Učinci antilipidnih lijekova na kolinesterazu i parametre oksidacijskoga stresa u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora

Vukšić, Antonija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:491413

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Antonija Vukšić

Učinci antilipidnih lijekova na kolinesterazu i parametre oksidacijskoga stresa u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Antonija Vukšić

Učinci antilipidnih lijekova na kolinesterazu i parametre oksidacijskoga stresa u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u sklopu znanstvenog projekta broj 0000000-0013 „Serumske esteraze, leptin, lipidi i antilipidni lijekovi“, voditelj prof. dr. sc. Vlaste Bradamante, u Zavodu za farmakologiju i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku pri Kliničkom bolničkom centru Zagreb i Poliklinici Bonifarm u Zagrebu.

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Lovrić

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Lovrić na podršci, pomoći i vrijednim savjetima tijekom provedbe istraživanja i pisanja. Također hvala znanstvenicima i suradnicima prof. dr.sc. Nadi Božini, dr. sc. Dubravki Rašić, dr. sc. Suzani Žunec, dr.sc. Pašku Konjevodi te tehničarki gđi. Željki Roca na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela disertacije i statističke obrade podataka. Posebno hvala doktoru Marinku Bilušiću na podršci, pomoći i poticajnim raspravama tijekom istraživanja. Osobito veliku zahvalu osjećam i dugujem prof.dr.sc. Vlasti Bradamante na ustrajnoj podršci, strpljenju i savjetima oko osmišljavanja, provođenja i pomoći pri pisanju disertacije. Naposljetku, zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali i motivirali da ustrajem svih ovih godina.

SADRŽAJ

KRATICE

1 UVOD ... 1

1.1 Hiperlipidemije i antilipidni lijekovi ... 2

1.2 Antilipidni učinci statina i fibrata i njihove farmakokinetičke značajke ... 4

1.2.1 Statini ... 4

1.2.1.1 Farmakokinetika simvastatina i rosuvastatina ... 8

1.2.2 Fibrati ... 10

1.2.2.1 Farmakokinetika fenofibrata ... 11

1.3 Ne lipidni (pleiotropni) i ostali učinci statina i fibrata ... 12

1.3.1 Ne lipidni (pleiotropni) učinci ... 12

1.3.1.1 Statini ... 13

1.3.1.2 Fibrati ... 15

1.3.1.3 Mogući mehanizmi nelipidnih (pleiotropnih) učinaka statina i fibrata ... 16

1.3.2 Ostali učinci ... 17

1.3.2.1 Statini ... 17

1.3.2.2 Fibrati ... 18

1.4 Kolinesteraze ... 19

1.4.1 Acetilkolinesteraza i pseudokolinesteraza ... 19

1.4.2 Pseudokolinesteraza i njezin značaj u organizmu ... 20

1.4.2.1 Detoksikacija ... 20

1.4.2.2 Hidroliza acetilkolina ... 21

1.4.2.3 Farmakološka uloga pseudokolinesteraze ... 22

1.4.2.4 Pseudokolinesteraza i lipidi ... 22

1.4.2.5 Pseudokolinesteraza i β-amiloid ... 23

1.4.2.6 Čimbenici koji utječu na aktivnost pseudokolinesteraze ... 24

1.5 Oksidacijski stres i antilipidni lijekovi ... 26

1.5.1 Oksidansi i antioksidansi ... 26

1.5.2 Malondialdehid ... 28

1.5.3 Superoksid-dismutaza ... 28

1.5.4 Glutation ... 29

1.5.5 Lijekovi i oksidacijski stres ... 30

1.5.5.1 Statini i oksidacijski stres ... 31

1.5.5.2 Fibrati i oksidacijski stres ... 33
2 HIPOTEZA ... 35
3 CILJEVI RADA ... 37
4 MATERIJALI I METODE ... 39
4.1 Životinje ... 40
4.2 Ispitivane supstancije ... 40
4.2.1 Odabir doza ... 40
4.3 Postupci sa životinjama ... 41
4.3.1 Normolipemični štakori ... 41
4.3.2 Hiperlipemični štakori ... 42
4.3.3 Kontrolne skupine ... 42
4.3.4 Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala ... 42
4.4 Biokemijske metode ... 43
4.4.1 Određivanje katalitičke aktivnosti pseudokolinesteraze u mozgu i plazmi ... 43
4.4.2 Određivanje katalitičke aktivnosti pseudokolinesteraze u jetrimama ... 43
4.4.3 Određivanje koncentracije malondialdehida u tkivima mozga i jetre ... 43
4.4.4 Određivanje koncentracije malondialdehida u plazmi ... 44
4.4.5 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u tkivima mozga i jetre ... 46
4.4.6 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u plazmi ... 46
4.4.7 Određivanje koncentracije reduciranog glutationa u plazmi i tkivima mozga i jetre ... 47
4.4.8 Određivanje koncentracije triglicerida i HDL kolesterola u plazmi ... 48
4.4.8.1 Trigliceridi ... 48
4.4.8.2 HDL kolesterol ... 49
4.5 Analiza podataka ... 50
4.5.1 Statistička analiza podataka ... 50
4.5.2 Prikaz rezultata ... 50
5 REZULTATI ... 51
5.1 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze u plazmi, jetrima i mozgu mjerena acetiltiokolinom i butiriltiokolinom ... 52
5.1.1 Normolipemični štakori ... 52
5.1.2 Hiperlipemični štakori ... 64
5.2 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze u plazmi, jetrima i mozgu ... 67
5.2.1 Normolipemični štakori ... 67

5.2.2 Hiperlipemični štakori 72
5.3 Koncentracija malondialdehida u plazmi, jetrima i mozgu 75
5.3.1 Normolipemični štakori 75
5.3.2 Hiperlipemični štakori 79
5.4 Koncentracija reduciranog glutationa u plazmi, jetrima i mozgu 81
5.4.1 Normolipemični štakori 81
5.4.2 Hiperlipemični štakori 86
5.5 Koncentracija triglicerida i HDL kolesterola u plazmi 88
5.5.1 Normolipemični štakori 88
5.5.2 Hiperlipemični štakori 91
6 RASPRAVA 93
7 ZAKLJUČCI 107
8 KRATKI SADRŽAJ 110
9 SUMMARY 112
10 POPIS LITERATURE 114
11 KRATKA BIOGRAFIJA 138

KRATICE

Aβ – amiloid β

ACh – acetilkolin

AChE – acetilkolinesteraza

ATCh – acetiltiokolin

apoA-I – apoprotein A-I

apoA-II – apoprotein A-II

apoA-IV – apoprotein A-IV

apoA-V – apoprotein A-V

apoB-100 – apoprotein B-100

apoC-I – apoprotein C-I

apoC-II – apoprotein C-II

apoC-III – apoprotein C-III

apoE – apoprotein E

BTCh – butiriltiokolin

CoQ10 – koenzim Q10

CRP – C reaktivni protein

CYP2C9 – citokrom P 450 2C9

CYP3A4 – citokrom P450 3A4

FDA – eng. *Food and Drug Administration*

FENO – fenofibrat

FPP – farnesil pirofosfat

GGPP – geranilgeranil pirofosfat

GSH – reducirani glutation

GSSH – oksidirani glutation

HDL – lipoproteini velike gustoće

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

HPLC – engl. *High Performance Liquid Chromatography*

ICAM-1 - međustanična adhezijska molekula 1

IDL - lipoproteini srednje gustoće

IL-1 – interleukin I

IL-6 – interleukin 6

IL-10 – interleukin 10

INF-γ – interferon γ

LDL – lipoproteini male gustoće

MDA – malondialdehid

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid H

PPAR – peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor

ROS – reaktivni kisikovi spojevi

ROSU – rosuvastatin

SIMV – simvastatin

SOD – superoksid – dismutaza

SŽS – središnji živčani sustav

TNFα – tumor nekrotizirajući faktor α

VLDL – lipoproteini vrlo male gustoće

1 UVOD

1.1 Hiperlipidemije i antilipidni lijekovi

Hiperlipidemije ili hiperlipoproteinemije predstavljaju stanje poremećenog metabolizma lipida za koje je karakteristično povećanje koncentracije kolesterola i/ili trialcilglicerola. Biokemijski točan naziv triacilgliceroli je u nastavku teksta zamijenjen nazivom trigliceridi, budući da se potonji uvriježio u kliničkoj praksi i svakodnevnom životu. Kolesterol je u eukariota sastavni dio svake stanične membrane i čini osnovu njezinog fizikalnog integriteta, a sudjeluje i u sintezi steroidnih hormona i žučnih kiselina. U organizmu osim egzogenog kolesterola, unesenog hranom, postoji i endogeni kolesterol kojeg sintetizira svaka stanica u tijelu. Ipak, najviše endogenog kolesterola nastaje u stanicama jetre. Trigliceridi su esteri glicerola i masnih kiselina. Za razliku od kolesterola, oni služe prvenstveno kao izvor energije. Slično kolesterolu, i trigliceridi u organizmu dvojakog su porijekla: egzogeni koji se unose u ovom obliku hranom, te endogeni koji se sintetiziraju u jetrima nakon obroka bogatog ugljikohidratima (1,2).

S obzirom na činjenicu da su lipidi netopljivi u vodi, problem njihovog prijenosa u vodenoj krvnoj plazmi riješen je spajanjem nepolarnih lipida (trigliceridi i esteri kolesterola) s amfipatskim lipidima (fosfolipidima i kolesterolom) i proteinima (apoproteini, apolipoproteini) u čestice koje se nazivaju lipoproteini (2). Lipoproteini se s obzirom na svoju gustoću pri ultracentrifugiranju (gustoća lipoproteina se smanjuje povećanjem udjela lipida u odnosu na proteine) i elektroforetsku pokretljivost dijele na lipoproteine vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoproteins,* VLDL), lipoproteine srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoproteins*, IDL), lipoproteine male gustoće (engl. *low density lipoproteins,* LDL), lipoproteine velike gustoće (engl. *high density lipoproteins,* HDL), te hilomikrone. Apoproteini se dijele u šest klasa (A, B, C, D, E, H), a neke od klasa u podklase. Na primjer podklase apoproteina A su apoprotein A-I (apoA-I), apoprotein A-II (apoA-II), apoprotein A-IV (apoA-IV), apoprotein A-V (apoA-V). Apoprotein B (apoB) ima dvije podklase, a apoprotein C (apoC) 4 podklase. Pojedini lipoproteini mogu imati jedan ili više različitih apoproteina. Tako na primjer, LDL lipoprotein uglavnom sadrži apoB-100, dok HDL lipoprotein osim najviše zastupljenog apoA-I sadrži i apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III i apoE. Glavne funkcije apoproteina su osiguravanje strukturne stabilnosti molekula lipoproteina i vezanje lipoproteina za specifične receptore na površini stanica što omogućuje njihov ulazak u stanicu i razgradnju. Također apoproteini služe i kao kofaktori u enzimatskim procesima koji reguliraju metabolizam lipoproteina (3).

Postoje lipoproteini koji prenose lipide iz hrane, kao i oni koji prenose endogene lipide. Lipide iz hrane (trigliceridi i kolesterol) prenose hilomikroni. Endogene lipide kao što su trigliceridi, u ljudskoj plazmi prenose VLDL i IDL čestice. Osim triglicerida, VLDL lipoproteini sadržavaju estere kolesterola i fosfolipide. VLDL čestice krvlju stižu do kapilara u kojima se trigliceridi iz njihovog sastava hidroliziraju djelovanjem lipoprotein-lipaze. Ostatne čestice VLDL se nakon hidrolize triglicerida nazivaju IDL česticama. IDL lipoproteini u svojem sastavu sadrže uglavnom estere kolesterola i ostatke endogenog triglicerida. Jedan dio preostalih VLDL i IDL čestica se nakon vezanja za površinu hepatocita i ulaska u jetru metabolizira, dok se drugi dio IDL čestica djelovanjem lipoprotein i jetrene lipaze pretvara u LDL. U plazmi čovjeka, LDL čestice su glavni prijenosnici kolesterola i estera kolesterola i omogućuju njihov unos u različita tkiva. LDL-kolesterol strukturno promijenjen (oksidiran, glikoziran, alkiliran, agregiran, elektronegativno nabijen) ima ključnu ulogu u nastanku plakova u intimi arterija i progresiji ateroskleroze (4,5). HDL čestice sastoje se od lipida podrijetlom iz VLDL-a i hilomikrona koji se oslobađaju tijekom lipolize. HDL čestice imaju važnu ulogu u reverzibilnom transportu kolesterola, tj. uklanjaju višak kolesterola iz perifernih tkiva i dopremaju ga u jetru gdje se metabolizira. U stvari HDL čestice održavaju kolesterolsku homeostazu stanica (6–8). U jetrene stanice i u neka periferna tkiva lipoproteini ulaze pomoću specifičnih membranskih receptora, LDL-receptora, koji „prepoznaju“ apoB i apoE. Endocitoza posredovana LDL-receptorima najvažniji je način uklanjanja lipoproteina i kolesterola, dok je za mehanizam eliminacije masnih kiselina iz cirkulacije odgovorna lipoprotein-lipaza.

Hiperlipidemije ili hiperlipoproteinemije nastaju kao posljedica ubrzane sinteze ili usporene razgradnje lipoproteinskih čestica. Hiperlipoproteinemije se obzirom na vrstu lipida i lipoproteina čija je koncentracija u plazmi dominantno povišena prema Fredricksonu, dijele u pet tipova (Tablica 1.1).

Tablica 1.1 Podjela hiperlipoproteinemija prema Fredricksonu

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

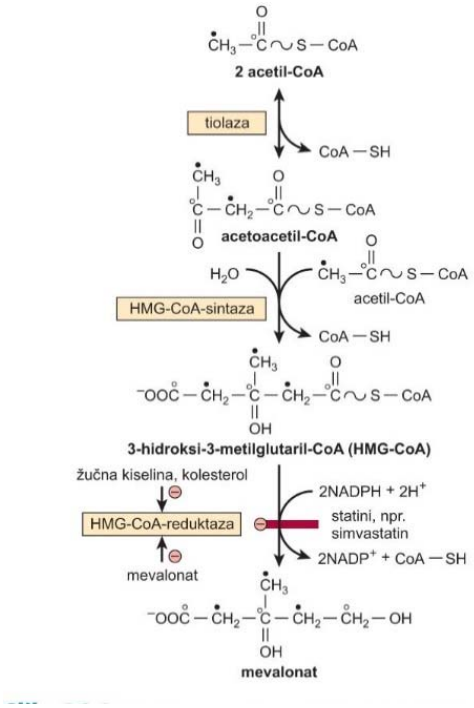
Uvriježeno je mišljenje da su za razvoj kardiovaskularnih bolesti odgovorne ne samo povišene plazmatske koncentracije LDL kolesterola i triglicerida nego i snižene plazmatske vrijednosti HDL kolesterola (8–10). Kako se hiperlipidemija smatra jednim od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti, a koje su uzrok smrtnosti broj jedan u svijetu, antilipidni lijekovi su danas nezaobilazni u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti (11). Stoga i ne čudi činjenica da su antilipidni lijekovi pri samom vrhu najpropisivanijih lijekova u svijetu. U antilipidne lijekove ubrajaju se inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, poznatiji pod nazivom statini, zatim derivati fibrične kiseline (fibrati), inhibitori crijevne apsorpcije sterola, sekvestranti žučnih kiselina i nikotinska kiselina. Svi oni se međusobno razlikuju po mehanizmu djelovanja, terapijskoj namjeni i učestalosti primjene. Kod većine bolesnika s hiperlipidemijom od antilipidnih lijekova najčešće se koriste statini i fibrati. Statini se koriste za liječenje bolesnika kod kojih je dominantno povišena koncentracija kolesterola, a fibrati kod bolesnika s dominantno povišenim koncentracijama trigliceridia. Obje skupine lijekova osim antilipidnih učinaka ispoljavaju i ne lipidne ili pleoiotropne učinke.

1.2 Antilipidni učinci statina i fibrata i njihove farmakokinetičke značajke

1.2.1 Statini

Statini reverzibilno inhibiraju HMG-CoA reduktazu, enzim ključan za endogenu sintezu kolesterola. Inhibicijom HMG-CoA reduktaze unutar mevalonatnog lanca statini sprečavaju sintezu mevalonske kiseline, limitirajuće reakcije u biosintezi kolesterola i preteču ne samo endogenog kolesterola nego i izoprenoida, kao što su vitamin K, koenzim Q10 te

steroidni hormoni (12). Sinteza mevalonata, te mjesto djelovanja statina prikazano je na slici 1.1. Statini smanjujući endogenu sintezu kolesterola u jetrima posredno uzrokuju povećanje ekspresije LDL-receptora u stanicama različitih tkiva, rezultat čega je smanjenje koncentracije ukupnog i LDL kolesterola u plazmi (5,12). Navedeno smanjenje koncentracije LDL kolesterola u plazmi glavni je učinak svih statina, a raspon sniženja koncentracije kolesterola u odnosu na one prije terapije kreće se između 20–60% (13). Meta analize mnogih studija učinaka statina pokazale su da se o dozi ovisnom sniženju serumskih vrijednosti LDL kolesterola smanjuje i relativni rizik kardiovaskularnih bolesti. Smanjenjem serumskog LDL kolesterola za 1,0 mmol/L mortalitet od kardiovaskularnih bolesti smanjuje se za 20–25% (14). Osim što značajno smanjuju koncentraciju LDL kolesterola statini različito učinkovito smanjuju koncentraciju triglicerida (10–30%), kao i glavnog prijenosnika triglicerida u plazmi VLDL-a te povećavaju koncentraciju HDL kolesterola (5–15%) u plazmi (13,15,16). Navedeni pozitivni učinci statina variraju i ovise o vrsti i dozi pojedinog statina te o njihovim pojedinačnim farmakokinetičkim svojstvima (17). Većina statina umjereno povećava koncentraciju HDL kolesterola u plazmi dok simvastatin i rosuvastatin isti značajno povećavaju (13).



Slika 1.1 Biosinteza mevalonata i mjesto djelovanja statina

*****_Preuzeto iz: Murray RK, Bender DA, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil P. prijevod 28. izdanja Harperova ilustrirana biokemija. Medicinska naklada, Zagreb. Slika 26-1. i slika 26-3. Str.225._

Budući da se metabolizam lipoproteina razlikuje između ljudi i štakora, učinak hipolipemičnih lijekova na masti i lipoproteine u ljudi i štakora nije isti. Za razliku od ljudi, štakori većinu endogenog kolesterola i trigliceride u plazmi prenose putem HDL-a, a prekomjerna koncentracija kolesterola rezultira povećanom proizvodnjom VLDL-a (18,19). Također je dokazano da iako značajno inhibiraju mevalonatni put, statini u glodavaca ne snižavaju koncentraciju plazmatskog kolesterola nego triglicerida (20). Isti istraživači su u svojim istraživanjima dokazali da se kod štakora smanjenje koncentracije triglicerida uzrokovanog lovastatinom može ukinuti dodavanjem kolesterola, mevalonata ili bilo kojeg drugog produkta iz reakcije sinteze kolesterola, te da je učinak lovastatina na trigliceride ovisan o stupnju inhibicije HMG-CoA-reduktaze (20). U pretkliničkim ispitivanjima je dokazano da se štakori ipak mogu koristiti za procjenu učinaka statina budući da kod njih sniženje koncentracije triglicerida korelira sa sniženjem koncentracije kolesterola kod drugih životinjskih modela (zamorac ili kunić) kod kojih je kao i u ljudi LDL glavni prijenosnik kolesterola (21,22). Također, štakori predstavljaju dobar model i za istraživanje o kolesterolu neovisnih učinaka (23).

Statini po podrijetlu mogu biti prirodni i sintetski. Kompaktin (mevastatin) dobiven fermentacijom gljive *Penicillium citrinum* zbog animalne toksičnosti nije klinički ispitan, lovastatin je nastao fermentacijom iz gljivice *Aspergillus terreus*, a kemijskom modifikacijom kompaktina i lovastatina dobiveni su simvastatin i pravastatin (24). Sintetskim postupcima dobiveni su atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin te cerivastatin. Prema topljivosti statini se dijele na lipofilne, topljive u mastima (atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin, pitavastatin, cerivastatin) i hidrofilne, topljive u vodi (pravastatin, rosuvastatin). Lovastatin i simvastatin su laktonski predlijekovi koji se u probavnom traktu hidroliziraju do aktivnih derivata, pravastatin ima otvoren aktivni prsten, dok su atorvastatin, fluvastatin i rosuvastatin aktivni u postojećem obliku (25).

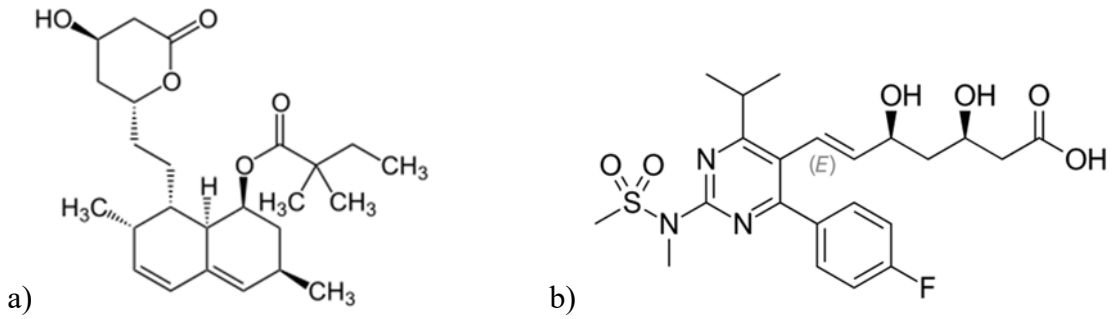
Većina statina posjeduje hepatoselektivni učinak na inhibiciju endogene sinteze kolesterola. Zbog značajnog učinka prvog prolaska kroz jetra, učinak statina najvažniji je u jetrima. Na terapijsku učinkovitost statina najmanje utječe njihova bioraspoloživost (25). Do nedavno je smatrano da je za ulazak lipofilnh statina u hepatocite i prolaz kroz membrane ostalih stanica pa tako i kroz krvno moždanu barijeru dovoljna samo pasivna difuzija, dok hidrofilni statini koji su hepatoselektivniji za prolaz kroz stanične membrane koriste aktivni transport (25). Danas je međutim dokazano da se i lipofilni statini uglavnom distribuiraju u jetru aktivnim transportom preko organskog anionskog transportnog polipeptida (OATP) 1B1, smještenog na bazolateralnoj strani hepatocita, koji je odgovoran za hepatički unos statina, ali

i za eliminaciju mnogih statina iz krvi (26). Efluksni transporteri kao što su MDR1 (engl. *multidrug resistance associated protein*) ili BSEP (engl. *bile acid export pump*) sudjeluju u završnom koraku izbacivanja statina u žuč (27).

Većina statina se iz crijeva apsorbira relativno brzo, a vršne koncentracije postižu se za manje od 4 sata. Nakon oralne primjene apsorpcija varira za pojedine predstavnike skupine i iznosi 30–80%. Iznimke su cerivastatin i fluvastatin koji se iz crijeva apsorbiraju gotovo 100% (25). Unatoč varijabilnoj apsorpciji, većina njih se iz crijeva apsorbira relativno brzo i postižu vršnu koncentraciju u plazmi unutar 4 sata. Osim pravastatina, statini se u velikoj mjeri vežu za proteine plazme pa je stoga sistemska izloženost farmakološki aktivnom obliku malena. Statini su općenito podložni značajnom metabolizmu prvog prolaska kroz jetru (presistemska eliminacija putem enzimskog sustava citokroma P450) zbog čega imaju slabu sistemsku bioraspoloživost (5–20%). Iznimka su pitavastatin i cerivastatin kod kojih je sistemska bioraspoloživost veća (80% i 60%). Stimulacija ili inhibicija sustava citokroma P450 hranom ili drugim lijekovima može značajno utjecati na plazmatsku koncentraciju statina, a time i na njihov učinak. Poluvijek eliminacije ishodnih spojeva je raspona 1-4 sata. Iznimke su atorvastatin i rosuvastatin s vrijednostima poluvijeka eliminacije od 20 sati. Duži poluvijek atorvastatina i rosuvastatina može pridonijeti njihovoj snažnijoj antilipidnoj aktivnosti. Ostali statini imaju kratak poluvijek eliminacije od oko 3 sata ili kraće (25). Svi statini se metaboliziraju u jetrima, a više od 70% metabolita statina eliminira se stolicom. Iznimke su pravastatin i rosuvastatin. Nakon oralne primjene približno 20% radioaktivnog pravastatina se izluči bubregom, a oko 70% stolicom. Dok je nakon intravenske primjene radioaktivnog pravastatina u zdravih dobrovoljaca, bubrežna ekskrecija iznosila 47% od ukupnog sistemskog klirensa, ne-renalno izlučivanje iznosilo je 53% (putem žući i biotransformacijom u jetrima). U eksperimentalnom dijelu ove disertacije korišteni su simvastatin i rosuvastatin. Njihova farmakokinetika je detaljno prikazana u odlomku 1.2.1.1.

1.2.1.1 Farmakokinetika simvastatina i rosuvastatina

Simvastatin je predstavnik prirodno dobivenih i lipofilnih statina, dok je rosuvastatin predstavnik sintetski dobivenih i hidrofilnih statina. Oba lijeka se odlikuju snažnom terapijskom učinkovitošću, što je ranije i spomenuto. Struktura simvastatina i rosuvastatina prikazana je na slici 1.2.



Slika 1.2 a) struktura simvastatina; b) struktura rosuvastatina

**Preuzeto iz Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001*

a)Simvastatin[ažurirano31.05.2015;pristupljeno02.07.2019.]Dostupno na:https://hr.wikipedia.org/wiki/Simvastatin.

b)Rosuvastatin[ažurirano21.06.2019;pristupljeno02.07.2019.Dostupn na:https://en.wikipedia.org/wiki/Rosuvastatin

Simvastatin (SIMV) je neaktivni laktonski predlijek koji se u probavnom sustavu i jetrima hidrolizira u odgovarajuću beta-hidroksi kiselinu koja je potentan inhibitor HMG-CoA reduktaze. Važnu ulogu u aktivaciji ovog predlijeka ima izoenzim citokrom P450 3A4 (CYP3A4) na kojem se odvija metabolizam laktonskog prstena. Simvastatin se prevodi u aktivni oblik i enzimskom hidrolizom nespecifičnim karboksiesterazama (paraoksonaza) u crijevnoj stanici.

Kod ljudi SIMV se dobro apsorbira iz crijeva i podložan je snažnom utjecaju prvog prolaska kroz jetru. Bioraspoloživost aktivnog metabolita, tj. beta-hidroksi kiseline u krvotoku je manja od 5% od primijenjene doze. Vršne koncentracije aktivnog metabolita u plazmi postižu se 1-2 sata nakon primjene predlijeka. Za proteine plazme vezano je više od 95% SIMV i beta-hidroksi kiseline. SIMV prolazi kroz krvno moždanu barijeru (28,29).

Nakon oralne primjene radioaktivnog SIMV kod ljudi, tijekom 96 sati izluči se oko 13% radioaktivnosti urinom i oko 60% fecesom. Doza radioaktivnosti izlučena stolicom odgovara količini lijeka, odnosno njegovih metabolita izlučenih putem žući i količini lijeka koja se nije apsorbirala iz probavnog sustava. Poluvijek eliminacije beta-hidroksi kiseline u plazmi nakon intravenske primjene prosječno iznosi 1,9 sati. Preporučena dnevna doza SIMV kod ljudi je u rasponu od 5 do 40 mg, dok je primjena maksimalne dnevne doze od 80 mg ograničena.

Rosuvastatin (ROSU) u svojoj strukturi sadrži fluor i aktivan je u izvornom obliku (Slika 1.2. b). Nakon oralne primjene vršne koncentracije u plazmi postižu se za približno 5 sati, dok apsolutna bioraspoloživost iznosi približno 20%. ROSU je sintetski hepatoselektivan lijek, što znači da biva brzo preuzet od strane jetre. Približno 90% ROSU vezuje se za bjelančevine plazme, uglavnom za albumin. ROSU se ograničeno metabolizira (približno 10%). *In vitro* je na humanim hepatocitima dokazano da je ROSU slab supstrat za metabolizam preko CYP3A4. Glavni izoenzim koji je uključen u metabolizam ROSU je citokrom P450 2C9 (CYP2C9). Glavni učinci na inhibiciju HMG-CoA reduktaze su povezani s originalnom molekulom. ROSU slabo prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (28,29).
Približno 90% ROSU izluči se nepromijenjeno fecesom (čine ga apsorbirana i neapsorbirana djelatna tvar), a ostatak se izluči urinom (oko 5% u nepromijenjenom obliku). Poluvijek eliminacije u plazmi iznosi oko 19 sati. Prosječna dnevna doza ROSU za liječenje hiperlipidemija je u rasponu 5 mg do 40 mg. Osnovne farmakokinetičke značajke SIMV i ROSU su prikazane u tablici 1.2 (25,30).

Tablica 1.2 Farmakokinetička svojstva rosuvastatina i simvastatina nakon oralne primjene

Parametar	Statin	
	Rosuvastatin	Simvastain
Apsorpcija (%)	50	70-85
T_{max} (h)[a]	3	1,3-2,4
Bioraspoloživost (%)	20	5
Vezanje za proteine plazme (%)	88-90	90-96,5
Aktivni metaboliti	Malo	Da
$t_{1/2}$ (h)[b]	19-20,8	1,9-5,6
Metabolizam u jetrima CYP450	Minimalan, CYP2C9	Izrazit CYP3A4
Prolazak krvno-moždane barijere	Ne	Da
Eliminacija bubregom (%)	10	13
Eliminacija stolicom (%)	90	58

[a] T_{max} (h) – vrijeme potrebno za vršnu koncentraciju u plazmi; [b] $t_{1/2}$ (h) – poluvijek eliminacije

1.2.2 Fibrati

Fibrati su derivati fibrične kiseline u koje se ubrajaju klofibrat, gemfibrozil, fenofibrat (Slika 1.3), ciprofibrat, bezafibrat i pemafibrat. Osim klofibrata koji je povučen s tržišta zbog nuspojava, fibrati se koriste u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti za liječenje dislipidemija prvenstveno hipertrigliceridemije i hipoalfalipoproteinemije (nizak HDL) (11,31,32). Primjenjuju se i u kombinaciji sa statinima, osobito fenofibrat, kada su unatoč terapiji statinima vrijednosti triglicerida povišene, a vrijednosti HDL-a smanjene (33).

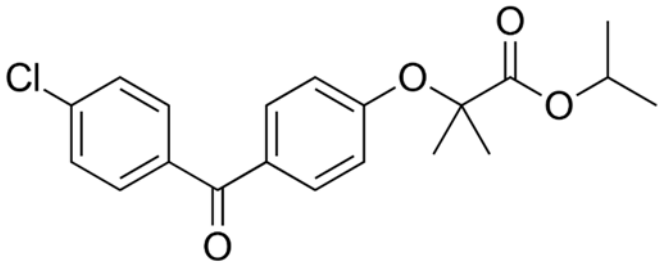
Mehanizam djelovanja fibrata je složen i još uvijek nedovoljno razjašnjen. Njihova osnovna značajka je da ne inhibiraju sintezu kolesterola. Djeluju kao ligandi za nuklearne receptore za aktivator proliferacije peroksisoma α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha,* PPAR-α), tj. aktivacija tih receptora inducira proliferaciju peroksisoma u stanici. Na taj način aktivirani PPARα receptori reguliraju ekspresiju niza gena koji imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze, transportu masnih kiselina i sintezi apoproteina. Aktivacijom PPARα, fibrati značajno snizuju razinu triglicerida u krvi tako što s jedne strane stimuliraju aktivnost lipoprotein lipaze i pospješuju lipolizu u hilomikronima i VLDL česticama, dok s druge strane smanjuju sintezu apoC-III sastavnog dijela VLDL čestica (34,35). Također, preko aktivacije PPARα i transkripcijske indukcije sinteze glavnih

apolipoproteina HDL čestica, apoA-I i apoA-II fibrati povećavaju razinu HDL-a (34). Antilipidnom učinku fibrata doprinosi i povećan unos masnih kiselina u stanice te njihov katabolizam β oksidacijom što skupa sa smanjenom proizvodnjom triglicerida rezultira smanjenom sintezom VLDL-a u jetrima (34).

Fibrati se općenito dobro apsorbiraju iz probavnog sustava, te pokazuju visoki stupanj vezanja za albumine u plazmi. U jetrima se metaboliziraju putem CYP3A4, zbog čega su česte interakcije s drugim lijekovima. Klinički najvažnije česte interakcije su sa statinima, varfarinom i oralnim hipoglikemicima. Izlučivanje bubrezima je glavni put eliminacije metabolita u obliku estera glukuronida fenofibrinske kiseline i njezinog reduciranog derivata (36). Fibrati prolaze krvno-moždanu barijeru (37).

1.2.2.1 Farmakokinetika fenofibrata

U eksperimentalnom dijelu ove disertacije iz skupine fibrata korišten je fenofibrat (FENO) čija je struktura prikazana na slici 1.3.



Slika 1.3 Struktura fenofibrata

**Preuzeto iz Wikipedia:the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc.2001Fibrate; [ažurirano 03.05.2019; pristupljeno 02.07.2019.].*

Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Fibrate.

Nakon peroralne primjene, svi fibrati, pa tako i fenofibrat se brzo apsorbiraju iz probavnog sustava (>90%) ukoliko se primijene uz obrok. Manja učinkovitost lijeka je ukoliko se primijene na prazan želudac. U plazmi se ne može naći nepromijenjeni fenofibrat, dok je glavni metabolit fenofibrična kiselina. Fenofibrična kiselina se snažno veže za albumine u plazmi (više od 99%). Vršne koncentracije fenofibrične kiseline u plazmi nastupaju unutar 4-5 sati. Lijek se najvećim dijelom eliminira mokraćom u obliku fenofibroične kiseline i njezinog glukuronidnog konjugata. Značajno je još dodati da sam FENO ne reagira s glutationom.

Međutim, nakon prve faze metabolizma zbog u strukturi fenofibrata postojanja keto grupe i esterske grupe i reakcija redukcije i hidrolize, nastaju metaboliti koji konjugiraju s glutationom (Slika 1.3). Nakon primjene radioaktivno obilježenog fenofibrata, približno 60% od doze izlučuje se mokraćom, a oko 25% stolicom. Njegova farmakokinetička svojstva prikazana su u nastavku (Tablica 1.3). Ovisno o farmaceutskoj formulaciji fenofibrata (mikroniziran, tablete, kapsule) preporučena dnevna doza za liječenje hiperlipidemija kreće se u rasponu od 90 mg do 267 mg.

