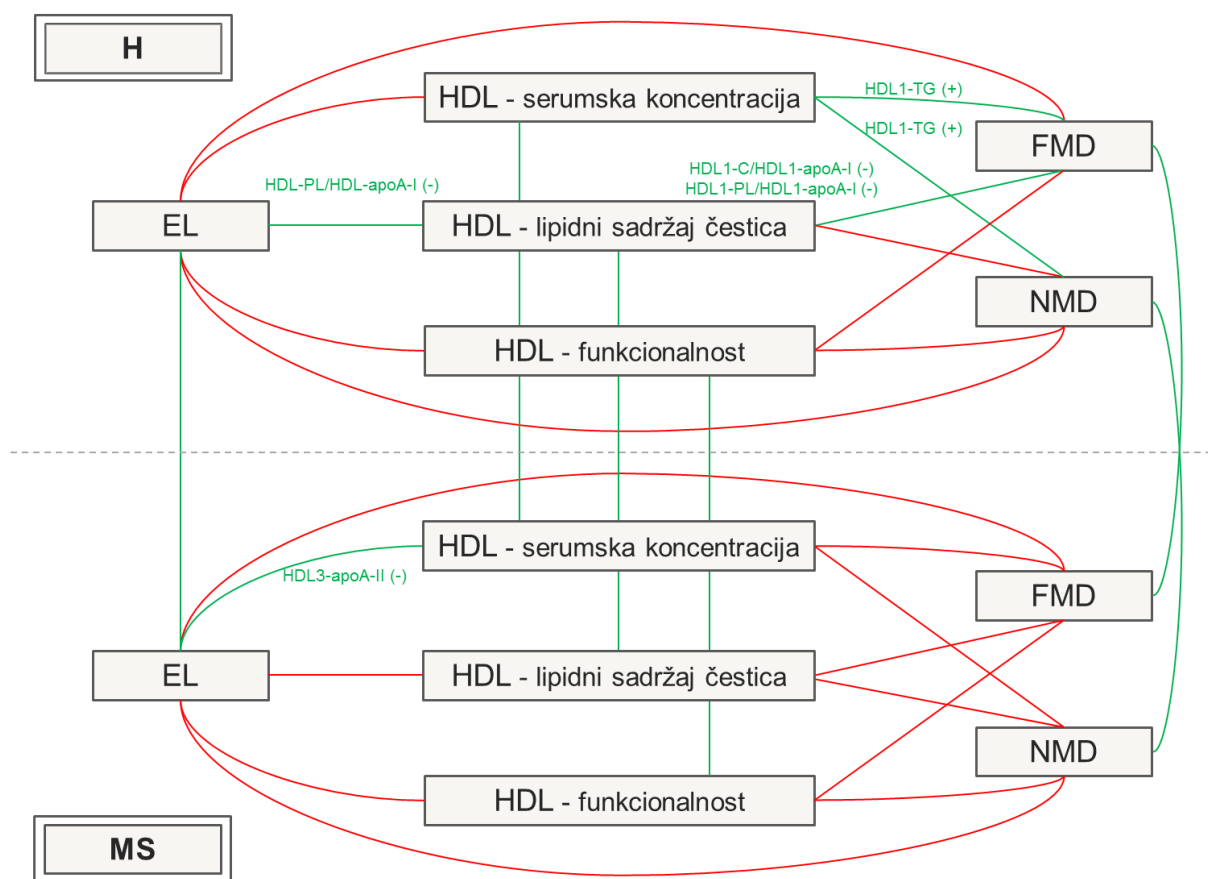
Tablica 12. Korelacije pokazatelja funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjera koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a s ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Varijabla	FMD (%)				NMD (%)			
	H (N=65)		MS (N=64)		H (N=57)		MS (N=64)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
AE (mmol/min/mL apoBDS)	0,15	0,240	-0,02	0,901	0,07	0,601	0,07	0,594
AE (mmol/min/mL apoBDS) / HDL-apoA-I	0,02	0,898	-0,02	0,903	-0,04	0,749	0,09	0,502
CEC (%)	0,04	0,744	-0,02	0,895	0,13	0,342	-0,13	0,324
CEC (%) / HDL-apoA-I	-0,15	0,234	-0,08	0,544	0,04	0,753	-0,11	0,374

Spearmanov test korelacije korišten je za analizu povezanosti pokazatelja funkcionalnosti seruma iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B i omjera koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a s ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

P vrijednosti <0,05 smatrane su statistički značajnima i podebljano su otisnute.

AE - arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (engl. *arylesterase activity of paraoxonase 1*), apoA-I - apolipoprotein A-I, apoBDS - serum iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B (engl. *apolipoprotein B-depleted serum*), CEC - kapacitet za efluks kolesterola (engl. *cholesterol efflux capacity*), FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*); HDL - engl. *high-density lipoprotein*, min - minuta, mL - mililitar, mmol - milimol, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), N - broj, NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, r - Spearmanov koeficijent korelacije, % - postotak.



Slika 22. Sažetak utvrđenih rezultata i odnosa između analiziranih varijabli kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

Zelena linija - statistički značajna razlika (za analogne varijable kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom) ili povezanost (za varijable koje su testirane Spearmanovim testom korelacije), crvena linija - nema statistički značajne razlike (za analogne varijable kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom) ili povezanosti (za varijable koje su testirane Spearmanovim testom korelacije).

ApoA-I - apolipoprotein A-I, apoA-II - apolipoprotein A-II, C - kolesterol (engl. *cholesterol*), EL - endotelna lipaza, FMD - engl. *flow-mediated dilation*, H - zdravi ispitanik (engl. *healthy*), HDL - engl. *high-density lipoprotein*, MS - metabolički sindrom (engl. *metabolic syndrome*), NMD - engl. *nitroglycerin-mediated dilation*, PL - fosfolipid (engl. *phospholipid*), TG - triglicerid (engl. *triglyceride*).

6. RASPRAVA

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem dodatnog objašnjavanja kompleksnih biokemijskih odnosa u metabolizmu lipida i njihovog utjecaja na razvitak endotelne disfunkcije, kao najranije faze aterosklerotske bolesti stijenke arterija.

Iako je istraživanjima učinjenim *in vitro* opisan veliki broj molekula koje su u interakciji i vode do nastanka endotelne disfunkcije, teško je procijeniti učinak koje od tih molekula je dominantan i vodi patološki proces u ljudi. To otvara vrata translacijskim istraživanjima.

Bolesnici s metaboličkim sindromom i bez do sada poznatih kliničkih manifestacija uznapredovale aterosklerotske bolesti arterija predstavljaju najpogodniju skupinu ispitanika za istraživanje interakcija molekula u metabolizmu lipida koje vode do nastanka endotelne disfunkcije. Već je ranije na više od 950 000 ispitanika jasno pokazano da postojanje metaboličkog sindroma dvostruko povećava rizik obolijevanja od infarkta miokarda i cerebrovaskularnog infarkta, kao akutnih manifestacija aterosklerotskih promjena stijenke koronarnih i cerebralnih arterija.¹¹⁶

Iako nismo uspjeli u potpunosti opisati hipotezom predložene povezanosti endotelne lipaze, čestica HDL-a i pokazatelja endotelne disfunkcije u bolesnika s metaboličkim sindromom, rezultati istraživanja otkrivaju zanimljive razlike u odnosima istih molekula u zdravlju i bolesti. Također ostaje prostor za istraživanje novih molekula koje moguće nadjačavaju utjecaj endotelne lipaze u metaboličkom sindromu te dominiraju patološkim metabolizmom HDL-a i procesom razvitka endotelne disfunkcije u ljudi.

U nastavku ćemo postupno analizirati dobivene rezultate, pretpostaviti fiziološke i patofiziološke odnose i procese u pozadini zabilježenih vrijednosti, kao i sagledati mogućnost postojanja drugih čimbenika u metabolizmu ili studijskim postupcima koji iskrivljuju ispravnu percepciju tih odnosa i procesa.

6.1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

U obje su skupine ispitanika uključenih u istraživanje zadovoljeni svi uključni i dijagnostički kriteriji, uz nepostojanje karakteristika koje su definirane kao isključni kriteriji. Skupina ispitanika s metaboličkim sindromom i skupina zdravih ispitanika adekvatno su usklađene prema dobi i spolu, tjelesnim funkcijama i navikama ispitanika, kao i nepostojanju akutnih ili kroničnih bolesti koje nisu sastavnice metaboličkog sindroma. Sve zabilježene značajne

razlike između skupina (prema opsegu struka, tjelesnoj masi, indeksu tjelesne mase te učestalosti arterijske hipertenzije i šećerne bolesti; $p < 0,001$ za sve navedene varijable) obuhvaćene su definicijom metaboličkog sindroma. To povećava reproducibilnost zamijećenih razlika u laboratorijski i ultrazvukom izmjerenim varijablama između dviju skupina ispitanika i vjerojatnost da su te razlike povezane upravo s patofiziologijom metaboličkog sindroma.

Iako je dio ispitanika s metaboličkim sindromom već ranije bio liječen lijekovima čiji je utjecaj na endotelnu funkciju opisan u literaturi, s ispitanicima je dogovoreno da tijekom 24 sata prije sudjelovanja u istraživanju ne uzmu inače predviđene doze lijekova. Utjecaj lijekova dodatno je testiran analizom razlika vrijednosti ključnih varijabli u podskupinama ispitanika s metaboličkim sindromom koji su koristili ili nisu koristili pojedini lijek.

6.2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji

6.2.1. Standardni biokemijski laboratorijski pokazatelji

Iz Tablice 2 vidljivo je da su medijani i interkvartilni rasponi koncentracija analiziranih laboratorijskih pokazatelja koji se rutinski koriste u kliničkom radu u granicama referentnih intervala u obje ispitivane skupine; izdvajaju se tek očekivano povećane koncentracije glukoze i lipida u serumu dijela ispitanika s metaboličkim sindromom. To potvrđuje činjenicu da uključeni ispitanici, zdravi i oni s metaboličkim sindromom, nisu bolovali od drugih kroničnih bolesti koje bi mogle imati značajan utjecaj na promatrani metabolizam lipida.

Iako su medijani koncentracija analiziranih biokemijskih pokazatelja u granicama intervala koji se u svakodnevnom kliničkom radu smatraju zadovoljavajućima, pregled statistički značajnih razlika koncentracija istih pokazatelja između skupine zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom nadopunjuje patofiziološku sliku metaboličkog sindroma. Značajno veće koncentracije triglicerida ($p < 0,001$), glukoze ($p < 0,001$), proteina ($p = 0,002$) i urata ($p < 0,001$) u serumu ispitanika s metaboličkim sindromom možemo dijelom objasniti njihovim povećanim unosom ugljikohidrata i sastojaka animalnog porijekla hranom. Masne kiseline iz triglicerida odlažu se u masne stanice koje proizvode proupalne citokine,^{105,106} a glikirani proteini pospješuju izlučivanje proupalnih citokina u makrofazima.¹¹² Dodatno, razgradnjom purinskih dušičnih baza do urata pomoću ksantin oksidaze stvaraju se slobodni radikali kisika,¹²⁹ koji također posreduju nastanak upalne reakcije.¹³⁰ Opisano proupalno stanje moglo bi objasniti izmjerene značajno veće

koncentracije IL-6 ($p < 0,001$) i CRP-a ($p < 0,001$) u serumu ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike u ovom istraživanju. *In vitro* je pokazano da IL-6 i drugi proupalni citokini povećavaju ekspresiju endotelne lipaze u endotelnim stanicama.^{93,100}

6.2.2. Endotelna lipaza

Koncentracija endotelne lipaze u ovom je istraživanju određena iz seruma ELISA metodom, bez prethodne primjene heparina ispitanicima. Izračunati medijan koncentracija endotelne lipaze za sve ispitanike približno odgovara vrijednostima koje su zabilježili Badellino i suradnici prije primjene heparina svojim ispitanicima.¹⁰⁴ Oni su dodatno istoj skupini ispitanika, koja je obuhvaćala i zdrave osobe i osobe s metaboličkim sindromom bez drugih kroničnih bolesti, odredili i koncentracije endotelne lipaze u serumu nakon primjene heparina, čiji je medijan bio približno 3 puta veći od medijana koncentracija određenih prije primjene heparina. Objašnjenje se krije u činjenici da je dio u krv izlučenih molekula endotelne lipaze preko heparan sulfatnih proteoglikana u interakciji s endotelnim stanicama stijenke krvne žile, a oslobađaju se primjenom heparina.⁷⁶ Badellino i suradnici opisali su da koncentracije endotelne lipaze u serumu prije i nakon primjene heparina značajno koreliraju kod istoga ispitanika, da je većina korelacija endotelne lipaze s drugim varijablama očuvana u obje situacije te za daljnja istraživanja predlažu određivanje koncentracije endotelne lipaze u serumu bez primjene heparina ispitanicima.¹⁰⁴

Značajno veća koncentracija endotelne lipaze kod ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike u ovom istraživanju ($p = 0,002$) je u skladu s podacima koje daju Lamarche i suradnici.¹¹³ Pretpostavljeni patofiziološki mehanizmi koji uzrokuju povećanje koncentracije endotelne lipaze u stanju metaboličkog sindroma analizirani su u Uvodu.

U literaturi se navodi da statini smanjuju ekspresiju endotelne lipaze u endotelnim stanicama i makrofazima, kao i njenu fosfolipaznu aktivnost.^{76,102} U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika između koncentracija endotelne lipaze u podskupinama ispitanika s metaboličkim sindromom bez ili s terapijom statinom, pri čemu su ispitanici liječeni statinom zadnju doza lijeka uzeli najmanje 24 sata prije uzorkovanja krvi. Stoga smo zaključili da korekcija za terapiju statinima u daljnjim statističkim analizama koje uključuju koncentraciju endotelne lipaze nije potrebna.

6.2.3. Lipoproteini

U skladu s definicijom metaboličkog sindroma,¹¹⁴ u ovom istraživanju zabilježene su značajno manje koncentracije HDL-C u ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$). Još je u Framinghamskoj studiji 1988. godine opisano da su žene s koncentracijom HDL-C $< 1,4$ mmol/L imale 5 puta veći rizik, a muškarci s HDL-C $\leq 1,1$ mmol/L 1,7 puta veći rizik nastanka infarkta miokarda tijekom narednih 12 godina u usporedbi sa ženama koje su imale HDL-C $> 1,7$ mmol/L ili muškarcima s HDL-C $> 1,35$ mmol/L, i to neovisno o dobi i postojanju drugih rizičnih čimbenika za kardiovaskularne bolesti.¹³¹ Usporedbom s opisanim relativnim rizicima bolesnika s metaboličkim sindromom za razvoj kardiovaskularnih bolesti,^{114,116} može se zaključiti da je, u spletu svih molekula čija je koncentracija i funkcija promijenjena u metaboličkom sindromu, HDL-a jedan od ključnih nositelja tog povećanog rizika.

Iako statistički neznajno različiti, u ovom su istraživanju medijani koncentracija ukupnog kolesterola i LDL-C u serumu ispitanika s metaboličkim sindromom bili manji u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Iz rezultata prezentiranih analiza možemo zaključiti da se radi o učinku statina kojima je dio ispitanika s metaboličkim sindromom bio liječen prije sudjelovanja u istraživanju.

S obzirom na zabilježeni utjecaj statina na koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-C kod ispitanika s metaboličkim sindromom, testirali smo i njihov utjecaj na koncentraciju HDL-C i triglicerida. Nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentracijama HDL-C i triglicerida između podskupina ispitanika s metaboličkim sindromom liječenih ili neliječenih statinima, iz čega smo zaključili da korekcija za terapiju statinima u daljnjim statističkim analizama koje uključuju HDL nije neophodna. Tom zaključku pridonose i podatci iz istraživanja STELLAR, koje je analiziralo promjene koncentracije HDL-C u serumu ispitanika tijekom terapije svim standardnim dozama rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina i pravastatina, te pokazalo da je najveća zabilježena promjena koncentracije HDL-C uz terapiju statinima $< 10\%$.¹³²

6.3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom

Razlike u serumskim koncentracijama sastavnica HDL-a zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom u ovom istraživanju možemo usporediti s odgovarajućim vrijednostima u studiji koju su proveli Stadler i suradnici. Analizirali su lipoproteinski sastav

HDL-a pretilih ispitanica sa značajno većim koncentracijama triglicerida i značajno manjim koncentracijama HDL-C u serumu (koji su određeni standardnim biokemijskim laboratorijskim metodama) u usporedbi sa zdravim ispitanicima uredne tjelesne mase. Opisali su značajno manju serumsku koncentraciju fosfolipida, kolesterola i apoA-I te značajno veću koncentraciju triglicerida u sastavu HDL-a pretilih ispitanica u usporedbi sa zdravima,¹³³ što odgovara zabilježenim razlikama između ispitanika s metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika u ovom istraživanju.

S obzirom da metoda određivanja serumskih koncentracija sastavnica HDL-a korištenim NMR spektrometrom ne daje izravnu informaciju o koncentraciji čestica HDL-a u serumu, već je u ranijim istraživanjima predloženo korištenje serumске koncentracije apoA-I u sastavu čestica HDL-a kao približne procjene broja čestica HDL-a u jediničnom volumenu seruma.^{124,125}

Iz serumskih koncentracija apoA-I u sastavu čestica HDL-a pojedinog podrazreda, možemo zaključiti da male čestice HDL-a zauzimaju najveći udio u ukupnom broju čestica HDL-a kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom. To je u skladu s nalazima drugih istraživanja koja su analizirala koncentraciju čestica HDL-a u uzorcima zdravih ispitanika¹²⁵ ili ispitanika različitih kliničkih karakteristika, ali bez anamneze kardiovaskularnih bolesti.¹²⁴ U ovom je istraživanju također vidljivo da je broj čestica HDL-a svih podrazreda u jediničnom volumenu seruma (promatran preko odgovarajuće koncentracije apoA-I) značajno manji kod ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike (HDL1-apoA-I: $p=0,007$; HDL2-apoA-I: $p=0,004$; HDL3-apoA-I: $p=0,040$; HDL4-apoA-I: $p=0,023$). Pri tome je ipak zabilježen značajno veći udio čestica male do srednje veličine (podrazred 3) u ukupnom broju čestica HDL-a u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike, dok se udjeli najvećih i najmanjih čestica nisu značajno razlikovali između promatranih skupina (HDL1-apoA-I/HDL-apoA-I: $p=0,088$; HDL2-apoA-I/HDL-apoA-I: $p=0,652$; HDL3-apoA-I/HDL-apoA-I: $p=0,047$; HDL4-apoA-I/HDL-apoA-I: $p=0,424$). Iako u literaturi postoje podatci o značajno manjem udjelu velikih čestica i značajno većem udjelu malih čestica HDL-a u ukupnoj masi čestica HDL-a pretilih ispitanica ili ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi s odgovarajućim veličinama kod kontrolnih ispitanika, oni se temelje na podjeli čestica HDL-a u dvije, odnosno tri frakcije (HDL2, HDL3, male HDL3 čestice), određeni su drugom metodom i nisu usporedivi s rezultatima našeg istraživanja.^{133,134} Ipak, zanimljivo je da su Lagos i suradnici, unatoč opisanim razlikama u udjelima čestica različite veličine u ukupnoj količini čestica HDL-a, zamijetili značajno

manju masu i velikih i malih čestica HDL-a kod bolesnika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike.¹³⁴

6.4. Lipidni sadržaj čestica HDL-a

Serumske koncentracije sastavnica HDL-a, zbog postojanja više podrazreda čestica HDL-a koji su određeni veličinom i gustoćom čestica (podrazredi 1 do 4) te različitog broja čestica koje čine pojedini podrazred, ne pružaju informaciju o sadržaju pojedinih lipidnih sastavnica u česticama HDL-a određenog podrazreda.

Odnos lipidnog sadržaja prosječnih čestica HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika zabilježen u ovom istraživanju možemo usporediti s rezultatima istraživanja koje su proveli Denimal i suradnici. Njihov nalaz značajno manjeg sadržaja kolesterola i značajno većeg sadržaja triglicerida u sastavu čestica HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi s kontrolama je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Razliku čini činjenica da u istraživanju Denimala i suradnika sadržaj fosfatidilkolina u sastavu čestica HDL-a nije bio značajno različit u promatranim skupinama, no potrebno je istaknuti da sadržaj fosfolipida kao skupine u sastavu čestica HDL-a u tom istraživanju nije zabilježen niti uspoređen.¹³⁵

Pregledom literature, sustavno prikazani podatci o lipidnom sadržaju čestica HDL-a pojedinog podrazreda kod bolesnika s metaboličkim sindromom za usporedbu s nalazima ovog istraživanja nisu pronađeni.

Serumske koncentracije sastavnica HDL-a i pokazatelji lipidnog sadržaja čestica HDL-a u ovom istraživanju načelno su u suglasju s nalazima drugih istraživača. Ipak, izravne i jednoznačne usporedbe su otežane zbog upotrebe različitih laboratorijskih metoda, različitog načina prezentiranja rezultata i različitih skupina ispitanika koje su bile uključene u istraživanja drugih istraživača.

6.5. Funkcionalnost HDL-a

6.5.1. Kapacitet HDL-a za efluks kolesterola

Zabilježili smo značajno manji kapacitet jediničnog volumena apoBDS za efluks kolesterola kod ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$), no kapacitet čestica HDL-a za efluks kolesterola ispitanika s metaboličkim sindromom nije se razlikovao u usporedbi sa zdravim ispitanicima. To upućuje na činjenicu da je manji broj

čestica HDL-a u jediničnom volumenu apoBDS kod ispitanika s metaboličkim sindromom razlog manjeg kapaciteta njihovog apoBDS za efluks kolesterola.

Literaturni podatci o kapacitetu HDL-a za efluks kolesterola se razlikuju. Marsche i suradnici su opisali povezanost većeg opsega struka i indeksa tjelesne mase te manje koncentracije HDL-C i adiponektina u serumu, što odgovara profilu bolesnika s metaboličkim sindromom, sa smanjenim kapacitetom HDL-a za efluks kolesterola.¹²⁸ Za razliku od toga, Stadler i suradnici, proučavajući populaciju pretilih ispitanica sa značajno većim koncentracijama triglicerida i značajno manjim koncentracijama HDL-C u serumu u usporedbi sa zdravim ispitanicima uredne tjelesne mase, nisu pronašli značajnu razliku u kapacitetu HDL-a za efluks kolesterola.¹³³ U obje studije kao analog za procjenu funkcionalnosti HDL-a korišten je apoBDS, a kapacitet čestica HDL-a za efluks kolesterola nije analiziran.^{128,133}

6.5.2. Arilesterazna aktivnost s HDL-om povezane paraoksonaze 1

Nalaz ovog istraživanja je značajno manja arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u jediničnom volumenu apoBDS kod ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p=0,030$). Uzevši u obzir da nije zabilježena značajna razlika u arilesteraznoj aktivnosti paraoksonaze 1 čestica HDL-a između analiziranih skupina, zaključak je da je manja arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u jediničnom volumenu apoBDS ispitanika s metaboličkim sindromom bila posredovana njihovom manjom koncentracijom čestica HDL-a u serumu.

Za usporedbu, Stadler i suradnici nisu pronašli značajnu razliku u serumskoj (apoBDS) arilesteraznoj aktivnosti paraoksonaze 1 u pretilih ispitanica sa značajno većim koncentracijama triglicerida i značajno manjim koncentracijama HDL-C u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu. U tom istraživanju arilesterazna aktivnost s HDL-om povezane paraoksonaze 1 koja bi odgovarala česticama HDL-a nije kvantificirana.¹³³

Dostupan je relativno velik broj istraživanja u kojima se određivala arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u serumu iz kojega nisu bili odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B. Ta istraživanja ovdje nisu analizirana jer ne opisuju ekskluzivno arilesteraznu aktivnost s HDL-om povezane paraoksonaze 1.

6.5.3. Druge mjere antioksidativnog kapaciteta HDL-a

Osim određivanjem arilesterazne aktivnosti s HDL-om povezane paraoksonaze 1, antioksidativni kapacitet HDL-a može se kvantificirati i drugim metodama koje nisu korištene u ovom istraživanju.