Tablica 1.3. Farmakokinetička svojstva fenofibrata

Parametar	**Fenofibrat**
Apsorpcija (%)	60-90, veća uz hranu
T_{max} (h)[a]	4-6
Bioraspoloživost	dobra
Vezanje za proteine plazme (%)	99
Aktivni metaboliti	Da, fibrična kiselina
$t_{1/2}$ (h)[b]	20
Metabolizam CYP450	Ne, umjereno inhibira 2C9
Eliminacija bubregom (%)	60
Eliminacija stolicom (%)	25

[a] T_{max} (h) – vrijeme potrebno za vršnu koncentraciju u plazmi; [b] $T_{1/2}$ (h) – poluvijek eliminacije.

1.3 Ne lipidni (pleiotropni) i ostali učinci statina i fibrata

1.3.1 Ne lipidni (pleiotropni) učinci

Osim djelovanja na lipide i lipoproteine, statini i fibrati su unazad 20-tak godina predmetom brojnih istraživanja zbog neosporivih dokaza da imaju i dodatne, ne lipidne učinke, koji većinom nisu posljedica njihovog djelovanja na metabolizam lipida. Ne lipidni (engl. *non-lipid effect)* ili pleiotropni učinci (grč. *pleio* = mnogo i *tropein* = utjecaj) statina i fibrata mogu biti pozitivni i korisni, ali ima i onih koji mogu djelovati na organizam štetno. Od vrlo korisnih, pleiotropnih, učinaka statina i fibrata zamijećenih u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima najčešće se spominju kardioprotektivni, protuupalni,

imunomodulacijski, neuroprotektivni i antioksidacijski (38–42). Potrebno je odmah naglasiti da se većina navedenih pozitivnih učinaka, bilo statina bilo fibrata, ne može oštro odijeliti, tj. oni se međusobno isprepliću zbog sličnosti na molekularnom nivou upalnog i oksidacijskog procesa.

1.3.1.1 Statini

Poznata je činjenica da je u kliničkim ispitivanjima dokazan pozitivan učinak statina na smanjenje kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (43–45). U podlozi svih kardiovaskularnih bolesti najčešće se spominje ateroskleroza. Ateroskleroza je kronična upalna reakcija, kojoj prethodi oštećenje endotela arterije u kombinaciji s oksidacijskim stresom, nakupljanje kolesterola, povećana sklonost koagulaciji krvi i fibroproliferativni proces. Smatra se da je pozitivna značajna uloga statina u kardiovaskularnim bolestima posljedica njihovog protuupalnog i antiaterogenog, a ne antilipidnog učinka, budući da su rezultati nekoliko ispitivanja pokazali da statini smanjuju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti čak i u odsutnosti značajnog pada koncentracije kolesterola (46,47). Korisni učinci statina uključuju poboljšanje funkcije endotela krvnih žila i protoka krvi, smanjenje oksidiranog LDL kolesterola, inhibiciju proliferacije glatkih mišića krvnih žila i agregaciju trombocita, kao i smanjenje upalne reakcije u krvnim žilama (46,48). Također interferiraju sa stvaranjem i progresijom aterosklerotskog plaka na način da moduliraju ekspresiju metaloproteinaze u makrofagima. Dokaz protuupalnog učinka statina može se ilustrirati njihovim djelovanjem na disfunkciju endotela i C reaktivni protein (CRP), kojeg stimuliraju upalni citokini interleukin 1 (IL-1) i interleukin 6 (IL-6) (49). Također inhibiraju adheziju endotela, tra-trans-endotelnu migraciju leukocita na mjesto upale i ekspresiju gena adhezijske molekule (ICAM-1). Statini inhibiraju proliferaciju glatkih mišića krvnih žila i moduliraju aktivaciju gena odgovornih za upalni odgovor preko IL-1β, IL-6 i tumor nekrotizirajućeg faktora α (TNF-α).

U reumatoidnom artritisu, sinovijalne membrane zglobova su bogati izvor proupalnih citokina, poput TNF-α, IL-1 ili IL-6, koji nakon oslobađanja u cirkulaciju izazivaju upalni proces. Nagashima i suradnici (2006) su *in vitro* na sinovijalnim stanicama izoliranima iz zglobova bolesnika s reumatoidnim artritisom i osteoartritisom ispitali učinak lipofilnog fluvastatina i hidrofilnog pravastatina (50). Dokazani protuupalni učinak statina posljedica je njihovog potentnog djelovanja usmjerenog na inhibiciju indukcije nekoliko proupalnih

citokina uključivo TNF-α, IL-1β, IL-6, te smanjenje koncentracije CRP-a kao predstavnika sistemskog upalnog procesa.

Statini se često spominju kao lijekovi za koje se pretpostavlja da djeluju neuroprotektivno i terapijski na različite poremećaje središnjeg živčanog sustava (SŽS) poput multiple skleroze, moždanog udara, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (40,51–54). Multipla skleroza jedna je od prvih autoimunih modela na kojem je dokazan protuupalni učinak statina. Brojna su neklinička ispitivanja u kojima je ispitan utjecaj statina na razvoj multiple skleroze (55–57). Standardni animalni model za multiplu sklerozu je eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis u miša. Lovastatin, korišten na takvom modelu, inducirao je diferencijaciju limfocita T_0 u T_1, smanjio stvaranje proupalnih citokina (IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6 i inducibilnu NO sintazu), a inducirao protuupalni citokin IL-10 (58). Na temelju ovih rezultata, zaključak Natha i sur. je bio da lovastatin inhibira aktivni i pasivni eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis na način da modulira odgovore T stanica kao antigen-prezentirajuće stanice. Prema rezultatima nekoliko kliničkih ispitivanja provedenih kod bolesnika s multiplom sklerozom, atorvastatin se pokazao sigurnim lijekom, te u mozgu izazvao redukciju volumena lezija. Kod bolesnika s istom bolesti dokazane su i povećane vrijednosti protuupalnog IL-10 (59). Međutim, opći je stav da rezultati pretkliničkih i kliničkih ispitivanja nisu jednoznačno pozitivni, te da uglavnom ovise o tipu korištenog statina, modelu bolesti i kliničkoj situaciji (59).

Nove spoznaje o etiologiji Parkinsonove bolesti ukazuju da oksidacijski stres i upala živčanog tkiva imaju ključnu ulogu u patofiziologiji ove bolesti. Na temelju rezultata eksperimentalnih istraživanja na modelu Parkinsonove bolesti izazvane u Wistar štakora primjenom neurotoksina 6-hidroksidopamina zamijećeno je da su upala živčanog tkiva i infiltracija upalnim stanicama u središnjem živčanom sustavu inhibirani atorvastatinom i simvastatinom (60). Naime, 6-hidroksidopamin primijenjen u corpus striatum značajno oštećuje lokomotornu aktivnost, antioksidativnu obranu i aktivnost mitohondrijskih enzima, te povećava koncentracije upalnih citokina (TNF-α i IL-6). Prema Kumaru i suradnicima oba statina imaju određeni neuroprotektivni potencijal.

Jedno opservacijsko ispitivanje je pokazalo da je prevalencija od razvoja moguće Alzheimerove bolesti u osoba na terapiji statinima za 60-73% manja u usporedbi s općom populacijom ili u usporedbi s bolesnicima koji uzimaju uobičajenu terapiju za liječenje hipertenzije ili kardiovaskularne bolesti (61). Na temelju takvih rezultata provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja u kojima je ispitana terapijska korist od liječenja statinima kod osoba već oboljelih od Alzheimerove bolesti. Međutim, prema rezultatima tih ispitivanja,

terapijska korist nije bila značajna (62). Ponovnom analizom neuspjelih kliničkih pokusa isti su autori ustanovili da uporaba statina može biti od koristi samo kod bolesnika s Alzheimerovom bolesti koji su homozigoti za ApoE4 (62). Antioksidacijski učinci statina opisani su u točki 1.5.5.1. (Statini i oksidacijski stres).

1.3.1.2 Fibrati

Kao što je spomenuto u točki 1.2.2 fibratima se neovisno o učincima na lipoproteine pripisuju dodatni, pleiotropni učinci poput protuupalnog, antitrombocitnog, poboljšanja tolerancije glukoze, smanjenja upale vaskularnih glatkih mišića te smanjenje fibrinogena u plazmi (63–67).

Slično statinima i fibrati mogu poboljšati funkciju endotela. Dokazano je da fenofibrat inhibicijom migracije endotelnih stanica može zaštiti krvne žile od patoloških oštećenja povezanih s metaboličkim bolestima. Isto tako PPARα aktivatori inhibiraju trombinom inducirano stvaranje endotelina-1 u humanim endotelnim stanicama (68). Endotelin-1 je vrlo potentni vazokonstrikcijski peptid koji inducira proliferaciju glatkih mišićnih stanica i može igrati ulogu u razvoju ateroskleroze. Fenofibrat i fluvastatin smanjuju plazmatsku koncentraciju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta koji ima značajnu ulogu u razvoju angiogeneze i može biti važan u kardiovaskularnoj patofiziologiji. Kod bolesnika s dislipidemijom i aterosklerozom fenofibrat također smanjuje plazmatske koncentracije interferona-γ (INF- γ) i TNF-α. Na temelju eksperimentalnih podataka sugerirano je da fenofibratom inducirana aktivacija PPARα u humanim CD4-pozitivnim T limfocitima smanjuje ekspresiju proupalnih citokina, kao što je INF-γ. Isto tako fenofibrat može značajno smanjiti plazmatsku koncentraciju fibrinogena. Poznato je da je pad koncentracije fibrinogena povezan s manjom viskoznošću krvi i nakupljanjem eritrocita, što opet poboljšava mikrocirkulaciju u pacijenata s hiperlipidemijom. Učinci PPARα agonista pa tako i fenofibrata su još smanjena ekspresija metaloproteinaze, smanjeno stvaranje pro-aterogenih Th1 citokina IFN-γ, TNFα, IL-2 (49). Postoje dokazi i o preventivnom djelovanju fibrata na postiradijacijske ozljede SŽS-a (69). Meta analiza 22 randomiziranih kliničkih ispitivanja je ukazala na pozitivan učinak fenofibrata i bezafibrata na smanjenje inzulinske rezistencije i koncentracije glukoze u plazmi natašte (63).

1.3.1.3 Mogući mehanizmi nelipidnih (pleiotropnih) učinaka statina i fibrata

Dok je mehanizam antilipidnog učinka statina i fibrata dobro poznat, nije jasno kojim mehanizmima ovi lijekovi potiču gore opisane pleiotropne učinke. Što se tiče pleiotropnih učinaka statina, u literaturi se najčešće spominju dva moguća mehanizma kojima ovi lijekovi ostvaruju gore navedene učinke. Prvi vjerojatni mehanizam se temelji na smanjenju sinteze same mevalonske kiseline (Slika 1.1) izazvane inhibicijom HMG-CoA-reduktaze što je limitirajuća reakcija u biosintezi kolesterola. Time se inhibira ne samo sinteza kolesterola nego i sinteza izoprenoida i njihovih intermedijarnih spojeva poput farnesil-pirofosfata (FPP) i geranilgeranil-pirofosfata (GGPP) koji su važni za aktivaciju malog o GTP-u ovisnog Ras proteina i Ras-u sličnih proteina kao što su Rho i Rac. Mali GTP-vezujući proteini mogu aktivirati mnoge signalne putove, uključujući mitogenom aktiviranu protein-kinazu i fosfatidilinozitol-3-kinazu. Smanjujući aktivaciju malih G proteina statini ometaju različite biološke funkcije inducirane čimbenicima rasta i citokinima, kao što su proliferacija, oksidacijski stres i upala (49). Statini mogu utjecati i na zbivanja u staničnoj jezgri, tako da moduliraju ekspresiju gena, a time posljedično i staničnu funkciju (12,48).

Drugi pretpostavljeni mehanizam koji objašnjava pleiotropne učinke statina temelji se na agonističkom djelovanju ove skupine lijekova na PPAR receptore, tj. statini su ligandi za nuklearne receptore za aktivator proliferacije peroksizoma (39,70–72). Već je ranije spomenuto da PPAR receptori reguliraju enzime ključne za održavanje energetske homeostaze. Poznate su tri izoforme PPAR (α, β/δ i γ). PPAR α većinom su izraženi u tkivima s velikom kataboličkom aktivnošću masnih kiselina poput jetre, srca, masnog tkiva, bubrega i crijeva, a uključeni su u regulaciju sinteze lipoproteina. Također, PPARα igraju važnu ulogu u regulaciji upalnih procesa. Tako su pretklinička ispitivanja pokazala da PPARα agonisti inhibiraju upalnu reakciju u različitim tipovima stanica, uključujući astrocite i stanice mikroglije (73). Nadalje pretkliničkim ispitivanjima uočeni su neuroprotektivni učinci PPARα agonista kod raznih oboljenja SŽS-a uključujući moždani udar, eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis i Parkinsonovu bolest (74). PPARβ/δ su izraženi u mnogim tkivima, a naročito mozgu, masnom tkivu i koži. PPARγ receptori uključuju tri podskupine (γ1, γ2, γ3). PPARγ1 izraženi su praktički u svim tkivima, uključivo u srcu, mišićima, kolonu, bubregu, gušteraći i slezeni. PPARγ2 su većinom smješteni u masnom tkivu, a PPARγ3 u makrofagima, kolonu i bijelom masnom tkivu. PPARγ receptori kao skupina reguliraju i promoviraju diferencijaciju adipocita i pohranu lipida, te sudjeluju u regulaciji upalnih

procesa i metabolizmu glukoze (75). Endogeni ligandi su im masne kiseline, a egzogeni između ostalih i antilipidni lijekovi.

Dokazano je da su statini agonisti PPARα i PPARγ receptora. Zato ne začuđuje što u makrofagima preko indukcije transkripcijske aktivnosti PPARγ inhibiraju lipopolisaharidom induciran TNF-α i ekspresiju proteina MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*). Preko aktivacije PPARα i PPARγ statini također potiskuju transkripcijsku aktivnost nuklearnog transkripcijskog čimbenika (NFκB) i aktivatora proteina (AP1) (46). Prema literaturnim podacima statini putem aktivacije PPARγ stabiliziraju aterosklerotske plakove, što podupire ranije spomenute dokaze o učincima statina na imunološka zbivanja preko aktivacije PPAR. Isto tako je dokazano da simvastatin u ovisnosti o dozi inducira aktivnost PPARα i PPARγ i inhibira kolagenom induciranu agregaciju trombocita.

Što se tiče mehanizma djelovanja fibrata, odnosno fenofibrata na smanjenje lokalnog i sistemskog upalnog odgovora, on je najvećim dijelom posljedica njegovog agonističkog djelovanja na PPARα receptore tj. slično je djelovanju statina.

Jasno je da su PPAR receptori, naročito PPARα zajednička točka djelovanja statina i fibrata i da statini barem dio pleiotropnih učinaka ostvaruju preko tih receptora. Na temelju navedenog može se izvesti samo jedan zaključak, a taj je da su potrebna još mnoga ne-klinička i klinička ispitivanja koja će omogućiti slaganje mozaika svih pleiotropnih učinaka statina i fibrata.

1.3.2 Ostali učinci

1.3.2.1 Statini

Pretklinička ispitivanja kronične toksičnosti su pokazala da su statini osobito toksični ako ih se primjenjuje u visokim dozama. Tako je u životinja uočeno povećanje jetrenih enzima, atipične žarišne hiperplazije jetre, stvaranje katarakte, vaskularne lezije u središnjem živčanom sustavu, toksični učinak na skeletne mišiće, degeneracija testisa i tumori u raznim organima. U kliničkim i epidemiološkim ispitivanjima ozbiljni neželjeni događaji nisu uočeni dugi niz godina, pa se smatralo da ti lijekovi posjeduju dobar sigurnosni profil. Međutim, po nekim studijima i do 25% korisnika ne podnosi lijek i prekida njegovo uzimanje zbog pojave štetnih učinaka, poput mialgije, po život opasne rabdomiolize i asimptomatskog povećanja jetrenih enzima (76). Prema novijim literaturnim podacima upotreba statina se sve češće dovodi u vezu s nastankom drugih neželjenih događaja poput povećanog rizika nastanka

tumora, bolesti bubrega i kognitivnog oštećenja (77–80). Meta analize kliničkih ispitivanja potvrdile su da statini također povećavaju rizik za razvoj šećerne bolesti u normoglikemijskih osoba i pogoršavaju glikemijsku kontrolu u osoba oboljelih od šećerne bolesti (81,82). Procijenjeno je da atorvastatin u dozi od 40 mg dnevno može izazvati šećernu bolest kod 50-100 pacijenata od ukupno njih 10 000 liječenih (83). Očito je da su podaci o pojavi dijabetesa tipa 2 dosta sigurni, budući da je Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration,* FDA) izmijenila sigurnosne informacije o statinima ističući kako postoji povećani rizik od povećanja koncentracije šećera u krvi i oboljenja od šećerne bolesti tip 2 (84). Rizik od pojavnosti šećerne bolesti povezan je primjenom većih doza statina s jačim antilipidnim učincima kao što su simvastatin, atorvastatin i rosuvastatin (85). Isto tako, oprečni su podaci o učincima statina na kognitivne funkcije, a najnoviji ukazuju da štetno djeluju na kogniciju (80,86).

1.3.2.2 Fibrati

Unazad 40-ak godina koliko su u primjeni za liječenje dislipidemija fibrati su se pokazali kao lijekovi koji se relativno dobro podnose. Postmarketinškim prijavljivanjem nuspojava zamijećeno je da fibrati uglavnom izazivaju reverzibilna povećanja jetrenih enzima i kreatinina u serumu, dok se miopatija i rabdomioliza javljaju rijetko. Potonje nuspojave mogu biti ozbiljne ukoliko se fibrati primjenjuju zajedno sa statinima (63). Kod štakora i miševa fibrati imaju snažan učinak na proliferaciju peroksisoma i indukciju peroksisomalnih i mitohondrijskih enzima koji metaboliziraju masne kiseline (87). Ispitivanja u štakora i miševa su pokazala da jednogodišnja primjena fibrata uzrokuje 100% incidenciju tumora jetre. S druge strane, epidemiološka ispitivanja su pokazala da su ljudi otporni na kancerogene učinke fibrata (87). Dvije činjenice vjerojatno mogu objasniti zašto je čovjek manje osjetljiv na fibrate od glodavca. To su u čovjeka smanjeni kapacitet vezanja fibrata za PPARα receptore, te različita ekspresija gena koje kontroliraju aktivirani PPAR receptori u čovjeka i glodavca (88).

1.4 Kolinesteraze

1.4.1 Acetilkolinesteraza i kolinesteraza ili pseudokolinesteraza

Kolinesteraze su enzimi koje se svrstavaju u skupinu hidrolaza, te podskupinu esteraza. Poznate su barem dvije kolinesteraze. To su acetilkolinesteraza ili specifična kolinesteraza (AChE; E.C.3.1.1.7) i butirilkolinesteraza ili nespecifična kolinesteraza, za koju postoje još nazivi kolinesteraza (ChE), pseudokolinesteraza, plazmatska ili serumska kolinesteraza (PChE; E.C.3.1.1.8), a prisutne su u tkivima svih sisavaca. Iako se radi o srodnim enzimima (homologni su u oko 50% sekvenci aminokiselina) s relativno sličnom tercijarnom i kvarternom strukturom, međusobno se razlikuju po specifičnosti za supstrate, rasprostranjenosti u organizmu te podložnosti promjene aktivnosti na različite endogene i egzogene tvari (89).

AChE je najvažniji enzim koji regulira neurotransmisiju u kolinergičkom putu kralježaka, koji uključuje središnji i periferni živčani sustav, te skeletne mišiće. Metoda hibridizacije mRNA je pokazala da u čovjeka poprečnoprugasti mišići imaju najveće koncentracije AChE mRNA, što je konzistentno s relativno visokim sadržajem enzima u mišićima, osobito mišićima nogu. U mozgu je sadržaj AChE četiri puta manji u odnosu na skeletne mišiće (90,91). Najmanje količine AChE mRNA izmjerene su u posteljici, bubregu i gušterači. Histokemijska ispitivanja su pokazala da je AChE u mozgu smještena uglavnom u neuronima. U svih sisavaca AChE selektivno inaktivira ACh unutar sekunde ili milisekunde nakon što se isti oslobodi iz kolinergičkih presinaptičkih završetaka. Djelovanje AChE jednako je u mozgu i perifernim tkivima (92). Osim u živčanom sustavu AChE se nalazi i na vanjskoj strani eritrocitne membrane.

Uobičajeni naziv za kolinesterazu je pseudokolinesteraza (PChE) koja se sintetizira u jetrima i neposredno nakon sinteze oslobađa u krv. Osim u jetrima i plazmi, enzim je još prisutan u mozgu, crijevima, srcu, masnom tkivu, bubrezima i plućima (93). Humana plazma sadrži isključivo PChE, dok plazma životinja sadrži varijabilne količine i PChE i AChE. Metoda hibridizacije mRNA je pokazala da tkiva koja u čovjeka najviše obiluju s PChE mRNA jesu jetra, pluća, mozak i srce, što je konzistentno s relativnim sadržajem i aktivnosti enzima u jetrima, plućima i mozgu. Srce također obiluje s PChE mRNA, ali suprotno od mozga i jetre, aktivnost enzima u srcu je mala (90,91,94). Dok AChE hidrolizira isključivo ACh, PChE osim ACh hidrolizira niz sintetskih estera poput butirilkolina, butiriltiokolina,

propionilkolina, te sukcinilkolina. Hidroliza ACh izazvana s PChE značajno je sporija od one izazvane s AChE. Osim esterazne aktivnosti PChE posjeduje i aril acilamidaznu aktivnost, koja je međutim preniska, da bi imala ulogu u metabolizmu endogenih ili egzogenih aril acilamida (95).

Obje kolinesteraze imaju također brojne uloge u nizu različitih bolesti, kao što su neoplastičke bolesti, fenilketonurija, Alzheimerova ili Parkinsonova bolesti, te su odgovorne za mnoge abnormalnosti u svezi kliničkog stanja tih bolesti. Dobar primjer navedenom je Alzheimerova bolest, u kojoj se obje kolinesteraze dovode u vezu s β-amiloidnim plakovima (96,97). Također, aktivnosti oba enzima su povećane u plazmi i tkivima osoba koje boluju od šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, inzulinske rezistencije i hiperlipidemije (98). Rezultat povećane aktivnosti ovih enzima je niža koncentracija ACh.

Osim u navedenim patološkim stanjima, aktivnost plazmatske PChE i eritrocitne AChE može biti povećana u različitim upalnim stanjima blažeg stupnja. Ove činjenice postaju važnije u kontekstu današnjih saznanja da je ACh protuupalna molekula, te da se povećanjem aktivnosti AChE i PChE može smanjiti protuupalni učinak ACh-a. Odnosno, ACh osim što regulira koncentracije serotonina, dopamina i drugih neuropeptida, modulira također i imunološki odgovor. Stoga se unazad nekoliko godina intenzivno proučava tzv. kolinergički protuupalni put (99,100). Kolinergički put posredstvom eferentnih živčanih niti vagusa, acetilkolina i nikotinskih receptora na makrofagima, inhibira stvaranje čimbenika tumorske nekroze, interleukina-1, čimbenika inhibicije migracije makrofaga, te potiskuje ekspresiju nuklearnog faktora-kapa β (98). U kontekstu činjenice da ACh može biti protuupalna molekula stvorena je i druga pretpostavka da AChE i PChE mogu predstavljati upalne biljege kod sistemskih upala blažeg stupnja (98,101).

Fiziološki supstrat za PChE, kao niti njezina fiziološka uloga za sada još uvijek nisu potvrđeni. Suprotno toj činjenici PChE koja je u ovom radu jedan od glavnih ciljeva istraživanja, ima u organizmu niz funkcija, koje su navedene u točki 1.4.2.

1.4.2 Pseudokolinesteraza i njezin značaj u organizmu

1.4.2.1 Detoksikacija

Danas je općenito usvojen koncept o ulozi PChE u detoksikacijskom procesu prilikom trovanja izazvanog bilo hranom bilo inhalacijom. Fizostigmin u *Calabar* grahu i kokain u

lišću koke su prirodni otrovi koje PChE hidrolizira do inaktivnih metabolita (90). Teva Pharmaceutical Industries Ltd. provela je u zdravih dobrovoljaca dvostruko–slijepo placebom kontrolirano kliničko ispitivanje kako bi utvrdila ponašanje, psihološke i sigurnosne učinke jednokratne intravenske injekcije kokaina primijenjene nakon jednokratne intramuskularne primjene mutirane PChE humanog podrijetla spojene na albumin (102). Primjena mutirane PChE vezane na albumin bila je za ispitanike sigurna. Ispitanici tijekom praćenja od tjedan dana nisu pokazali opetovanu želju za kokainom, dok su učinci kokaina bili manje izraženi. Zbog toga se razmišlja o odobrenju primjene humane PChE u liječenju kokainske ovisnosti. Isti enzim uništava organofosforne spojeve, u koje se ubrajaju živčani bojni otrovi i pesticidi, te neurotoksični antikolinesterazni anatoksin kojeg stvara specifična alga *Anabaenia flos-aquae* (90).

1.4.2.2 Hidroliza acetilkolina

U normalnim uvjetima aktivnost PChE u organizmu ne pridonosi hidrolizi ACh-a. Ovaj zaključak se temelji na spoznaji da su „knockout“ miševi bez PChE zdravi, kao što su zdrave i osobe koje nemaju PChE zbog mutacije ili nedostatka gena za taj enzim (103). Međutim, prema novijim literaturnim podacima PChE je koregulator kolinergičke funkcije u mozgu. Naime, u uvjetima visoke moždane aktivnosti lokalna koncentracija ACh može postići takve mikromolarne vrijednosti koje mogu inhibirati AChE aktivnost. Pretpostavlja se da bliski prostorni odnos PChE u glija stanicama omogućuje hidrolizu ACh, te da PChE sudjeluje u regulaciji lokalne koncentracije ACh i održavanju normalne kolinergičke funkcije. Tako je dokazano da lijekovi za Alzheimerovu bolest, huperzin A i donepezil, specifično inhibiraju AChE, ali ne inhibiraju PChE. Preživljavanje „knockout“ miševa bez AChE ali s normalnom aktivnošću i lokalizacijom PChE podržava koncept ključne uloge PChE u hidrolizi ACh u slučaju nedostatka AChE, budući da je u takvih miševa izostao neurotoksični učinak tih lijekova (90,104,105). Međutim, miševi s kompletnim nedostatkom PChE, ali normalnom aktivnosti AChE, uginuli su nakon primjene donepezila ili huperzina A. Njihovo uginuće je bilo praćeno toničkim konvulzijama tj. simptomima karakterističnim za višak ACh (104). Zato se danas često govori da su u mozgu AChE i PChE koregulatori trajanja učinka ACh u kolinergičkoj transmisiji. Također se pretpostavlja da PChE tijekom embrionalnog razvoja živčanog sustava može biti povezana s proliferacijom živčanih stanica i rastom aksona.

1.4.2.3 Farmakološka uloga pseudokolinesteraze

PChE igra važnu ulogu u metabolizmu egzogenih spojeva tako što pojedine lijekove razgrađuje u inaktivne metabolite (sukcinilkolin, acetilsalicilna kiselina), a druge poput bambuterola i heroina aktivira. Sukcinilkolin je nekompetitivni blokator poprečnoprugaste muskulature i u klinici se koristi za njezinu relaksaciju. U prisutnosti PChE djelovanje sukcinilkolina je vrlo kratko, pa se isti često koristi kod određenih dijagnostičkih zahvata. Što se tiče bambuterola i heroina, treba istaknuti da je bambuterol predlijek koji djelovanjem PChE prelazi u aktivni antiasmatski lijek terbutalin, dok heroin kao diester djelovanjem PChE prelazi u morfin. Isti enzim hidrolizira endokanabinoid 2-arahidonoilglicerol (90).

1.4.2.4 Pseudokolinesteraza i lipidi

Povijesne su pretpostavke o ulozi PChE u metabolizmu lipida i lipoproteina te regulaciji koncentracije kolina u plazmi (106). Histokemijskim i imunoelektroforetskim metodama dokazana je povezanost PChE i LDL čestica i blokiranje katalitičke aktivnosti PChE česticama LDL-a (107,108). Prema hipotezi Kutty-a i sur., LDL nastaje iz VLDL-a u prisutnosti PChE, odnosno ukoliko je aktivnost PChE inhibirana, VLDL prelazi u HDL (109). Aktivnost PChE pokazuje snažnu pozitivnu korelaciju sa serumskom razinom triglicerida, ukupnog kolesterola te inzulinskom rezistencijom, a negativnu korelaciju sa serumskom razinom HDL-kolesterola (110,111). Lipoproteini posjeduju fosforilkolinsku skupinu koja može stvarati nestabilnu vezu s PChE što ukazuje na moguću ulogu PChE u metabolizmu lipoproteina (112). Aktivnost PChE je povećana kod pretilih osoba kao i kod osoba s metaboličkim sindromom kod kojih je također pojačan oksidacijski stres (113–115). Duchnowicz P. i sur. su zaključili da kod adolescenata s metaboličkim sindromom oksidacijski stres i poremećen metabolizam lipida uzrokuju povećanu aktivnost PChE (116). Zbog navedenog u ovom eksperimentu osim normolipemičnih štakora korišteni su Zucker (fa/fa) štakori koji predstavljaju dobar eksperimentalni model koji ispoljuje metaboličke promjene koje se često nalaze kod ljudi liječenih statinima kao što su hiperkolesterolemija i prekomjerna tjelesna masa. Zucker štakori također pokazuju svojstva dislipidemije, masne promjene jetre i inzulinske rezinstencije te imaju povišene aktivnosti PChE (117,118). Najnovija izvješća ukazuju na moguću pravu specifičnu fiziološku ulogu PChE. To je

hidroliza hormona koji potencira apetit, tj. grelina (119). Grelin je acilirani peptid, kojeg proizvode uglavnom stanice fundusa želuca i epsilon stanice gušterače. Podrijetlo grelina u SŽS-u je dvojako. Dio grelina pristiže iz želuca kroz krvno-moždanu barijeru, a jedan dio stvaraju jezgre hipotalamusa. U jezgrama hipotalamusa grelin stimulira izlučivanje hormona rasta iz hipofize. Dokazano je da je grelin jedan od osnovnih hormona odgovornih za osjećaj gladi, stimulira glad, jer aktivira centar za glad u mozgu. Dokazano je da humana PChE hidrolizira oktanoil grelin u desacil grelin i oktanoičnu kiselinu. „Knockout" miševi bez PChE postaju gojazni ukoliko su na prehrani bogatoj mastima. Prema hipotezi De Vriese i sur. deficit PChE je povezan sa smanjenim katabolizmom masti (120).

1.4.2.5 Pseudokolinesteraza i β-amiloid

U mozgu se PChE povezuje primarno s glija stanicama, ali se također nalazi i u značajnoj populaciji neurona uglavnom smještenih u dubokim slojevima kore, hipokampalnim strukturama, mnogim jezgrama talamusa, amigdalama, te endotelnim stanicama (92,98). Te strukture su uključene u normalne funkcije spoznaje i ponašanja, a ugrožene su u Alzheimerovoj bolesti. Unazad 20-tak godina, sve je više literaturnih podataka o ulozi PChE u nastanku Alzheimerove bolesti. Dok je aktivnost AChE u Alzheimerovoj bolesti značajno snižena, aktivnost PChE može ostati nepromijenjena ili je povećana kao npr. u korteksu mozga, te neuritičkim plakovima i neurofibrilarnim čvorićima (92). Kao što je poznato, neuritički plakovi građeni od β-amiloida i neurofibrilarni čvorići glavno su obilježje Alzheimerove bolesti (121). Smatra se da u nastanku amiloid β (Aβ) plakova primarnu ulogu ima PChE, a ne AChE. Naime, dokazano je da je PChE primarno povezana samo s „malignim" Aβ plakovima karakterističnima za Alzheimerovu bolest, te da je nema u „benignim" Aβ plakovima, koji su često prisutni u osoba bez demencije (96,121). Ova povezanost aktivnosti PChE te „benignih" i „malignih" Aβ plakova temelj je pretpostavke da PChE može također biti uključena u prijelaz „benignog" oblika Aβ u „maligni" oblik koji je karakterističan za Alzhemimerovu bolest. Međutim, mehanizam tog procesa nije objašnjen (96). Smatra se da bi vizualiziranje aktivnosti PChE povezane s Aβ plakovima u kori mozga predstavljalo vrijedan alat u razlikovanju plakova povezanih s Alzheimerovom bolesti od onih koji su prisutni u normalnom mozgu starije životne dobi (97). Do sada je sintetizirano nekoliko radioliganada, za koje je preliminarno dokazano da prelaze u mozak i kumuliraju se u onim regijama za koje je poznato da sadrže PChE. Za budućnost, metoda od neprocjenjive

vrijednosti za postavljanje dijagnoze Alzheimerove bolesti. Značajan je i podatak da aktivnost PChE u mozgu čovjeka značajno pozitivno korelira s povećanjem životne dobi (122). Rezultati pokusa *in vitro* Diamanta i sur. suprotni su prethodno navedenima, jer sugeriraju da PChE može smanjiti stvaranje Aβ plakova (96,123). Posljedično, uloga PChE u nastanku plakova još uvijek nije razjašnjena.

1.4.2.6 Čimbenici koji utječu na aktivnost pseudokolinesteraze

Na aktivnost PChE u kvalitativnom i kvantitativnom smislu (povećanje ili smanjenje njezine katalitičke aktivnosti) mogu utjecati genetski čimbenici, patološka stanja, spol i neki lijekovi.

Genetski čimbenici. Snižena aktivnost PChE može se naći u osoba koji su genetski homozigoti za atipičnu PChE. Takve osobe hidroliziraju sukcinilkolin vrlo sporo. Postoje i osobe koje posjeduju pritajeni, takozvani „silent" gen koji uopće ne potiče sintezu PChE. I za osobe koje su homozigoti za atipičnu PChE, kao i za one koje imaju „silent" gen govorimo da imaju kvalitativno promijenjenu katalitičku aktivnost enzima.