Antioksidativni kapacitet HDL-a kvantificiran sposobnošću apoBDS-a za inhibiciju oksidacije dihidrorodamina bio je u studiji Stadler i suradnika značajno manji u već ranije opisanoj populaciji pretilih ispitanica u usporedbi sa zdravim ispitanicama uredne tjelesne mase.¹³³

Hansel i suradnici opisali su značajno manju antioksidativnu aktivnost čestica HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, mjereći učinkovitost čestice HDL-a u zaštiti čestice LDL-a od oksidacije.¹³⁶

6.5.4. HDL-om posredovana aktivacija eNOS

Iako ova mjera funkcionalnosti HDL-a nije analizirana u aktualnom istraživanju, vrijedi istaknuti nalaz Denimala i suradnika, koji su *in vitro* pokazali da su čestice HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom izazivale 69% manju aktivaciju eNOS u humanim endotelnim stanicama u usporedbi s česticama HDL-a kontrolnih ispitanika.¹³⁵

6.6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika

6.6.1. Osvrt na analizirane varijable i njihovu vrijednost u ovom istraživanju

Zabilježeni značajno veći bazalni promjeri brahijalne arterije ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima (bazalni promjer arterije 1: $p=0,024$; bazalni promjer arterije 2: $p=0,042$) mogu se objasniti različitom konstitucijom tijela ispitanika promatranih skupina, odnosno značajno većom tjelesnom masom ispitanika s metaboličkim sindromom ($p<0,001$).

Iako je zamijećeno da je vrijeme proteklo od završetka kompresije arterije manžetom do postizanja najvećeg promjera brahijalne arterije značajno duže kod ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na zdrave ispitanike ($p<0,001$), niti koncentracija endotelne lipaze niti analizirane mjere strukture i funkcionalnosti HDL-a nisu bile u korelaciji s tom varijablom, zbog čega je stavljena izvan fokusa ovog istraživanja. Ipak, Black i suradnici naglašavaju važnost ovog pokazatelja i njegovu značajnu razliku između mlađih i starijih ispitanika.¹³⁷

U skupini ispitanika s metaboličkim sindromom u ovom istraživanju izmjeren je značajno manji FMD ($p=0,013$) i značajno manji NMD ($p=0,033$) u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Poznato je da je za ostvarivanje vazodilatacije koju mjeri FMD potrebna i produkcija NO u endotelnim stanicama stijenke arterije i relaksacija glatkih mišićnih stanica stijenke arterije kao odgovor na proizvedeni NO, dok vazodilatacija koju mjeri NMD podrazumijeva relaksaciju glatkih mišićnih stanica stijenke arterije kao odgovor na egzogeni NO. S obzirom da u ovom istraživanju postoji značajna razlika i u varijabli FMD i NMD, ali da je razlika između promatranih skupina izraženija za varijablu FMD u odnosu na NMD, možemo zaključiti da između zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom postoji i razlika u produkciji NO u endotelnim stanicama i razlika u reaktivnosti glatkih mišićnih stanica na postojeći NO. Analizu ipak otežava činjenica da slobodni radikali kisika, prisutni u povećanoj koncentraciji kod ispitanika s metaboličkim sindromom,¹³⁸ inaktiviraju NO, čime mogu stvoriti dojam i smanjene produkcije NO u endotelnim stanicama i smanjene reaktivnosti glatkih mišićnih stanica stijenke arterije na NO.¹⁰

U literaturi je opisan protektivni učinak inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima,¹³⁹⁻¹⁴¹ antagonista kalcijevih kanala,¹⁴² antagonista β -adrenergičnih receptora,¹⁴³ diuretika,¹⁴⁴ metformina,^{145,146} i statina^{147,148} na endotelnu funkciju brahijalne arterije mjerenu ultrazvučnom metodom (FMD). Testirali smo moguće razlike u varijablama FMD i NMD za svaku navedenu skupinu lijekova između podskupina ispitanika s metaboličkim sindromom koji su uzimali lijek iz promatrane skupine i onih koji takav lijek nisu uzimali. Nakon 24 sata prekida uzimanja lijekova prije sudjelovanja u istraživanju, niti za jednu skupinu lijekova nije pronađena statistički značajna razlika u FMD ili NMD između tom skupinom lijekova liječenih i neliječenih ispitanika s metaboličkim sindromom. S obzirom na tu činjenicu, procijenjeno je da korekcije dobivenih rezultata i korelacija za uzimanje navedenih lijekova u ovom istraživanju nisu potrebne.

6.6.2. Usporedba izabranih pokazatelja funkcije brahijalne arterije s rezultatima drugih istraživanja

U skladu s rezultatima ovog istraživanja, postoje druge studije koje su pokazale da su ispitanici s metaboličkim sindromom imali značajno manji FMD u odnosu na zdrave ispitanike.^{149,150} Opisana razlika zabilježena je i u odnosu na zdrave ispitanike neovisno o tome jesu li oni bili pretili,¹⁵¹ kao i u odnosu na kontrolne ispitanike iz opće populacije bez metaboličkog sindroma koji nisu preboljeli akutne kardiovaskularne bolesti.^{152,153}

U dijelu istraživanja koja su uspoređivala heterogene skupine pripadnika opće populacije s ili bez metaboličkog sindroma nije nađena statistički značajna razlika u varijabli FMD između promatranih skupina.^{154,155}

Dvije od navedenih studija koje su istraživale vaskularnu funkciju u ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi s opisanim kontrolnim populacijama, obuhvaćale su i mjerenje varijable NMD te nisu zabilježile statistički značajnu razliku između promatranih skupina za tu varijablu.^{149,154}

6.7. Korelacije analiziranih pokazatelja

U prvom je dijelu istraživanja pokazano da postoje statistički značajne razlike u koncentraciji endotelne lipaze, strukturi i funkcionalnosti HDL-a te ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije stijenke krvne žile između skupine zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

U prvom dijelu Rasprave uspoređene su u istraživanju zabilježene vrijednosti koje opisuju endotelnu lipazu, strukturu i funkcionalnost HDL-a te funkciju stijenke krvne žile kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom s odgovarajućim vrijednostima koje su zabilježili drugi istraživači.

Zadatak drugog dijela istraživanja bio je utvrditi postojanje povezanosti između zabilježenih vrijednosti koje opisuju endotelnu lipazu, strukturu i funkcionalnost HDL-a te funkciju stijenke krvne žile kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

U drugom dijelu Rasprave analizirat ćemo zabilježene korelacije te ih usporediti s do sada poznatim patofiziološkim procesima te rezultatima drugih istraživača.

6.7.1. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a

U ovom je istraživanju zabilježena slaba negativna povezanost serumske koncentracije endotelne lipaze sa serumskom koncentracijom apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine (HDL3-apoA-II) samo u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom ($r=-0,25$; $p=0,047$). (Tablica 7, Slika 12) Ranije smo u Raspravi pokazali i podatak da, iako je broj čestica HDL-a svih podrazreda u jediničnom volumenu seruma bio značajno manji u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima, ispitanici s metaboličkim sindromom imali su značajno veći udio čestica HDL-a iz podrazreda 3 u ukupnom broju čestica HDL-a u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Odnos

endotelne lipaze i apolipoproteina A-II proučavali su Broedl i suradnici na mišjem modelu. Pokazali su da je ekspresija humane endotelne lipaze kod transgeničnih miševa bila povezana sa značajno većom redukcijom koncentracije apolipoproteina A-I u odnosu na apolipoprotein A-II. Dodatno, na modelu transgeničnih miševa koji su ekspimirali humane apoA-I i apoA-II, a u usporedbi s transgeničnim miševima koji su ekspimirali samo apoA-I, zabilježena je značajno manja aktivnost endotelne lipaze u serumu, sa značajno manje izraženom redukcijom plazmatske koncentracije fosfolipida, kolesterola i apoA-I u česticama HDL-a. Pri tome nije bilo značajne razlike u koncentraciji endotelne lipaze u serumu dviju skupina miševa nakon primjene heparina, što znači da bi apoA-II mogao imati funkciju inhibitora endotelne lipaze kod miševa.⁸⁵ Na osnovi rezultata ovog istraživanja nije moguće donositi zaključke o interakcijama endotelne lipaze i apoA-II kod ljudi na molekularnoj razini, ali oni mogu biti smjerokaz za formiranje hipoteze daljnjih molekularno-bioloških istraživanja. Dodatno, ovi rezultati mogu pridonijeti tumačenju izostanka korelacije koncentracije endotelne lipaze i sadržaja fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom, iako je opisana korelacija bila značajna u skupini zdravih ispitanika u ovom istraživanju.

6.7.2. Korelacije koncentracije endotelne lipaze i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a

Druga zabilježena statistički značajna korelacija bila je negativna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i sadržaja fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a (HDL-PL/HDL-apoA-I) samo u skupini zdravih ispitanika ($r=-0,25$; $p=0,041$). (Tablica 8, Slika 14) To je u skladu s nalazom istraživanja u kojem je *in vitro* dokazano da endotelna lipaza razlaže fosfatidilkolin u česticama HDL-a, pri čemu oslobađa zasićene i nezasićene masne kiseline.⁷⁷

Većina dosadašnjih istraživanja analizirala je samo serumsku koncentraciju fosfolipida u sastavu čestica HDL-a u uvjetima različitih koncentracija endotelne lipaze u serumu i također zabilježila njihov inverzan odnos kod miševa i kod ljudi.^{88,89} No, te se rezultate ne može poistovjetiti s korelacijom na razini sadržaja fosfolipida samih čestica HDL-a zabilježenom u ovom istraživanju jer je za promjene serumске koncentracije pojedinog lipida u sastavu čestica HDL-a važna i promjena broja istih čestica.

Jedno od mogućih objašnjenja izostanka odgovarajuće korelacije u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom je, već spomenuti, veći udio čestica podrazreda 3 u ukupnom broju čestica HDL-a u toj skupini ispitanika i pokazana negativna korelacija serumске koncentracije

apoA-II u sastavu čestica HDL-a tog podrazreda s koncentracijom endotelne lipaze. Osim endotelne lipaze, fosfolipide u česticama HDL-a mogu hidrolizirati i fosfolipaza A2 vezana na lipoproteine (engl. *lipoprotein-associated phospholipase A2*, LpPLA2), čija je koncentracija povećana kod bolesnika s metaboličkim sindromom,^{37,156} te LCAT, čija je koncentracija povećana u stanju pretilosti.^{37,40,133} Moguće je da je utjecaj endotelne lipaze na sadržaj fosfolipida u česticama HDL-a kod ispitanika s metaboličkim sindromom prikriven djelovanjem opisanih lipaza koje u ovom istraživanju nisu analizirane.

6.7.3. Korelacije koncentracije endotelne lipaze, pokazatelja funkcionalnosti HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije

Iako su vrijednosti pokazatelja funkcionalnosti (arilesterazna aktivnost PON1 i kapacitet za efluks kolesterola) apoBDS-a, kao analoga HDL-a, bile značajno manje u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima, u ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna korelacija koncentracije endotelne lipaze u serumu s varijablama koje opisuju funkcionalnost apoBDS-a ili čestica HDL-a u analiziranim skupinama ispitanika. (Tablica 9)

S obzirom da su na mišjem modelu opisali povećanu arilesteraznu aktivnost s HDL-om povezane PON1 pod utjecajem endotelne lipaze, Schilcher i suradnici su dodatno istražili odnose istih varijabli i kod zdravih ljudi, no pri tome nisu zabilježili statistički značajnu korelaciju koncentracije endotelne lipaze i arilesterazne aktivnosti s HDL-om povezane PON1.⁴⁶ Taj nalaz podupiru i rezultati ovoga istraživanja.

Do sada je *in vitro* i *in vivo* na miševima pokazano da endotelna lipaza povećava kapacitet HDL-a, odnosno seruma, za efluks kolesterola posredovan proteinom ABCA1,^{91,92} ali i da smanjuje efluks kolesterola posredovan proteinom SR-BI.⁹² Kod zdravih je ljudi primjenom monoklonskog protutijela koje neutralizira endotelnu lipazu zabilježeno značajno o dozi ovisno povećanje ukupnog kapaciteta apoBDS-a za efluks kolesterola, ali nije bilo značajne razlike u kapacitetu za efluks kolesterola koji je posredovan proteinom ABCA1 u odnosu na placebo.⁸⁹ To bi moglo upućivati na zaključak da je utjecaj endotelne lipaze na efluks kolesterola posredovan proteinom ABCA1 kod zdravih ljudi manje izražen nego u miševa. U svakom slučaju, suprotni učinci endotelne lipaze na kapacitet HDL-a za efluks kolesterola posredovan pojedinim proteinima mogu predstavljati objašnjenje činjenice da u ovom istraživanju nismo zabilježili značajnu korelaciju koncentracije endotelne lipaze u serumu s ukupnim kapacitetom čestica HDL-a za efluks kolesterola.

Iako je *in vitro* dokazano da endotelnom lipazom modificirane čestice HDL-a učinkovitije aktiviraju eNOS u usporedbi s kontrolnim česticama HDL-a,^{95,96} u ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna povezanost serumske koncentracije endotelne lipaze i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije stijenke brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. S obzirom da korelacija nije opisana niti u jednoj promatranoj skupini, njezin izostanak ne možemo objasniti patofiziološkim mehanizmima koji karakteriziraju metabolički sindrom. Postoji mogućnost da povezanost između ispitivanih varijabli nije zabilježena jer u organizmu čovjeka postoje drugi, dominantniji mehanizmi povećanja aktivnosti eNOS koji uopće nisu posredovani endotelnom lipazom i HDL-om ili su posredovani HDL-om kojeg učinkovitije remodeliraju drugi čimbenici u usporedbi s endotelnom lipazom. U tom bi slučaju, opisani mehanizam aktivacije eNOS posredovan endotelnom lipazom i HDL-om, iako postoji, mogao biti neprimijećen na razini rezultatne aktivacije eNOS i pokazatelja FMD i NMD.

U svim analiziranim slučajevima, u kojima smo testirali povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s pokazateljima funkcionalnosti HDL-a ili ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije stijenke brahijalne arterije, postoji i mogućnost da je izostanak statističke značajnosti uvjetovan i odabranom metodom kvantifikacije endotelne lipaze. Poznato je da je dio molekula endotelne lipaze izlučenih u krv preko heparan sulfatnih proteoglikana vezan na endotelne stanice stijenke krvne žile.⁷⁶ Iako Ishida i suradnici nisu zabilježili značajnu razliku u koncentraciji endotelne lipaze u serumu prije i nakon primjene heparina,¹⁵⁷ Badellino i suradnici su izmjerili približno 3 puta veći medijan koncentracije endotelne lipaze u serumu istih ispitanika nakon primjene heparina.¹⁰⁴ Ipak, autori oba istraživanja opisali su značajnu korelaciju vrijednosti koncentracija endotelne lipaze u serumu prije i nakon primjene heparina, zbog čega su čak i Badellino i suradnici za daljnja istraživanja kao ravnopravnu opciju predložili korištenje uzorka seruma bez prethodne primjene heparina.^{104,157} Dodatno, osim mjerenja koncentracije endotelne lipaze, postoji i mogućnost mjerenja njene aktivnosti.¹⁵⁸ To je važno s obzirom na postojanje varijanti i mutacija u genu koji kodira endotelnu lipazu, čiji protein može biti manje funkcionalan. Ipak, najčešća od 17 opisanih mutacija u genu koji kodira endotelnu lipazu, koja je potvrđena kod više od 30% ispitanika s povećanim koncentracijama HDL-a i 30% kontrolnih ispitanika u istraživanju deLemos i suradnika, kodira protein s normalnom lipaznom aktivnošću.^{159,160} Činjenica je da su mutacije i polimorfizmi gena koji kodira endotelnu lipazu prisutni u općoj

populaciji. Iako njihov učinak ne mora biti potpuni izostanak sinteze proteina niti potpuni gubitak njegove funkcije, postoji mogućnost da moduliraju korelacije koje smo proučavali.

6.7.4. Korelacije serumskih koncentracija sastavnica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije

U istraživanju smo utvrdili statistički značajnu pozitivnu korelaciju serumske koncentracije triglicerida u sastavu velikih čestica HDL-a (HDL1-TG) s varijablama FMD ($r=0,27$; $p=0,033$) i NMD ($r=0,28$; $p=0,038$) samo u skupini zdravih ispitanika. (Tablica 10, Slika 18)

S obzirom da je razina statističke značajnosti korelacije slična za varijablu FMD i NMD, možemo zaključiti da se učinak kojim trigliceridi u sastavu velikih čestica HDL-a pospješuju dilataciju brahijalne arterije temelji na mehanizmu koji dominantno uključuje njihovo djelovanje na glatke mišićne stanice stijenke krvne žile. Fiziološku osnovu ove korelacije na molekularnoj razini nismo uspjeli razjasniti niti je u analiziranoj literaturi pronađen podatak koji pokazuje slične odnose ili opisuje njihov uzrok. Potrebna su daljnja istraživanja radi objašnjenja važnosti ove korelacije.

Budući da se serumske koncentracije triglicerida u sastavu velikih čestica HDL-a nisu značajno razlikovale u skupinama zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom te da odgovarajuća korelacija njihove koncentracije s FMD i NMD nije zabilježena u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom, smatram da to nije uzrokovano značajnom razlikom u remodelaciji HDL-a u promatranim skupinama, nego negativnim učinkom patoloških čimbenika i procesa koji vladaju u metaboličkom sindromu na reaktivnost glatkih mišićnih stanica stijenke krvne žile.

Drukčije, iako ne u potpunosti usporedive, podatke daju Girona i suradnici. U njihovom istraživanju, provedenom na populaciji bolesnika s rizičnim čimbenicima za kardiovaskularne bolesti i metaboličkim sindromom, su značajno veću serumsku koncentraciju triglicerida u sastavu čestica HDL-a imali bolesnici s formiranim aterosklerotskim plakovima stijenke karotidnih arterija u odnosu na one koji nisu imali opisane aterosklerotske plakove. Dodatno, serumska koncentracija triglicerida u sastavu čestica HDL-a pozitivno je korelirala s aktivnošću proteina CETP (koji omogućuje prijenos estera kolesterola iz čestica HDL-a lipoproteinskim česticama koje sadrže apolipoprotein B u zamjenu za trigliceride^{37,42}). Iako analize nisu učinjene s osvrtom na veličinu čestica HDL-a, autori naglašavaju da najveću ulogu u opisanim razlikama imaju male čestice HDL-a bogate trigliceridima, koje nastaju

djelovanjem proteina CETP u uvjetima hipertrigliceridemije, pri čemu molekule triglicerida svojim volumenom iz jezgre narušavaju integritet površine čestice HDL-a. Povećana serumska koncentracija triglicerida u sastavu čestica HDL-a u tom se istraživanju percipirala kao rizični čimbenik za kardiovaskularne bolesti.¹⁶¹

6.7.5. Korelacije omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije

U skupini zdravih ispitanika u ovom istraživanju zabilježena je značajna negativna povezanost sadržaja kolesterola i fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera s varijablom FMD (HDL1-C/HDL1-apoA-I: $r=-0,30$; $p=0,015$; HDL1-PL/HDL1-apoA-I: $r=-0,26$; $p=0,037$). (Tablica 11, Slika 20)

S obzirom da odgovarajuća povezanost u skupini zdravih ispitanika nije opisana i s varijablom NMD, zaključak je da se zapravo radi o korelaciji sadržaja kolesterola i fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera s funkcijom endotelnih stanica stijenke krvne žile, bez značajnog utjecaja reaktivnosti glatkih mišićnih stanica stijenke krvne žile.

Patofiziološka osnova opisane korelacije mogla bi se temeljiti na činjenici da je razina hidrolize fosfolipida u sastavu čestice HDL-a razmjerna smanjenju veličine čestice.⁹⁰ Čestice HDL-a manjeg promjera *in vitro* su značajno manje sklone oksidaciji u usporedbi s velikim česticama HDL-a.⁸⁰ Robert i suradnici nisu utvrdili značajnu razliku u mogućnosti prolaska malih i velikih čestica HDL-a kroz sloj endotelnih stanica, kao početnom koraku reverznog transporta kolesterola.⁹³

Iako izravnim analizama povezanost serumske koncentracije endotelne lipaze s varijablom FMD u zdravih ispitanika nije bila statistički značajna, vidljiv je hipotetski trend negativne povezanosti koncentracije endotelne lipaze u serumu i sadržaja fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a te negativne povezanosti sadržaja fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera s varijablom FMD u skupini zdravih ispitanika. (Slika 22) Dodatno, iako u ovom istraživanju nije zabilježena značajna korelacija koncentracije endotelne lipaze u serumu sa sadržajem kolesterola u česticama HDL-a, *in vivo* je na mišjim modelima pokazano da endotelna lipaza pospješuje unos estera kolesterola u jetru preko SR-BI receptora te da smanjuje serumsku koncentraciju kolesterola u sastavu čestica HDL-a (HDL-C).^{82,87}

Izostanak odgovarajućih korelacija sadržaja fosfolipida i kolesterola u česticama HDL-a velikog promjera s varijablom FMD u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom mogao bi

biti uzrokovan inhibicijom eNOS posredovanom angiotenzinom II, citokinom TNF- α , česticama LDL-a ili hiperglikemijom;¹⁰ inaktivacijom već sintetiziranog NO slobodnim radikalima kisika;^{10,138} ili dominacijom vazokonstriktorskih čimbenika poput endotelina-1, čija je koncentracija negativno korelirala s varijablom FMD kod ispitanika s metaboličkim sindromom u istraživanju Samsamshariata i suradnika.¹⁵⁰

Pregledom literature nisu pronađena druga istraživanja koja su analizirala funkciju stijenke krvne žile u ovisnosti o lipidnom sadržaju čestica HDL-a u zdravlju i bolesti.

6.7.6. Korelacije pokazatelja funkcionalnosti HDL-a i pokazatelja funkcije brahijalne arterije

U ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna povezanost analiziranih pokazatelja funkcionalnosti HDL-a (arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1, kapacitet za efluks kolesterola) s ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije brahijalne arterije u skupini zdravih ispitanika niti u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom. (Tablica 12)

Jedna od u literaturi opisanih funkcija HDL-a je izravna aktivacija eNOS pomoću SR-BI i S1P₃ receptora u kaveolama endotelne stanice stijenke krvne žile,^{70,71} što uzrokuje povećanje proizvodnje NO i dilataciju krvne žile. Taj oblik funkcionalnosti HDL-a u ovom istraživanju nije analiziran.

S obzirom da je izravno određivanje antioksidativnog kapaciteta čestica HDL-a tehnički zahtjevno, mjerenje arilesterazne ili paraoksonazne aktivnosti s HDL-om povezane paraoksonaze 1 služi kao indirektni pokazatelj antioksidativnog kapaciteta HDL-a.¹⁶²

Molekularnu osnovu očekivane korelacije antioksidativnog kapaciteta HDL-a kvantificiranog aktivnošću s HDL-om povezane PON1 i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije opisali su Besler i suradnici. PON1 sprječava oksidaciju HDL-a, koji bi inače vezanjem na receptor za oksidirane lipoproteine na membrani endotelne stanice bio uključen u signalne puteve koji inhibiraju aktivaciju eNOS i produkciju NO.¹⁶³ Dodatno, PON1 sprječava i oksidaciju čestica LDL-a,⁴⁴ koje inače također smanjuju aktivaciju eNOS.⁶⁴

Slično rezultatima ovog istraživanja, niti Espinola-Zavaleta i suradnici nisu utvrdili značajnu povezanost arilesterazne aktivnosti PON1 u serumu i varijable FMD u promatranoj skupini ispitanika s Takayasuovim arteritisom.¹⁶⁴

Dostupno je više istraživanja koja su analizirala korelaciju paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i varijable FMD u različitim skupinama ispitanika, no niti ona nisu opisala statistički

značajnu korelaciju navedenih varijabli.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Ipak, potrebno je naglasiti da je paraoksonazna aktivnost PON1, za razliku od njene arilesterazne aktivnosti, značajno ovisna o populacijski učestalim varijacijama gena koji kodira PON1.^{169,170}

Uzevši u obzir da se arilesterazna i paraoksonazna aktivnost PON1 mogu značajno razlikovati u istom uzorku seruma ovisno o genotipu PON1, moguće je da niti antioksidativni kapacitet koji PON1 ostvaruje prema česticama LDL-a nije u potpunosti opisan samo arilesteraznom ili paraoksonaznom aktivnošću tog enzima. Štoviše, dokazano je da PON1 zadržava svoje antioksidativno djelovanje prema LDL-u i kada je njena arilesterazna aktivnost kemijski inhibirana.¹⁷¹ To je moguće objašnjenje izostanka povezanosti arilesterazne aktivnosti PON1 i ultrazvučnih pokazatelja funkcije stijenke krvne žile u ovom istraživanju i dostupnoj literaturi.