Patološka stanja su odgovorna za kvantitativnu promjenu katalitičke aktivnosti PChE. Povišena plazmatska aktivnost PChE dokazana je u patološkim upalnim stanjima poput inzulinske rezistencije, pretilosti, šećerne bolesti tip 2, hipertenzije i hiperlipidemije (101,116). Tako je kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa dva i/ili arterijskom hipertenzijom dokazana pozitivna korelacija između aktivnosti PChE i koncentracije triglicerida i ukupnog kolesterola, a negativna između aktivnosti PChE i koncentracije HDL u plazmi (110). Prema rezultatima istraživanja Rustemijera i sur., aktivnost PChE se u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 i hipertrigliceridemijom može smatrati biljegom sinteze triglicerida (124). Suprotni su rezultati jednog pokusa *in vitro*, prema kojima inhibicija aktivnosti PChE u kulturi stanica nije djelovala na sintezu triglicerida (125). Logično pitanje postavljeno je od strane Randella i sur. u svezi aktivnosti PChE kao mogućeg biljega metaboličkog sindroma, a glasi da li je povećana aktivnost PChE posljedica metaboličkog sindroma ili prethodi njegovom nastanku (114)?

Snižena aktivnost PChE u plazmi osoba oboljelih od kronične opstruktivne bolesti pluća dokazana je po prvi puta u kliničkim ispitivanjima Sicinska P i sur. (126). Budući da je u istih osoba izmjeren pad ukupnog antioksidacijskog kapaciteta i porast peroksidacije lipida,

pad aktivnosti PChE dovodi se u vezu s oksidacijskim stresom izazvanim kroničnom opstruktivnom bolesti pluća.

Lijekovi. Različiti lijekovi mogu modulirati katalitičku aktivnost PChE. Tako njezinu aktivnost inhibiraju lijekovi koji se koriste u dijagnostici i liječenju miastenije gravis, tzv. indirektni kolinomimetici (npr. edrofonij, neostigmin, piridostigmin i ambenonij) (89). Organofosforni spoj ekotiopat važan u liječenju glaukoma, također inhibira aktivnost PChE. Inhibitorima aktivnosti PChE u ljudi i/ili životinja pripadaju također glukokortikoidi i esmolol, za razliku od oksprenolola za kojeg je dokazano da povećava plazmatsku aktivnost enzima u štakora (127–130). Za antilipidne lijekove još uvijek ne postoji jedinstveni stav o njihovom utjecaju na aktivnost enzima. Tako su Darvesh i sur. na temelju rezultata svoje *in vitro* studije objavili da lovastatin i simvastatin statistički značajno smanjuju aktivnost PChE, dok kod mevastatina i pravastatina nije zamijećen nikakav učinak (131). Povećana aktivnost PChE u plazmi i jetrima primjećena je nakon primjene fenofibrata u normolipemičnih štakora i gemfibrozila u štakora s hipertrigliceridemijom izazvanom prehranom bogatom ugljikohidratima (132,133). Simvastatin i atorvastatin primijenjeni u štakora tijekom 7 dana nisu utjecali na aktivnost AChE u krvi i PChE u plazmi štakora, dok je značajno smanjenje aktivnosti AChE izmjereno u frontalnom korteksu mozga (134). Naša nedavna ispitivanja su pokazala suprotno, tj. da je simvastatin primijenjen tijekom 21 dan izazvao značajni porast aktivnosti PChE u plazmi i jetrima normolipemičnih štakora (135). Malo je kliničkih ispitivanja u kojima je praćena aktivnost PChE u plazmi bolesnika na terapiji antilipidnim lijekovima. U ispitivanju provedenom kod bolesnika s hipertrigliceridemijom i šećernom bolesti tipa 2 i liječenih inzulinom, primjena bezafibrata, ali ne i pravastatina je izazvala značajni pad aktivnosti PChE (124). Rezultati kliničkog ispitivanja utjecaja simvastatina na aktivnost PChE kod osoba s hiperlipidemijom IIa i IIb, nisu dokazali značajni inhibitorni učinak lijeka na aktivnost PChE (136). Kliničkim ispitivanjem provedenim kod osoba oboljelih od koronarne bolesti primjena rosuvastatina i atorvastatina izazvala je značajni pad aktivnosti PChE u plazmi (137).

1.5 Oksidacijski stres i antilipidni lijekovi

1.5.1 Oksidansi i antioksidansi

Kisik (O_2) je vitalna molekula za sve aerobne organizme zahvaljujući jedinstvenom svojstvu krajnjeg akceptora elektrona u mitohondrijima koji nastaju oksidacijom masti, ugljikohidrata i proteina. Redukcijom kisika u mitohondrijskom lancu transporta elektrona nastaju reaktivni oblici kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) ili oksidansi. ROS je zajednički naziv za reaktivne radikale kisika koji u vanjskoj orbitali sadrže jedan nespareni elektron, kao i za reaktivne neradikalne oblike kisika koji u vanjskoj ljusci nemaju nespareni elektron. Skupinu reaktivnih radikala kisika čine superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), peroksilni ($R^{\bullet}O_2$) i dr., dok reaktivnim neradikalnim oblicima kisika pripadaju ozon (O_3), vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina (HClO), singletni kisik (O_2) i peroksinitrit ($ONOO^-$). Za reaktivne radikale kisika često se rabi i naziv slobodni radikali kisika (slobodni kisikovi radikali). Reaktivni oblici kisika se značajno razlikuju po svojoj reaktivnosti, pa posljedično tome i učincima na biomolekulama. Najreaktivniji radikal kisika je hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$) koji se u odnosu na druge reaktivne radikale O_2 u stanicama nalazi u najmanjoj koncentraciji (138,139).

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže staničnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija prema oksidaciji, odnosno kao stanje u kojem je ravnoteža između ROS-a i antioksidacijskog kapaciteta poremećena pa uzrokuje oštećenja stanice (140). To je stanje prekomjernog nekontroliranog stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih oblika kisika pri čemu je ravnoteža pomaknuta prema stvaranju radikala, a znatno je smanjena mogućnost stanice da nastale radikale razgradi. Uzroci narušavanja ravnoteže su brojni. To su različite ozljede tkiva, stres, šok, upala, ishemija, sepsa, karcinogeneza, metaboličke bolesti, poremećaji imunosnog sustava, mehanička, bakterijska ili virusna oštećenja kao i egzogeni toksini. Svaki pojedinačni uzrok ili kombinacija njih nekoliko vode ka lokalnom ili sustavnom oksidacijskom stresu.

Oksidacijski stres može nastati na razini stanice, tkiva, a ponekad i čitavog organizma. Na razini stanice neželjeni učinak djelovanja slobodnih radikala nastaje njihovim ulaskom u oksidacijsko-redukcijske reakcije sa staničnim makromolekulama. U tim procesima djelovanje ROS-a najčešće vodi ka oštećenju DNA koje može uzrokovati mutaciju ili smrt stanice, ali također može dovesti do inaktivacije proteina zbog oksidacijskoga oštećenja proteina sa sulfhidrilnom skupinom te do lipidne peroksidacije bioloških membrana. Pojava oksidacijskog stresa na razini tkiva i čitavog organizma značajna je za nastanak ateroskleroze,

upale i mnogih drugih patoloških procesa, a posljedice su akutni i kronični poremećaji koji u konačnici mogu ugroziti život organizma (141).

U različitim patofiziološkim procesima mogu nastati reaktivni aldehidi kao konačni produkti peroksidacije lipida od kojih dominantnu ulogu imaju malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) i akrolein (142). Reaktivni aldehidi poput MDA imaju biološke učinke na makromolekulama čime se značajno omogućava produljenje oksidacijskog stresa. Navedeni aldehidi kao važni posrednici širenja oksidacijskog stresa nazivaju se drugim glasnicima slobodnih radikala.

Međutim, potrebno je naglasiti da je oksidacijski stres fiziološka pojava u procesima u kojima je nastanak ROS-a svrsishodan, a njegove posljedice reverzibilne za stanice i cijeli organizam. Kisikovi reaktivni oblici su važan sastavni dio bioloških funkcija te sudjeluju u modulaciji ekspresije gena i mnogih staničnih signalnih putova. Jedan od primjera fiziološke uloge kisikovih radikala je njihovo posredovanje u sklopu imunološkog odgovora na infekcije.

Kako bi se koncentracija ROS-a u stanicama održavala unutar granica potrebnih za njihovo normalno funkcioniranje, stanice posjeduju antioksidacijski kapacitet. U svrhu učinkovitog uklanjanja ROS-a organizam je razvio brojne prirodne mehanizme obrane. Potencijalnu toksičnost ROS-a u fiziološkim uvjetima sprječavaju različiti antioksidansi. Antioksidansi se dijele na enzimske i ne-enzimske.

Najbrojniji antioksidansi su ne-enzimski, a pripadaju skupini hvatača ili čistača (engl. *scavenger)* slobodnih radikala. To su molekule koje učinkovito u stehiometrijskom omjeru reagiraju s radikalima uz istodobno stvaranje neradikala. U tu skupinu antioksidansa ubrajamo: vitamine A, C i E, glutation (GSH), beta-karoten, albumin, bilirubin, koenzim Q, i dr. (139). Osim ovih molekula koje su prisutne u organizmu u antioksidanse hvatače ubrajamo i molekule koje unosimo u organizam kao što su flavonoidi, probukol, likopen, *N*-acetil-cistein i dr. Enzimski antioksidansi su učinkovitiji od ne-enzimskih, jer se ne troše tijekom reakcija, a regulacijom ekspresije gena njihova se aktivnost može povećavati ili smanjivati. U skupinu važnih enzimskih antioksidansa ubrajaju se: superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza i glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza, peroksidaze i dr. U organizmu su prisutni i neki proteini s antioksidacijskom aktivnosti primjerice transferin, ceruloplazmin, laktoferin, deferoksamin ili albumin. Koncentracije navedenih proteina rutinski se određuju u kliničkim laboratorijima (143). Zdrave stanice mogu mijenjati razinu ROS-a i/ili antioksidacijskog kapaciteta kako bi kompenzirale učinak različitih biokemijskih procesa, poput primjerice porasta ROS-a prilikom popravljanja i diferencijacije tkiva (138).

Oksidacijski stres je niz godina cilj brojnih znanstvenih i kliničkih istraživanja obzirom da je prisutan u mnogim klinički čestim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti te neoplazme.

1.5.2 Malondialdehid

Oštećenjem lipida oksidacijskim stresom nastaju brojni sekundarni reaktivni spojevi. MDA je glavni i najistraživaniji završni spoj peroksidacije lipida, ponajviše nezasićenih masnih kiselina. Za razliku od slobodnih radikala koji su kratkoživući, aldehidi poput MDA, 4-HNE i akroleina su relativno dugoživući. Posebna karakteristika tih aldehida je da djeluju daleko od mjesta nastanka (npr. biološke membrane), bilo unutar ili izvan stanice. Povišene koncentracije reaktivnih aldehida pronađene su u mnogobrojnim različitim bolestima u ljudi, ali unatoč tome značajnu ulogu imaju samo u nekim bolestima. Danas je poznato da imaju i snažnu biološku ulogu u mnogobrojnim putovima prijenosa staničnog signala u patološkim ali i fiziološkim stanjima, primjerice u regulaciji staničnog ciklusa. Toksični učinci peroksidacije lipida očituju se dvama glavnim mehanizmima. Oksidacijskim oštećenjem lipida koji su sastavni dio membrana narušava se struktura i dinamična funkcija organela i stanica, dok s druge strane završni reaktivni aldehidi nastavljaju lančanu reakciju širenja oksidacijskog stresa čime nastaju oštećenja DNA i proteina (139). Oksidacijskom modifikacijom masnih kiselina LDL-a mijenjaju se karakteristike samog lipoproteina koji se kao takav ne može uklanjati iz plazme preko receptora nego ga fagocitiraju makrofazi pretvarajući se u pjenušave stanice koje se odlažu u stjenke krvnih žila (144). Obzirom da je kvantifikacija ROS-a zbog male stabilnosti često teško provediva, kao biomarker oksidacijskog stresa koristi se koncentracija MDA (145). Razina oksidacijskog stresa u plazmi i tkivima pozitivno korelira s koncentracijama MDA (142). U praksi se najčešće kombiniraju dvije metode za određivanje koncentracije MDA – HPLC i TBARS esej (146).

1.5.3 Superoksid-dismutaza

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je enzimski antioksidans koji ubrzava reakciju pretvorbe superoksida u vodikov peroksid i kisik ($O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Predstavlja glavnu obranu u organizmu od superoksidnog aniona. Poznate su tri izoforme

ovog enzima, citoplazmatska (SOD1/CuZnSOD) koja kao kofaktor sadrži ione bakra i cinka, mitohondrijska (SOD2/MnSOD) koja sadrži ion mangana i ekstracelularna (SOD3/EcSOD) koja sadrži ione bakra i cinka. Izrazite (abnormalne) promjene količine i aktivnosti SOD povezane su s preuranjenim starenjem i apoptozom stanica (147,148). Enzimska aktivnost SOD1 ovisi o prisutnosti katalitičkih iona bakra i cinka, te se može povećavati pomoću citoplazmatskog proteina nosača iona bakra. Aktivnost SOD1 raste i mimo citoplazmatskog nosača bakra posredstvom reduciranog glutationa (GSH) (149). Glavna uloga SOD2 je održavanje mitohondrijske funkcije redukcijom superoksidnog aniona nastalog u respiracijskom lancu. Izoenzim SOD3 je glavni ekstracelularni SOD no prisutan je i u krvnim žilama, plućima, bubregu i srcu. Obzirom da je SOD3 prisutan u stjenkama krvnih žila i u atereosklerotskim lezijama pretpostavlja se da ima ulogu u aterosklerozi no funkcijski značaj u razvoju ateroskleroze za sada je nepoznat (147). Aktivnost SOD u patološki prooksidacijskim stanjima nije uvijek jednoznačna. Na primjer, kod ateroskleroze, hipertenzije i pojednih tumora uočena je smanjena aktivnost SOD (139,147). S druge strane, u kliničkom ispitivanju procjene oksidacijskog stresa kod oboljelih od sepse, u kojoj je dokazan prooksidacijski status, pokazalo se da je aktivnost SOD-a bila značajno povišena u odnosu na zdravu populaciju (150). Navedeno može ukazivati na različitu sposobnost kompenzacije organizma nastalom oksidacijskom stresu ovisno o intenzitetu, vrsti i vremenu trajanja patološkog stanja. U istraživanjima na ljudima pokazalo se da osobe s trisomijom 21 imaju ekstra kopiju gena koji kodira SOD1 te je i aktivnost SOD1 veća za 50% u odnosu na normalnu diploidnu populaciju, dok je kod osoba s familijarnim oblikom amiotrofične lateralne skleroze uslijed besmislenih mutacija i delecije gena na kromosomu 21 aktivnost SOD1 smanjena (148, 149).

1.5.4 Glutation

Reducirani glutation (GSH) je tripeptid i glavni unutarstanični antioksidans. Nalazi se u gotovo svim stanicama te s enzimima (glutation–peroksidazom, glutation–reduktazom, glutation–S–transferazom) kojima je supstrat čini jedan od važnijih antioksidacijskih sustava u organizmu. Unutar stanice koncentracija GSH je molarna, što rezultira visokom omjerom GSH/GSSG (>30) (151). GSSG je kratica za oksidirani glutation. Omjer GSH/GSSG u serumu je značajno niži (~3). Oksidacija GSH je reverzibilan proces pa tako NADPH reducira GSSG u 2 molekule GSH. Enzim glutation-peroksidaza katalizira redukciju vodikovog

peroksida nastalog djelovanjem SOD-a stvarajući pri tomu oksidirani oblik glutationa (GSSH) (H_2O_2 + 2GSH → GSSH + $2H_2O$). Glutation-reduktaza omogućuje regeneraciju GSH i njegovo ponovno korištenje (GSSG + NADPH + H+ → 2GSH + NADP-). Oksidirani glutation (GSSH) obnavlja glutation reduktaza, a glutation peroksidaza koristi reducirani glutation u obrani od oksidacijskog stresa. Glutation–S–transferaza je velika skupina enzima koji razgrađuju mnoge ksenobiotike i pesticide u procesima konjugacije s reduciranim glutationom. U stanicama se gotovo sav glutation nalazi u reduciranom obliku. Najveća količina GSH nastaje u jetrima koja ga otpušta u plazmu kojom se prenosi po čitavom tijelu. Poluvijek eliminacije GSH u eritrocitima je 4 dana, dok je u jetrima 3 sata (139). Reducirani glutation sadrži slobodnu SH skupinu koja je izvor redukcijskog potencijala u svim stanicama te time osigurava reducirane oblike mnogih antioksidansa poput koenzima Q te vitamina C i E. Nedostatak GSH povezan je s oštećenjima mitohondrija nastalih djelovanjem vodikovog peroksida. Ispitivanja *in vitro* su pokazala da se prilikom izlaganja stanica kvasca, makrofaga, monocita i kožnih fibroblasta reaktivnim sekundarnim spojevima oksidacijskog stresa početno smanjuje koncentracija GSH nakon čega dolazi do povećanja koncentracije GSH sve do razine dvostruko veće od one u kontrolnim stanicama (139). Pretpostavlja se da je naknadni porast koncentracije GSH adaptacija na oksidacijski stres, no sam mehanizam zasad još nije poznat. Također, u velikom broju patofizioloških procesa primijećen je pad koncentracije GSH (152).

1.5.5 Lijekovi i oksidacijski stres

Biotransformacija lijekova odvija se uglavnom u jetrima. Metaboličke promjene lijekova u organizmu odvijaju se uz pomoć brojnih enzimskih sustava, poput enzima prve (CYP – enzimi, reduktaze, hidrolaze) i druge faze metabolizma lijekova (fosfataze, transferaze). Tijekom metabolizma lijeka može nastati čitav niz toksičnih međuprodukata i metabolita. Tako reakcije oksidacije predstavljaju važan put razgradnje različitih lijekova rezultirajući nastajanjem slobodnih radikala koji vezanjem za biološke makromolekule (lipidi, nukleinske kiseline i proteini) uzrokuju promjene fizioloških funkcija stanice. Obzirom da je oksidacijski stres prisutan u patološkim stanjima poput hiperlipidemije, šećerne bolesti, metaboličkog sindroma i ateroskleroze često su istraživani učinci različitih antioksidansa na tijek i ishod navedenih patoloških stanja. No rezultati većine kliničkih ispitivanja nisu potvrdili da antioksidansi imaju povoljan utjecaj na ishod kardiovaskularnih bolesti. Veliki

interes pobudili su lijekovi koji se koriste u prethodno spomenutim patološkim stanjima nakon što se uočilo da osim osnovnog posjeduju dodatne učinke između ostalog i na oksidacijski stres (153). Kod štakora, mertformin je povoljno utjecao na streptozocinom induciranu dijabetičku nefropatiju neovisno o glikemijskoj kontroli djelujući antioksidativno (smanjio ROS, povećao GSH i povećao aktivnost katalaze) (154). Primjena inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima (kaptopril) tijekom 14 dana smanjila je miokardijalnu fibrozu smanjenjem oksidacijskog stresa (smanjena koncentracija MDA i povećana aktivnost SOD i katalaze) (155). S druge strane, primjena indometacina, hidrokortizona i acetilsalicilne kiseline kod štakora smanjenjem aktivnosti enzima SOD, katalaze i glutation–peroksidaze u jetrima i bubrezima djelovala je prooksidativno (156).

1.5.5.1 Statini i oksidacijski stres

Rezultati ispitivanja statina na parametre oksidacijskog stresa u nekliničkim i kliničkim ispitivanjima nisu jednoznačni. Razlog je što rezultati jednih ispitivanja ukazuju na njihovo antioksidacijsko djelovanje, a rezultati drugih ispitivanja na prooksidacijsko.

Prvotna neklinička i klinička ispitivanja su ukazivala da statini djeluju isključivo antioksidacijski. Tako su u *in vitro* ispitivanjima Aviram i sur. uočili da lovastatin i aktivni metaboliti atorvastatina smanjuju stvaranje oksidiranog LDL kolesterola, te posredno tomu smanjuju i aterogeni potencijal lipoproteina (157,158). Erdos i sur. su primjenom ROSU (2 mg/kg/dan) Zucker štakorima tijekom četiri tjedna dokazali pad povećanih vrijednosti superoksida u bazilarnoj arteriji zbog inhibicije NAD(P)H oksidaze, popraćeno poboljšanjem cerebrovaskularne funkcije (159). U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima atorvastatin je također smanjio ekspresiju NADPH-oksidaze te značajno smanjio staničnu proizvodnju ROS-a (160). Schrris i sur. su *in vitro* ispitivanjima dokazali da statini, osobito njihovi laktonski oblici, inhibiraju mitohondrijski kompleks III, koji je zaslužan za značajnu proizvodnju ROS-a te da je stupanj inhibicije jači primjenom lipofilnijih statina poput simvastatina (161).

Također, *in vitro* ispitivanja kao i pretklinička na pokusnim životinjama su pokazala da statini smanjuju angiotenzinom II inducirani oksidacijski stres u kardiomiocitima i glatkim mišićnim stanicama krvne žile inhibicijom Rac-1, malog G-proteina, koji utječe na aktivnost NADH oksidaze (162,163). Simvastatin i pravastatin djelovali su antioksidativno protiv dekstrozom induciranog stresa na endoplazmatskom retikulumu, kao i oksidacijskog stresa na stanicama endotela i HepG2 stanicama (164). Primjena rosuvastatina smanjila je oksidacijski

stres u Wistar štakora izazvanog bukom (46). U *in vivo* ispitivanjima, SIMV je značajno smanjio koncentraciju MDA u plazmi, jetrima, bubregu i mozgu normolipemičnih štakora (135). Prema rezultatima Mohamadina i sur. SIMV (10 mg/kg/dan) je, primijenjen tijekom 5 tjedana u štakora s dijabetesom izazvanim streptozotocinom, djelovao antioksidativno, tj. protektivno na lipidnu peroksidaciju i povećao učinak enzimatskih (SOD i katalaze) i ne-enzimatskih antioksidansa (GSH i vitamin C). Navedeni antioksidacijski učinci SIMV nisu bili uočeni kod kontrolnog standardnog soja štakora (165). Također, njihova *in vitro* ispitivanja su potvrdila antioksidativnu aktivnost SIMV i njegovu uspješnost u hvatanju slobodnih radikala (165).

U kliničkom ispitivanju u kojem je sudjelovalo 151 pacijenata s dijabetesom tipa 2 i liječenih SIMV u dozi od 40 mg ili atorvastatinom u dozi od 10 mg dnevno, oba statina su smanjila plazmatsku koncentraciju MDA i povećali aktivnost glutation peroksidaze i SOD. Bolji učinak na redukciju oksidacijskog stresa pokazao je atorvastatin u odnosu na SIMV (166). U osoba oboljelih od hiperkolesterolemije primjena atorvastatina je smanjila koncentraciju oksidiranog LDL za 17%, a primjena rosuvastatina za 25%, dok je primjena SIMV tijekom 6 mjeseci značajno smanjila koncentracija F_2-8-isoprostaglandina, biljega peroksidacije lipida (167,168).

Učinkovitost SIMV u liječenju hiperkolesterolemije i uporaba kod bolesnika s dijabetesom tipa 2 dobro je dokumentirana. U zdravih osoba čini se da statini ne djeluju na parametre oksidacijskog stresa. Naime, prema rezultatima Rasmussena i sur., primjena SIMV zdravim muškarcima u dozi od 40 mg dnevno tijekom 14 dana nije reducirala specifične biljege unutarstaničnog i izvanstaničnog oksidacijskog stresa (oksidacija DNA i RNA, MDA) kao što nije izazvala niti pad vrijednosti kolesterola (169). Komentar istih autora je da je nevjerojatno da SIMV ima učinke samo na oksidacijski stres u populaciji oboljelih, kao što je dijabetes, gdje je oksidacijski stres izražen.

Ranije je spomenuto (Točke 1.2.1 i 1.3.1.3) da statini inhibicijom aktivnog mjesta HMG-CoA reduktaze, sprječavaju nastanak mevalonata, koji je ključna stepenica u metaboličkom putu ne samo sinteze kolesterola, nego i određenih izoprenoida (12,163). Posljedično, inhibicijom enzima i mevalonata, statini ostvaruju korisne i štetne učinke. Korisni učinci su inhibicija sinteze kolesterola i izoprenoidnih međuprodukata, geranilgeranilpirofosfata i farnesilpirofosfata, odgovornih za prenilaciju proteina. Štetni učinci statina, poput miopatije, nastaju zbog inhibicije sinteze ubikinona ili koenzima Q10, također derivata izoprenoida (170). Ubikinon, regulira mitohondrijsku oksidativnu fosforilaciju i time proizvodnju ATP-a te djeluje kao snažan antioksidant bilo da uklanja

ROS, te time sprječava inicijaciju i diseminaciju oksidacije membrana i/ili da obnavlja stanične antioksidanse, kao što su α-tokoferol i askorbinska kiselina (171). U stvari, statini inhibicijom ubikinona smanjuju antioksidacijski kapacitet mitohondrija, pa se stoga nameće logična pretpostavka da statini mogu djelovati i prooksidativno.

Ovu pretpostavku potvrđuju najnoviji rezultati nekoliko autora. Zenga i Liu (2019) su dokazali da atorvastatin u jetrima dijabetičkih štakora povećava ne samo sekreciju proupalnih čimbenika kao što su IL-1, TNF, IL-6, nego i koncentraciju ROS-a, dok smanjuje aktivnost antioksidantnih enzima (SOD i CAT) (172). U kliničkom ispitivanju u kojem je sudjelovalo 33 statin-*naive* bolesnika s dijabetesom tipa 1 ili 2, pretilošću i hipertenzijom, tj. bolesnika s povećanim oksidacijskim stresom, primjena SIMV u dozi od 40 mg ili atorvastatina u dozi od 10 mg dnevno tijekom 12 tjedana je izazvala je značajno smanjenje koenzima Q10 (173). Također, tijekom ispitivanog perioda nije došlo do značajnih promjena u koncentracijama mijeloperoksidaze i MDA.(173). U zaključku isti autori dovode u pitanje mogući pleiotropni učinak statina na oksidacijski stres.

Fassett i sur. su objavili *post hoc* analizu randomiziranog placebom kontroliranog kliničkog ispitivanja u kojem je ispitan učinak atorvastatina u dozi od 10 mg/dnevno u odnosu na oksidacijski stres kod bolesnika s kroničnom bolesti bubrega. Dokazali su da primjena atorvastatina tijekom 3 godine nije smanjila biljege oksidacijskog stresa, nego je suprotno očekivanom izazvala porast MDA, statistički značajan porast F2-isoprostaglandina, te statistički značajno smanjenje aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu (174).

1.5.5.2 Fibrati i oksidacijski stres

Kao i kod statina, rezultati ispitivanja fibrata na parametre oksidacijskog stresa u nekliničkim ispitivanjima nisu jednoznačni. Tako su Aviram i sur. u *in vitro* studijama uočili da gemfibrozil smanjuje stvaranje oksidiranih LDL kolesterola, te posredno tomu smanjuje i aterogeni potencijal lipoproteina (158). Kao aktivatori PPARα, bezafibrat i FENO su *in vitro* uvjetima povećali ekspresiju gena za CuZnSOD, a sam FENO i za glutation peroksidazu (42,68,175).

Ispitivanja objavljena prije trideset godina su pokazala da klofibrat i procetofen značajno smanjuju aktivnost SOD i glutation peroksidaze u jetrima Wistar štakora oba spola (izraženije u ženki), dok je aktivnost katalaze u oba spola bila povećana (izraženije u

mužjaka) (176). Ispitujući učinke fenofibrata na parametre oksidacijskog stresa, Ciriolo i sur. (1984) su u jetrima štakora mužjaka dokazali izraziti pad aktivnosti superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze, dok je koncentracija MDA bila značajno povećana. Porast MDA jasno ukazuje na lipidnu peroksidaciju (177).

Primjena FENO kod miševa tijekom dva tjedna izazvala je povećanje koncentracije vodikovog peroksida, te ukupnog i oksidiranog glutationa u jetrima. Istovremeno, povećana lipidna peroksidacija nije dokazana, vjerojatno zbog prisutnosti velike koncentracije ubikinona (178). Sedmodnevna primjena FENO kod štakora je značajno smanjila plazmatske koncentracije MDA (19). S druge strane, gemfibrozil je kod štakora značajno povećao koncentraciju MDA u plazmi, jetrima i bubregu (135). Utjecaj fenofibrata na oksidacijski stres ispitan je u kliničkim ispitivanjima kod bolesnika s hipertrigliceridemijom i metaboličkim sindromom (179–182). Kliničkim ispitivanjem primjene bezafibrata kod osoba oboljelih od hiperkolesterolemije uočena je smanjena lipidna peroksidacija (168).

Iz priloženog je vidljivo da su podaci o antioksidacijskim i oksidacijskim učincima statina i fibrata kako u pretkliničkim tako i u kliničkim istraživanjima prilično heterogeni. Prema Frijhoffu i sur. (2015) razlozi takve heterogenosti mogu biti npr. različite metode koje su korištene za utvrđivanje oksidacijskog stresa, kao i nehomogenost patofiziološka stanja i bolesti u kojima su istraživanja oksidacijskog stresa provedena (142). Stoga se i dalje traži specifični biljeg za oksidacijski stres u određenoj bolesti.

U Uvodnom dijelu o kolinesterazama (Točka 1.4.1) istaknuto je da je acetilkolin ne samo neurotransmitor nego i protuupalna molekula, te da se danas intenzivno ispituje kolinergički protuupalni put. U kontekstu te činjenice, stvorena je pretpostavka da PChE može predstavljati upalni biljeg kod sistemskih upala blažeg stupnja (98,183). Stoga je važno poznavati lijekove koji povećavajući ili smanjujući katalitičku aktivnost PChE mogu indirektno utjecati na kolinergički protuupalni put. Pritom je važno naglasiti da i oksidacijski stres pridonosi upalnom procesu. U ovom istraživanju ispitivani su učinci simvastatina, rosuvastatina i fenofibrata kod normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora ne samo na PChE, nego i na biljege oksidacijskog stresa (MDA, glutation i SOD), kako bi utvrdili da li antilipidni lijekovi djelovanjem na aktivnost PChE i biljege oksidacijskog stresa mogu indirektno utjecati na upalni proces, što u konačnosti mogu biti njihovi korisni i/ili štetni učinci. Obzirom na činjenicu da PChE osim ACh hidrolizira niz sintetskih estera poput butiriltiokolina i sukcinilkolina, u ovom radu je katalitička aktivnost enzima mjerena s dva supstrata, acetiltiokolinom i butiriltiokolinom. Namjera je bila utvrditi da li je smjer promjena u aktivnosti PChE jednak bez obzira na korišteni supstrat.

2 HIPOTEZA

1. Višekratna primjena simvastatina i rosuvastatina kod normolipemičnih kao i simvastatina kod hiperlipemičnih štakora povećava katalitičku aktivnost pseudokolinesteraze i superoksid-dismutaze, povećava koncentraciju reduciranog glutationa, a smanjuje koncentraciju malondialdehida. U normolipemičnih štakora povećanje aktivnosti PChE i SOD, povećanje koncentracije GSH, te smanjenje koncentracije MDA biti će izraženije nakon primjene simvastatina, nego rosuvastatina.

2. Višekratna primjena fenofibrata kod normolipemičnih kao i kod hiperlipemičnih štakora povećava aktivnost PChE, smanjuje aktivnost SOD, smanjuje koncentraciju GSH i povećava koncentraciju MDA.

3 CILJEVI RADA

OPĆI CILJEVI

Ispitati postoji li razlika u aktivnosti PChE i vrijednostima parametara oksidacijskoga stresa nakon primjene statina različite lipofilnosti, te fibrata između normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora.

SPECIFIČNI CILJEVI

Kod normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora istražiti utjecaj višekratne primjene različitih doza rosuvastatina, simvastatina i fenofibrata na:

1. katalitičku aktivnost PChE u mozgu, plazmi i jetrima;
2. katalitičku aktivnost SOD u mozgu, plazmi i jetrima;
3. vrijednosti koncentracija MDA u mozgu, plazmi i jetrima;
4. vrijednosti koncentracija GSH u mozgu, plazmi i jetrima;
5. vrijednosti koncentracija triglicerida i HDL-kolesterola.

Utvrditi:

- da li postoji razlika u djelovanju na PChE i parametre oksidacijskoga stresa u mozgu obzirom na različiti stupanj lipofilnosti između simvastatina i rosuvastatina;
- da li postoji razlika u antioksidacijskim učincima između simvastatina i rosuvastatina (tj. statina kao grupe) s jedne strane i fenofibrata, tj. fibrata s druge strane;
- da li se učinci simvastatina na PChE i parametre oksidacijskoga stresa razlikuju između normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora;
- učinke fenofibrata na PChE i parametre oksidacijskoga stresa, te da li su ti učinci isti kod normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora;
- da li su učinci simvastatina, rosuvastatina i fenofibrata u normolipemičnih štakora ovisni o dozi;
- da li postoje razlike između rosuvastatina, simvastatina i fenofibrata u učincima na trigliceride i HDL-kolesterol između normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Životinje

Za istraživanje su korištena ukupno 130 muških štakora. Od ukupnog broja, njih 108 pripada standardnom soju normolipemičnih Wistar štakora (vlastiti uzgoj Zavoda za Farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu), mase 250-300 g i starosti 2-3 mjeseca. Preostala 22 štakora bila su genetski hiperlipemična, mase 250-300 g i starosti 2 mjeseca (HsdHlr:ZUCKER-*Lepr*^{fa}), proizvođača Envigo, Harlan iz Italije. Životinje su tijekom svih pokusa boravile u prostorijama s reguliranim 12-satnim ciklusom svjetla i temperaturom 22-24°C sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Hranjeni su normalnom, komercijalno dostupnom štakorskom hranom. Za obavljanje pokusa dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (Ur. Broj: 04-76/2007-391).

4.2 Ispitivane supstancije

U eksperimentima su korišteni antilipidni lijekovi: rosuvastatin (CAS-147098-20-2) (Crestor®, AstraZeneca, Hrvatska) (ROSU), simvastatin (CAS-79902-63-9) (Lipex®, Merck Sharp & Dohme, Haarlem Nizozemska) (SIMV) i fenofibrat (CAS-49562-28-9) (Tricor® Recipharm Fontaine, Francuska) (FENO) u obliku tableta.

4.2.1 Odabir doza

Napomena: Fizikalni pojam tjelesna masa u daljnjem tekstu zamijenjen je pojmom tjelesna težina, koji se u farmakološkom nazivlju uobičajeno koristi pri odabiru doza u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima.

Rosuvastatin (ROSU)

5 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je ekvivalentna humanoj dozi od 0,8 mg/kg tjelesne težine dnevno. Prosječna težina čovjeka je 60-70 kg, a maksimalna dnevna doza za liječenje hiperkolesterolemije je 40 mg dnevno. Prema tome doza ROSU od 5 mg/kg/dan odabrana za ovo istraživanje je približno jednaka preporučenoj maksimalnoj dnevnoj dozi u čovjeka.

10 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je dva puta veća od maksimalne dnevne doze koja se u čovjeka preporučuje za liječenje hiperkolesterolemije.

Simvastatin (SIMV)

10 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je ekvivalentna humanoj od 1,6 mg/kg tjelesne težine dnevno. Maksimalna dnevna doza SIMV za liječenje hiperkolesterolemije je 80 mg/dan, što znači da je doza SIMV od 10 mg/kg/dan nešto veća od maksimalne dnevne doze u čovjeka koja se preporučuje za liječenje hiperkolesterolemije.

50 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je oko pet puta veća od maksimalne dnevne doze koja se u čovjeka preporučuje za liječenje hiperkolesterolemije.

Fenofibrat (FENO)

30 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je ekvivalentna humanoj od 4,8 mg/kg tjelesne težine dnevno. Maksimalna dnevna doza FENO za liječenje hiperkolesterolemije je 267 mg/dan, što znači da je doza FENO od 30 mg/kg/dan odabrana za ovo istraživanje približno jednaka preporučenoj maksimalnoj dnevnoj dozi u čovjeka.

50 mg/kg tjelesne težine dnevno. Odabrana doza je nešto manje od 2 puta veća od maksimalne dnevne doze koja se u čovjeka preporučuje za liječenje hiperkolesterolemije.

4.3 Postupci sa životinjama

Primjena svih antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora, te fiziološke otopine u kontrolnim skupinama istih sojeva životinja provodila se jednom dnevno, između 9 i 10 sati, tijekom 21 dan. Ispitivani antilipidni lijekovi primjenjivani su u obliku suspenzije *per os* putem gastričke sonde. Suspenzije su dobivene miješanjem homogeniziranih tableta pojedinog antilipidnog lijeka i fiziološke otopine. U svim pokusima je ukupna dnevna doza pojedinih antilipidnih lijekova suspendirana u 5 mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne težine životinja.

4.3.1 Normolipemični štakori

Normolipemični štakori (N=108) bili su nasumice raspoređeni u 6 eksperimentalnih (N=10) i 6 kontrolnih skupina (N=8). U svakoj eksperimentalnoj skupini životinje su primale po jedan lijek u jednoj dnevnoj dozi: ROSU (5 i 10 mg/kg tjelesne težine), SIMV (10 i 50 mg/kg tjelesne težine) i FENO (30 i 50 mg/kg tjelesne težine).

4.3.2 Hiperlipemični štakori

Hiperlipemični štakori (N=22) bili su nasumice raspoređeni u dvije eksperimentalne skupine (N=8) i jednu kontrolnu skupinu (N=6). Svakoj eksperimentalnoj skupini primijenjen je jednom dnevno ili SIMV u dozi od 50 mg/kg tjelesne težine ili FENO u dozi od 30 mg/kg tjelesne težine.

4.3.3 Kontrolne skupine

Kontrolne skupine normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora su dobivale 5 mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne mase *per os* dnevno putem gastričke sonde. Katalitička aktivnost PChE mjerena s dva supstrata (acetiltiokolinom i butiriltiokolinom), aktivnost SOD te koncentracije MDA i GSH u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora su predstavljale bazične vrijednosti, na osnovu kojih se zaključivalo da li je primjena antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama oba soja životinja izazvala promjene navedenih parametara te da li su promjene bile statistički značajne.

4.3.4 Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala

Žrtvovanje životinja je provedeno 22. dana nakon završene primjene pojedinih antilipidnih lijekova i fiziološke otopine, te 12-satnog noćnog gladovanja. Sve životinje su bile podvrgnute općoj anesteziji inhalacijom dietil-etera, jer se pokazalo da dietil-eter u odnosu na druge anestetike ne mijenja aktivnost PChE (184). Žrtvovanje se provelo postupkom uzimanja venske krvi direktno iz srca do eksangvinacije. Tako dobivena krv pohranjena je u heparinizirane epruvete kako bi se iz plazme izvršila određivanja aktivnosti PChE i SOD-a te koncentracije MDA, reduciranog glutationa, triglicerida i HDL kolesterola. Od uzoraka tkiva korišteni su cijeli mozgovi mase 1,8-2,2 grama i komadići jetre mase 0,7-0,98 grama. Uzorci tkiva su prije pohrane homogenizirani s fiziološkom otopinom u omjeru 1:4 te centrifugirani pri 3500 G između 15-20 minuta (Rotofix-32 Hettich, Njemačka). Dobiveni supernatanti korišteni su za određivanje aktivnosti PChE i SOD-a, te koncentracije MDA i GSH. Uzorci plazme i supernatanti jetre i mozga su do trenutka mjerenja bili pohranjeni su u zamrzivaču na temperaturi od -80°C.

4.4 Biokemijske metode

4.4.1 Određivanje katalitičke aktivnosti pseudokolinesteraze u mozgu i plazmi

Katalitička aktivnost PChE u plazmi i mozgu mjerena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu i suradnicima koristeći butiriltiokolin (BTCh) i acetiltiokolin (ATCh) kao supstrate (185). Otopina za mjerenje načinjena je od 1 mL mješavine pufera (3 mL 0,1 M fosfatni pufer) i reagensa (100 µL 0,38 mM 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoične kiseline) – DTNB). U istu otopinu dodano je 100 µL BTCh odnosno ATCh kao supstrata te 50 µL plazme ili supernatanta mozga. Kao slijepa proba korištena je otopina pufera, reagensa i supstrata, bez uzorka plazme i supernatanta mozga. Spektrofotometrijsko određivanje brzine reakcije provedeno je na spektrofotometru (HPV 220-Iskra, Slovenija) mjerenjem promjene apsorbancije tijekom 3 minute pri temperaturi 25ºC i valnoj duljini od 412 nm. Katalitička aktivnost PChE izražena je kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po mililitru plazme odnosno gramu tkiva (µmol/min/mL, µmol/min/g).

4.4.2 Određivanje katalitičke aktivnosti pseudokolinesteraze u jetrima

Mjerenje katalitičke aktivnosti PChE u jetrima je također provedeno prema metodi po Ellmanu i suradnicima (185). S obzirom da tkivo jetre sadrži obje kolinesteraze za određivanje katalitičke aktivnosti PChE u jetrima rabljen je etopropazin, specifični inhibitor BuChE. U prvom djelu određena je ukupna aktivnost kolinesteraza na način kako je prethodno opisano za određivanje aktivnosti u plazmi i mozgu pri čemu se umjesto uzorka plazme odnosno mozga u otopinu za mjerenje dodalo 100 µL supernatanta jetre. U drugom djelu određena je aktivnost AChE uz dodatak 100 µL etopropazina u otopinu za mjerenje. Razlika između ukupne aktivnosti i aktivnosti AChE predstavljala je aktivnost PChE. Kao supstrati korišteni su BTCh i ATCh. Katalitička aktivnost PChE izražena je kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu tkiva jetre (µmol/min/g).

4.4.3 Određivanje koncentracije malondialdehida u tkivima mozga i jetre

Određivanje koncentracije MDA u homogenatima tkiva mozga i jetre provedeno je u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, IMI, prema

metodi koju su opisali Drury i suradinici (186). Metoda se temelji na vezanju MDA s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje ružičasti spoj koji apsorbira svjetlost valne duljine od 538 nm. Kao standard za baždarnu krivulju korišten je 1,1,3,3-tetraetoksi propan. Daljnja oksidacija spriječena je dodavanjem butiliranog hidroksitoluena (BHT).
Otopina za mjerenje sadržavala je 50 µL supernatanta tkiva mozga ili jetre, 5 µL BHT (0,2%, w/v), 750 µL fosforne kiseline (1%, v/v), 250 µL TBA (0,6%, w/v) te 445 µL vode.
Uzorci s reagensima su promiješani i inkubirani u kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Reakcija je zaustavljena hlađenjem u vodi te je 20 µL priređene otopine injektirano je u tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). HPLC sastoji se od uređaja koji uklanja otopljene plinove, izokratne i gradijentne pumpe, termostatiranog prostora za kolonu, UV i fluorescentnog detektora (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Pretkolona i analitička kolona su C-18 obrnute faze (LiChrospher, Merck, Darmstadt, Njemačka) s česticama veličine 5 µm. Dimenzije pretkolone su 4,0 x 4,0, a kolone 4,0 x 125,0 mm.

Iz mobilne faze koja se sastojala od 50 mM KH_2PO_4 i metanola (60:40, v/v, pH 6,8) uklonjen je otopljeni zrak u ultrazvučnoj kupelji (15 minuta). Protok mobilne faze bio je 1 mL/min. MDA je mjeren UV detektorom pri valnoj duljini od 532 nm. Injektirano je 20 µm uzorka, a temperatura kolone je bila 32ºC. Pri tim uvjetima vrijeme zadržavanja MDA na koloni bilo je 2,5 minute. Koncentracija MDA u tkivima mozga i jetre izražena je kao mikromol po litri (µmol/L).

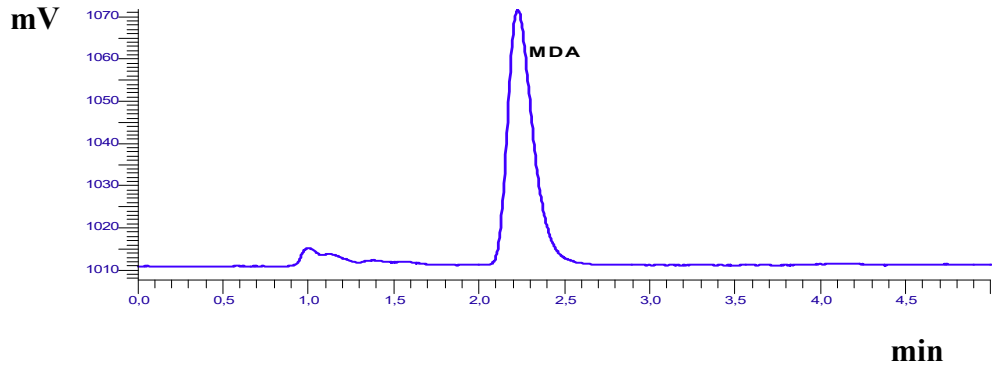
4.4.4 Određivanje koncentracije malondialdehida u plazmi

Mjerenja koncentracije MDA u plazmi provodila su se u Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografija Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Koncentracije malondialdehida u plazmi određene su HPLC-om (Shimadzu, Nexera) korištenjem komercijalno dostupnog kita (Chromsystems Instruments and Chemicals, Order no. 67000, Chromsystems Instruments and Chemicals GmbH, Njemačka), prema uputama proizvođača. Priprema uzoraka se temelji na taloženju proteina nakon čega slijedi derivatizacija. HPLC sustav sastojao se od fluorescentnog detektora (RF-$20A_{XS}$), izokratične pumpe (LC-$20AD_{XR}$), termostata kolone (CTO-20A), autoinjektora (SIL-30_{AC}), odplinjača (DGU-20A5) i kontrolne jedinice (CBM-20A). Za prikupljanje i obradu podataka iz detektora korišten je LabSolutions software (Shimadzu).

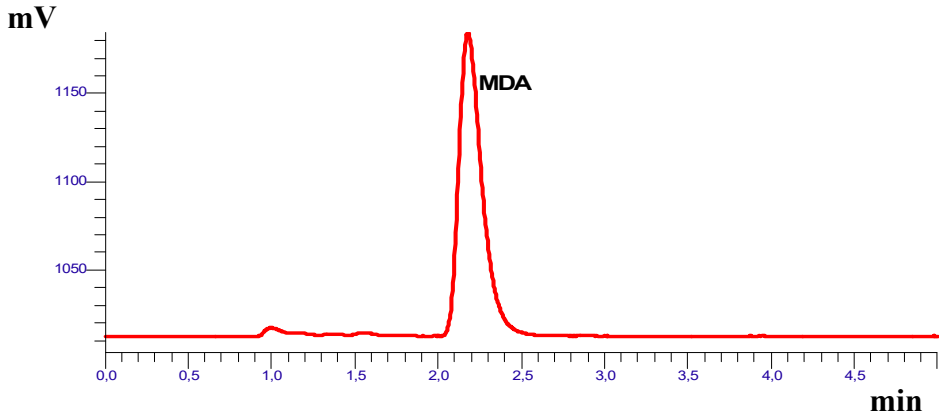
Kromatografski uvjeti. HPLC kolona za analizu malondialdehida u plazmi i odgovarajuća predkolona su u ponudi istog proizvođača (Order no. 67100, Chromsystems GmbH, Njemačka). Protok pokretne faze: izokratično, 1,0 mL/min; tlak oko 125 bara. Detektor: fluorescentni detektor (Shimadzu). Valna duljina od 515 nm (ekscitacija) i 553 nm (emisija). Temperatura kolone: 25°C. Vrijeme analize: 5 minuta. Volumen injektiranja: 20 µL.

Priprema uzoraka. U označene bočice, zaštićene od svjetla pipetirano je 100 µL plazme (kalibrator, kontrole, uzorci) i 500 µL reagensa za taloženje te su uzorci vorteksirani a zatim centrifugirani 5 minuta na 13 000 o/min. 500 µL supernatanta je prebačeno u označene bočice za derivatizaciju i u svaku bočicu je dodano 100 µL reagensa za derivatizaciju, bočice su začepljene, kratko vorteksirane te stavljene na inkubaciju 60 minuta na 95°C. Nakon inkubacije, bočice s uzorkom su naglo ohlađene pod mlazom hladne vode. Zatim je u ohlađenu smjesu dodano 500 µL pufera za neutralizaciju. 20 µL pripremljenog uzorka injektirano je na kolonu. Koncentracija MDA u plazmi izražena je kao mikromol po litri (µmol/L). Usporedba kontrolnog i testiranog uzorka prikazana je na slici 4.1.

a) kromatogram kontrolnog uzorka



b) kromatogram testiranog uzorka



Slika 4.1 Kromatogram kontrolnog i testiranog uzorka

4.4.5 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u tkivima mozga i jetre

Određivanje aktivnosti SOD u supernatantima mozga i jetre štakora provedena su uJedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, IMI, inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin-oksidaza po metodi Flohé i Ötting (187).

U svrhu određivanja aktivnosti korištene su kemikalije od Sigma Chemical Co., SAD: pufer – otopina fosfatnog pufera (50 mmol/L, pH = 7,8) s etilendiaminotetraoctenom kiselinom (EDTA) pripremljena otapanjem 3,72 mg EDTA u 100 mL fosfatnog pufera, otopina A pripremljena miješanjem otopina citokroma C (0,05 mmol/L u puferu) i ksantina (1 mmol/L u 1 mmol/L NaOH) u omjeru 1:10 (v/v), otopina B pripremljena razrjeđivanjem osnovne otopine ksantin-oksidaze aktivnosti 35,51 IU/mL u puferu do konačne aktivnosti 0,059 IU/ml, te otopine standarda u koncentraciji od 0,02 do 0,1 mg/mL pripremljene razrjeđivanjem osnovne otopine SOD-a iz goveđih eritrocita koncentracije 1 mg/ml u puferu. Stupanj inhibicije redukcije citokroma c predstavlja mjeru katalitičke aktivnosti SOD-a mjerene spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm, a očituje se porastom apsorbancije praćenim tijekom 3 min pri temperaturi od 25°C. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50%-tnu inhibiciju redukcije citokroma c na baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Katalitička aktivnost SOD-a u uzorcima jetre i mozga izražena je kao $IU/g_{proteina}$.

4.4.6 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u plazmi

Mjerenja aktivnosti SOD u plazmi provodila su se u Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografija Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Aktivnost SOD u plazmi je određena imunoenzimskim testom, ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), korištenjem komercijalno dostupnog ELISA kompleta Calbiochem® Superoxide Dismutase Assay Kit II, Cat. No. 574601 (Calbiochem/EMD Millipore Corporation, San Diego, CA). Ovaj ELISA test koristi tetrazolijevu sol za detekciju superoksidnih radikala. U reakciji se tetrazolijeva sol reducira u formazansku boju koja apsorbira svjetlost valne duljine 450 nm, a superoksidni radikali se oksidiraju u molekularni kisik. Nastali molekularni kisik se ksantin-oksidazom reducira u superoksidni radikal, a nastali nusprodukti su vodikov peroksid i mokraćna kiselina.

Komercijalni ELISA kit je sadržavao mikrotitarsku pločicu, pufer za ispitivanje (assay buffer, 5 mL), pufer za uzorke (sample buffer, 5 mL), detektor radikala - otopina tetrazolijeve soli (radical detector, 250 µL), SOD standarde - otopina goveđe eritrocitne SOD (Cu/Zn) (100 µL) i ksantin-oksidazu (150 µL). Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Svi uzorci i SOD standardi su analizirani u duplikatu. Postupak: u sve jažice na mikrotitarskoj pločici dodano je 200 µL pripremljenog detektora radikala. Zatim je u određenu jažicu dodano 10 µL standarda ili 10 µL uzorka. Reakcija je započeta dodatkom 20 µL ksantin-oksidaze. Pločica je inkubirana na tresilici 20 min na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je izmjerena na 450 nm na čitaču mikropločica (Gladiator Iason, Graz, Austrija). Katalitička aktivnost SOD-a u plazmi izražena je kao IU/mL.

4.4.7 Određivanje koncentracije reduciranog glutationa u plazmi i tkivima mozga i jetre

Koncentracija GSH u plazmi i tkivima mozga i jetre štakora mjerena je u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, IMI, spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (188).

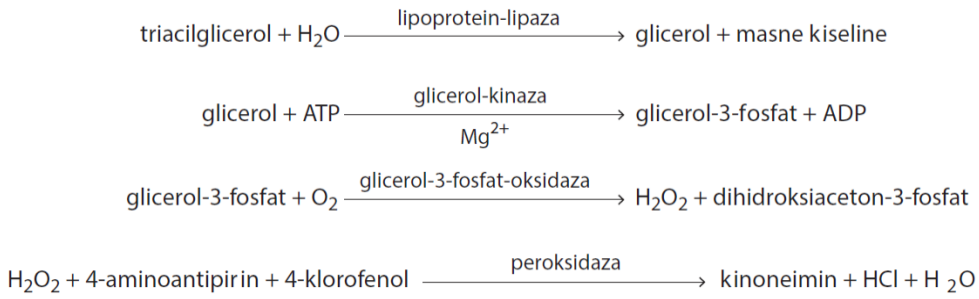
Metoda se temelji na vezanju glutationa (tiola) s 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom (DTNB). U ovoj brzoj reakciji cijepa se disulfidna veza te nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (NTB), koji se ionizira do NTB^{2-} koji je žute boje i apsorbira svjetlost valne duljine od 412 nm. U 300 µL supernatanta dodano je 100 µL TCA (5%-tne otopine). Smjesa je promiješana na tresilici i centrifugirana 10 minuta na 10 000 G. Pripremljene su otopine slijepe probe, standarda GSH i uzoraka za mjerenje apsorbancije na 412 nm (100 µL H_2O/100 µL standarda/100 µL supernatanta tkiva ili plazme, 850 µL fosfatnog pufera i 50 µL DTNB). Apsorbancija GSH mjerena je u triplikatu. DTNB je dodan neposredno prije mjerenja apsorbancije svakog uzorka jer je nestabilan pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak promiješan je na vortex mješalici. Mjerenje je provedeno tako da se paralelno mjerila apsorbancija slijepe probe i standarda ili pojedinih uzoraka. Koncentracija GSH iz uzoraka izračunata je iz formule Lamber-Beerovog zakona, prema kojem je apsorbancija bezdimenzijska veličina, jednaka umnošku molarnog koeficijenta apsorpcije (ε) izražene jedinicom mol/L (mjera sposobnosti neke tvari da apsorbira i raspršti zračenje), debljini sloja otopine (l) izražene u centimetrima i koncentracije (*c*): $A = \varepsilon\ l\ c$ ili iz baždarnog dijagrama. Koncentracija GSH izražena je kao mikrogram po mililitru (µg/mL).

4.4.8 Određivanje koncentracije triglicerida i HDL kolesterola u plazmi

Koncentracije triglicerida i HDL kolesterola u plazmi štakora mjerene su u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Poliklinike Bonifarm spektrofotometrijski standardnim enzimatskim metodama na analizatoru Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) korištenjem originalnih reagensa tvrtke Roche Diagnostics.

4.4.8.1 Trigliceridi

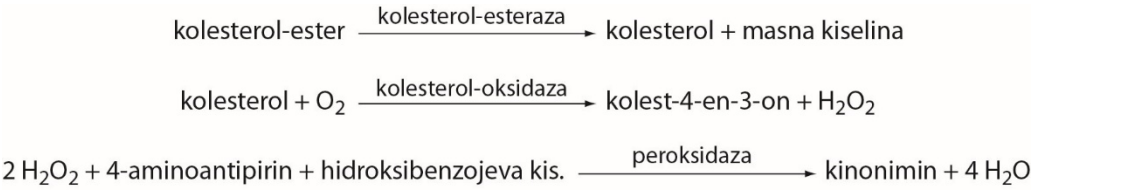
Načelo metode (Shema 4.4.8.1): Enzimatska, kolorimetrijska metoda (GPO/PAP) s glicerol-fosfat-oksidazom. Trigliceridi se hidroliziraju pomoću lipoprotein-lipaze (LPL) na glicerol i masne kiseline. Glicerol se zatim fosforilira u glicerol-3-fosfat u prisustvu ATP-a u reakciji koju katalizira glicerol-kinaza (GK). Glicerol-fosfat-oksidaza (GPO) oksidira glicerol-3-fosfat u dihidroksiaceton-3-fosfat i vodikov peroksid (H_2O_2). U prisutnosti peroksidaze (POD), vodikov peroksid reagira s 4-klorofenolom i 4-aminofenazonom i nastaje crveno obojeni kinoniminski produkt. Povećanje apsorbancije se mjeri na 512 nm i direktno je proporcionalno koncentraciji triacilgricerola u uzorku. Koncentracija triacilglicerola izražena je kao mmol/L.



Shema 4.4.8.1 Određivanje koncentracije triglicerida kolorenzimskom (PAP) metodom
**Preuzeto iz: Lovrić J. Priručnik za vježbe iz medicinske kemije i biokemije. 3. izdanje. Medicinska naklada. Str.149.*

4.4.8.2 HDL kolesterol

Načelo metode: Homogena enzimatska kolorimetrijska metoda. U prisutnosti magnezijevih iona i dekstran-sulfata nastaju u vodi topivi kompleksi LDL, VLDL i hilomikrona koji su otporni na PEG-modificirane enzime. Koncentracija HDL kolesterola se određuje enzimatski pomoću enzima: kolesterol-esteraze i kolesterol-oksidaze koje su vezane amino skupinama s PEG-om (~40%). Kolesterol-esteraza razgrađuje kolesterol estere na kolesterol i masne kiseline. U prisutnosti kisika, kolesterol-oksidaza oksidira kolesterol u kolest-4-en-3-on i vodikov peroksid (H_2O_2). U prisutnosti peroksidaze vodikov peroksid reagira sa 4-aminoantipirinom i HSDA [natrij N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin] i nastaje plavo obojeni kinoniminski produkt. Povećanje apsorbancije se mjeri na 583 nm i direktno je proporcionalno koncentraciji HDL kolesterola u uzorku. Koncentracija HDL kolesterola izražena je kao mmol/L.



Shema 4.4.8.2 Određivanje koncentracije kolesterola kolorenzimskom (PAP) metodom
**Preuzeto iz: Lovrić J. Priručnik za vježbe iz medicinske kemije i biokemije. 3. izdanje. Medicinska naklada. Zagreb 2017. str.151.*

4.5 Analiza podataka

4.5.1 Statistička analiza podataka

Analiza podataka obavljena je uporabom statističkog kompjuterskog programa GraphPad Prism (verzija 6) licenciranim na Centar za NMR Instituta Ruđer Bošković. Razlika među skupinama analizirala se uporabom parametrijskih, odnosno neparametrijskih statističkih testova, ovisno o raspodjeli dobivenih podataka. Svi primijenjeni testovi su dvosmjerni. P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim (189).

4.5.2 Prikaz rezultata

Za normolipemične štakore rezultati u tablicama su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija ($\bar{x}$ ± S.D.), a na slikama su navedene pojedinačne vrijednosti i p-vrijednosti, horizontalna crta označava aritmetričku sredinu. Rezultati za hiperlipemične štakore u tablicama su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i p – vrijednost (ANOVA). Na slikama su navedene pojedinačne vrijednosti i p-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom, horizontalna crta označava aritmetričku sredinu.

5 REZULTATI

Rezultati su prikazani tablično i grafički. Statistički značajni rezultati označeni su u tablicama podebljano i kao p vrijednost.

5.1 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze u plazmi, jetrima i mozgu mjerena acetiltiokolinom i butiriltiokolinom

5.1.1 Normolipemični štakori

A. Plazma

Rosuvastatin

ATCh. Katalitička aktivnost PChE nije se značajno promijenila pri primjeni ROSU u manjoj dozi (5 mg/kg/dan). Značajan porast aktivnosti PChE za 20% (p = 0,008) u odnosu na kontrolnu vrijednost izmjeren je nakon primjene veće doze ROSU (10 mg/kg/dan) (Tablica 5.1.1. i Slika 5.1.1 A).

BTCh. Obje doze ROSU (5 i 10 mg/kg/dan) izazvale su značajan i jednak porast aktivnosti PChE za 14% (p = 0,019 i p = 0,001) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrijednosti (Tablica 5.1.1 i Slika 5.1.1 B).

Tablica 5.1.1 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u plazmi normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ACTh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina (ROSU) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE plazma / ATCh (μM/min/mL)	PChE plazma / BTCh (μM/min/mL)
kontrola 1	0,35 ± 0.042 (n = 7)	0,07 ± 0,006 (n = 8)
ROSU 5 mg/kg/dan	0,37 ± 0.042 (n = 10)	**0,08 ± 0,014** (n = 10) **(p = 0,019)**
kontrola 2	0,34 ± 0,058 (n = 8)	0,07 ± 0.006 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	**0,41 ± 0,027** (n = 8) **(p = 0,008)**	**0,08 ± 0,011** (n = 10) **(p = 0,001)**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Simvastatin

ATCh. Manja doza SIMV (10 mg/kg/dan) nije značajno promijenila katalitičku aktivnost PChE. Značajan porast aktivnosti PChE za 22% ($p = 0,029$) u odnosu na kontrolnu vrijednost izmjeren je nakon primjene veće doze SIMV (50 mg/kg/dan) (Tablica 5.1.2 i Slika 5.1.1.C).

BTCh. Obje doze SIMV izazvale su značajan porast aktivnosti enzima za 17% ($p = 0,041$) i 57% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.1.2 i Slika 5.1.1. D).

Tablica 5.1.2 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u plazmi normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene simvastatina (SIMV) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE plazma / ACTh (μM/min/mL)	PChE plazma / BTCh (μM/min/mL)
kontrola 1	0,31 ± 0,060 (n = 8)	0,06 ± 0,006 (n = 7)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,31 ± 0,085 (n = 10)	**0,07 ± 0,013** (n = 9) **p = 0,041**
kontrola 2	0,31 ± 0,063 (n = 8)	0,07 ± 0,010 (n = 8)
SIMV 50 mg/kg/dan	**0,38 ± 0,048** (n = 7) **p = 0,029**	**0,11 ± 0,005** (n = 8) **p < 0,001**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Fenofibrat

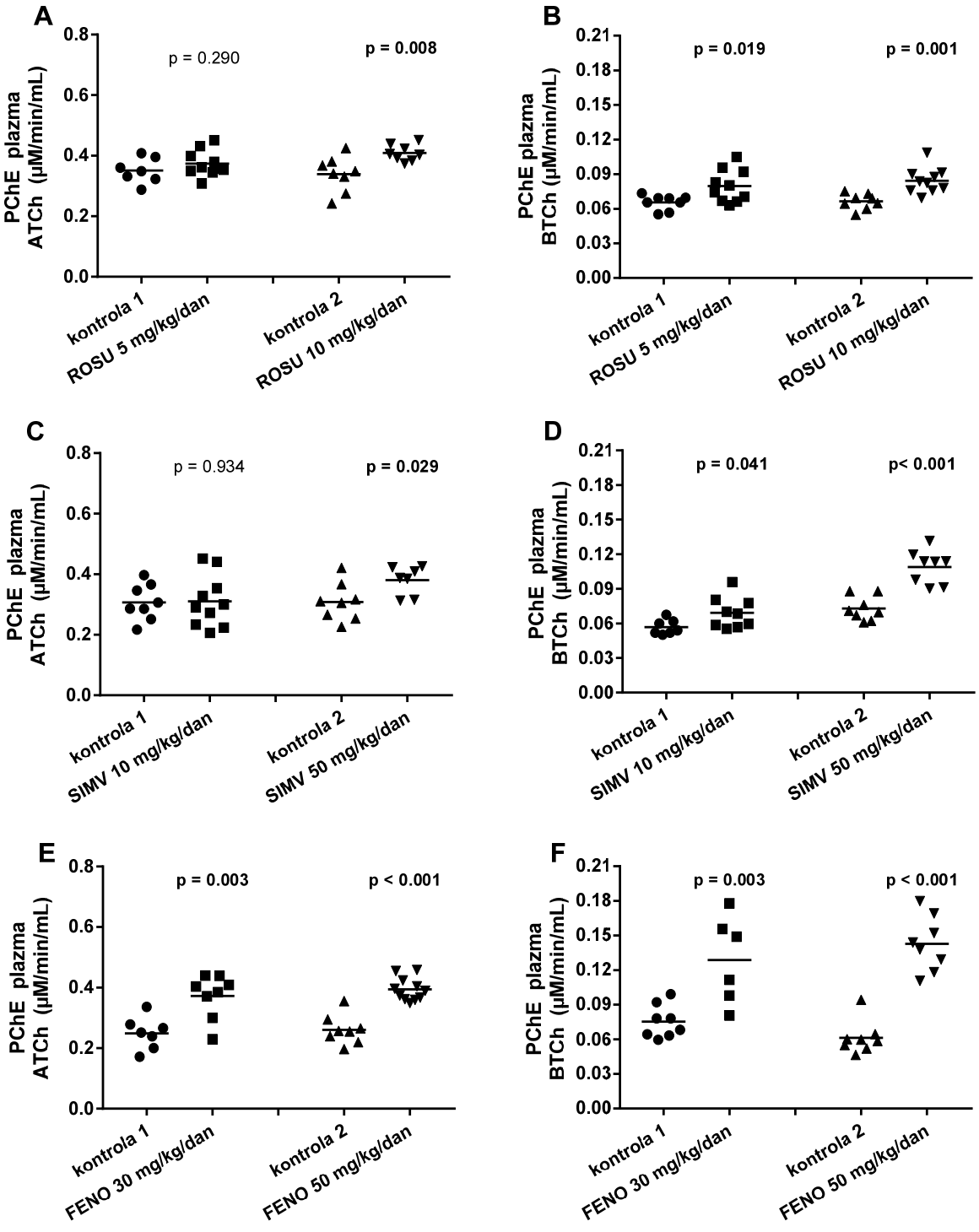
ATCh. Obje doze FENO izazvale su značajan i gotovo identičan porast katalitičke aktivnosti PChE za 48% ($p = 0,003$) i 46% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.1.3 i Slika *5.1.1 E).*

BTCh. Pri primjeni obje doze FENO (30 i 50 mg/kg/dan) izmjeren je značajan porast aktivnosti PChE za 62% ($p = 0,003$) i 133% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.1.3 i Slika 5.1.1 F).

Tablica 5.1.3 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u plazmi normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE plazma / ACTh (μM/min/mL)	PChE plazma / BTCh (μM/min/mL)
kontrola 1	0,25 ± 0,049 (n = 7)	0,08 ± 0,014 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	**0,37 ± 0,073** (n = 8) **p = 0,003**	**0,13 ± 0,038** (n = 6) **p = 0,003**
kontrola 2	0,26 ± 0,049 (n = 8)	0,06 ± 0,014 (n = 8)
FENO 50 mg/kg/dan	**0,38 ± 0,022** (n = 8) **p < 0,001**	**0,14 ± 0,024** (n = 8) **p < 0,001**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.1.1 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u plazmi normolipemičnih štakora mjerena supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

B. Jetra

Rosuvastatin

ATCh. Samo je manja doza ROSU izazvala statistički značajno povećanje katalitičke aktivnosti PChE za 113% (p = 0,008) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je pri većoj dozi aktivnost enzima bila slična kontrolnoj vrijednosti (Tablica 5.1.4 i Slika 5.1.2 A).

BTCh. Statistički značajno povećanje aktivnosti PChE za 65% (p = 0,022) u odnosu na kontrolu izmjereno je nakon primjene manje doze, dok je veća doza izazvala pad aktivnosti PChE za 30%, koji nije bio značajan (Tablica 5.1.4 i Slika 5.1.2 B).

Tablica 5.1.4 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u jetrima normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina (ROSU) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE jetra / ATCh (μM/min/g)	PChE jetra / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,30 ± 0,125 (n = 5)	0,54 ± 0,274 (n = 7)
ROSU 5 mg/kg/dan	**0,64 ± 0,223** (n = 9) **p = 0,008**	**0,89 ± 0,277** (n = 10) **p = 0,022**
kontrola 2	0,49 ± 0,248 (n = 7)	0,64 ± 0,341 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	0,45 ± 0,207 (n = 10)	0,45 ± 0,148 (n = 8)

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Simvastatin

ATCh. Bez značajnih promjena u aktivnosti PChE nakon primjene obje doze SIMV (Tablica 5.1.5 i slika 5.1.2 C).