Za razliku od opisanih istraživanja drugih autora koji su koristili serum sa svim lipoproteinima koje sadrži, u ovom je istraživanju za analizu arilesterazne aktivnosti s HDL-om povezane PON1 korišten serum iz kojeg su odstranjeni lipoproteini koji sadrže apolipoprotein B. Iako su čestice HDL-a dominantni nositelj proteina PON1 u serumu, poznato je da je mali dio PON1 u serumu vezan i za čestice VLDL-a te hilomikrone.^{172,173}

Molekularnu osnovu očekivane korelacije kapaciteta HDL-a za efluks kolesterola i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije čini proteinom ABCG1 posredovan efluks kolesterola iz humanih endotelnih stanica, čije opterećenje kolesterolom inače povećava interakciju eNOS s proteinom kaveolinom 1, smanjuje aktivnost eNOS i smanjuje produkciju NO.¹⁷⁴

Ista skupina autora pokazala je na modelu miševa hranjenih namirnicama bogatim kolesterolom da postoji razlika u *o endotelu ovisnoj*-, ali ne i u *o egzogenom preparatu dušikova oksida ovisnoj relaksaciji* femoralne arterije miševa bez eksprimiranih proteina ABCA1 i ABCG1 u odnosu na miševe s eksprimiranim navedenim proteinima. To je objašnjeno smanjenom aktivacijom eNOS u jedinki bez eksprimiranog proteina ABCG1.¹⁷⁵

Vigna i suradnici opisali su značajnu pozitivnu povezanost kapaciteta apoBDS-a za efluks kolesterola posredovan proteinom ABCG1 s varijablom FMD kod ljudi, no nije bilo značajne povezanosti ukupnog kapaciteta apoBDS-a za efluks kolesterola ili kapaciteta apoBDS-a za efluks kolesterola posredovan drugim proteinima s varijablom FMD.¹⁷⁶ Ipak, Vazquez i suradnici pokazali su da je kapacitet seruma za efluks kolesterola posredovan proteinom ABCA1 značajno pozitivno povezan s varijablom FMD kod pretilih žena.¹⁷⁷

Činjenica da je u ovom istraživanju mjeren ukupni kapacitet HDL-a za efluks kolesterola, a ne kapacitet HDL-a za efluks kolesterola posredovan pojedinim proteinima, predstavlja moguće objašnjenje za izostanak očekivane korelacije te varijable s ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije.

6.7.7. Opisane korelacije - šira slika

Negativna korelacija koncentracije endotelne lipaze u serumu sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a, kao i negativne korelacije sadržaja fosfolipida i kolesterola u česticama HDL-a velikog promjera s varijablom FMD mogu se objasniti do sada poznatim biokemijskim procesima i molekularnim mehanizmima opisanim *in vitro*. Iako u ovom istraživanju nije pronađena izravna povezanost koncentracije endotelne lipaze s varijablom FMD, čestice HDL-a modificirane na način koji je povezan s endotelnom lipazom koreliraju i s varijablom FMD. Pri tome, iako izravna korelacija ne postoji, veća koncentracija endotelne lipaze postoji istovremeno s većom vrijednošću varijable FMD. Činjenica je da su navedene korelacije opisane samo u skupini zdravih ispitanika. Koncentracija endotelne lipaze u serumu u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom značajno negativno korelira sa serumskom koncentracijom apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine (HDL3-apoA-II), čiji je udio u ukupnom broju čestica HDL-a značajno veći u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Dodatno, *in vitro* je na mišjem modelu pokazano da bi apoA-II mogao imati funkciju inhibitora endotelne lipaze kod miševa,⁸⁵ no takav mehanistički zaključak nije moguće sa sigurnošću prenijeti i na ovo istraživanje s obzirom na organizaciju istraživanja i raspoložive statističke analize.

Prema rezultatima ovog istraživanja, endotelna lipaza ne predstavlja dominantan modifikator strukture i funkcije HDL-a u serumu bolesnika s metaboličkim sindromom.

Utjecaj endotelne lipaze na sadržaj fosfolipida u čestici HDL-a kod ispitanika s metaboličkim sindromom može biti prikriven djelovanjem drugih enzima s fosfolipaznom aktivnošću, poput LpPLA2, čija je koncentracija povećana kod bolesnika s metaboličkim sindromom,^{37,156} ili LCAT, čija je koncentracija povećana u stanju pretilosti.^{37,40,133}

Djelovanje proteina CETP moglo bi objasniti značajno manju serumsku koncentraciju kolesterola u sastavu čestica HDL-a (HDL-C: $p < 0,001$) i značajno manji sadržaj kolesterola u česticama HDL-a (HDL-C/HDL-apoA-I: $p < 0,001$) u bolesnika s pretilošću i metaboličkim sindromom. Taj protein, koji omogućuje prijenos estera kolesterola iz čestica HDL-a

lipoproteinskim česticama koje sadrže apolipoprotein B u zamjenu za trigliceride,^{37,42} u uvjetima povećane koncentracije triglicerida i posljedično povećane koncentracije čestica VLDL-a u serumu, uzrokuje osiromašenje čestica HDL-a kolesterolom, smanjenje njihovog promjera i njihovu intenzivniju razgradnju.¹⁶¹

Izostanak odgovarajućih korelacija sadržaja fosfolipida i kolesterola u česticama HDL-a s varijablom FMD u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom može biti uzrokovan inhibicijom eNOS posredovanom angiotenzinom II, citokinom TNF- α , česticama LDL-a ili hiperglikemijom;¹⁰ inaktivacijom već sintetiziranog NO slobodnim radikalima kisika;^{10,138} ili dominacijom vazokonstriktorskih čimbenika poput endotelina-1.¹⁵⁰

Analize otežava i činjenica da mehanizmom dilatacije krvne žile, osim NO, i u fiziološkim uvjetima u manjoj mjeri upravljaju i drugi vazoaktivni mehanizmi. Poznato je da se oko 70% intenziteta vazodilatacije koju opisuje varijabla FMD može objasniti učinkom sintetiziranog NO,²⁶ a na mišjem je modelu zabilježena djelomična dilatacija arteriola miševa s inaktiviranim genom koji kodira eNOS kao odgovor na smično naprezanje stijenke arteriole.¹⁷⁸

Moguće je zaključiti da su molekule i procesi koji u organizmu modificiraju sastav i funkcionalnost HDL-a, kao i tonus stijenke krvne žile, redundantni. Složenost sustava dodatno se ogleda u činjenici da su u različitim fiziološkim i patofiziološkim uvjetima pojedini mehanizmi regulacije dominantni i nadjačavaju utjecaj preostalih mehanizama, iako se oni moguće i dalje odvijaju. Ta činjenica ističe važnost međusobnog nadopunjavanja rezultata istraživanja učinjenih *in vitro*, *in vivo* na laboratorijskim životinjama u kontroliranim uvjetima te kliničkih istraživanja kod ljudi, gdje je promatrani proces inkorporiran u biološki sustav u zdravlju ili bolesti.

6.8. Ograničenja istraživanja

Iako je prije istraživanja provedena procjena potrebne veličine uzorka pomoću u literaturi dostupnih koncentracija endotelne lipaze, HDL-C i veličine varijable FMD kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom; dobivene procjene potrebne veličine uzorka su realizirane i zabilježene su statistički značajne razlike u varijablama koje su analizirane tijekom procjene veličine uzorka između promatranih skupina; moguće je da bi veći broj ispitanika otkrio i dodatne korelacije karakteristika pojedinih podrazreda čestica HDL-a ili pojedinih pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a s analiziranim varijablama.

Za sve su ispitanike prije uključivanja u istraživanje i razvrstavanja u skupine analizirani anamnestički podaci, podaci iz povijesti bolesti, podaci dobiveni kliničkim pregledom te standardni laboratorijski biokemijski pokazatelji. Organizacija istraživanja nije uključivala isključivanje postojanja aterosklerotskih promjena stijenke krvnih žila invazivnim angiografskim metodama. Moguće je, s obzirom na njihovu prosječnu dob, da je manji broj ispitanika koji su klasificirani kao zdravi, imao aterosklerotske promjene stijenke krvnih žila bez postojanja kriterija koji karakteriziraju metabolički sindrom i bez kliničkih manifestacija ishemijske bolesti srca ili udova.

Organizacija istraživanja i korištene istraživačke metode nisu omogućavale zaključivanje o uzročno-posljedičnim vezama između promatranih pokazatelja, nego samo analizu njihove povezanosti. Također, nisu moguća mehanistička tumačenja dobivenih rezultata na molekularnoj razini, nego samo usporedba rezultata s do sada poznatim činjenicama iz istraživanja učinjenih *in vitro*. Pojedini zabilježeni rezultati, kakvi do sada nisu opisani u dostupnoj literaturi, predstavljaju početnu točku za daljnja bazična, laboratorijska istraživanja.

Iako korištene molekularne i biokemijske metode predstavljaju zlatni standard i najbolji izbor među do sada poznatim postupcima u analizi pojedinih laboratorijskih pokazatelja, rezultati donose i nova pitanja za daljnja istraživanja, poput mjerenja aktivnosti endotelne lipaze umjesto njene koncentracije u serumu ili drugih metoda procjene antioksidativnog kapaciteta HDL-a. S obzirom da primijenjena metoda klasifikacije čestica HDL-a i analize njihovog sastava NMR-om ne pruža izravnu informaciju o broju čestica HDL-a u jediničnom volumenu seruma, varijabla HDL-apoA-I je korištena za približnu procjenu koncentracije čestica HDL-a, što je ranije primijenjeno i u istraživanjima drugih autora.

7. ZAKLJUČCI

Ispitanici s metaboličkim sindromom imaju značajno veću koncentraciju endotelne lipaze u serumu u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p=0,002$).

Ispitanici s metaboličkim sindromom imaju značajno manju koncentraciju čestica HDL-a u serumu u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p<0,001$). Istovremeno, serumska je koncentracija kolesterola i fosfolipida u sastavu čestica HDL-a značajno manja ($p<0,001$ za obje varijable), a serumska koncentracija triglicerida u sastavu čestica HDL-a značajno veća ($p=0,006$) kod ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Analizom lipidnog sastava prosječnih čestica HDL-a, utvrđeno je da u ispitanika s metaboličkim sindromom one imaju značajno manji sadržaj kolesterola ($p<0,001$) i fosfolipida ($p=0,002$) te značajno veći sadržaj triglicerida ($p<0,001$) u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Ariesterazna aktivnost paraoksonaze 1 i kapacitet za efluks kolesterola seruma koji ne sadrži apolipoprotein B su značajno manji kod ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravim ispitanicima (AE: $p=0,030$; CEC: $p<0,001$), što je odraz isključivo manjeg broja čestica HDL-a u jediničnom volumenu seruma, a ne lošije funkcionalnosti čestica HDL-a ispitanika s metaboličkim sindromom.

Postotak dilatacije brahijalnih arterija ispitanika s metaboličkim sindromom nakon kompresije manžetom (FMD) i nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) je značajno manji u usporedbi sa zdravim ispitanicima (FMD: $p=0,013$; NMD: $p=0,033$).

7.1. Korelacije u skupini zdravih ispitanika

- (a) Koncentracija endotelne lipaze u serumu negativno korelira sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a ($r=-0,25$; $p=0,041$).
- (b) Nije utvrđena statistički značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i analiziranih pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a.
- (c) Nije utvrđena izravna statistički značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i analiziranih ultrazvučnih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).
- (d) Serumska koncentracija triglicerida u sastavu velikih čestica HDL-a pozitivno korelira s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD: $r=0,27$;

$p=0,033$) i nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD: $r=0,28$; $p=0,038$). Sadržaj kolesterola i fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera negativno korelira s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) (HDL1-C/HDL1-apoA-I: $r=-0,30$; $p=0,015$; HDL1-PL/HDL1-apoA-I: $r=-0,26$; $p=0,037$).

(e) Nije utvrđena statistički značajna povezanost pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a s analiziranim ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD).

7.2. Korelacije u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom

(a) Koncentracija endotelne lipaze u serumu negativno korelira sa serumskom koncentracijom apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine ($r=-0,25$; $p=0,047$), ali ne i s pokazateljima lipidnog sadržaja samih čestica HDL-a.

(b) Nije utvrđena statistički značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i analiziranih pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a.

(c) Nije utvrđena statistički značajna povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu i analiziranih ultrazvučnih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

(d) Nije utvrđena statistički značajna povezanost serumskih koncentracija sastavnica HDL-a niti pokazatelja lipidnog sadržaja čestica HDL-a s analiziranim ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD).

(e) Nije utvrđena statistički značajna povezanost pokazatelja funkcionalnosti čestica HDL-a s analiziranim ultrazvučnim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD, NMD).