BTCh. Bez značajnih promjena u aktivnosti PChE nakon primjene obje doze SIMV (Tablica 5.1.5 i slika 5.1.2 D).

Tablica 5.1.5 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u jetrima normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene simvastatina (SIMV) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE jetra / ATCh (μM/min/g)	PChE jetra / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,46 ± 0,222 (n = 8)	0,62 ± 0,058 (n = 5)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,35 ± 0,107 (n = 10)	0,67 ± 0,180 (n =7)
kontrola 2	0,58 ± 0,165 (n = 8)	0,79 ± 0,292 (n = 6)
SIMV 50 mg/kg/dan	0,69 ± 0,207 (n = 7)	0,82 ± 0,177 (n = 5)

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Fenofibrat

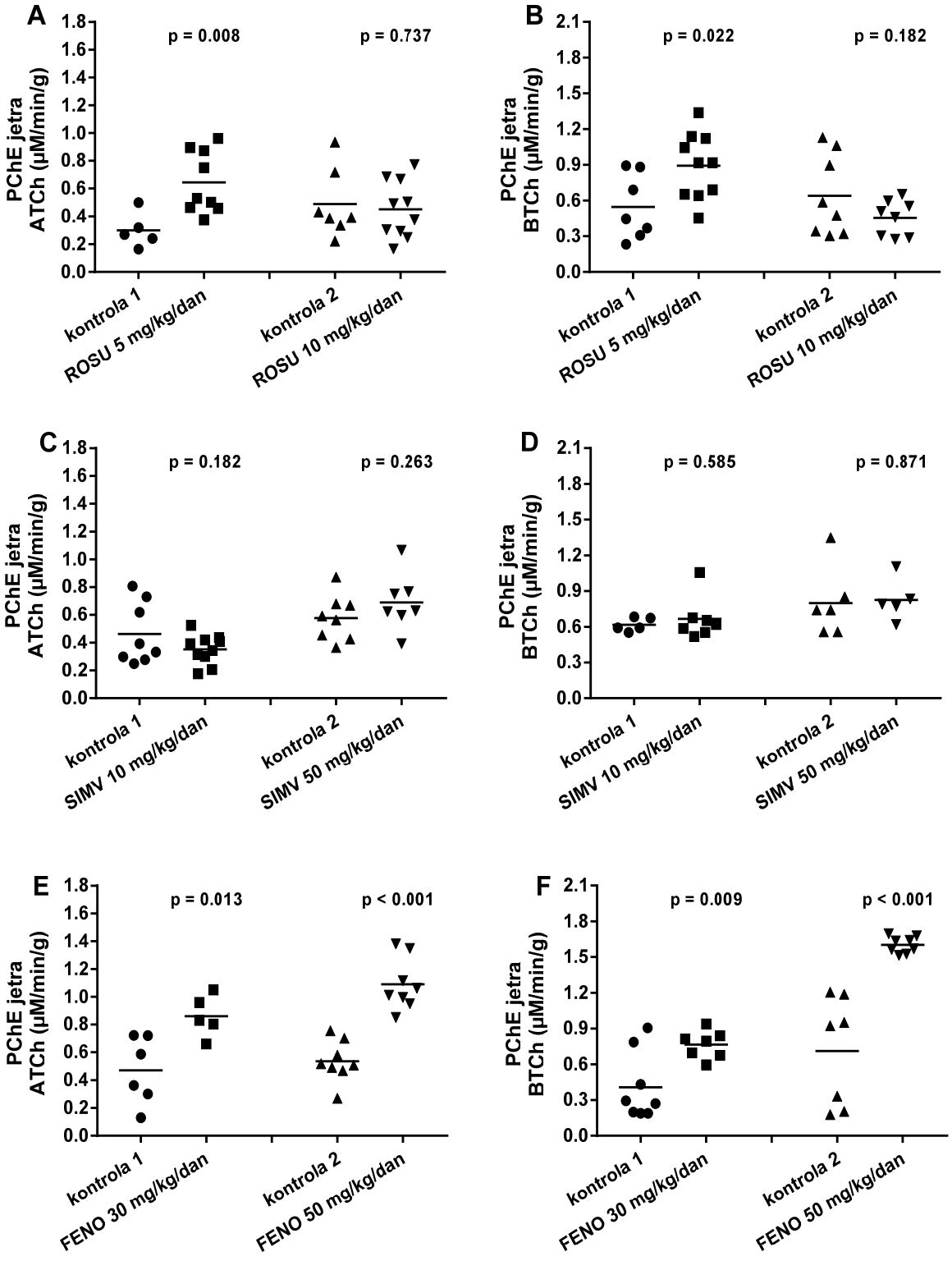
ATCh. Obje doze FENO izazvale su značajan porast aktivnosti enzima za 83% (p = 0,013) i 102% (p < 0,001) (Tablica 5.1.6 i slika 5.1.2 E).

BTCh. Obje doze FENO izazvale su značajan porast aktivnosti enzima za 85% (p = 0,009) i 125% (p < 0,001) (Tablica 5.1.6 i Slika 5.1.2 F).

Tablica 5.1.6 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u jetrima normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ACTh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE jetra / ATCh (μM/min/g)	PChE jetra / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,47 ± 0,243 (n = 6)	0,41 ± 0,284 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	**0,86 ± 0,150** (n = 5) **(p = 0,013)**	**0,76 ± 0,115** (n = 7) **p = 0,009**
kontrola 2	0,54 ± 0,149 (n = 8)	0,71 ± 0,458 (n = 7)
FENO 50 mg/kg/dan	**1,09 ± 0,187** (n = 8) **(p < 0,001)**	**1,60 ± 0,669** (n = 8) **(p < 0,001)**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.1.2 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u jetrima normolipemičnih štakora mjerena supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

C. Mozak

Rosuvastatin

ATCh. Obje doze ROSU nisu značajno promijenile katalitičku aktivnost PChE (Tablica 5.1.7 i Slika 5.1.3 A) u odnosu na kontrolne vrijednosti.

BTCh. Veća doza ROSU (10 mg/kg/dan) značajno je povećala aktivnost PChE za 17% (p = 0,003) (Tablica 5.1.7 i Slika 5.1.3 B).

Tablica 5.1.7 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u mozgu normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina (ROSU) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE mozak / ATCh (μM/min/g)	PChE mozak / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,35 ± 0,033 (n = 8)	0,07 ± 0,012 (n = 8)
ROSU 5 mg/kg/dan	0,35 ± 0,038 (n = 10)	0,07 ± 0,012 (n = 10)
kontrola 2	0,29 ± 0,044 (n = 8)	0,06 ± 0,006 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	0,30 ± 0,023 (n = 10)	**0,07 ± 0,006** (n = 10) **p = 0,003**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Simvastatin

ACTh. Obje doze SIMV nisu značajno promijenile katalitičku aktivnost PChE (Tablica 5.1.8 i Slika 5.1.3 C).

BTCh. Obje doze SIMV izazvale su značajan i jednak porast aktivnosti enzima za 17% (p = 0,034 i p = 0,043) u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.1.8 i Slika 5.1.3 D).

Tablica 5.1.8 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u mozgu normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene simvastatina (SIMV) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE mozak / ATCh (μM/min/g)	PChE mozak / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,26 ± 0,025 (n = 8)	0,06 ± 0,007 (n = 8)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,28 ± 0,021 (n = 9)	**0,07 ± 0,002** (n = 10) **p = 0,034**
kontrola 2	0,29 ± 0,018 (n = 8)	0,06 ± 0,009 (n = 8)
SIMV 50 mg/kg/dan	0,28 ± 0,006 (n = 8)	**0,07 ± 0,002** (n = 8) **p = 0,043**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).

Fenofibrat

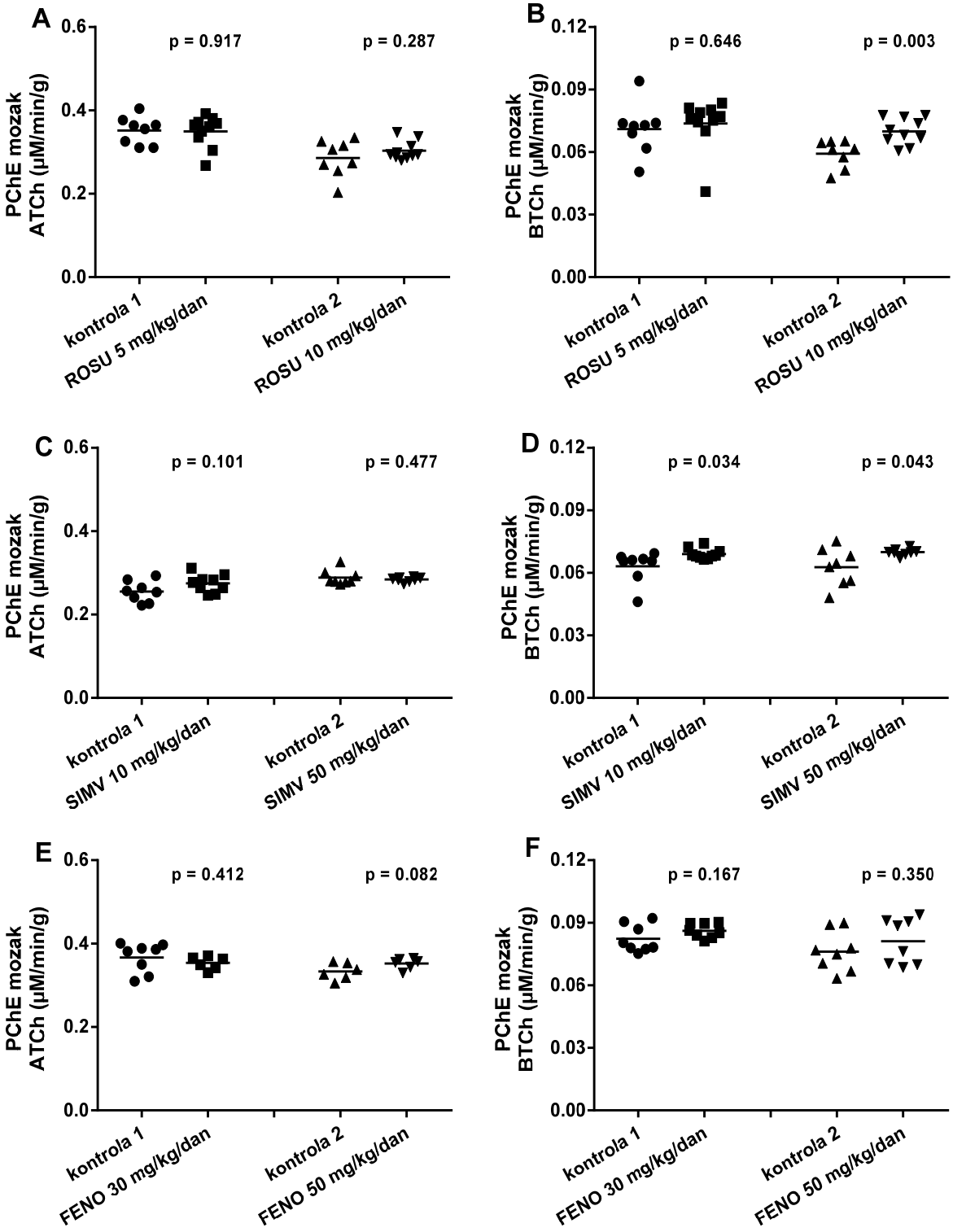
ATCh. Obje doze FENO nisu značajno promijenile katalitičku aktivnost PChE (Tablica 5.1.9 i Slika 5.1.3 E) u odnosu na kontrolne vrijednosti.

BTCh. Obje doze FENO nisu značajno promijenile katalitičku aktivnost PChE (Tablica 5.1.9 i Slika 5.1.3 F) u odnosu na kontrolne vrijednosti.

Tablica 5.1.9 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u mozgu normolipemičnih štakora mjerene supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	PChE mozak / ATCh (μM/min/g)	PChE mozak / BTCh (μM/min/g)
kontrola 1	0,37 ± 0,035 (n = 8)	0,08 ± 0,006 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	0,35 ± 0,016 (n = 8)	0,09 ± 0,003 (n = 8)
kontrola 2	0,33 ± 0,020 (n = 6)	0,08 ± 0,009 (n = 8)
FENO 50 mg/kg/dan	0,35 ± 0,013 (n = 5)	0,08 ± 0,011 (n = 8)

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.1.3 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u mozgu normolipemičnih štakora mjerena supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene rosuvastatina, simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.1.2 Hiperlipemični štakori

A. Plazma

Simvastatin

ATCh. SIMV je u dozi od 50 mg/kg/dan izazvao statistički značajno povećanje aktivnosti PChE za 56% u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p = 0,001$) (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 A).

BCTh. SIMV je u istoj dozi statistički značajno povećao aktivnosti PChE za 94% ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 B).

Fenofibrat

ATCh. FENO je u dozi od 30 mg/kg/dan izazvao značajno povećanje aktivnosti PChE za 84% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 A).

BTCh. U istoj dozi FENO je izazvao značajno povećanje aktivnosti enzima za 144% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 B).

B. Jetra

Simvastatin

ATCh. SIMV je u dozi od 50 mg/kg/dan izazvao statistički značajno povećanje aktivnosti enzima za 40% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 C).

BTCh. SIMV je u istoj dozi izazvao značajno povećanje aktivnosti PChE za 103% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 B).

Fenofibrat

ATCh. FENO je u dozi od 30 mg/kg/dan izazvao značajno povećanje aktivnosti PChE za 59% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 C).

BTCh. Porast aktivnosti PChE od 26% u odnosu na kontrolnu vrijednost nije bio značajan (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 D).

C. Mozak

Simvastatin

ATCh. SIMV je u dozi od 50 mg/kg/dan izazvao statistički značajno povećanje aktivnosti enzima za 18% ($p = 0,008$) (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 E).

BCTh. Pri dozi SIMV od 50 mg/kg/dan porast aktivnosti PChE za 14% je bio značajan u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,001$) (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 F).

Fenofibrat

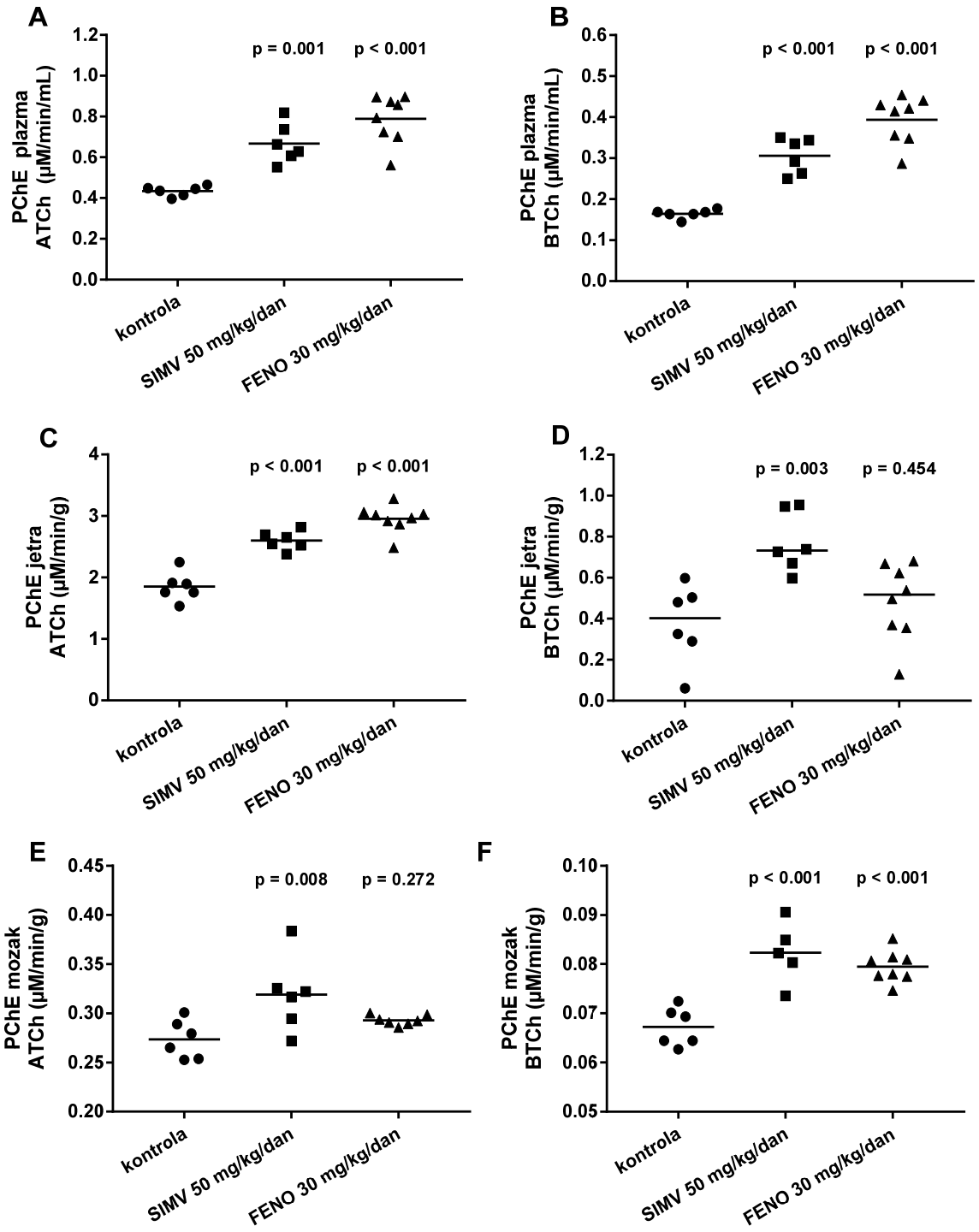
ATCh. Porast aktivnosti PChE za 7% nije bio značajan u odnosu na kontrolu (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 E).

BTCh. Pri dozi FENO od 30 mg/kg/dan porast aktivnosti PChE za 14% je bio značajan u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,001$) (Tablica 5.1.10 i Slika 5.1.4 F).

Tablica 5.1.10 Aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) mjerena supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Varijabla	Kontrola	SIMV 50 mg/kg/dan	FENO 30 mg/kg/dan	P-vrijednost (ANOVA)
PChE plazma / ATCh (µmol/min/mL)	0,43 ± 0,025 (n = 6)	**0.67 ± 0,096** (n = 6) **p = 0,001**	**0,79 ± 0,118** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001
PChE jetra / ATCh (µmol/min/g)	1,85 ± 0,237 (n = 6)	**2,60 ± 0,152** (n = 6) **p < 0,001**	**2,95 ± 0,226** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001
PChE mozak / ATCh (µmol/min/g)	0,27 ± 0,020 (n =6)	**0,32 ± 0,038** (n = 6) **p = 0,008**	0,29 ± 0,005 (n = 7)	0,015
PChE plazma / BTCh (µmol/min/mL)	0,16 ± 0,011 (n = 6)	**0,31 ± 0,043** (n = 6) **p < 0,001**	**0,39 ± 0,06** (n = 8) p< 0,001	< 0,001
PChE jetra / BTCh (µmol/min/g)	0,38 ± 0,193 (n = 6)	**0,77 ± 0,147** (n = 6) **p = 0,003**	0,48 ± 0,189 (n = 8)	0,004
PChE mozak / BTCh (µmol/min/g)	0,07 ± 0,004 (n = 6)	**0,08 ± 0,006** (n = 5) **p < 0,001**	**0,08 ± 0,003** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.) i P – vrijednost (ANOVA). Podebljano – statistički značajno (P vrijednost - Dunettov test).



Slika 5.1.4 Katalitička aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora mjerena supstratima acetiltiokolinom (ATCh) i butiriltiokolinom (BTCh) nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i P-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom. Horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.2 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze u plazmi, jetrima i mozgu

5.2.1 Normolipemični štakori

A. Plazma

Rosuvastatin

Aktivnost SOD je statistički značajno porasla za 17% (p = 0,040) u odnosu na kontrolnu vrijednost nakon primjene ROSU u manjoj dozi (5 mg/kg/dan). Porast aktivnosti istog enzima za 6%, koji nije značajan, dokazan je nakon primjene veće doze ROSU (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.1 A).

Simvastatin

Porast aktivnosti SOD od 11% nakon primjene doze SIMV od 10 mg/kg/dan nije bio značajan. Međutim veća doza SIMV (50 mg/kg/dan) izazvala je značajan porast aktivnosti SOD za 37% (p < 0,001) u odnos na kontrolu (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.1 B). Pri manjoj dozi postoji pad aktivnosti za 16%, a pri većoj porast aktivnosti enzima za 32% u odnosu na kontrolne vrijednosti.

Fenofibrat

Pri manjoj dozi FENO (30 mg/kg/dan), pad aktivnosti SOD za 5% nije bio značajan. Veća doza (50 mg/kg/dan) izazvala je statistički značajni pad aktivnosti SOD za 25% (p = 0,005) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.1 C).

B. Jetra

Rosuvastatin

Obje doze ROSU značajno su smanjile aktivnost SOD za 17% (5 mg/kg/dan; p = 0,018) i 26% (10 mg/kg/dan; p = 0,023) u odnosu na njihove kontrolne vrijednosti (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.2 A).

Simvastatin

Obje doze SIMV nisu značajno promijenile katalitičku aktivnost SOD (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.2 B) u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.2 B). Međutim, pri manjoj dozi postoji trend pada za 16%, a pri većoj dozi trend porasta aktivnosti enzima za 32% u odnosu na kontrolne vrijednosti.

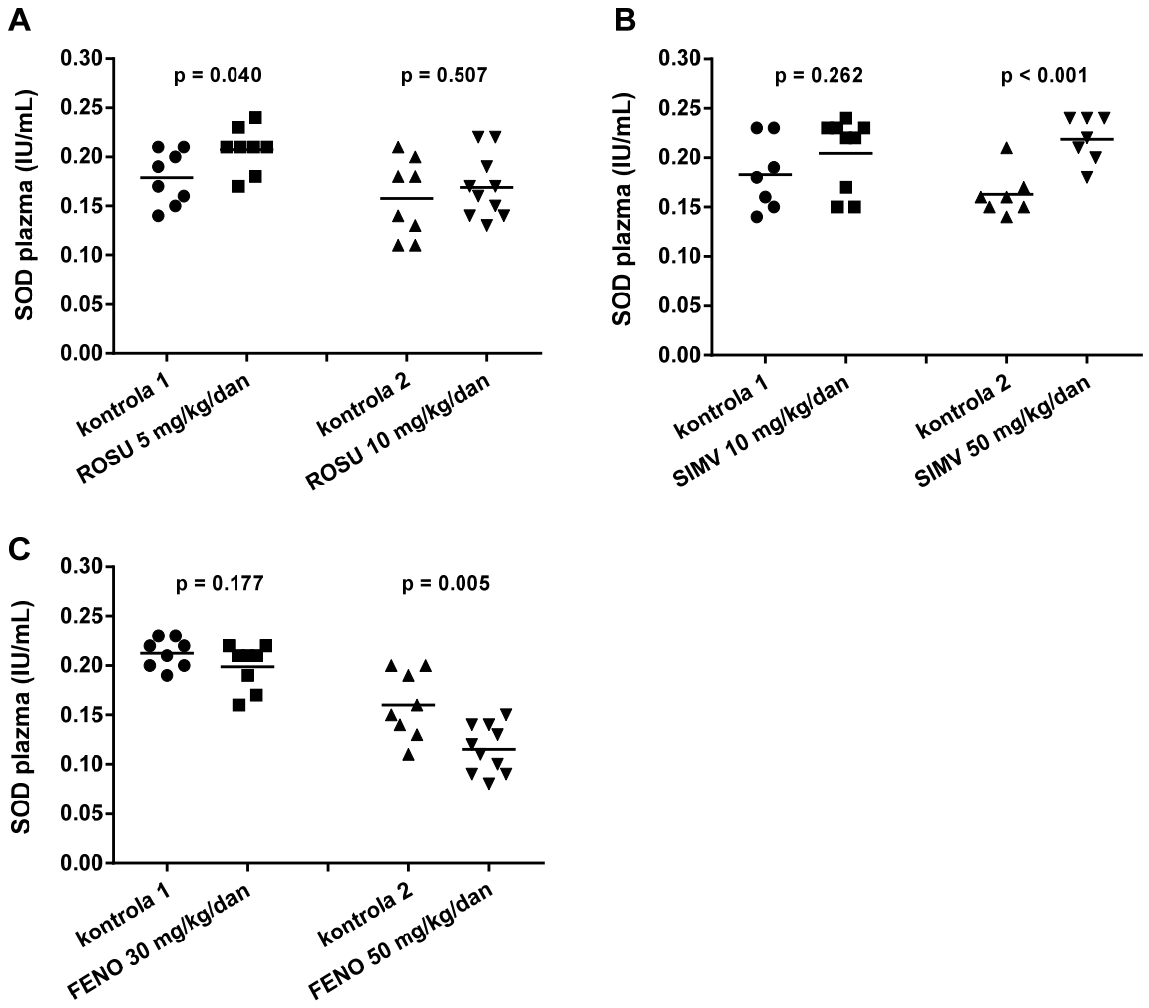
Fenofibrat

Obje doze FENO su značajno smanjile aktivnost SOD za 20% (30 mg/kg/dan; p = 0,024) i 23% (50 mg/kg/dan; p = 0,031) u odnosu na njihove kontrolne vrijednosti (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.2 C).

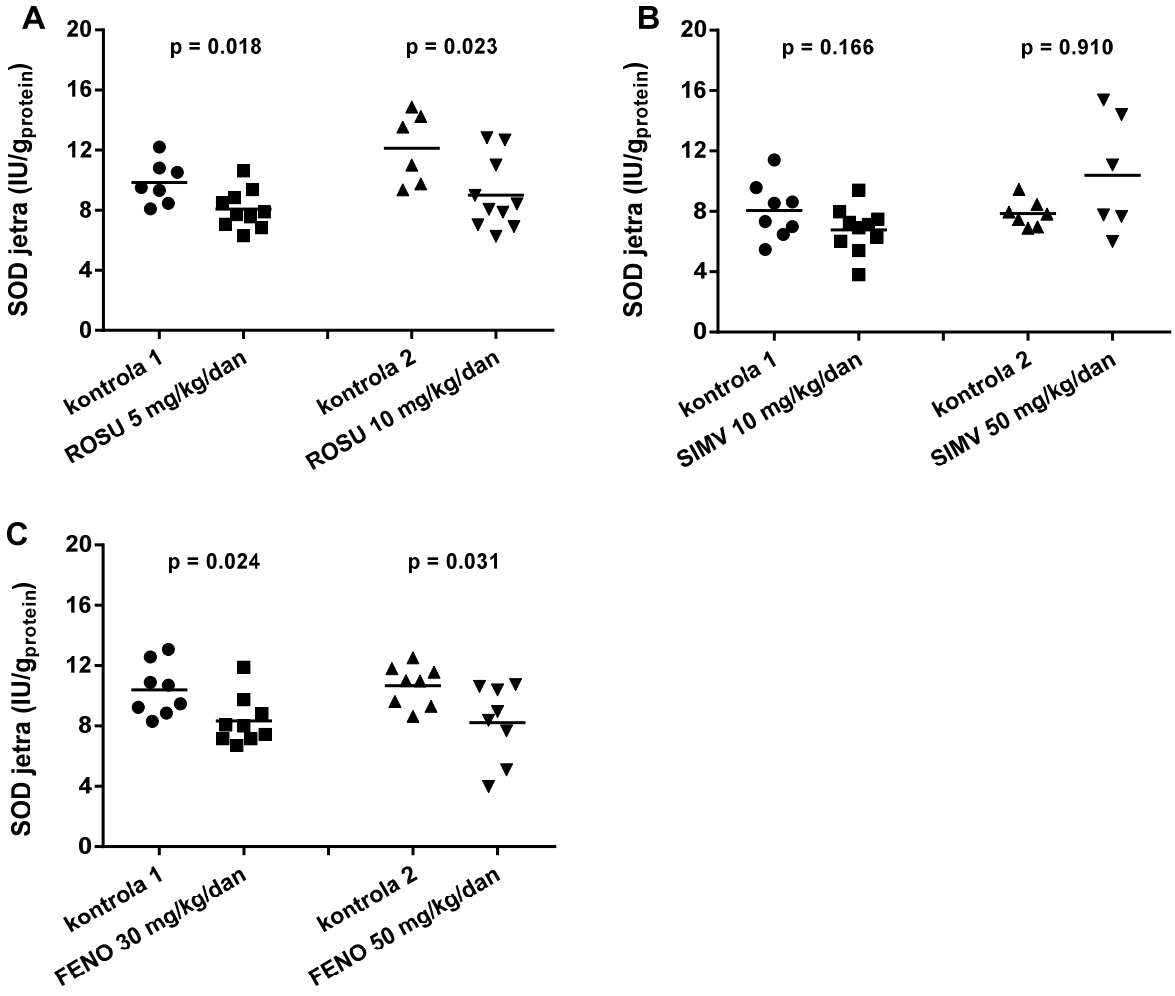
Tablica 5.2.1 Aktivnost superoksid-dismutaze u plazmi, jetrima i mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	Superoksid-dismutaza		
	Plazma (IU/mL)	Jetra (IU/$g_{protein}$)	Mozak (IU/$g_{protein}$)
kontrola 1	0,18 ± 0,027 (n = 8)	9,8 ± 1,44 (n = 7)	6,1 ± 0,50 (n = 6)
ROSU 5 mg/kg/dan	**0,21 ± 0,023** (n = 8) **p = 0,04**	**8,1 ± 1,29** (n = 10) **p = 0,018**	**4,1 ± 0,31** (n = 8) **p = 0,001**
kontrola 2	0,16 ± 0,040 (n = 8)	12,1 ± 2,39 (n = 6)	5,7 ± 0,22 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	0,17 ± 0,032 (n = 10)	**9,0 ± 2,37** (n = 10) **p = 0,023**	7,3 ± 0,92 (n = 6)
kontrola 1	0,18 ± 0,036 (n = 7)	8,1 ± 1,89 (n = 8)	4,9 ± 0,58 (n = 8)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,20 ± 0,037 (n = 9)	6,8 ± 1,52 (n = 10)	**3,9 ± 0,71** (n = 10) **p = 0,004**
kontrola 2	0,16 ± 0,022 (n = 8)	7,9 ± 0,89 (n = 7)	6,2 ± 0,40 (n = 8)
SIMV 50 mg/kg/dan	**0,22 ± 0,023** (n = 7) **p < 0,001**	10,4 ± 3,87 (n = 6)	**3,7 ± 0,80** (n = 9) **p < 0,001**
kontrola 1	0,21 ± 0,015 (n = 8)	10,4 ± 1,73 (n = 8)	4,7 ± 0,89 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	0,20 ± 0,023 (n = 8)	**8,3 ± 1,63** (n = 9) **p = 0,024**	4,3 ± 0,38 (n = 8)
kontrola 2	0,16 ± 0,034 (n = 8)	10,7 ± 1,35 (n = 8)	5,4 ± 0,87 (n = 6)
FENO 50 mg/kg/dan	**0,12 ± 0,025** (n = 10) **p = 0,005**	**8,2 ± 2,55** (n = 8) **p = 0,031**	**8,2 ± 0.82** (n = 7) **p < 0,001**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.2.1 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.2.2 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u jetrima normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

C. Mozak

Rosuvastatin

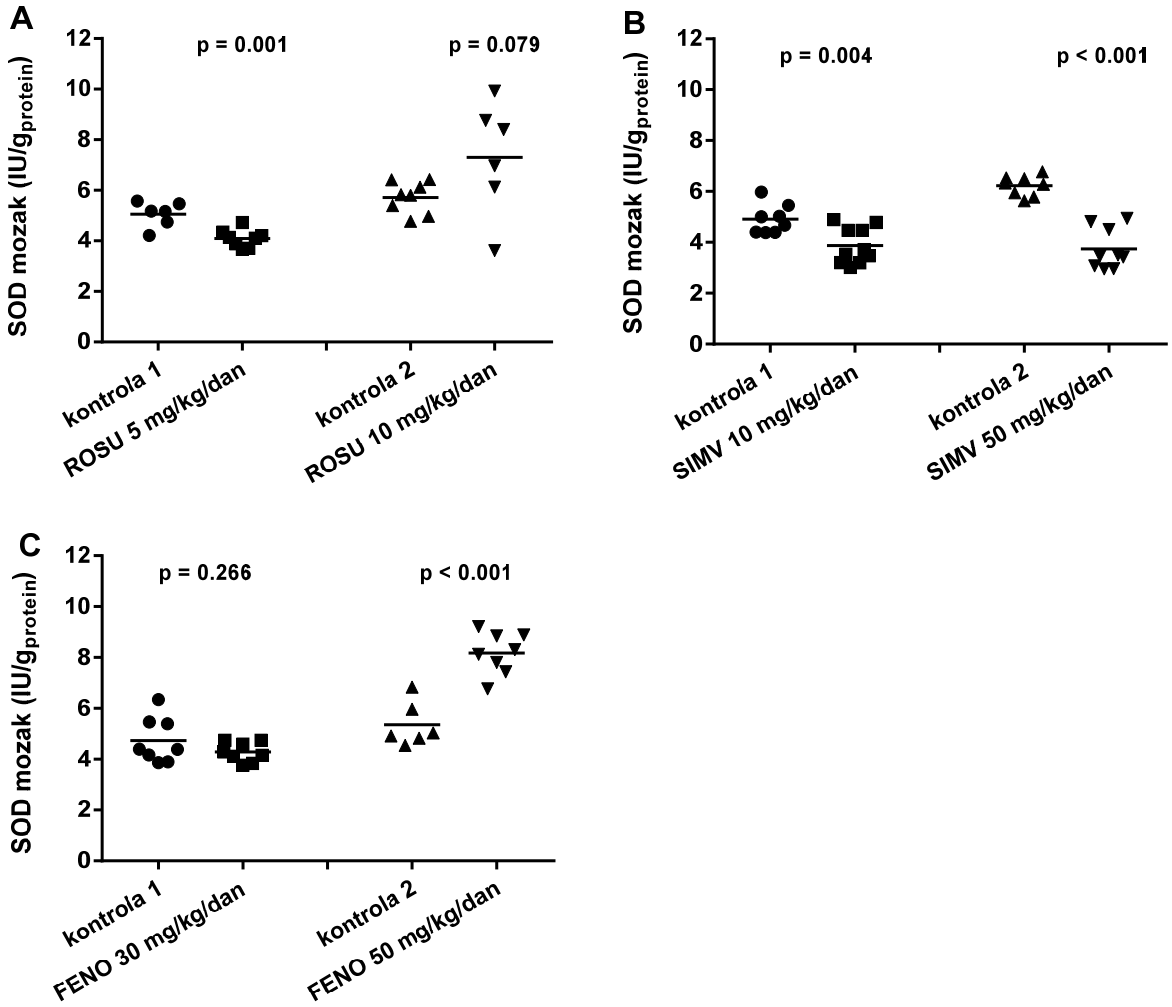
Aktivnost SOD statistički je značajno smanjena za 33% (p = 0,001) samo nakon primjene ROSU u dozi od 5 mg/kg/dan u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.3 A). Pri većoj dozi (10 mg/kg/dan) povećanje aktivnosti za 28% u odnosu na kontrolu nije značajno.

Simvastatin

Obje doze SIMV značajno su smanjile katalitičku aktivnost SOD u odnosu na njihove kontrolne vrijednosti. Pri dozi od 10 mg/kg/dan pad aktivnosti bio je 21% (p = 0,004), a pri dozi od 50 mg/kg/dan za 40% (p < 0,001) (Tablica 5.2.1 i Slika 5.2.3 B).

Fenofibrat

Veća doza FENO (50 mg/kg/dan) izazvala je porast aktivnosti SOD za 52% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu vrijednost, dok pri manjoj dozi (30 mg/kg/dan) pad aktivnosti enzima za 9% nije značajan (Tablica 5.2.1, Slika 5.2.3 C).



Slika 5.2.3 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.2.2 Hiperlipemični štakori

A. Plazma

Simvastatin

Porast aktivnosti SOD za 11% u odnosu na kontrolnu vrijednost nije bio značajan (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 A).

Fenofibrat

Pad aktivnosti SOD za 20% u odnosu na kontrolnu vrijednost nije bio značajan (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 A).

B. Jetra

Simvastatin

Katalitička aktivnost SOD značajno je porasla za 93% ($p = 0,018$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 B).

Fenofibrat

Bez značajnih promjena u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 B).

C. Mozak

Simvastatin

Aktivnost SOD je statistički značajno smanjena za 24% ($p = 0.045$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 C).

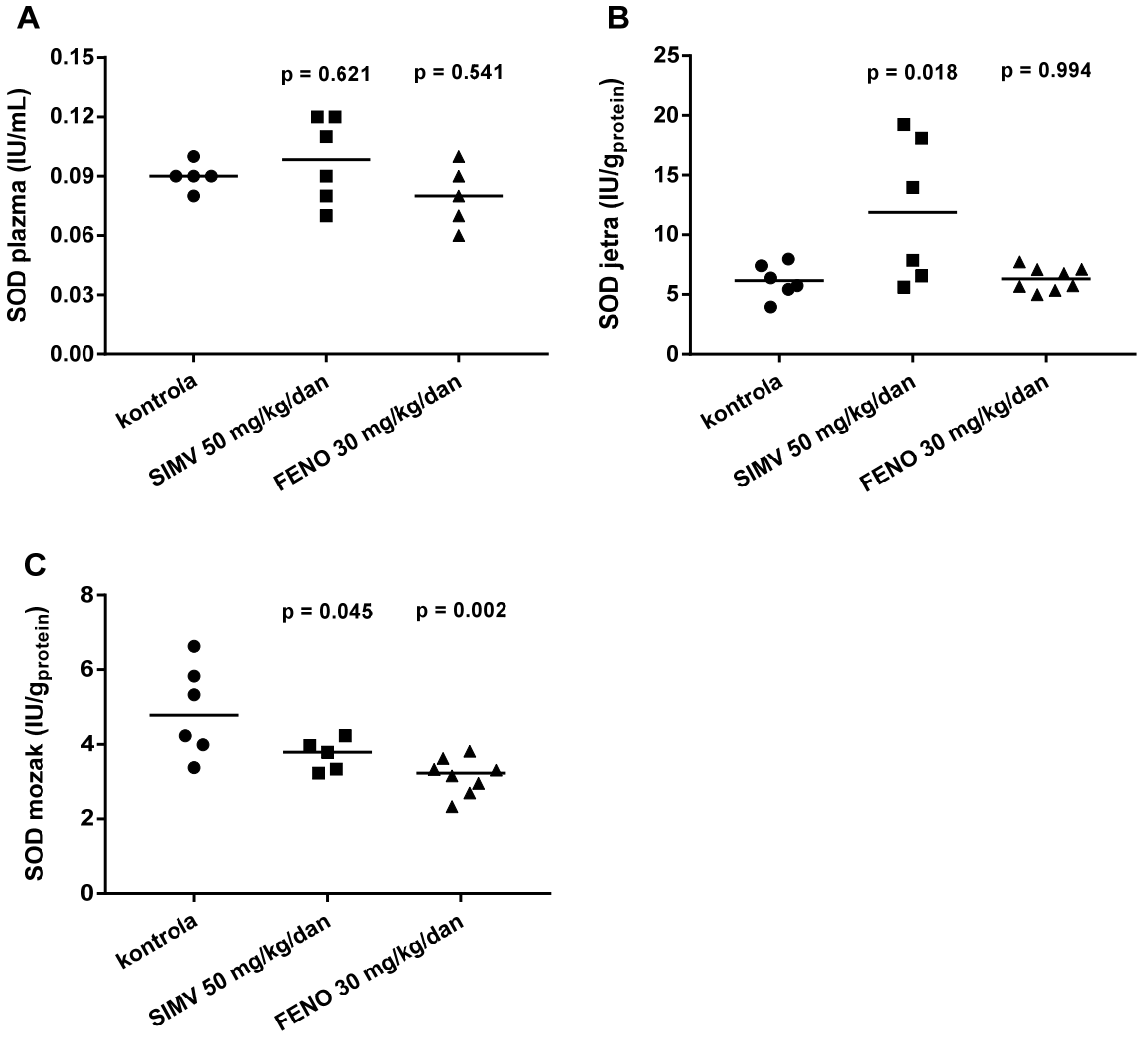
Fenofibrat

Aktivnost SOD je statistički značajno smanjena za 36% ($p = 0,002$) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.2.2 i Slika 5.2.4 C).

Tablica 5.2.2 Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Varijabla	Kontrola	SIMV 50 mg/kg/dan	FENO 30 mg/kg/dan	P-vrijednost (ANOVA)
SOD plazma (IU/mL)	0,09 ± 0,007 (n = 5)	0,10 ± 0,021 (n = 6)	0,08 ± 0,016 (n = 5)	0,219
SOD jetra ($IU/g_{protein}$)	6,15 ± 1,448 (n = 6)	**11,89 ± 6,012** (n = 6) **p = 0,018**	6,31 ± 0,997 (n = 8)	0,012
SOD mozak ($IU/g_{protein}$)	4,90 ± 1,236 (n = 6)	**3,71 ± 0,420** (n = 5) **p = 0,045**	**3,15 ± 0,484** (n = 8) **p = 0,002**	0,003

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.) i P – vrijednost (ANOVA). Podebljano – statistički značajno (P – vrijednost, Dunettov test).



Slika 5.2.4 Katalitička aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i P-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom. Horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.3 Koncentracija malondialdehida u plazmi, jetrima i mozgu

5.3.1 Normolipemični štakori

A. Plazma

Rosuvastatin

Koncentracija MDA je statistički značajno porasla za 15% ($p = 0,008$) u odnosu na kontrolnu vrijednost nakon primjene veće doze ROSU (10 mg/kg/dan). Porast MDA od 10%, ali ne značajan, izmjeren je nakon primjene manje doze ROSU (Tablica 5.3.1 i Slika 5.3.1 A).

Simvastatin

Trend pada koncentracije MDA za 8% u odnosu na kontrolnu vrijednost, koji nije značajan, zamijećen je nakon primjene manje doze SIMV (10 mg/kg/dan). Veća doza SIMV (50 mg/kg/dan) izazvala je statistički značajan pad koncentracije MDA za 20% u odnosu na kontrolu ($p = 0,044$) (Tablica 5.3.1 i Slika 5.3.1 B).

Fenofibrat

Obje doze FENO izazvale su statički značajan pad koncentracije MDA u odnosu na kontrolu. Pri dozi od 30 mg/kg/dan pad koncentracije MDA je iznosio 39% ($p = 0,017$), dok je pri dozi od 50 mg/kg/dan pad koncentracije MDA bio neznatno veći i iznosio je 42% ($p < 0,001$) (Tablica 5.3.1 i Slika 5.3.1 C).

B. Jetra

Niti jedan antilipidni lijek nije značajno promijenio koncentraciju MDA (Tablica 5.3.1 i Slike 5.3.2 A, B i C). Sklonost pada koncentracije MDA postoji nakon primjene obje doze ROSU (17% i 12%), manje doze SIMV (12%) i veće doze FENO (16%).

C. Mozak

Rosuvastatin

Pad koncentracije MDA, ali ne i značajan, izmjeren je nakon primjene ROSU u većoj dozi.

Simvastatin

Statistički značajan pad koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu vrijednost izmjeren je nakon primjene manje doze SIMV i to za 59% ($p < 0,001$), dok je pad koncentracije MDA za 21% nakon primjene veće doze na granici značajnosti ($p = 0,05$) (Tablica 5.3.1 i Slika 5.3.3 B).

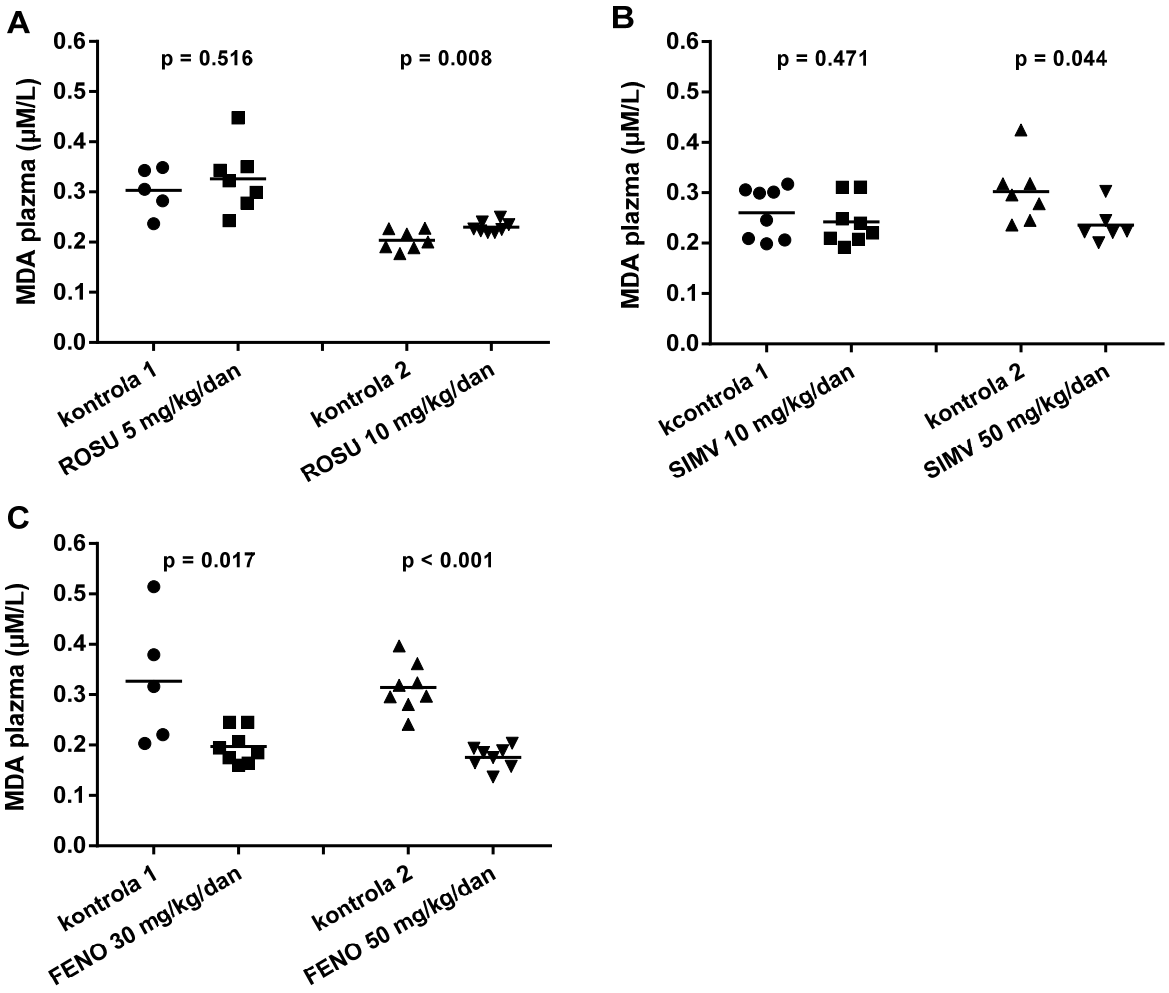
Fenofibrat

Obje doze (Tablica 5.3.1 i Slike 5.3.3 A i C) izazvale su pad MDA za 6% i 24%. U oba slučaja pad nije bio značajan

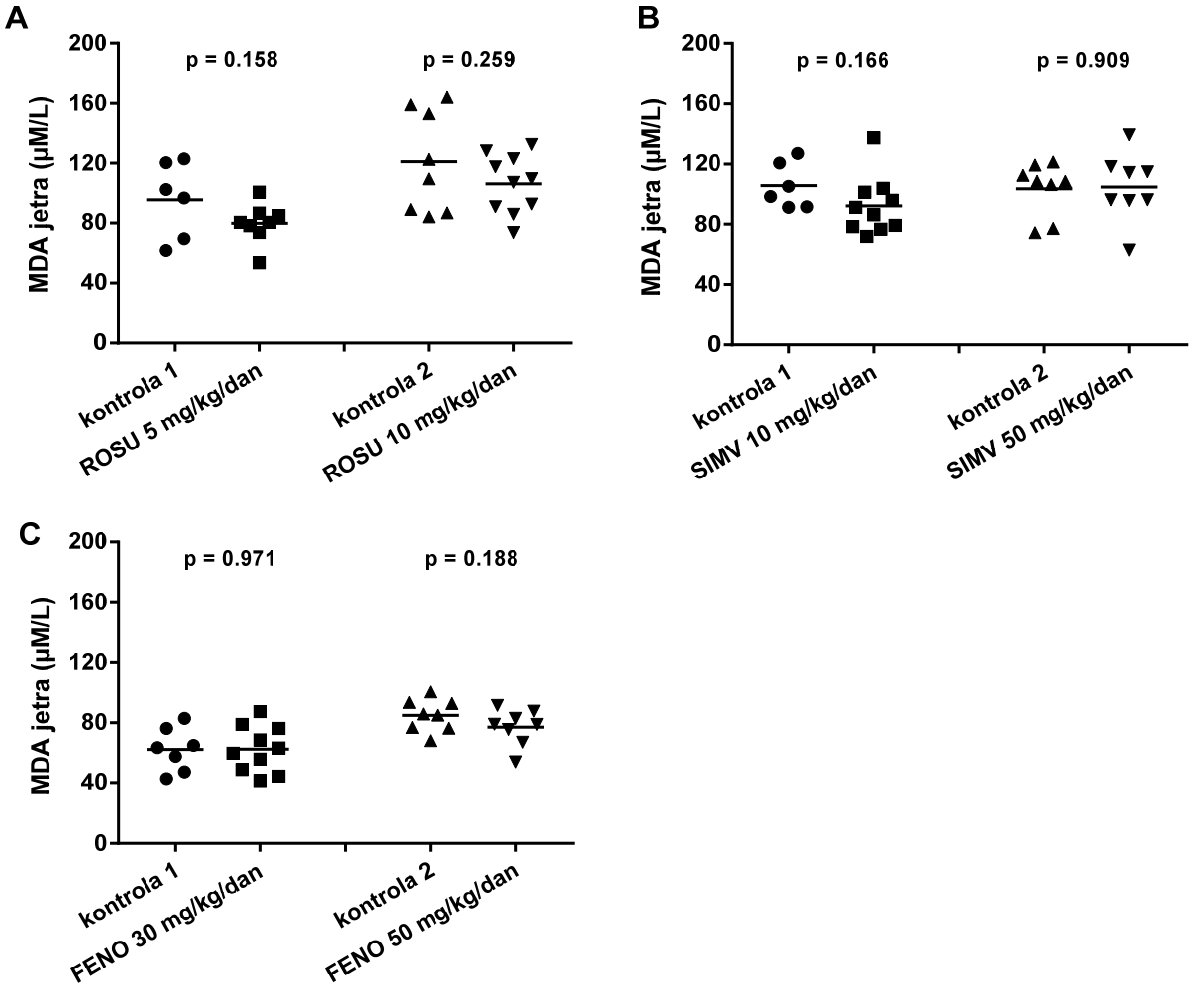
Tablica 5.3.1 Koncentracija malodialdehida u plazmi, jetrima i mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	Malondialdehid		
	Plazma (μmol/L)	Jetra (μmol/L)	Mozak (μmol/L)
kontrola 1	0,30 ± 0,046 (n = 5)	95,6 ± 25,41 (n = 6)	3,04 ± 0,727 (n = 8)
ROSU 5 mg/kg/dan	0,33 ± 0,065 (n = 7)	79,9 ± 13,31 (n = 8)	2,91 ± 0,398 (n = 10)
kontrola 2	0,20 ± 0,020 (n = 7)	121,1 ± 33,81 (n = 8)	2,81 ± 0,237 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	**0,23 ± 0,011** (n = 8) **p = 0,008**	106,2 ± 19,71 (n = 10)	2,65 ± 0,193 (n = 8)
kontrola 1	0,26 ± 0,051 (n = 8)	105,2 ± 15,12 (n = 6)	2,67 ± 0,204 (n = 8)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,24 ± 0,046 (n = 8)	92,3 ± 19,26 (n = 10)	**1,11 ± 0,231** (n = 10) **p < 0,001**
kontrola 2	0,30 ± 0,236 (n = 7)	103,6 ± 17,94 (n = 8)	2,28 ± 0,508 (n = 8)
SIMV 50 mg/kg/dan	**0,24 ± 0,036** (n = 6) **p = 0,044**	104,8 ± 22,54 (n = 8)	1,80 ± 0,218 (n = 6)
kontrola 1	0,33 ± 0,127 (n = 5)	62,2 ± 14,43 (n = 7)	3,51 ± 0,596 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	**0,20 ± 0,033** (n = 8) **p = 0,017**	62,4 ± 15,37 (n = 10)	3,30 ± 0,40 (n = 10)
kontrola 2	0,31 ± 0,048 (n = 8)	85,0 ± 10,70 (n = 8)	2,89 ± 1,018 (n = 8)
FENO 50 mg/kg/dan	**0,18 ± 0,022** (n = 8) **p < 0,001**	71,1 ± 11,95 (n = 8)	2,20 ± 0,13 (n = 7)

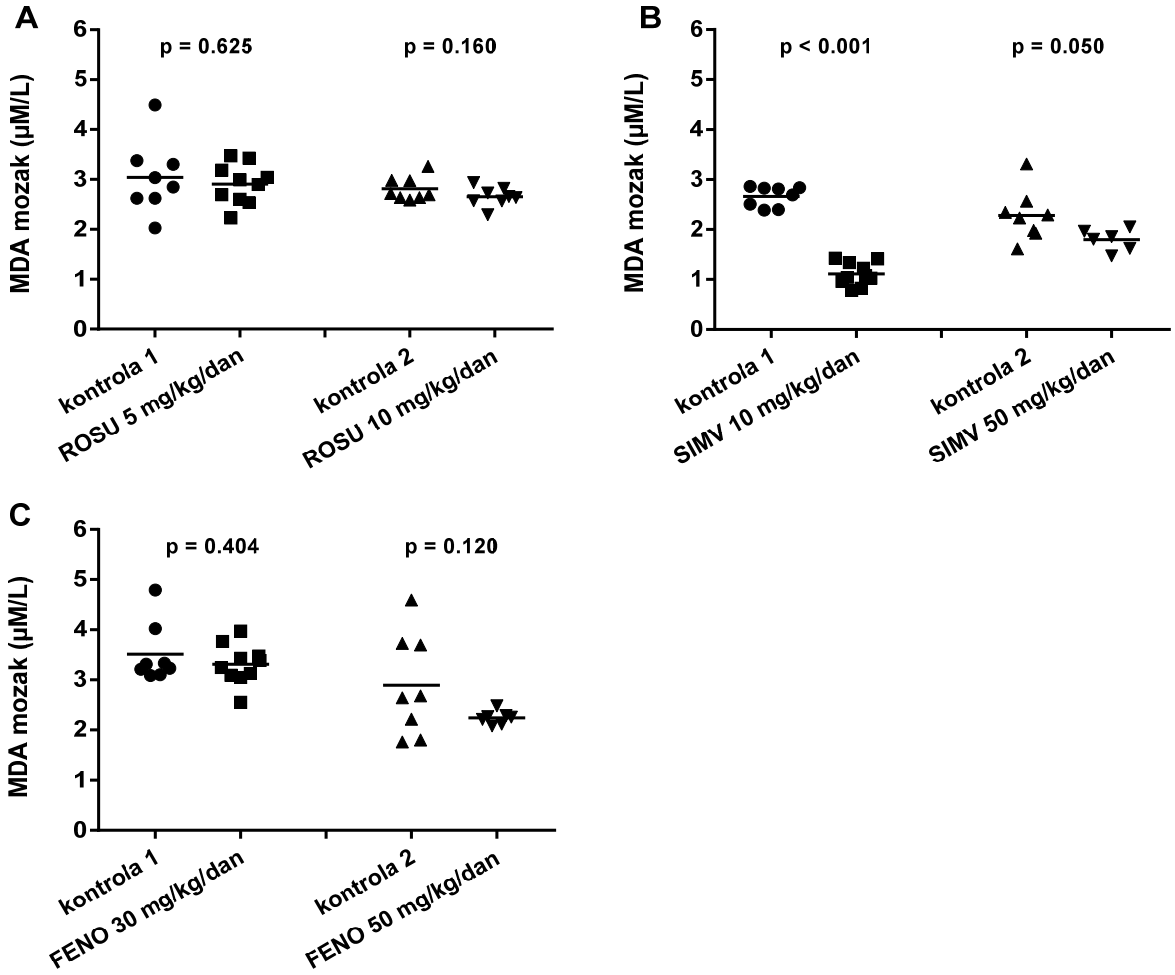
Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.3.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.3.2 Koncentracija malondialdehida (MDA) u jetrima normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.3.3 Koncentracija malondialdehida (MDA) u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.3.2 Hiperlipemični štakori

A. Plazma

Simvastatin

SIMV nije značajno promijenio koncentraciju MDA u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 A).

Fenofibrat

Izmjeren je značajni pad koncentracije MDA za 33% (p = 0,009) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 A)

B. Jetra

Simvastatin

Pad koncentracije MDA za 9% nije bio značajan u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 B).

Fenofibrat

Pad koncentracije MDA za 10% nije bio značajan u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 B).

C. Mozak

Simvastatin

Pad koncentracije MDA za 11% nije bio značajan u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 C).

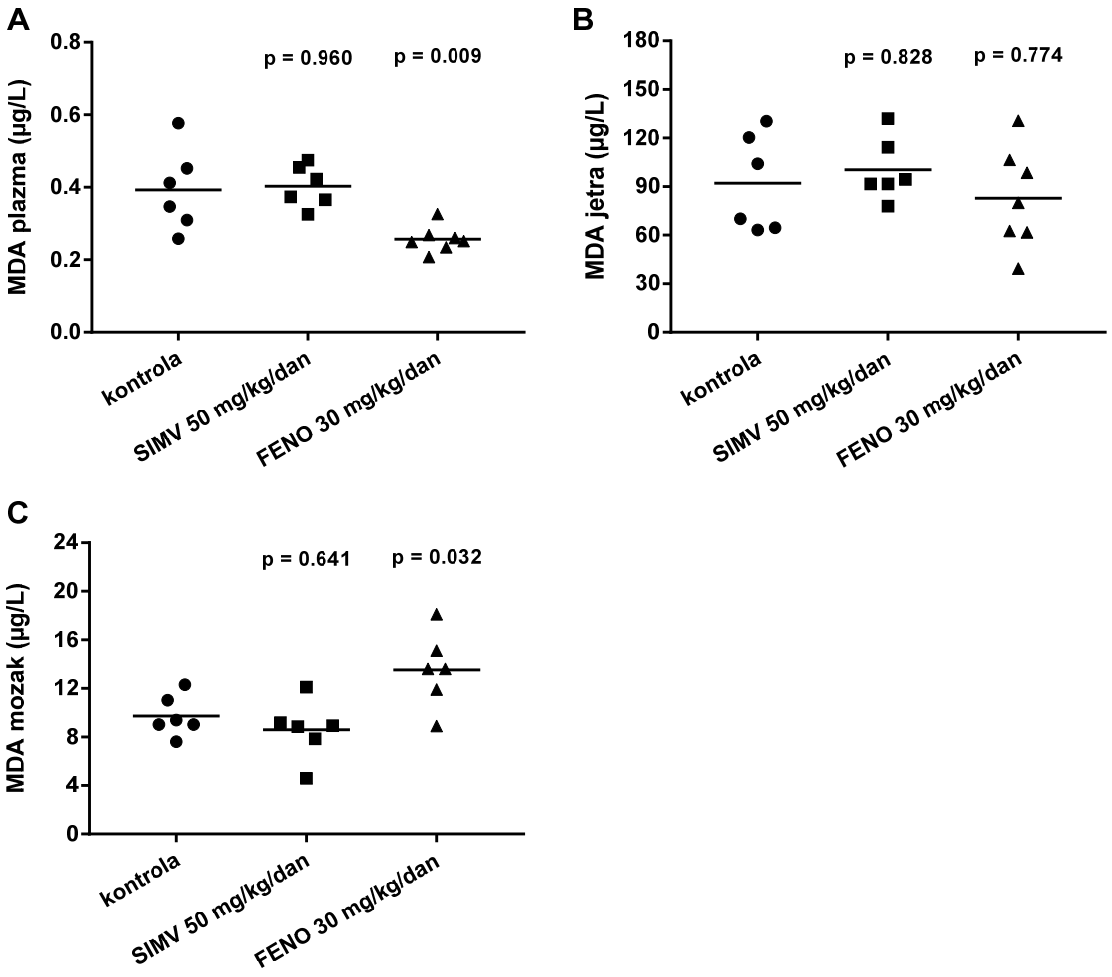
Fenofibrat

Izmjeren je značajni porast koncentracije MDA za 39% (p = 0,032) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 C).

Tablica 5.3.2 Koncentracija malondialdehida (MDA) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Varijabla	Kontrola	SIMV 50 mg/kg/dan	FENO 30 mg/kg/dan	P-vrijednost (ANOVA)
MDA plazma (μg/L)	0,39 ± 0,114 (n = 6)	0,40 ± 0,057 (n = 6)	**0,26 ± 0,036** (n = 7) **p = 0,009**	0.041
MDA jetra (μg/L)	92,1 ± 30,00 (n = 6)	100,4 ± 19,45 (n = 6)	82,8 ± 31,26 (n = 7)	0,534
MDA mozak (μg/L)	9,7 ± 1,67 (n = 6)	8,6 ± 2,42 (n = 6)	**13,5 ± 3,08** (n = 6) **p = 0,032**	0,009

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.) i P – vrijednost (ANOVA). Podebljano – statistički značajno (P –vrijednost, Dunettov test).



Slika 5.3.4 Koncentracija malondialdehida (MDA) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Prikazane su pojedinačne vrijednosti i P-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom. Horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.4 Koncentracija reduciranog glutationa u plazmi, jetrima i mozgu

5.4.1 Normolipemični štakori

A. Plazma

Rosuvastatin

Pri manjoj dozi (5 mg/kg/dan) pad koncentracije GSH za 11% u odnosu na kontrolu nije značajan. Koncentracija GSH nakon veće doze (10 mg/kg/dan) praktički je jednaka kontrolnoj vrijednosti (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.1 A).

Simvastatin

Pad koncentracije GSH za 17% i 10% nakon primjene SIMV u dozama od 10 mg/kg/dan i 50 mg/kg/dan nije bio značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.1 B).

Fenofibrat

Koncentracija GSH u odnosu na kontrolnu vrijednost statistički je značajno porasla za 31% ($p = 0,030$) nakon primjene veće doze FENO. Nakon primjene manje doze porast koncentracije GSH za 10% nije bio značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.1 C).

B. Jetra

Rosuvastatin

ROSU nije značajno promijenio koncentraciju GSH u odnosu na kontrolne vrijednosti, iako kod veće doze postoji porast koncentracije za 15% (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.2 A).

Simvastatin

Manja doza SIMV je izazvala statistički značajan porast koncentracije GSH za 63% ($p = 0,002$) u odnosu na kontrolnu vrijednost, dok kod veće doze porast koncentracije za 13% nije značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.2 B).

Fenofibrat

Obje doze FENO statistički su značajno smanjile koncentracije GSH u odnosu na njihove kontrolne vrijednosti. Manja doza izazvala je pad koncentracije GSH za 54% ($p = 0,013$), a veća za 60% ($p < 0,001$).

C. Mozak

Rosuvastatin

U manjoj dozi je ROSU značajno smanjio koncentraciju GSH za 17% u odnosu na kontrolnu vrijednost, dok kod veće doze pad koncentracije za 21% nije značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.3 A).

Simvastatin

SIMV nije značajno promijenio koncentraciju GSH u odnosu na kontrolne vrijednosti,
iako kod manje doze postoji porast za 29%, a kod veće za 17% (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.3 B).

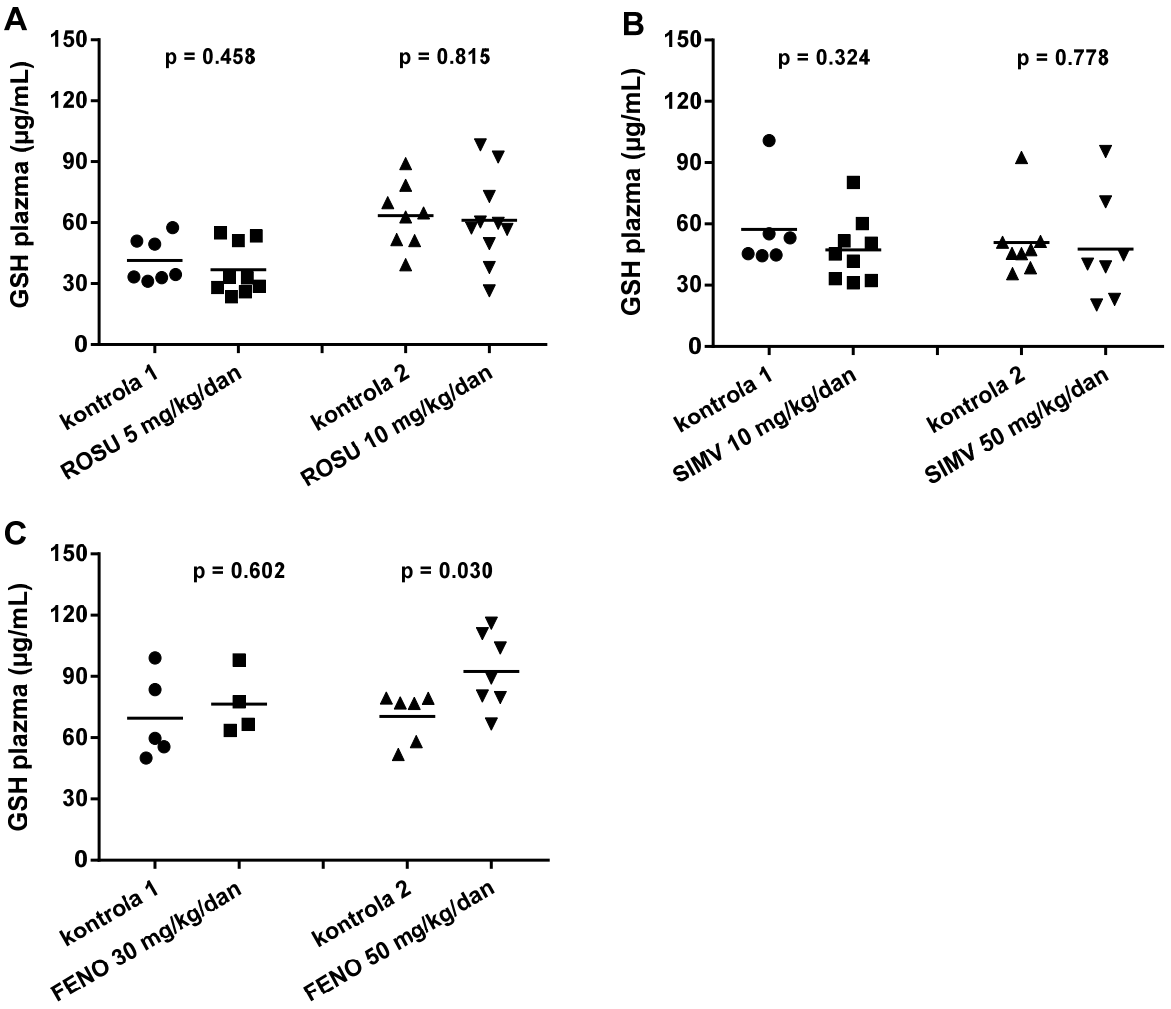
Fenofibrat

FENO nije značajno promijenio koncentraciju GSH u odnosu na kontrolne vrijednosti, iako kod veće doze postoji trend porasta za 14% (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.3 C).