Zaključno, koncentracija endotelne lipaze u serumu korelira s lipidnim sadržajem čestica HDL-a ispitanika niskog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Dodatno, lipidni sadržaj čestica HDL-a, modificiran na način koji korelira s EL, povezan je i sa stupnjem *o endotelu ovisne dilatacije* brahijalne arterije (FMD) iste skupine ispitanika. Pri tome, iako izravna korelacija ne postoji, veća koncentracija endotelne lipaze u serumu postoji istovremeno s većom vrijednošću varijable FMD. U skupini ispitanika s metaboličkim sindromom, čiji je rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti veći, endotelna lipaza ne predstavlja značajan modifikator strukture i funkcije čestica HDL-a, kao ni funkcije brahijalne arterije.

Radi procjene kliničke vrijednosti mjerenja koncentracije endotelne lipaze u serumu za prepoznavanje ljudi s nepogodnijim lipidnim profilom čestica HDL-a i lošijom *o endotelu ovisnom funkcijom* brahijalne arterije, koji prema sada važećim klasifikacijama pripadaju u populaciju niskog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, potrebno je provesti prospektivno istraživanje s praćenjem razvoja akutnih kardiovaskularnih događaja u budućnosti u opisanoj populaciji.

8. KRATKI SADRŽAJ

Iva Klobučar: Povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s funkcionalnošću HDL čestica i endotelnom disfunkcijom u bolesnika s metaboličkim sindromom, 2023.

Cilj istraživanja bio je opisati povezanost koncentracije endotelne lipaze u serumu s koncentracijom, sastavom i funkcionalnošću čestica HDL-a te ultrazvučnim pokazateljima funkcije stijenke krvne žile (FMD, NMD) u zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

U istraživanje je uključeno ukupno 130 ispitanika (65 zdravih i 65 ispitanika s metaboličkim sindromom), prosječne dobi 56 godina (50,0; 60,0), s udjelom žena od 47,7% u svakoj skupini. Koncentracija endotelne lipaze bila je značajno veća; a koncentracija čestica HDL-a, sadržaj fosfolipida i kolesterola prosječnih čestica HDL-a, vrijednosti pokazatelja funkcionalnosti HDL-a te vrijednosti varijabli FMD i NMD bile su značajno manje u ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi sa zdravima. Unatoč tome, nije pronađena značajna povezanost opisanih varijabli u ispitanika s metaboličkim sindromom. Ipak, u zdravih ispitanika, koncentracija endotelne lipaze je negativno korelirala sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a, a sadržaj fosfolipida i kolesterola u česticama HDL-a velikog promjera negativno je korelirao s varijablom FMD. Dodatno, serumska je koncentracija triglicerida u sastavu velikih čestica HDL-a pozitivno korelirala s varijablama FMD i NMD u zdravih ispitanika.

Zaključno, endotelna lipaza ne predstavlja dominantan modifikator koncentracije, sastava ili funkcionalnosti čestica HDL-a, kao ni funkcije endotela stijenke krvne žile u uvjetima metaboličkog sindroma. Ipak, u skupini ispitanika nižeg rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, koji nemaju metabolički sindrom i još uvijek ih smatramo zdravima, koncentracija endotelne lipaze povezana je sa sastavom čestica HDL-a, a sastav čestica HDL-a sličan onome povezanom s koncentracijom endotelne lipaze korelira i s varijablom FMD. Unatoč tome, izravna povezanost koncentracije endotelne lipaze i pokazatelja funkcije endotela stijenke krvne žile nije opisana niti u zdravih ispitanika.

Ključne riječi: endotelna lipaza, HDL, FMD, endotelna disfunkcija, metabolički sindrom

9. SUMMARY

Iva Klobučar: Association of endothelial lipase serum levels with functional characteristics of HDL particles and endothelial dysfunction in patients with metabolic syndrome, 2023

The aim of the present study was to determine the associations of endothelial lipase serum levels (EL) with the serum levels, contents and functional characteristics of HDL particles, as well as with the ultrasonographic indicators of blood vessel wall endothelial dysfunction (FMD, NMD) in healthy volunteers (H) and metabolic syndrome patients (MS).

A total of 130 subjects were enrolled in the study (65 H and 65 MS), with a median age of 56 (50.0; 60.0) years and 47.7% of women in each group. EL was significantly higher; while serum levels of HDL particles, their average phospholipid- and cholesterol contents, functional characteristics of HDL, as well as FMD and NMD were significantly lower in MS compared to H. Despite the observed differences, no significant associations of these variables were found in MS. However, in H, EL correlated negatively with the phospholipid content of average HDL particles. Additionally, the phospholipid- and cholesterol contents of the big HDL particles correlated negatively with FMD. Concomitantly, the serum levels of HDL triglycerides were significantly positively associated with FMD and NMD in H.

In conclusion, EL is not a dominant modifier of serum levels of HDL particles, their content or function, nor of the blood vessel wall endothelial function in MS. However, among participants with low cardiovascular risk who are still considered healthy, EL correlates with the HDL particle content; and the HDL particle content, which is similar to the HDL particle content associated with EL, correlates with FMD as well. Still, no significant direct associations of EL with the indicators of blood vessel wall endothelial function were found in H.

Keywords: endothelial lipase, high-density lipoprotein, flow-mediated dilation, endothelial dysfunction, metabolic syndrome

10. POPIS LITERATURE

1. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, i sur. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390:1151-1210.
2. Ahmad FB, Anderson RN. The Leading Causes of Death in the US for 2020. *JAMA*. 2021;325(18):1829-1830.
3. Erceg M, Miler Knežević A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2020. godini [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Služba za epidemiologiju i prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti; 2021. [pristupljeno 06.02.2023.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/izvjesce-o-umrlim-osobama-u-hrvatskoj-u-2020-godini/>
4. SCImago, (n.d.). SJR - SCImago Journal & Country Rank, Viz Tools, Subject Bubble Chart [Internet]. [pristupljeno 06.02.2023.]. Dostupno na: <https://www.scimagojr.com>
5. Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(suppl III):27-32.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
7. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann. Rev. Physiol*. 1986;48:307-320.
8. Vane JR, Änggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Eng J Med*. 1990;323(1):27-36.
9. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147(suppl I):193-201.
10. Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*. 2016;119:375-396.
11. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:e108-e114.

12. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989;38(11):1709-1715.
13. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol.* 2009;196:193-222.
14. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 2017;219:22-96.
15. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):208-219.
16. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120:713-735.
17. Natali A, Ferrannini E. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55(6):1559-1563.
18. Jia G, Sowers JR. Endothelial Dysfunction Potentially Interacts With Impaired Glucose Metabolism to Increase Cardiovascular Risk. *Hypertension.* 2014;64:1192-1193.
19. Fornoni A, Raij L. Metabolic Syndrome and Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2005;7(2):88-95.
20. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis, Mikhailidis DP. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(2):140-146.
21. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011;18(6):775-789.
22. Poredos P, Jezovnik MK. Testing Endothelial Function and its Clinical Relevance. *J. Atheroscler Thromb.* 2013;20:1-8.
23. Anderson EA, Mark AL. Flow-Mediated and Reflex Changes in Large Peripheral Artery Tone in Humans. *Circulation.* 1989;79(1):93-100.

24. Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol*. 1990;258:H1004-H1011.
25. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, *i sur*. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-1115.
26. Corretti MC, Anderson TS, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, *i sur*. Guidelines for Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of Brachial Artery: A Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *JACC*. 2002;39(2):257-65.
27. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, *i sur*. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(1):H2-12.
28. Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, deKoning EJP. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurements on the FMD response. *Eur Heart J*. 2005;26(4):363-368.
29. Greyling A, van Mil AC, Zock PL, Green DJ, Ghiadoni L, Thijssen DH, *i sur*. (TIFN International Working Group on Flow Mediated Dilation). Adherence to guidelines strongly improves reproducibility of brachial artery flow-mediated dilation. *Atherosclerosis*. 2016;248:196-202.
30. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;331(6152):168-170.
31. Cooke JP, Rossitch E Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow Activates an Endothelial Potassium Channel to Release and Endogenous Nitrovasodilator. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1663-1671.
32. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR, Saito T, Miura M, *i sur*. Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles: Important Role of Ca^{2+} -Activated K^+ Channels. *Circulation*. 2001;103(15):1992-1998.

33. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circ Res.* 1996;79(5):984-991.
34. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-605.
35. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation: A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool? *Chest.* 2005;127:2254-2263.
36. Favre J, Vessieres E, Guihot AL, Grimaud L, Proux C, Loufrani L, i sur. Early inactivation of membrane estrogen receptor alpha (Er α) recapitulates the endothelial dysfunction of aged mouse resistance arteries. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2862.
37. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224.* London: Springer Open; 2015. Str. 3-51.
38. Rohatgi A, Westerterp M, von Eckardstein A, Remaley A. HDL in the 21st century. *Circulation.* 2021;143:2293-2309.
39. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res.* 2013;54(10):2575-2585.
40. Gorshkova IN, Mei X, Atkinson D. Arginine 123 of apolipoprotein A-I is essential for lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res.* 2018;59(2):348-356.
41. Duriez, P, Fruchart JC. High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin Chim Acta.* 1999;286(1-2):97-114.
42. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, i sur. HDL Biogenesis, Remodeling, and Catabolism. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224.* London: Springer Open; 2015. Str. 53-111.

43. Jakubowski H. Calcium-dependent Human Serum Homocysteine Thiolactone Hydrolase. *J Biol Chem.* 2000;275(6):3957-3962.
44. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):129-135.
45. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Bio.* 2001;21(4):473-480.
46. Schilcher I, Stadler JT, Leichleitner M, Hrzenjak A, Berghold A, Pregartner G, i sur. Endothelial Lipase Modulates Paraoxonase 1 Content and Arylesterase Activity of HDL. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):719.
47. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FLPC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2009;50(3):574-585.
48. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem.* 2000;275(42):33053-33058.
49. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, i sur. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21(4):424-428.
50. Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, i sur. Cloning of a Unique Lipase from Endothelial Cells Extends the Lipase Gene Family. *J Biol Chem.* 1999;274(20):14170-14175.
51. Knapp M, Górski J. Endothelial lipase: regulation and biological function. *J Physiol Phramacol.* 2022;73(3):329-336.
52. Illingworth DR. Lipoprotein metabolism. *Am J Kidney Dis.* 1993;22(1):90-97.
53. Krieger M. Charting the Fate of the “Good Cholesterol”: Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:523-558.

54. Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(5):473-481.
55. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(26):9774-9779.
56. Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high-density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem.* 2005;280(34):30150-30157.
57. Favari E, Chroni A, Tietge UJF, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224.* London: Springer Open; 2015. Str. 181-199.
58. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, i sur. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature.* 2003;421(6918):75-79.
59. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, i sur. The intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* 1999;5(6):656-661.
60. Riwanto M, Rohrer L, von Eckardstein A, Landmesser U. Dysfunctional HDL: From Structure-Function-Relationships to Biomarkers. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224.* London: Springer Open; 2015. Str. 337-366.
61. Annema W, von Eckardstein A, Kovanen PT. HDL and Atherothrombotic Vascular Disease. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224.* London: Springer Open; 2015. Str. 369-403.
62. Rye KA, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J. Lipid Res.* 2014;55(2):168-179.

63. Karlsson H, Kontush A, James RW. Functionality of HDL: Antioxidation and Detoxifying Effects. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, Handbook of Experimental Pharmacology 224. London: Springer Open; 2015. Str. 207-228.
64. Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase Localization and Activation in Caveole. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11278-11283.
65. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, i sur. Monocyte Transmigration Induced by Modification of Low Density Lipoprotein in Cocultures of Human Aortic Wall Cells is due to Induction of Monocyte Chemotactic Protein 1 Synthesis an is Abolished by High Density Lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991;88(6):2039-2046.
66. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-Density Lipoproteins Inhibit Cytokine-Induced Expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1987-1994.
67. McGrath KCY, Li XH, Puranik R, Liong EC, Tan JTM, Dy VM, i sur. Role of 3β -Hydroxysteroid- Δ 24 Reductase in Mediating Antiinflammatory Effects of High-Density Lipoproteins in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:877-882.
68. Wu BJ, Chen K, Shrestha S, Ong KL, Barter PJ, Rye KA. High-Density Lipoproteins Inhibit Vascular Endothelial Inflammation by Increasing β -Hydroxysteroid- Δ 24 Reductase Expression and Inducing Heme Oxygenase-1. *Circ Res.* 2013;112(2):278-288.
69. Mineo C, Shaul PW. Novel Biological Functions of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Circ Res.* 2012;111:1079-1090.
70. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, i sur. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001;7(7):853-857.
71. Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, i sur. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P₃. *J Clin Invest.* 2004;113(4):569-581.

72. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais D, Maugeais C, Glick JM, i sur. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res.* 2002;43(6):921-929.
73. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(5):2748-2753.
74. Azumi H, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Rikitake Y, Takeuchi S, i sur. Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 2003;58(3):647-654.
75. Trbušić M, Riederer M, Vučić M, Lovričević I, Krušlin B, Gauster M, i sur. Increased expression of endothelial lipase in symptomatic and unstable carotid plaques. *J Neurol.* 2012;259(3):448-456.
76. Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the Role of Endothelial Lipase in High-Density Lipoprotein Metabolism, Reverse Cholesterol Transport, and Atherosclerosis. *Circ J.* 2010;74(11):2263-2270.
77. Gauster M, Rechberger G, Sovic A, Hörl G, Steyrer E, Sattler W, i sur. Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J Lipid Res.* 2005;46(7):1517-1525.
78. Khetrapal SA, Vitali C, Levin MG, Klarin D, Park J, Pamapana A, i sur. Endothelial lipase mediates efficient lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *PloS Genet.* 2021;17(9):e1009802.
79. Yang P, Belikova NA, Billheimer J, Rader DJ, Hill JS, Subbaiah PV. Inhibition of Endothelial Lipase Activity by Sphingomyelin in the Lipoproteins. *Lipids.* 2014;49(10):987-996.
80. Schilcher I, Ledinski G, Radulović S, Hallström S, Eichmann T, Madl T, i sur. Endothelial lipase increases antioxidative capacity of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864(10):1363-1374.
81. Strauss JG, Zimmermann R, Hrzenjak A, Zhou Y, Kratky D, Levak-Frank S, i sur. Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein

(HDL) particles and selective uptake of HDL associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *Biochem J.* 2002;368:69-79.

82. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJF. Scavenger Receptor BI-mediated Selective Uptake is Required for the Remodeling of High Density Lipoprotein by Endothelial Lipase. *J Biol Chem.* 2009;284(10):6093-6100.

83. Kojima Y, Hirata K, Ishida T, Shimokawa Y, Inoue N, Kawashima S, i sur. Endothelial Lipase Modulates Monocyte Adhesion to the Vessel Wall. A Potential Role in Inflammation. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54032-54038.

84. Jin W, Wang X, Millar JS, Quertermous T, Rothblat GH, Glick JM, i sur. Hepatic Proprotein Convertases Modulate HDL Metabolism. *Cell Metab.* 2007;6(2):129-136.

85. Broedl UC, Jin W, Fuki IV, Millar JS, Rader DJ. Endothelial lipase is less effective at influencing HDL metabolism in vivo in mice expressing apoA-II. *J Lipid Res.* 2006;47(10):2191-2197.

86. Gauster M, Hrzenjak A, Schick K, Frank S. Endothelial lipase is inactivated upon cleavage by the members of the proprotein convertase family. *J Lipid Res.* 2005;46:977-987.

87. Maugeais C, Tietge UJF, Broedl UC, Marchadier D, Cain W, McCoy MG, i sur. Dose-Dependent Acceleration of High-Density Lipoprotein Catabolism by Endothelial Lipase. *Circulation.* 2003;108(17):2121-2126.

88. Singaraja RR, Sivapalaratnam S, Hovingh K, Dubé MP, Castro-Perez J, Collins HL, i sur. The impact of partial and complete loss-of-function mutations in endothelial lipase on high-density lipoprotein levels and functionality in humans. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(1):54-62.

89. Le Lay JE, Du Q, Mehta MB, Bhagroo N, Hummer T, Falloon J, i sur. Blocking endothelial lipase with monoclonal antibody MEDI5884 durably increases high density lipoprotein in nonhuman primates and in a phase 1 trial. *Sci Transl Med.* 2021;13(590):eabb0602.

90. Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2005;46(5):896-903.

91. Qiu G, Hill JS. Endothelial Lipase Promotes Apolipoprotein AI-Mediated Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(1):84-91.
92. Yancey PG, Kawashiri M, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, et al. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004;45(2):337-346.
93. Robert J, Lehner M, Frank S, Perisa D, von Eckerdstein A, Rohrer L. Interleukin 6 Stimulates Endothelial Binding and Transport of High-Density Lipoprotein Through Induction of Endothelial Lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(12):2699-2706.
94. Schilcher I, Kern S, Hrzenjak A, Eichmann TO, Stojakovic T, Scharnagl H, et al. Impact of Endothelial Lipase on Cholesterol Efflux Capacity of Serum and High-Density Lipoprotein. *Sci Rep.* 2017;7(1):12485.
95. Radulović S, Gottschalk B, Hörl G, Zaradoya-Languardia P, Schilcher I, Hallström S, et al. Endothelial lipase increases eNOS activating capacity of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(4):158612.
96. Tatematsu S, Francis SA, Natarajan P, Rader DJ, Saghatelian A, Brown JD, et al. Endothelial Lipase Is a Critical Determinant of High-Density Lipoprotein-Stimulated Sphingosine 1-Phosphate-Dependent Signaling in Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):1788-1794.
97. Ahmed W, Orasanu G, Nehra V, Asatryan L, Rader DJ, Ziouzenkova O, et al. High-Density Lipoprotein Hydrolysis by Endothelial Lipase Activates PPAR α : A Candidate Mechanism for High-Density Lipoprotein-Mediated Repression of Leukocyte Adhesion. *Circ Res.* 2006;98(4):490-498.
98. Yasuda T, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, et al. Endothelial Lipase is Increased by Inflammation and Promotes LDL Uptake in Macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 2007;14(4):192-201.
99. Qiu G, Hill JS. Endothelial lipase enhances low density lipoprotein binding and cell association in THP-1 macrophages. *Cardiovasc Res.* 2007;76(3):528-538.
100. Hirata K, Ishida T, Matsushita H, Tsao PS, Quertermous T. Regulated Expression of Endothelial Cell-Derived Lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(1):90-93.

101. Shimokawa Y, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Inoue N, Quertermous T, i sur. Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2005;66(3):594-600.
102. Qiu G, Hill JS. Atorvastatin decreases lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2112-2122.
103. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Tchernof A, Richard C, Luu-The V, i sur. Visceral Adiposity and Endothelial Lipase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3538-3543.
104. Badellino KO, Wolfe MK, Reilly P, Rader DJ. Endothelial Lipase Concentrations Are Increased in Metabolic Syndrome and Associated with Coronary Atherosclerosis. *PloS Med.* 2006;3(2):e22.
105. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2409-2415.
106. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-850.
107. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Deshaies Y, Couture P, Archer WR, i sur. Endothelial lipase is associated with inflammation in humans. *J Lipid Res.* 2006;47(12):2808-2813.
108. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial Lipase Is Increased In Vivo by Inflammation in Humans. *Circulation.* 2008;117(5):678-685.
109. Shiu SWM, Tan KCB, Huang Y, Wong Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis.* 2008;198(2):441-447.
110. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Insulin-induced Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor and Its Substrates. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26055-26058.
111. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(11):4854-4858.

112. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1835.
113. Lamarche B, Paradis ME. Endothelial lipase and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(3):298-303.
114. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-1645.
115. Zambon A, Pauletto O, Crepaldi G. Review article: the metabolic syndrome - a chronic cardiovascular inflammatory condition. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:20-23.
116. Motillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirer P, et al. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(14):1113-1132.
117. Hirode G, Wong RJ. Trends in the Prevalence of Metabolic Syndrome in the United States, 2011-2016. *JAMA.* 2020;323(24):2526-2528.
118. Ivezić-Lalić D, Bergman Marković B, Kranjčević K, Kern J, Vrdoljak D, Vučak J. Diversity of metabolic syndrome criteria in association with cardiovascular diseases - a family medicine-based investigation. *Med Sci Monit.* 2013;19:571-578.
119. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Integrated Addendum to ICH E6(R1): guideline for good clinical practice E6(R2). Geneva (Switzerland): ICH; 2016.
120. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013;310:2191-2194.
121. Coolbaugh CL, Bush EC, Caskey CF, Damon BM, Towse TF. FloWave.US: validated, open-source, and flexible software for ultrasound blood flow analysis. *J Appl Physiol.* 2016;121:849-57.

122. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem*. 1990;36(1):15–19.
123. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604–612.
124. Mackey RH, Greenland P, Goff DC Jr, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Particle Concentrations, Carotid Atherosclerosis, and Coronary Events. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(6):508-516.
125. Qi Y, Fan J, Liu J, Wang W, Wang M, Sun J, et al. Cholesterol-Overloaded HDL Particles Are Independently Associated With Progression of Carotid Atherosclerosis in a Cardiovascular Disease-Free Population. 2015;65(4):355-363.
126. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1618-1624.
127. Khera AV, Cuhel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N Eng J Med*. 2011;364(2):127-135.
128. Marsche G, Zelzer S, Meinitzer A, Kern S, Meissl S, Pregartner G, et al. Adiponectin Predicts High-Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity in Adults Irrespective of Body Mass Index and Fat Distribution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(11):4117-4123.
129. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Vizioli L, Muscari A. The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *J Cardiol*. 2012;59(3):235-242.
130. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(7):1126-1167.
131. Abbott RD, Wilson WF, Kannel WB, Castelli WP. High Density Lipoprotein Cholesterol, Total Cholesterol Screening, and Myocardial Infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis*. 1988;8(3):207-211.

132. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney J, Miller E, i sur. Comparison of the Efficacy and Safety of Rosuvastatin Versus Atorvastatin, Simvastatin, and Pravastatin Across Doses (STELLAR Trial). *Am J Cardiol.* 2003;92(2):152-160.
133. Stadler J, Lackner S, Mörkl S, Trakaki A, Schnargl H, Borenich A, i sur. Obesity Affects HDL Metabolism, Composition and Subclass Distribution. *Biomedicines.* 2021;9(3):242.
134. Lagos KG, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Gazi IF, Rizos C, Tselepis AD, i sur. Alterations in the High Density Lipoprotein Phenotype and HDL-Associated Enzymes in Subjects with Metabolic Syndrome. *Lipids.* 2009;44(1):9-16.
135. Denimal D, Monier S, Brindisi MC, Petit JM, Bouillet B, Nguyen A, i sur. Impairment of the Ability of HDL From Patients With Metabolic Syndrome but Without Diabetes Mellitus to Activate eNOS: Correction by S1P Enrichment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(5):804-811.
136. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, i sur. Metabolic Syndrome Is Associated with Elevated Oxidative Stress and Dysfunctional Dense High-Density Lipoprotein Particles Displaying Impaired Antioxidative Activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):4963-71.
137. Black MA, Cable NT, Thijssen DHJ, Green DJ. Importance of Measuring the Time Course of Flow-Mediated Dilatation in Humans. *Hypertension.* 2008;51(2):203-210.
138. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, i sur. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-1761.
139. Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, Kardasz I, Huang Y, Taddei S, i sur. Different Effect of Antihypertensive Drugs on Conduit Artery Endothelial Function. *Hypertension.* 2003;41(6):1281-1286.
140. Pasini AF, Garbin U, Nava MC, Stranieri C, Pellegrini M, Bocciolett V, i sur. Effect of Sulfhydryl and non-Sulfhydryl Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Endothelial Function in Essential Hypertensive Patients. *Am J Hypertens.* 2007;20(4):443-450.

141. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Kim SJ, Koh Y, et al. Distinct vascular and metabolic effects of different classes of anti-hypertensive drugs. *Int J Cardiol.* 2010;140(1):73-81.
142. Si D, He Y, Yang C, Ni L, Li B, Ding M, et al. The Effects of Amlodipine and S(-)-Amlodipine on Vascular Endothelial Function in Patients With Hypertension. *Am J Hypertens.* 2014;27(1):27-31.
143. Peller M, Ozierański K, Balsam P, Grabowski M, Filipiak K, Opolski G. Influence of beta-blockers on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cardiol J.* 2015;22(6):708-716.
144. Rossi R, Nuzzo An, Iaccarino D, Lattanzi A, Origliani G, Monopoli DE, et al. Effects of antihypertensive treatment on endothelial function in postmenopausal hypertensive women. A significant role of aldosterone inhibition. *J Renin Angiotensin Syst.* 2011;12(4):446-455.
145. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Protogerou A, Piperi C, Papamichael C, Aessopos A, et al. Metformin administration improves endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(5):749-756.
146. Romualdi D, Costatini B, Selvaggi L, Giuliani M, Cristello F, Macri F, et al. Metformin improves endothelial function in normoinsulinemic PCOS patients: a new prospective. *Hum Reprod.* 2008;23(9):2127-2133.
147. Alonso R, Mata P, De Andres R, Villacastin BP, Martínez-González J, Badimon L. Sustained long-term improvement of arterial endothelial function in heterozygous familial hypercholesterolemia patients treated with simvastatin. *Atherosclerosis.* 2001;157(2):423-429.
148. Agewall S, Hernberg Å. Atorvastatin normalizes endothelial function in healthy smokers. *Clin Sci (Lond).* 2006;111(1):87-91.
149. Ghiadoni L, Penno G, Giannarelli C, Platina Y, Bernardini M, Pucci L, et al. Metabolic Syndrome and Vascular Alterations in Normotensive Subjects at Risk of Diabetes Mellitus. *Hypertension.* 2008;51(2):440-445.
150. Samsamshariat SZA, Sakhaei F, Salehizadeh L, Keshvari M, Asgary S. Relationship between Resistin, Endothelin-1, and Flow-Mediated Dilation in Patient with and without Metabolic Syndrome. *Adv Biomed Res.* 2019;8:16.

151. Sprung VS, Bowden Davies KA, Norman JA, Thompson A, Mitchell KL, Wilding JPH, i sur. Metabolic syndrome is associated with reduced flow mediated dilation independent of obesity status. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(2):211-220.
152. Suzuki T, Hirata K, Elkind MSV, Jin Z, Rundek T, Miyake Y, i sur. Metabolic Syndrome, Endothelial Dysfunction, and Risk of Cardiovascular Events: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Am Heart J.* 2008; 156(2):405-410.
153. Hamburg NM, Larson MG, Vita JA, Vasan RS, Keyes MJ, Widlansky ME, i sur. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, and Brachial Artery Vasodilator Function in Framingham Offspring Participants Without Clinical Evidence of Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol.* 2008;101(1):82-88.
154. Title LM, Lonn E, Charbonneau F, Fung M, Mather KJ, Verma S, i sur. Relationship between brachial artery flow-mediated dilatation, hyperemic shear stress, and the metabolic syndrome. *Vasc Med.* 2008;13(4):263-270.
155. Lind L. Endothelium-dependent vasodilatation, insulin resistance and the metabolic syndrome in an elderly cohort The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):795-802.
156. Moise LG, Marta DS, Raşcu A, Moldoveanu E. Serum lipoprotein-associated phospholipase A2 in males with metabolic syndrome and obstructive sleep apnea. *Acta Endocrinol (Buchar).* 2018;14(1):36-42.
157. Ishida T, Miyashita K, Shimizu M, Kinoshita N, Mori K, Sun L, i sur. ELISA System for Human Endothelial Lipase. *Clin Chem.* 2012;58(12):1656-1664.
158. Sun L, Ishida T, Miyashira K, Kinoshita N, Mori K, Yasuda T, i sur. Plasma activity of Endothelial Lipase Impacts High-Density Lipoprotein Metabolism and Coronary Risk Factors in Humans. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(4):313-321.
159. DeLemos AS, Wolf ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of Genetic Variants in Endothelial Lipase in Persons With Elevated High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Circulation.* 2002;106(11):1321-1326.

160. Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, Cupples A, Demissie S, Knudle Manning, i sur. Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. *J Clin Invest.* 2009;119(4):1042-1050.
161. Girona J, Amigó N, Ibarretxe D, Plana N, Rodríguez-Borjabad C, Heras M. HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3151.
162. Savolainen MJ. Epidemiology: Disease Associations and Modulators of HDL-Related Biomarkers. U: Von Eckardstein A, Kardassis D, ur. High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation, *Handbook of Experimental Pharmacology* 224. London: Springer Open; 2015. Str. 259-283.
163. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, Doerries C, Riwanto M, Shih DM, i sur. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2693-2708.
164. Espinola-Zavaleta N, Soto-López ME, Carreón-Torres E, Gamboa R, Mejía AM, Márquez-Velasco R, i sur. Altered Flow-Mediated Vasodilatation, Low Paraoxonase-1 Activity, and Abnormal High-Density Lipoprotein Subclass Distribution in Takayasu's Arteritis. *Circ J.* 2009;73(4):760-766.
165. Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, i sur. Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis: A Multiparametric Analysis Using Imaging Techniques and Laboratory Markers of Inflammation and Autoimmunity. *J Rheumatol.* 2008;35(3):398-406.
166. Soyman Z, Noyan V, Tulmac M, Yucel A, Sagsoz N, Bayrak T, i sur. Serum paraoxonase 1 activity, asymmetric dimethylarginine levels, and brachial artery flow-mediated dilatation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2011;95(3):1067-1072.
167. Sagit M, Sarli B, Guler S, Namuslu M, Celik HT, Kurtul S, i sur. Assessment of early atherosclerotic findings in patients with nasal polyposis. *Auris Nasus Larynx.* 2014;41(2):179-184.

168. Stanisavljevic N, Stojanovich L, Marisavljevic D, Djokovic A, Dopsaj V, Kotur-Stevuljevic J, i sur. Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients. *Clin Rheumatol*. 2016;35(10):2485-2493.
169. Billecke SS, Teiber JF. Pitfalls in the assessment of PON1 status in clinical populations. *Fertil Steril*. 2011;95(8):e63.
170. Durrington PN, Bashir B, Soran H. Paraoxonase1 and atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1065967.
171. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, i sur. Paraoxonase Active Site Required for Protection Against LDL Oxidation Involves Its Free Sulfhydryl Group and Is Different From That Required for Its Arylesterase/Paraoxonase Activities: Selective Action of Human Paraoxonase Allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 1998;18(10):1617-1624.
172. Deakin S, Moren X, James RW. Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis*. 2005;179(1):17-25.
173. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):55-61.
174. Terasaka N, Westerterp M, Koetsveld J, Fernández-Hernando C, Yvan-Charvet L, Wang N, i sur. ATP-Binding Cassette Transporter G1 and High-Density Lipoprotein Promote Endothelial NO Synthesis Through a Decrease in the Interaction of Caveolin-1 and Endothelial NO Synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2219-2225.
175. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R, i sur. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3701-3713.
176. Vigna GB, Satta E, Bernini F, Boarini S, Bosi C, Giusto L, i sur. Flow-mediated dilation, carotid wall thickness and HDL function in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(7):777-783.
177. Vazquez E, Sethi AA, Freeman L, Zalos G, Chaudhry H, Haser E, i sur. High-Density Lipoprotein Cholesterol Efflux, Nitration of Apolipoprotein A-I and Endothelial Function in Obese Women. *Am J Cardiol*. 2012;109(4):527-532.

178. Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, et al. Enhanced Release of Prostaglandins Contributes to Flow-Induced Arteriolar Dilation in eNOS Knockout Mice. *Circ Res.* 1999;85(3):288-293.

11. ŽIVOTOPIS

Iva Klobučar rođena je 1990. godine u Osijeku. Završila je Osnovnu školu Ivana Kukuljevića u Belišću i Opću gimnaziju u Srednjoj školi Valpovo. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2009. godine osvojivši prvo mjesto na prijemnom ispitu. Nagrađena je Dekanovom nagradom za najbolju studenticu prve godine studija akademske godine 2009./2010. Tijekom 5. godine studija odradila je ljetnu praksu u Klinici za kardiologiju Sveučilišne klinike Hamburg - Eppendorf u Hamburgu u Njemačkoj. Studij je završila 2015. godine s prosječnom ocjenom 4,93.

Godine 2016. položila je stručni ispit za doktore medicine. Od iste je godine radila kao specijalizantica kardiologije u Klinici za bolesti srca i krvnih žila Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu. Specijalistički ispit iz kardiologije položila je 2022. godine te od tada obavlja posao specijalistice kardiologije u Zavodu za intenzivnu kardiološku skrb iste ustanove. Područja stručnog interesa su joj zatajivanje srca, intenzivno liječenje i ehokardiografija. Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog kardiološkog društva.

Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2016. godine. Tijekom listopada 2019. godine educirala se u Istraživačkom centru za staničnu signalizaciju, izmjenu tvari i starenje Gottfried Schatz, na Medicinskom sveučilištu u Grazu u Austriji, o molekularno-biološkim istraživačkim metodama i sudjelovala u provedbi laboratorijskog dijela istraživanja koje obuhvaća doktorski rad. Autorica je i koautorica više znanstvenih radova koji su indeksirani u bazi *Web of Science* i čije je rezultate prezentirala na međunarodnim kongresima.

Od akademske godine 2017./2018. kao vanjska suradnica sudjeluje u nastavi kolegija *Fundamentals of Medical Skills* i *Emergency Medicine* na *Medical Studies in English*, a od 2018./2019. i u nastavi kolegija Temelji liječničkog umijeća na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

PRILOZI

Popis tablica

Tablica 1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 2. Biokemijski laboratorijski pokazatelji; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 3. Serumske koncentracije sastavnica HDL-a određene NMR spektrometrom; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 4. Omjeri koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 5. Pokazatelji funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjeri koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 6. Ultrazvukom određene karakteristike brahijalnih arterija ispitanika; razlike između skupine zdravih ispitanika i skupine ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 7. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 8. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 9. Korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu s pokazateljima funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjerima koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 10. Korelacije serumskih koncentracija sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 11. Korelacije omjera koji opisuju lipidni sadržaj čestica HDL-a i ultrazvukom određenih pokazatelja funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Tablica 12. Korelacije pokazatelja funkcionalnosti seruma koji ne sadrži apolipoprotein B i omjera koji opisuju funkcionalnost čestica HDL-a s ultrazvukom određenim pokazateljima funkcije brahijalne arterije (FMD i NMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Popis slika

Slika 1. Oprema korištena za procjenu endotelne funkcije brahijalne arterije.

Slika 2. Dio A. Broj ispitanika koji su zadovoljili pojedini kriterij koji definira metabolički sindrom.¹¹⁴ Dio B. Broj ispitanika koji su zadovoljili ukupno 0, 1, 2, 3, 4, ili 5 kriterija koji definiraju metabolički sindrom i njihova raspodjela u skupine.

Slika 3. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 4. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 5. Dijagrami s prikazom medijana i interkvartilnih raspona serumskih koncentracija lipidnih i proteinskih sastavnica HDL-a određenih NMR spektrometrom kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

Slika 6. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 7. Dijagrami s prikazom medijana i interkvartilnih raspona omjera koji opisuju lipidni sadržaj prosječnih čestica HDL-a kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.

Slika 8. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 9. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 10. Dijagrami s prikazom aritmetičke sredine i standardne devijacije postotaka promjene promjera brahijalnih arterija nakon kompresije manžetom (FMD) kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom (dio A); i prikazom aritmetičke sredine i standardne devijacije postotaka promjene promjera brahijalnih arterija nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom (dio B).

Slika 11. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 12. Prikaz korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu i serumske koncentracije apolipoproteina A-II u sastavu čestica HDL-a male do srednje veličine (HDL3-apoA-II) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Slika 13. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 14. Prikaz korelacije koncentracije endotelne lipaze u serumu sa sadržajem fosfolipida u prosječnim česticama HDL-a (HDL-PL/HDL-apoA-I) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Slika 15. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 16. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 17. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 18. Prikaz korelacija serumske koncentracije triglicerida u sastavu velikih, manje gustih čestica HDL-a (HDL1-TG) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) (dio A); i s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon primjene gliceriltrinitrata (NMD) (dio B) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom.

Slika 19. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 20. Prikaz korelacije sadržaja kolesterola u česticama HDL-a velikog promjera i male gustoće (HDL1-C/HDL1-apoA-I) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom (dio A); i korelacije sadržaja fosfolipida u česticama HDL-a velikog promjera i male gustoće (HDL1-PL/HDL1-apoA-I) s postotkom dilatacije brahijalne arterije nakon kompresije manžetom (FMD) u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika s metaboličkim sindromom (dio B).

Slika 21. Prikaz u podnaslovu analiziranih odnosa varijabli.

Slika 22. Sažetak utvrđenih rezultata i odnosa između analiziranih varijabli kod zdravih ispitanika i ispitanika s metaboličkim sindromom.