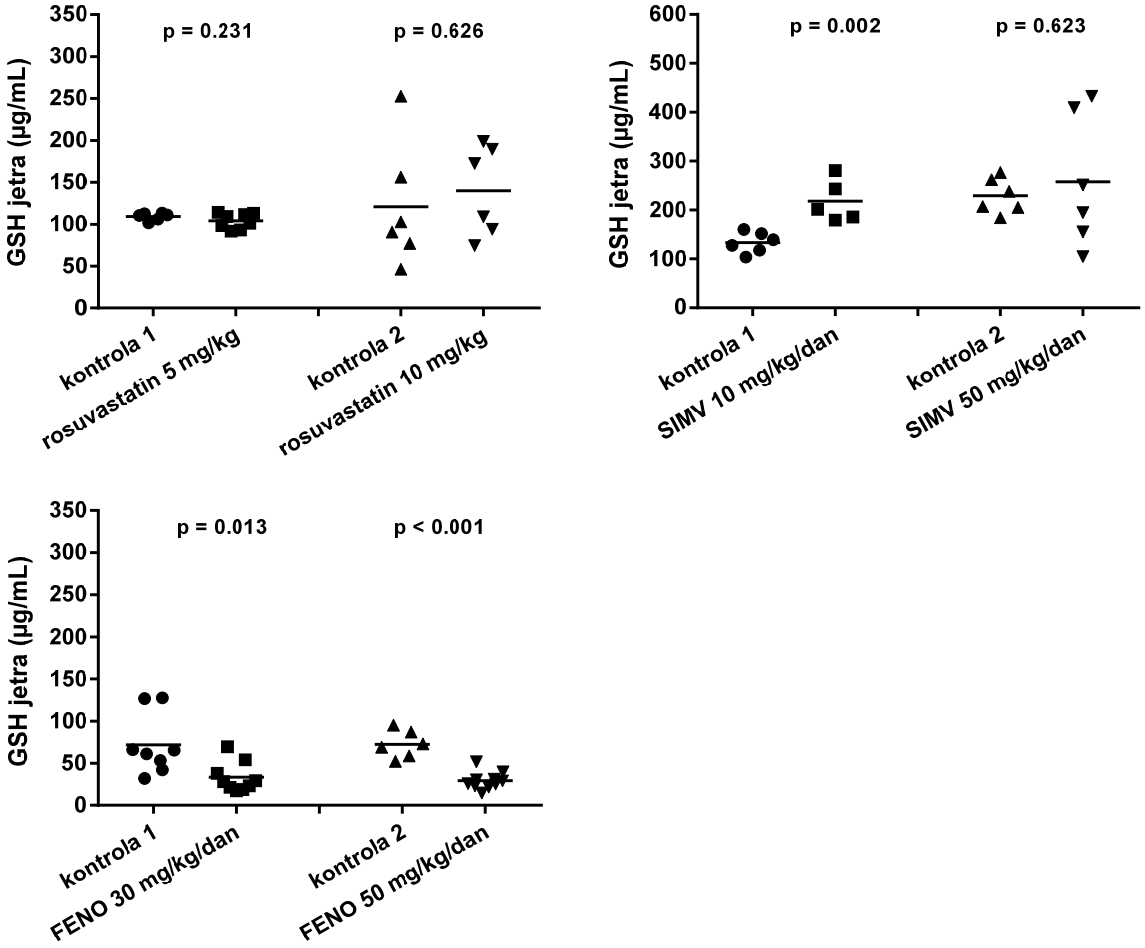
Tablica 5.4.1 Koncentracija reduciranog glutationa u plazmi, jetrima i mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Skupina	Glutation		
	Plazma (μg/mL)	Jetra (μg/mL)	Mozak (μg/mL)
kontrola 1	41.4 ± 10.84 (n = 7)	109,2 ± 4,46 (n = 6)	23,0 ± 2,42 (n = 8)
ROSU 5 mg/kg/dan	36.8 ± 12,65 (n = 9)	104,0 ± 9,12 (n = 8)	**19,1 ± 3,20** (n = 9) **p = 0,012**
kontrola 2	63,4 ± 16,03 (n = 8)	121,0 ± 73,93 (n = 6)	23,2 ± 6,64 (n = 9)
ROSU 10 mg/kg/dan	61,8 ± 22,11 (n = 10)	139,7 ± 53,5 (n = 6)	18,3 ± 2,09 (n = 9)
kontrola 1	57,3 ± 21,79 (n = 6)	133,5 ± 21,24 (n = 6)	17,2 ± 4,61 (n = 8)
SIMV 10 mg/kg/dan	47,4 ± 15,81 (n = 9)	**218,1 ±43,03** (n=5) **(p = 0,002)**	22,13 ± 9,08 (n = 10)
kontrola 2	51,0 ± 17,68 (n = 8)	229,0 ± 36,05 (n = 6)	20,2 ± 4,23 (n = 9)
SIMV 50 mg/kg/dan	47,7 ± 26,80 (n = 7)	258,0 ± 135,20 (n = 6)	23,6 ± 5,01 (n = 9)
kontrola 1	69,6 ± 20,85 (n = 5)	71,8 ± 36,16 (n = 8)	16,7 ± 2,54 (n = 7)
FENO 30 mg/kg/dan	76,5 ± 15,63 (n = 4)	**33,3 ± 17,71** (n = 9) **p = 0,013**	15,2 ± 3,54 (n = 9)
kontrola 2	70,4 ± 12,23 (n = 6)	72,6 ± 16,31 (n = 6)	20,6 ± 5,58 (n = 8)
FENO 50 mg/kg/dan	**92,4 ± 18,32** (n = 7) **p = 0,03**	**29,21 ± 10,27** (n = 10) **p < 0,001**	23,5 ± 2,57 (n = 10)

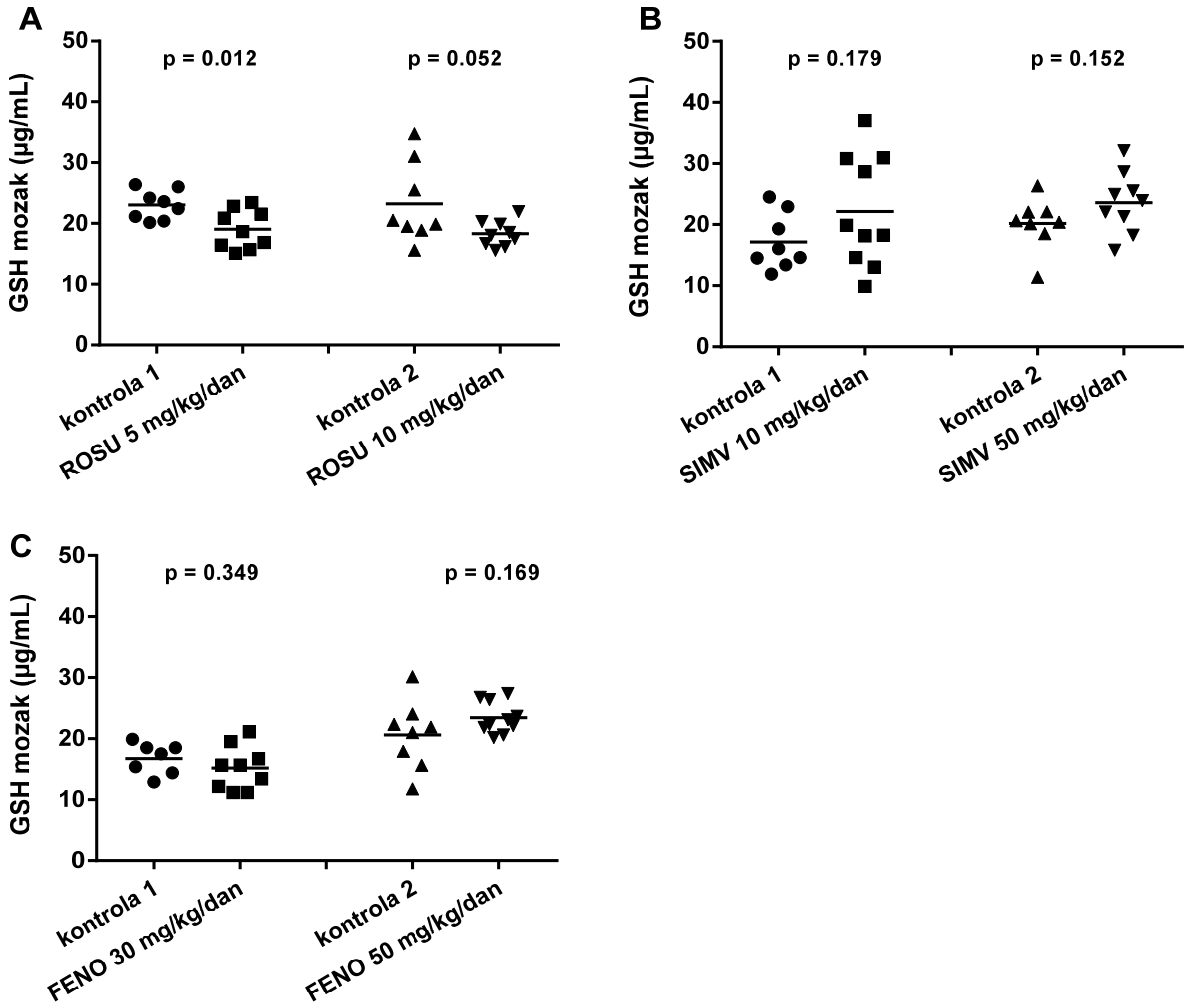
Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.4.1 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.4.2 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u jetrima normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.4.3 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.4.2 Hiperlipemični štakori

A. Plazma

Simvastatin

Pad koncentracije GSH za 11% u odnosu na kontrolnu vrijednost nije bio značajan (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 A).

Fenofibrat

Porast koncentracije GSH za 21% u odnosu na kontrolnu vrijednost nije bio značajan (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 A).

B. Jetra

Simvastatin

SIMV je izazvao statistički značajan pad koncentracije GSH za 45% (p = 0,045) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4.B).

Fenofibrat

Izmjeren je statički značajan pad koncentracije GSH za 80% (p < 0,001) u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4.B).

C. Mozak

Simvastatin

Nema značajne promjene u koncentraciji GSH u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 C).

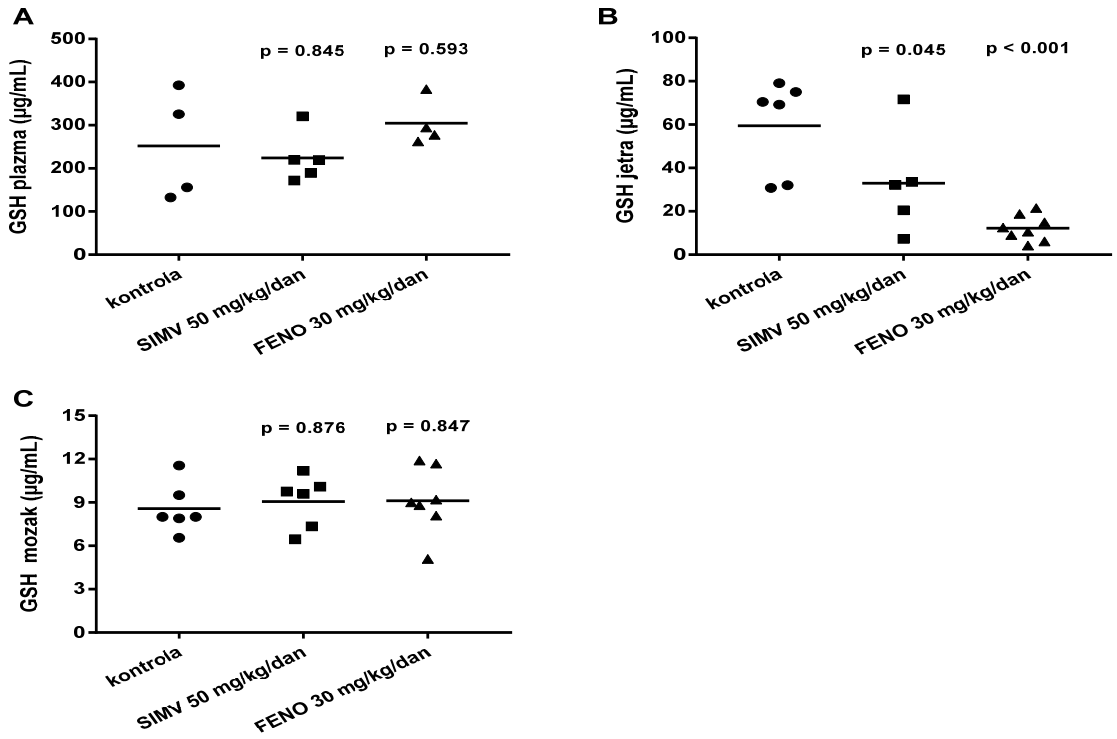
Fenofibrat

Nema značajne promjene u koncentraciji GSH u odnosu na kontrolnu vrijednost (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 C).

Tablica 5.4.2 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV 50 mg/kg i FENO 30 mg/kg tijekom tri tjedna.

Varijabla	Kontrola	SIMV 50 mg/kg/dan	FENO 30 mg/kg/dan	P-vrijednost (ANOVA)
GSH plazma (µg/mL)	251,7 ± 127,4 (n = 4)	224,2 ± 57,58 (n = 5)	304,6 ± 54,3 (n = 4)	0,393
GSH jetra (µg/mL)	59,4 ± 22,00 (n = 6)	**33,0 ± 24,04** (n = 5) **p = 0,045**	**12,2 ± 5,98** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001
GSH mozak (µg/mL)	8,9 ± 1,73 (n = 6)	9,1 ± 1,80 (n = 6)	9,1 ± 2,30 (n = 7)	0,872

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.) i P – vrijednost (ANOVA). Podebljano – statistički značajno (P – vrijednost, Dunettov test).



Slika 5.4.4 Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u plazmi, jetrima i mozgu hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Prikazane su pojedinačne vrijednosti i P-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom. Horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.5 Koncentracija triglicerida i HDL kolesterola u plazmi

5.5.1 Normolipemični štakori

Trigliceridi

Koncentracija triglicerida u plazmi je statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolne vrijednosti nakon primjene ROSU u dozi od 5 mg/kg/dan za 33% (p = 0,027), ROSU u dozi od 10 mg/kg/dan za 37% (p = 0,002), SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan za 57% (p = 0,003) i FENO u dozi od 50 mg/kg/dan za 33% (p = 0,006) (Tablica 5.5.1 i Slika 5.5.1). Pad koncentracije triglicerida za 17% izmjeren je nakon primjene manjih doza SIMV i FENO (Tablica 5.5.1 i Slika 5.5 1).

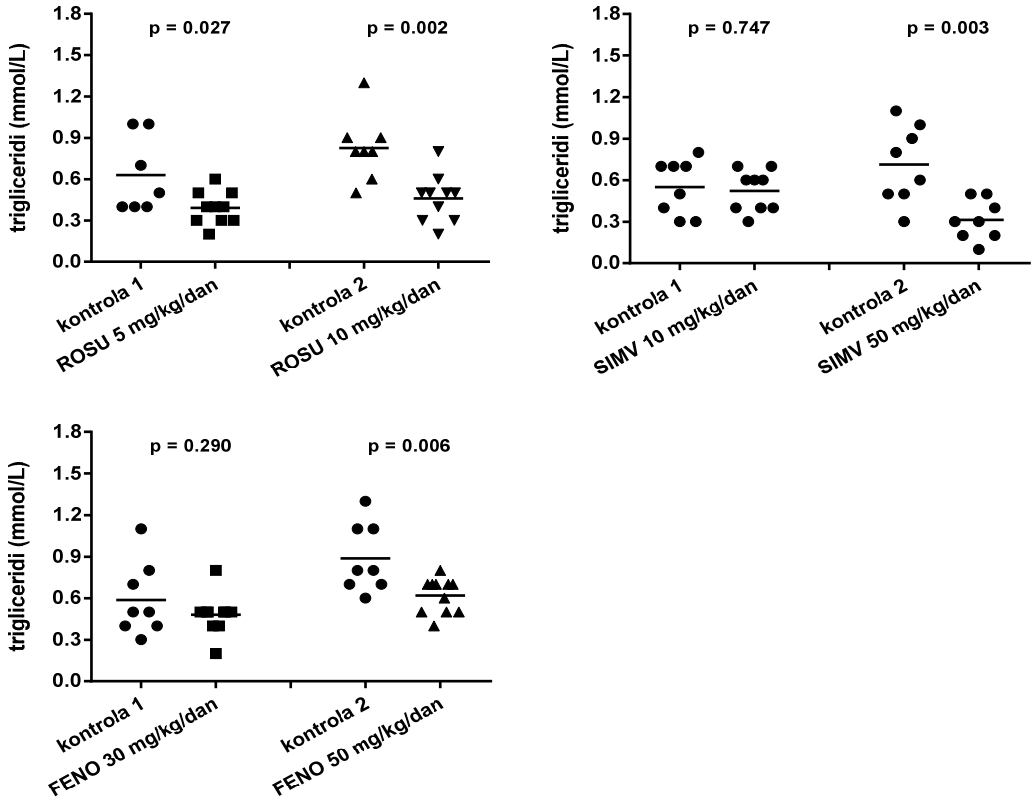
HDL

Koncentracija HDL – kolesterola u plazmi je statistički značajno porasla nakon primjene obje doze SIMV. Pri dozi SIMV od 10 mg/kg/dan porast HDL kolesterola je iznosio 25% ($p = 0,02$) u odnosu na kontrolu, a pri dozi od 50 mg/kg/dan 17% ($p < 0,001$). Statistički značajno smanjena koncentracija HDL-kolesterola u odnosu na kontrolu izmjerena je nakon primjene FENO u dozi od 50 mg/kg/dan (63% $p < 0,001$). Obje doze ROSU nisu statistički značajno promijenile koncentraciju HDL – kolesterola (Tablica 5.5.1 i Slika 5.5.2).

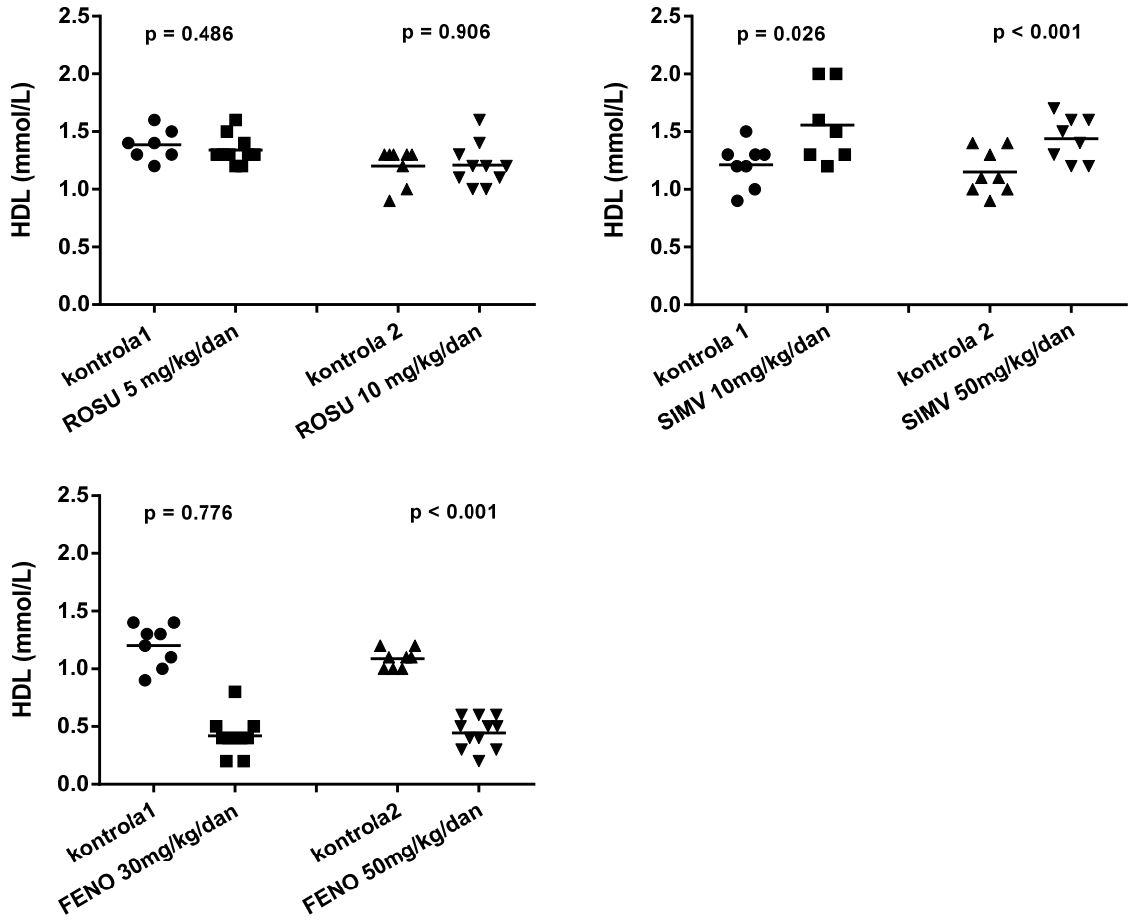
Tablica 5.5.1 Koncentracija triglicerida i HDL kolesterola u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tri tjedna.

Skupina	Trigliceridi (mmol/L)	HDL kolesterol (mmol/L)
kontrola 1	0,6 ± 0,28 (n = 7)	1,4 ± 0,13 (n = 7)
ROSU 5 mg/kg/dan	**0,4 ± 0,12** (n = 10) **p = 0,027**	1,3 ± 0,13 (n = 10)
kontrola 2	0,8 ± 0,24 (n = 8)	1,2 ± 0,16 (n = 8)
ROSU 10 mg/kg/dan	**0,5 ± 0,17** (n = 10) **p = 0,002**	1,2 ± 0,19 (n = 10)
kontrola 1	0,6 ± 0,20 (n = 8)	1,2 ± 0,19 (n = 8)
SIMV 10 mg/kg/dan	0,5 ± 0,15 (n = 9)	**1,5 ± 0,33** (n = 7) **p = 0,02**
kontrola 2	0,7 ± 0,28 (n = 8)	1,2 ± 0,19 (n = 8)
SIMV 50 mg/kg/dan	**0,3 ± 0,15** (n = 8) **p = 0,003**	**1,4 ± 0,19** (n = 8) **p < 0,001**
kontrola 1	0,6 ± 0,26 (n = 8)	1,2 ± 0,19 (n = 8)
FENO 30 mg/kg/dan	0,5 ± 0,15 (n = 10)	0,4 ± 0,17 (n = 10)
kontrola 2	0,9 ± 0,25 (n = 8)	1,1 ± 0,08 (n = 8)
FENO 50 mg/kg	**0,6 ± 0,12** (n = 11) **p = 0,006**	**0,4 ± 0,14** (n = 11) **p < 0,001**

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.).
Podebljano – statistički značajno (t-test).



Slika 5.5.1 Koncentracija triglicerida u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.



Slika 5.5.2 Koncentracija HDL kolesterola u plazmi normolipemičnih štakora nakon primjene rosuvastatina (ROSU), simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti i p-vrijednost, a horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

5.5.2 Hiperlipemični štakori

Trigliceridi

Koncentracija triglicerida u plazmi je statistički značajno porasla za 67% ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne vrijednosti nakon primjene FENO 30 mg/kg/dan. SIMV nije statistički značajno promijenio koncentraciju triglicerida (Tablica 5.5.2 i Slika 5.5.3).

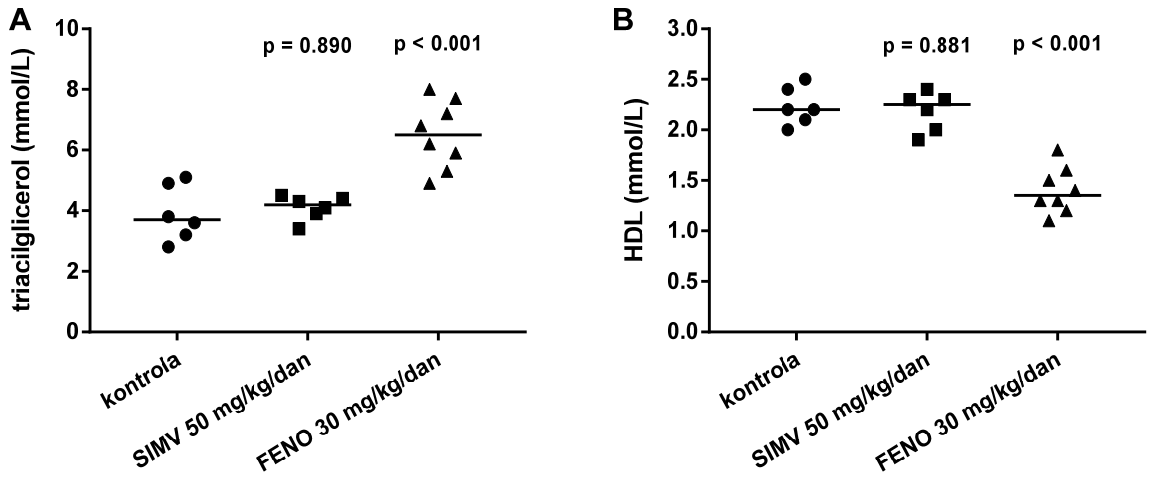
HDL

Koncentracija HDL kolesterola u plazmi je statistički značajno smanjena za 36% ($p < 0,001$) nakon primjene FENO 30 mg/kg/dan. SIMV nije statistički značajno promijenio koncentraciju HDL - kolesterola (Tablica 5.2.2, Slika 5.5.3).

Tablica 5.5.2 Koncentracija triglicerida i HDL – kolesterola u plazmi hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna.

Varijabla	Kontrola	SIMV 50 mg/kg/dan	FENO 30 mg/kg/dan	P-vrijednost (ANOVA)
Trigliceridi (mmol/L)	3,9 ± 0,92 (n = 6)	4,1 ± 0,41 (n = 6)	**6,5 ± 1,12** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001
HDL (mmol/L)	2,2 ± 0,18 (n = 6)	2,2 ± 0,19 (n = 6)	**1,4 ± 0,23** (n = 8) **p < 0,001**	< 0,001

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ($\bar{x}$) ± standardna devijacija (S.D.) i P – vrijednost (ANOVA). Podebljano – statistički značajno (P – vrijednost, Dunettov test).



Slika 5.5.3 Koncentracija triglicerida i HDL - kolesterola u plazmi hiperlipemičnih štakora nakon primjene simvastatina (SIMV) i fenofibrata (FENO) tijekom tri tjedna. Prikazane su pojedinačne vrijednosti i P-vrijednosti Dunnettova testa višestruke usporedbe s kontrolnom skupinom. Horizontalna crta označava aritmetičku sredinu.

6 RASPRAVA

Prikazani rezultati u tablicama 5.1.1 - 5.1.3 i slici 5.1.1 pokazuju da je aktivnost PChE u plazmi normolipemičnih štakora povećana nakon primjene sva tri antilipidna lijeka (ROSU, SIMV i FENO) bez obzira na primijenjenu dozu i upotrijebljeni supstrat. Izostanak statistički značajnog povećanja aktivnosti PChE u plazmi normolipemičnih štakora je vidljiv nakon primjene male doze ROSU (5 mg/kg/dan) i SIMV (10 mg/kg/dan) i korištenja ATCh kao supstrata. Također, značajno povećana aktivnost plazmatske PChE mjerene ATCh-om i BTCh-om je dokazana u hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV i FENO (50 i 30 mg/kg/dan) (Tablica 5.1.10, Slika 5.1.4). Prema rezultatima, veći porast plazmatske aktivnosti PChE mjerene s oba supstrata postoji u hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV (50 mg/kg/dan) i FENO (30 mg/kg/dan) u usporedbi s porastom aktivnosti enzima u normolipemičnih štakora nakon primjene istih doza SIMV i FENO. Veća aktivnost plazmatske PChE u oba soja štakora je izmjerena korištenjem BTCh kao supstrata, što je u skladu s literaturnim podacima o većem afinitetu PChE za supstrat BTCh, nego za ACTh (95).

Samo su mala doza ROSU i obje doze FENO izazvale značajan porast katalitičke aktivnosti PChE u jetrima normolipemičnih štakora neovisno o korištenom supstratu (Tablice 5.1.4 – 5.1.6, Slika 5.1.2). U slučaju FENO porast aktivnosti PChE iznosio je 83% odnosno 85% u odnosu na kontrolu, bez obzira da li je korišten ACTh ili BTCh (Tablica 5.1.6). Nakon primjene veće doze ROSU, u normolipemičnih štakora postoji tendencija pada aktivnosti PChE uz oba supstrata. Pad je veći ali ne i značajan (30%) uz korištenje BTCh, što je opet dokaz većeg afiniteta PChE prema BTCh. Nakon primjene SIMV u jetrima normolipemičnih štakora postoji tendencija porasta aktivnosti PChE. Značajan porast aktivnosti enzima uz oba supstrata izmjeren je u jetrima hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV, te FENO uz korištenje ATCh (Tablica 5.1.10, Slika 5.1.4). Sklonost porasta aktivnosti PChE u jetrima hiperlipemičnih štakora nakon primjene FENO postoji i uz korištenje BTCh kao supstrata. Porast aktivnosti enzima u jetrima hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV (50 mg/kg/dan) i FENO (30 mg/kg/dan) uz korištenje oba supstrata bio je veći nego u normolipemičnih štakora nakon primjene istih doza SIMV i FENO.

Što se tiče učinaka ispitivanih antilipidnih lijekova na aktivnost PChE u mozgu normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora, iz rezultata prikazanih u tablicama 5.1.7 do 5.1.10 i slikama 5.1.3 i 5.1.4 vidljivo je da u normolipemičnih štakora značajan porast aktivnosti PChE mjerene s BTCh postoji nakon primjene veće doze ROSU i obje doze SIMV, dok FENO uz oba supstrata nije promijenio aktivnost enzima. U mozgu hiperlipemičnih štakora SIMV (50 mg/kg/dan) i FENO (30 mg/kg/dan) su izazvali porast aktivnosti enzima. Porast je

značajan nakon primjene SIMV i oba supstrata, te FENO uz supstrat BTCh. Također, postoji tendencija porasta aktivnosti PChE nakon primjene FENO uz supstrat ACTh.

Prema dostupnim literaturnim podacima, ispitivanja učinaka antilipemičnih lijekova na aktivnost PChE kod hiperlipemičnih štakora nisu provedena. Zato rasprava o dobivenim rezultatima u ovog soja štakora za sada nije potpuna. Prema literaturi, eksperimentalni podaci dobiveni kod normolipemičnih životinja pokazuju da učinci statina i fibrata na aktivnost PChE u plazmi, jetrima i mozgu nisu jedinstveni (130,132–135,190). Također je važno naglasiti da u nekim eksperimentima nije mjerena katalitička aktivnost PChE nego aktivnost AChE, što teoretski može predstavljati problem pri interpretaciji i usporedbi dobivenih rezultata i rezultata drugih autora. Međutim, kako je PChE biokemijski slična AChE, tj. obje imaju približno 50% homolognih sekvenci, te slične tercijarne i kvarterne strukture razlike u osjetljivosti oba enzima prema supstratima nisu prepreka za interpretaciju i usporedbu dobivenih rezultata u svjetlu postojećih literaturnih podataka, budući da je u rezultatima porast aktivnosti u plazmi i mozgu potvrđen s oba supstrata, ATCh i BTCh (92). Pad aktivnosti enzima izmjeren je jedino u jetrima normolipemičnih štakora nakon primjene veće doze ROSU (Tablica 5.1.4, slika 5.1.2), a koji se može objasniti poznatom činjenicom da je u nekim slučajevima oslobađanje enzima u cirkulaciju iz jetre, koja je mjesto njegove sinteze, vrlo brzo (91). U dobivenim rezultatima potvrda ove činjenice je istovremeni pad aktivnosti PChE u jetrima, a porast u plazmi nakon primjene ROSU. Tako je pad aktivnosti PChE u jetrima pri dozi ROSU od 10 mg/kg/dan iznosio 8% uz supstrat ACTh i 30% uz supstrat BTCh (Tablica 5.1.4, slika 5.1.2), dok je aktivnost PChE u plazmi bila veća za 20% u odnosu na kontrolu uz ACTh i 14% uz BTCh.

Porast aktivnosti PChE u plazmi u normolipemičnih štakora dokazan u ovom radu je u skladu s našim ranijim rezultatima, prema kojima su ne samo SIMV nego i atorvastatin, pravastatin te gemfibrozil ili značajno povećali aktivnosti PChE ili je postojala tendencija porasta aktivnosti (133,191). Iz literaturnih podataka je vidljivo da su aktivnost PChE u jetrima i serumu štakora i miša značajno povećali ne samo gemfibrozil nego i klofibrat i fenofibrat (132,192–194).

U dobivenim rezultatima, porast aktivnosti PChE u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene ROSU i SIMV nije u skladu s rezultatima Cibickove i sur. koji su u prvoj studiji dokazali inhibitorni učinak simvastatina i atorvastatina na aktivnost AChE u frontalnom korteksu štakora, dok u njihovoj drugoj studiji atorvastatin i simvastatin nisu utjecali na aktivnost moždane PChE (134,195). Slične rezultate Cibickovoj i sur. iz 2008. godine. dobili su i Dalla i sur., koji su pokazali da simvastatin i pitavastin nisu utjecali na

aktivnost AChE u mozgu štakora na standardnoj ishrani (196). Još jedan dokaz inhibitornog učinka statina na aktivnost PChE su *in vitro* dobiveni rezultati Darvesha i sur., prema kojima su lovastatin i simvastatin značajno inhibirali PChE, dok inhibicijski učinak na aktivnost istog enzima nije dokazan za mevastatin, pravastatin i fibrate (131).

Iako je u Uvodu (Točka 1.2.1.1) navedeno da ROSU zbog svoje hidrofilnosti slabije prolazi u SŽS, dobiveni rezultati pokazuju da je ROSU u većoj dozi (10 mg/kg/dan) izazvao isti porast aktivnost PChE uz supstrat BTCh, kao i obje doze SIMV, što ukazuje na činjenicu da ROSU prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (Tablica 5.1.7, Slika 5.1.3). Da ROSU prolazi krvno-moždanu barijeru i djeluje u mozgu ukazuju rezultati nekoliko ispitivanja. Npr. antiepileptički učinak oralno primijenjenog ROSU tijekom 3 dana, tj. inhibicija abnormalne električke aktivnosti mozga, dokazan je u štakora nakon intrakortikalne injekcije penicilina G i bio je bolji od istog učinka atorvastatina i SIMV (197). Također, oralna primjena ROSU tijekom 7 dana prije, te jedan dan nakon namjerno izazvanog suparahnoidalnog krvarenja, značajno je u štakora poboljšala neurološki status, smanjila smrt moždanih stanica i ekstravazaciju imunoglobulina G (198).

Usprkos često suprotnih podataka iz literature o utjecaju statina i fibrata na aktivnost PChE, rezultati ovog kao i naših prethodnih istraživanja pokazuju da je iznesena hipoteza opravdana, tj. da statini i fibrati povećavaju aktivnost PChE.

Za sada još uvijek nije točno poznato kako statini i fibrati djeluju na katalitičku aktivnost PChE. U Uvodu je spomenuto (Točka 1.2.2 i Točka 1.3.1.3) da fibrati djeluju kao ligandi za nuklearne PPARα receptore, tj. aktivacija tih receptora inducira proliferaciju peroksisoma u stanici. Na taj način aktivirani PPARα receptori reguliraju ekspresiju niza gena koji imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze, transportu masnih kiselina i sintezi apoproteina. Slično fibratima, statini su ligandi ne samo PPARα već i PPARγ receptora (70,72). Prema rezultatima Ferreira i sur. primjena FENO aktivira PPARα receptore u masnom tkivu štakora, s posljedičnom povećanom ekspresijom nekih oksidacijskih enzima (199). Isti učinak FENO je imao na oksidacijske enzime u jetrima (200,201). Karahashia i sur. su dokazali da fenofibrat, bezafibrat i klofibrat induciraju u jetrima štakora adipoznu triglicerid lipazu i smanjuju koncentraciju triglicerida što je od koristi u sprječavanju jetrene steatoze (202). Statini kao agonisti PPARα i PPARγ također mogu biti induktori nekih enzima. Tako je u hepatocitima štakora dokazano da simvastatin povećava razinu mRNA *liver fatty acid-binding protein* (L-FABP), posredstvom njegovog agonističkog djelovanja na PPARα receptore (203). Statini (atorvastatin, simvastatin, lovastatin, rosuvastatin) su danas poznati induktori CYP450, a dokazano je da povećavaju i ekspresiju ABCA1 (*ATP-binding*

casette transporter A1) (204,205). Mehanizmi indukcije, odnosno ekspresije gore spomenutih enzima u svezi su s agonističkim djelovanjem statina i fibrata na PPARα.

Stoga su rezultati Ferreira i sur., Harano i sur., Karahashia i sur. uporište za pretpostavku da je aktivacija PPARα receptora u jetrima izazvana fenofibratom, rosuvastatinom i simvastatinom odgovorna i za povećanu ekspresiju i sintezu PChE, koja je u ovom ispitivanju indirektno dokazana značajnim povećanjem njezine aktivnosti u plazmi (199–202).

U Uvodu je spomenuto da su PPARα receptori dokazani i u nekim regijama mozga, u kojima imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida (206). Također, postoje pretpostavke da PPARα imaju određenu ulogu u kontroli sinaptičkog plasticiteta u neuronima hipokampusa, te da se specijalne masne kiseline koje igraju važnu ulogu u živčanim stanicama i esencijalne su komponente mijelina, sintetiziraju u peroksisomima (206,207). Daljnja bi istraživanja trebala dati odgovor na pitanje da li je, slično kao u jetrima, veća katalitička aktivnost PChE u mozgu barem dijelom posljedica agonističkog djelovanja SIMV i FENO na moždane PPARα receptore.

Broj kliničkih ispitivanja u kojima su ispitani učinci antilipidnih lijekova u osoba s različitim tipovima hiperlipidemija, je mali. U križanom kliničkom ispitivanju provedenom kod 45 osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2 i dislipidemijom, liječenje pravastatinom tijekom 12 tjedana (40 mg dnevno) nije značajno utjecalo na aktivnost plazmatske PChE, za razliku od bezafibrata (400 mg dnevno, 12 tjedana), koji je aktivnost plazmatske PChE značajno snizio (124). Aktivnost PChE nije se značajno promijenila niti u druga 2 klinička ispitivanja, u kojima su kod bolesnika s dislipidemijom ispitani učinci pravastatina, cerivastatina i simvastatina (136,208). Rezultati nedavno provedenog kliničkog ispitivanja kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti potpuno su suprotni gore spomenutim (137). Naime, kod tih bolesnika je dokazano značajno smanjenje aktivnost eritrocitne AChE i plazmatske PChE nakon primjene rosuvastatina (20 mg/dan), atorvastatina (40 mg/dan), te kombinacije atorvastatina (10 mg/dan) i ezetimiba (10 mg/dan). U istom radu, Pytel i sur. su također naglasili važnost povećane aktivnosti PChE u pretilih osoba, i opisuju ga kao važan rizični čimbenik za koronarnu bolest (137).

Važno pitanje je zašto se učinci ROSU, SIMV i FENO, dakle statina i fibrata na aktivnost PChE razlikuju između štakora, tj. glodavca i čovjeka? Odgovor je vjerojatno u različitoj osjetljivosti PPARα receptora u glodavca, tj. štakora i čovjeka. Poznata je činjenica da su glodavci daleko osjetljiviji na agense koji uzrokuju proliferaciju peroksisoma u usporedbi s psom, rezus majmunom ili čovjekom (209). Na primjer, agonsti PPARα receptora

u glodavaca izazivaju hepatocelularni adenom i karcinom. Međutim nema dokaza da je pri dugotrajnoj primjeni lijekova, tzv. proliferatora peroksizoma, povećan rizik od razvoja karcinoma jetre u čovjeka. Slični podaci potječu i iz epidemioloških studija (209). Uzevši u obzir ovu činjenicu, moguće je da je ta razlika u osjetljivosti PPAR receptora na statine i fibrate jedan od razloga zašto je povećana aktivnost PChE dokazana samo u štakora.

Obzirom na navedene razlike važno je istaknuti još jednu činjenicu koja se odnosi na doze antilipidnih lijekova. Dnevne doze SIMV i FENO korištene u gore spomenutim kliničkim ispitivanjima su bile prosječne terapijske. Najmanje doze u ovim ispitivanjima (ROSU 5 mg/kg/dan, SIMV 10 mg/kg/dan i FENO 30 mg/kg/dan) ekvivalentne su maksimalnim dnevnim dozama istih lijekova koje se samo u određenim slučajevima koriste u kliničkoj praksi. Na primjer, maksimalna dnevna doza SIMV od 80 mg koristi se u slučajevima teške hiperkolesterolemije i visokim rizikom od kardiovaskularnih komplikacija. O praćenju aktivnosti PChE kod primjene tako velikih doza SIMV nema literaturnih podataka. Ako se pretpostavi gubitak razlike u osjetljivosti PPARα receptora na statine i fibrate kod štakora i čovjeka kod velike doze tih lijekova, onda je moguće da kod bolesnika koji su na najvećim dnevnim dozama SIMV, ROSU i FENO aktivnost PChE bude povećana.

U Uvodu je u točki 1.4.2 spomenut značaj PChE u detoksikaciji (hidrolizi) kokaina, hidrolizi acetilkolina u mozgu i cirkulaciji, te hidrolizi grelina, jednog od osnovnih hormona koji regulira osjećaj gladi (90,120). Danas se sve više spominje i njezina uloga u upalnim stanjima blažeg stupnja, odnosno povezanosti toga enzima s acetilkolinom, ne kao neurotransmiterom, nego protuupalnom molekulom (99–101). Ne smije se izostaviti niti farmakološki značaj PChE i njezina uloga u Alzheimerovoj bolesti, te metabolizmu lipida. Na temelju nabrojanih što dokazanih, što pretpostavljenih uloga PChE u organizmu čovjeka, kod bolesnika koji su na najvećim, dozvoljenim dozama ROSU, SIMV i FENO povećana aktivnost PChE značila bi ozbiljnu nuspojavu. Za takvu pretpostavku potrebne su kliničke studije kod pomno odabranih bolesnika.

Kako je u ciljevima istraživanja istaknuto učinci ROSU, SIMV i FENO ispitani su na tri paramera oksidacijskog stresa (GSH, MDA i SOD). Međutim, za procjenu antioksidacijskog učinka antilipidnih lijekova korišteni su dalje u tekstu samo parametri MDA i GSH. Razlog takvog pristupa je činjenica što su rezultati SOD u plazmi, jetrima i mozgu vrlo nekonzistentni u odnosu na doze pojedinog antilipidnog lijeka, što onemogućuje kako pravilnu procjenu međusobnog odnosa SOD, MDA i GSH tako i procjenu antioksidacijskog ili oksidacijskog djelovanja ROSU, SIMV i FENO (Tablice 5.2.1 i 5.2.2, Slike 5.2.1.-5.2.4).

Naime, iz literaturnih podataka je vidljivo da čimbenici poput dužine primjene lijeka, patoloških stanja, metoda koje su korištene za mjerenje aktivnosti SOD ili ispitivanih supstancija, različito utječu na aktivnost SOD (139,210–212). Stoga nije lako donijeti zaključak kakva je promjena aktivnosti SOD-a u odnosu na oksidacijski stres kao niti da li je promjena aktivnosti posljedica oksidacijskog ili antioksidacijskog djelovanja lijeka. Kao što je u Uvodu istaknuto (Točka 1.5.3) aktivnost SOD u patološki prooksidacijskim stanjima nije uvijek jednoznačna. Tako na primjer, pretkliničkim ispitivanjem oksidacijskog stresa kod štakora s induciranim oksidacijskim stresom značajan je porast aktivnosti SOD bio protumačen kao posljedica oksidacijskog stresa (213). U ispitivanju Kocaka i sur. (2000) promjena aktivnosti SOD nije dokazana kod štakora s induciranim dijabetesom i u stanju pojačanog oksidacijskog stresa, dok je aktivnost druga dva antioksidativna enzima, katalaze i glutation-peroksidaze, bila značajno povišena (214). Stefek i sur. (2000) su nakon primjene piridoindola kod dijabetičnih štakora značajno smanjenje aktivnosti SOD pripisali antioksidacijskom djelovanju piridoindola (215). Cumao i sur. su nakon primjene fluvastatina u mozgu, srcu i jetrima standardnog soja štakora izmjerili značajan porast aktivnosti SOD, dok je kod dijabetičkih štakora izmjeren značajan pad aktivnosti SOD (216). S druge strane, u ispitivanju Mohamadina i sur. primjena simvastatina nije rezultirala promjenom aktivnosti SOD-a u jetrima standardnog soja štakora, dok je kod dijabetičnih štakora SIMV uzrokovao značajan porast aktivnosti SOD-a (165). U kliničkim patološkim stanjima poput ateroskleroze, hipertenzije i pojednih tumora uočena je smanjena aktivnost SOD (139,147). S druge strane, u kliničkom ispitivanju procjene oksidacijskog stresa kod oboljelih od sepse, u kojoj je dokazan prooksidacijski status, pokazalo se da je aktivnost SOD-a bila značajno povišena u odnosu na zdravu populaciju (150).

Različiti su također i podaci o utjecaju lijekova na parametre oksidacijskog stresa. U pretkliničkim ispitivanjima je učinak tiamina, inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima, metformina i acetaminofena na povećanje aktivnosti SOD u standardnog soja štakora, štakora s induciranim dijabetesom i hiperlipemičnih štakora protumačen kao antioksidacijski učinak ispitivanih supstanci (217–219). Rezultati Liu i sur. su pokazali suprotno, tj. da istovremena primjena acetaminofena i roksitromicina u jetrima štakora uzrokuje pojačani oksidacijski stres uz značajan pad aktivnosti SOD (220). Sve navedeno ukazuje na činjenicu kako organizam na različite načine pokušava kompenzirati oksidacijski stres, na intenzitet kojeg utječu čimbenici poput naravi patološkog stanja i njegovo vremensko trajanje, a naravno i lijekovi.

Za GSH, koji je ne-enzimski antioksidans, pri interpretaciji rezultata treba uzeti u obzir nekoliko činjenica. GSH u plazmi originalno potječe iz jetre, ali i iz drugih tkiva, napose stanica bubrega (221). Prelazak GSH iz jetre i tkiva u plazmu je kontinuirani proces. U plazmi kao i u tkivima GSH se koristi za reakcije koje dovode do stvaranja oksidiranog glutationa, tj. GSSG. GSH može prijeći u GSSG mehanizmima koji uključuju molekularni kisik, a pad koncentracije znači trošenje GSH pri uklanjanju ROS-a nastalih u određenim uvjetima. GSH je supstrat glutation-peroksidaze, pa pad u koncentraciji GSH i porast GSSG indirektno ukazuje na pad aktivnosti ovog enzima. Za obnovu GSH zadužena je glutation-reduktaza. GSH je glavni antioksidans i u mozgu, u kojem se nalazi u astrocitima i ekstracelularno (222,223). U mozgu, metabolizam i uloga GSH kao antioksidansa odvija se neovisno od onog u jetrima i perifernim stanicama.

MDA je završni spoj peroksidacije lipida izazvan oksidacijskim stresom. Prema nekim autorima određivanje koncentracije MDA je sigurniji pokazatelj oksidacijskog stresa lipidne peroksidacije nego mjerenje reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline, tzv TBARS (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances,* TBARS) (142,145).

Analiza rezultata GSH i MDA u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora pokazala je slijedeće.

U plazmi normolipemičnih štakora pad koncentracije GSH nakon primjene obje doze ROSU nije bio značajan. Primjena samo veće doze ROSU (10 mg/kg/dan) je izazvala značajan porast koncentracije MDA za 15% (Tablica 5.3.1, Slika 5.3.1). Budući da manja doza ROSU (5 mg/kg/dan) nije značajno promijenila koncentracije GSH i MDA, vjerojatno ROSU u toj dozi ne utječe na stvaranje reaktivnih radikala kisika. Doza ROSU od 5 mg/kg/dan približno je jednaka najvećoj dnevnoj terapijskoj dozi. Iako primjena veće doze nije izazvala značajne promjene u koncentraciji GSH, značajan porast koncentracije MDA dozvoljava pretpostavku da ROSU u dozi koja je dvostruko veća od najveće terapijske može izazvati lipidnu peroksidaciju, odnosno poticati oksidacijski stres.

U plazmi normolipemičnih štakora vrijednosti GSH nakon obje doze SIMV bile su slične kontrolnim vrijednostima (Tablica 5.4.1, Slika 5.4.1) Primjena veće doze SIMV (50 mg/kg/dan) izazvala je značajni pad koncentracije MDA od 20%, dok je nakon manje doze (10 mg/kg/dan) pad koncentracije MDA iznosio 9% (Tablica 5.3.1, Slika 5.3.1). Iz priloženog je vidljivo da manja doza SIMV (10 mg/kg/dan) u plazmi normolipemijskih štakora nema značajan utjecaj na antioksidacijske parametre, dok veća doza može djelovati antioksidacijski zbog značajnog pada koncentracije MDA. Doza SIMV od 10 mg/kg/dan korištena u ovom istraživanju jednaka je najvećoj terapijskoj dozi, što upućuje na pretpostavku da bi u čovjeka

SIMV mogao pokazati antioksidacijski učinak samo u dozi koja je veća od najveće terapijske. Na temelju naših dosadašnjih rezultata ovo ne bi bio točan zaključak. Naime, u našim ranijim istraživanjima na normolipemičnim štakorima SIMV je uzrokovao značajni pad koncentracije MDA u dozi 10 mg/kg/dan za 24%, a pri dozi od 50 mg/kg/dan za 39% (135,191). Tada su mjerenja koncentracije MDA u plazmi i tkivima provedena spektrofotometrijskom metodom. Sadašnji rezultati koncentracija MDA su dobiveni pomoću HPLC metode što ukazuje na kompleksnost interpretacije rezultata o antioksidacijskom djelovanju statina kada se za određivanje antioksidacijskih parametara koriste metode različite osjetljivosti. Vjerojatno je uporaba HPLC metode razlog zašto je pad koncentracije MDA u sadašnjim rezultatima manji nego u prethodnim. U svakom slučaju rezultati dobiveni s manjom dozom ROSU i obje doze SIMV pokazuju da oba statina ne pokazuju prooksidativno djelovanje. Antioksidacijski učinak SIMV dokazan je također u istraživanjima Nikolića i sur. (2018) u Wistar albino štakora s hiperhomocisteinemijom (224)).

U jetrima normolipemičnih štakora porast koncentracije GSH za 15% nakon veće doze ROSU (10 mg/kg/dan) nije bio značajan. (Tablica 5.4.1, Slika 5.4.2 A). Primjena obje doze ROSU nije izazvala značajne promjene u koncentracijama MDA, iako postoji sklonost njegovom padu. Na temelju ovih rezultata ROSU u jetrima normolipemičnih štakora nema utjecaja na stvaranje reaktivnih radikala kisika.

U jetrima normolipemičnih štakora, manja doza SIMV (10 mg/kg/dan) je izazvala značajan porast koncentracije GSH za 63% ($p = 0,002$), dok kod veće doze (50 mg/kg/dan) porast koncentracije za 13% nije značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.2 B). Samo je manja doza izazvala pad koncentracije MDA od 12%. Na temelju značajnog porasta GSH kod manje doze, i malog porasta kod veće doze što ukazuje da SIMV u jetrima normolipemičnih štakora nije utjecao na stvaranje reaktivnih radikala kisika. Spomenuto je da parametar oksidacijskog stresa može biti i određivanje TBARS, iako je manje pouzdan od MDA. U radu Mohamadina AM i sur. ispitan je antioksidacijski učinak SIMV u dozi od 10 mg/kg/dan tijekom 5 tjedana na koncentraciju TBARS u jetri i bubrezima štakora s eksperimentalnim dijabetesom (165). Na sličnost s ovim rezultatima dokazuje njegov značajni pad u dijabetičkih štakora u odnosu na kontrolu, tj. netretirane dijabetičke štakore. Međutim, rezultati Zenga i Liu-a pokazuju da u jetrima dijabetičkih štakora, atorvastatin povećava koncentraciju reaktivnih radikala kisika i smanjuje aktivnost SOD i katalaze (172).

U plazmi normolipemičnih štakora koncentracija GSH nakon primjene veće doze FENO (50 mg/kg/dan) značajno je porasla za 31% ($p = 0,030$), dok nakon manje doze (30 mg/kg/dan) porast koncentracije GSH za 10% nije bio značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.1

C). Pad koncentracije MDA bio je značajan nakon obje doze FENO (Tablica 5.3.1, Slika 5.3.1 C). Na temelju dobivenih rezultata obje doze FENO pokazuju antioksidacijski učinak, jer postoji pad MDA i porast GSH.

U jetrima normolipemičnih štakora značajni pad koncentracije GSH (za 54% i 60%) izmjeren je nakon primjene obje doze FENO (30 mg/kg/dan i 50 mg/kg/dan). Prethodno je istaknuto da se GSH stvara u jetrima i otpušta u krv. Zbog činjenice da u plazmi postoji porast koncentracije GSH, izgledno je da značajan pad koncentracije GSH u jetrima nije posljedica učinka FENO na njegovu sintezu, i drugo, da postoje dva razloga koji zajednički pridonose značajnom padu koncentracije GSH. Prvi razlog je vezan uz metabolizam FENO. Naime, u Uvodu (točka 1.2.2.1) je spomenuto da nakon prve faze biotransformacije zbog postojanja keto grupe i esterske grupe u strukturi fenofibrata i reakcija redukcije i hidrolize, nastaju metaboliti koji mogu konjugirati s glutationom i na taj način dovesti do pada koncentracije GSH (Slika 1.3). Drugi razlog leži u činjenici da u jetri glodavaca proliferatori peroksizoma, kojima pripada i FENO, značajno povećavaju β-oksidaciju masnih kiselina i aktivnost enzima acil-CoA oksidaze, koja je odgovorna za nastanak H_2O_2 (225). U tom procesu, glutation-peroksidaza, koja je sposobna inaktivirati H_2O_2, stvara oksidirani oblik glutationa (GSSG), rezultat čega može biti smanjena koncentracija reduciranog glutationa. Pad koncentracije GSH u jetri nakon primjene FENO dokazan u ovom istraživanju nije neočekivan, jer neka neklinička istraživanja ukazuju na činjenicu da FENO u jetrima uzrokuje povećanu koncentraciju ROS-a (209). Također je u kulturi humanih HepG2 stanica dokazano da je FENO izazvao smrt stanica mehanizmom koji uključuje povećanu koncentraciju reaktivnih oblika kisika (221). U glodavaca proliferatori peroksizoma, što znači i FENO, indirektno uzrokuju mutaciju gena povećanjem unutarstanične koncentracije H_2O_2, dok je aktivnost glutation-peroksidaze, enzima koji je sposoban razgraditi H_2O_2, često smanjena tijekom duže primjene proliferatora peroksizoma (209,226).

Stoga jaki prooksidacijski učinak FENO u jetrima normolipemičnih štakora je posljedica njegovog agonističkog djelovanja na PPAR receptore s posljedičnom povećanom aktivnosti acil-CoA. Zašto nije došlo do značajnih promjena u koncentraciji MDA u jetrima normolipemičnih štakora nakon primjene FENO moguće je objasniti rezultatima Lores Arnaiz i sur., koji su nakon primjene FENO tijekom 2 tjedna, u miševa izmjerili povećanje koncentracije vodikovog peroksida, te ukupnog i oksidiranog glutationa u jetri, dok peroksidacija lipida nije dokazana, vjerojatno zbog prisutnosti velike koncentracije ubikinona (178).

U mozgu normolipemičnih štakora koncentracija GSH nakon primjene ROSU značajno je pala za 17% nakon manje doze (5 mg/kg/dan), dok pad koncentracije za 21% nakon veće doze (10 mg/kg/dan) nije bio značajan. Pad koncentracije MDA za prosječno 6% nakon primjene obje doze ROSU nije bio značajan. Zbog pada koncentracije GSH za pretpostaviti je da, obje doze ROSU u mozgu normolipemičnih štakora mogu izazvati stvaranje reaktivnih radikala kisika.

U mozgu normolipemičnih štakora obje doze SIMV prouzročile su porast koncentracije GSH za 29% i 17% koji nije značajan (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.3 B). Koncentracija MDA značajno je smanjena nakon manje doze (10 mg/kg/dan, 59%) i na granici značajnosti nakon veće doze (50 mg/kg/dan, 21%). Zbog porasta GSH i pada MDA obje doze SIMV u mozgu normolipemičnih štakora pokazuju antioksidacijski učinak.

U mozgu normolipemičnih štakora FENO nije značajno promijenio koncentraciju GSH u odnosu na kontrolnu vrijednost, iako kod veće doze (50 mg/kg/dan) postoji porast koncentracije za 14% (Tablica 5.4.1 i Slika 5.4.3 C). Obje doze izazvale su pad MDA za 6% i 24% (Tablica 5.3.1 i Slike 5.3.3 A i C). U oba slučaja pad nije bio značajan. Za pretpostaviti je da FENO u mozgu normolipemičnih štakora pokazuje blagi antioksidacijski učinak.

U plazmi hiperlipemičnih štakora pad koncentracije GSH za 11% nakon primjene **SIMV** u dozi od 50 mg/kg/dan nije bio značajan (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 A). SIMV nije značajno promijenio koncentraciju MDA u odnosu na kontrolne vrijednosti (Tablica 5.4.2 i Slika 5.3.4 A). Iz dobivenih rezultata proizlazi da SIMV u plazmi hiperlipemičnih štakora ne narušuje ravnotežu između oksidacijskih i antioksidacijskih parametara.

U plazmi hiperlipemičnih štakora doza FENO od 30 mg/kg/dan izazvala je porast koncentracije GSH za 21% koji nije bio značajan (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 A), te značajan pad koncentracije MDA za 33%. Usporedba učinka FENO u dozi od 30 mg/kg/dan na iste parametre u normolipemičnih štakora (značajni pad MDA za 39% i manji porast GSH) s istim parametrima u hiperlipemičnih štakora jasno pokazuje da unatoč postojanja oksidacijskog stresa u hiperlipemičnih životinja antioksidacijsko djelovanje FENO u plazmi dolazi do izražaja.

U jetrima hiperlipemičnih štakora SIMV je izazvao značajni pad koncentracije GSH za 45% (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 B), dok pad koncentracije MDA za 9% nije bio značajan. Potrebno je naglasiti da je stvaranje slobodnih radikala i postojanje oksidacijskog stresa u hiperlipemičnih štakora očekivano povećano zbog hiperlipidemije. Pad koncentracije GSH dokazan u ovom istraživanju vjerojatno je posljedica nedostatka ubikinona izazvanog primjenom SIMV. Naime, u Uvodu (Točka 1.5.5.1) je navedeno kako SIMV u jetrima

inhibicijom aktivnog mjesta HMG-CoA reduktaze, sprječava nastanak i izoprenoida pretača ubikinona, koji je snažan antioksidans (Buhaescu, Antonopoulos). Zbog manjka ubikinona antioksidacijsku ulogu preuzima glutation-peroksidaza, koja inaktiviranjem H_2O_2, stvara oksidirani oblik glutationa (GSSG), rezultat čega je u ovom istraživanju smanjena koncentracija reduciranog glutationa. Prema tome SIMV u jetrima hiperlipemičnih štakora djeluje prooksidacijski, ali bez znakova lipidne peroksidacije (nema porasta koncentracije MDA). Razlike u koncentracijama GSH u jetrima hiperlipemičnih štakora i normolipemičnih dokaz su kako isti antilipidni lijek može drugačije djelovati u uvjetima promijenjenog patološkog stanja (Tablica 5.4.1 i 5.4.2, Slike 5.4.2 B i 5.4.4 B).

U jetrima hiperlipemičnih štakora FENO je u dozi od 30 mg/kg/dan je izazvao značajan pad koncentracije GSH za 80% (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 B), dok pad koncentracija MDA za 10% nije značajan. I u slučaju FENO, kao i u slučaju SIMV, potrebo je prvotno naglasiti postojanje oksidacijskog stresa u jetrima hiperlipemičnih štakora zbog hiperlipidemije. Pad koncentracije GSH u ovom soju štakora je veći (80%) nego što je pad GSH (54%-60%) u jetrima normolipemičnih štakora. Razlozi pada koncentracije GSH u ovom soju štakora su isti kao i oni opisani kod normolipemičnih. Razlog većeg pada u hiperlipemičnih štakora je postojanje patološkog stanja.

U mozgu hipelipemičnih štakora koncentracije GSH i MDA su bile praktički jednake kontrolnim vrijednostima nakon primjene SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan. Dobiveni rezultati ukazuju da SIMV ne utječe na ravnotežu između oksidacijskih i antioksidacijskih parametara (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 C). Međutim, kada se utjecaj SIMV na GSH i MDA u mozgu hiperlipemičnih štakora usporedi s učincima SIMV u istoj dozi (50 mg/kg/dan) na iste parametre u mozgu normolipemičnih štakora (pad MDA za 21% na granici značajnosti i porast GSH za 17%, ali ne i značajan) postaje jasno da antioksidacijski učinak SIMV u hiperlipemičnih životinja ne dolazi do izražaja zbog postojanja oksidacijskog stresa u istog soja životinja.

U mozgu hiperlipemičnih štakora koncentracija GSH nakon primjene FENO u dozi od 30 mg/kg/dan bila je slična vrijednosti kontrolne skupine (Tablica 5.4.2 i Slika 5.4.4 C). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je primjena **FENO** izazvala značajni porast koncentracije MDA za 39% ($p = 0,032$) u odnosu kontrolnu skupinu (Tablica 5.3.2 i Slika 5.3.4 C). Kad se usporedi utjecaj FENO na koncentraciju MDA u mozgu normolipemičnih životinja u kojoj je izmjeren pad koncentracije MDA za 24% vidljivo je da FENO zbog postojanja oksidacijskog stresa u mozgu hiperlipemičnih štakora djeluje suprotno tj. prooksidacijski.

Na temelju predočenih rezultata antioksidacijski učinak SIMV bez obzira na primijenjenu dozu postoji u plazmi, jetrima i mozgu normolipemičnih štakora. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima koji potvrđuju antioksidacijski učinak SIMV (135,165,224). Isto tako je iz rezultata vidljivo da antioksidacijski učinak SIMV nije došao do izražaja u plazmi i mozgu hiperlipemičnih štakora, dok je u jetrima istog soja štakora dokazan njegov prooksidacijski učinak. Vjerojatno je oksidacijski stres, izražen u stanju hiperlipemije, glavni razlog zašto u hiperlipemičnih štakora SIMV nije pokazao antioksidacijski učinak. Slični rezultati dobiveni su u istraživanjima Scheffera i suradnika (173). Za razliku od SIMV, ROSU bi u plazmi i mozgu, ali ne i u jetrima normolipemičnih štakora mogao djelovati prooksidativno.

Prema dobivenim rezultatima FENO u plazmi normolipemičnih štakora djeluje slično kao i SIMV, tj. antioksidacijski, dok u mozgu istog soja štakora postoji samo naznaka takvog učinka. Slične rezultate pokazala su istraživanja Beltowskog i sur. (19). U plazmi hiperlipemičnih štakora je unatoč postojanja oksidacijskog stresa antioksidacijsko djelovanje FENO održano. U mozgu hiperlipemičnih štakora postoji suprotni učinak FENO, tj. prooksidacijski. Budući da je FENO proliferator peroksizoma, nije iznenađujuće da je u jetrima normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora dokazano njegovo izrazito prooksidacijsko djelovanje, što je također u skladu s podacima iz literature.

Istaknuto je da se danas acetilkolin smatra važnom protuupalnom molekulom u kolinergičkom protuupalnom putu (98). Obzirom na činjenicu da sva tri antilipidna lijeka u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora povećavaju aktivnost plazmatske PChE znači, da je hidroliza acetilkolina ubrzana, a njegovo djelovanje kao protuupalne molekule može biti oslabljeno. U tom smislu sva tri antilipidna lijeka mogu djelovati proupalno. Porast aktivnosti PChE u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene SIMV i ROSU može značiti i ometanje kolinergičke transmisije ACh u SŽS. Mogući antioksidacijski učinak SIMV i FENO postoji u plazmi i mozgu normolipemičnih štakora, a ne postoji u plazmi i mozgu hiperlipemičnog soja. Kod hiperlipemičnih štakora, SIMV i FENO zbog toga što povećavaju aktivnost PChE i nemaju antioksidacijski učinak, mogu sinergistički potaknuti inhibiciju kolinergičkog protuupalnog puta. Značajnost ovih rezultata u patološkim stanjima u klinici zahtjeva daljnja istraživanja.

Što se tiče učinaka ROSU, SIMV i FENO na status lipida u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora važno je naglasiti (Uvod, točka 1.2.1) da za razliku od ljudi, štakori većinu endogenog kolesterola i trigliceride u plazmi prenose putem HDL-a, a prekomjerna

koncentracija kolesterola rezultira povećanom proizvodnjom VLDL-a (18,19). Iako statini u glodavaca ne snižavaju koncentraciju plazmatskog kolesterola, nego triglicerida, u pretkliničkim ispitivanjima je dokazano da se štakori mogu koristiti za ispitivanje učinaka statina (20). Naime, kod štakora sniženje koncentracije triglicerida korelira sa sniženjem koncentracije kolesterola kod zamorca ili kunića, kod kojih je kao i u ljudi LDL glavni prijenosnik kolesterola (21,22). Rezultati dobiveni u normolipemijskih štakora jasno pokazuju da su sva tri ispitivana antilipemijska lijeka izazvala pad koncentracije triglicerida (značajan kod obje doze ROSU, te kod veće doze SIMV i FENO). Značajan porast HDL izmjeren je samo nakon primjene obje doze SIMV. ROSU nije utjecao na koncentraciju HDL, dok su obje doze FENO značajno smanjile HDL. Kod hiperlipemičnih štakora SIMV nije utjecao na koncentracije HDL i triglicerida, suprotno fenofibratu koji je izazvao značajan porast triglicerida i značajan pad HDL kolesterola. Učinci SIMV na koncentracije HDL i triglicerida su u normolipemijskih štakora očekivani i u skladu su s podacima iz literature (227). Izostanak učinka SIMV na pad koncentracije triglicerida i porast HDL kolesterola u hiperlipemičnih štakora vjerojatno je posljedica patofiziološkog stanja spomenutog soja štakora. Rezultati koji pokazuju pad koncentracije HDL u normolipemičnih štakora nakon primjene FENO podudaraju se s rezultatima Wülfert-a iz 1980. koji je dokazao da fenofibrat u normolipemijskih štakora inducira smanjenje HDL kolesterola (228). Danas je međutim poznato da fibrati u glodavaca mogu smanjiti HDL kolesterol kao rezultat smanjene ekspresije gena za HDL apolipoproteine, ApoA-I i apoA-II, i neke enzime uključene u metabolizam lipida kao što je hepatička lipaza (229). Upravo smanjena ekspresija gena za HDL apolipoproteine izazvana s FENO može biti odgovorna za pad koncentracije HDL kolesterola u oba soja štakora. Porast triglicerida u hiperlipemičnih štakora nakon primjene fenofibrata dokazan u ovim rezultatima vjerojatno je posljedica njihovih još uvijek nerazjašnjenih učinaka na metabolizam lipida u hiperlipemičnih štakora. Postoje dokazi da fibrati mogu povećati ili smanjiti koncentracije triglicerida i kolesterola u jetrima, i da neki od njih, poput bezafibrata i gemfibrozila imaju suprotne učinke na koncentracije lipida u plazmi i jetrima ovisno o stupnju hipertrigliceridemije (230). Navedene razlike između bezafibrata i gemfibrozila vjerojatno vrijede i za fenofibrat, te pružaju objašnjenje za u dobivenim rezultatima vidljiv različiti učinak FENO na koncentraciju triglicerida u normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora.

7 ZAKLJUČCI

1. Ne postoji razlika u djelovanju antilipidnih lijekova na aktivnost PChE u plazmi normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora. Aktivnost PChE je povećana nakon primjene sva tri antilipidna lijeka (ROSU, SIMV i FENO) u normolipemičnih štakora bez obzira na primijenjenu dozu i upotrijebljeni supstrat (ACTh i BTCh). Isti zaključak odnosi se na učinke SIMV i FENO na aktivnost PChE u plazmi hiperlipemičnih štakora.

2. Veća aktivnost plazmatske PChE u oba soja štakora je izmjerena korištenjem BTCh kao supstrata, što je u skladu s literaturnim podacima o većem afinitetu PChE za supstrat BTCh nego za ACTh.

3. Postoji razlika u učincima jednakih doza SIMV i FENO na aktivnost PChE u plazmi normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora. Veći porast plazmatske aktivnosti PChE mjerene s oba supstrata postoji u hiperlipemičnih štakora.

4. Samo su mala doza ROSU i obje doze FENO izazvale značajan porast katalitičke aktivnosti PChE u jetrima normolipemičnih štakora neovisno o korištenom supstratu.

5. Postoji razlika u učincima jednakih doza SIMV i FENO na aktivnost PChE u jetrima normolipemičnih i hiperlipemičnih štakora. Porast aktivnosti PChE u jetrima hiperlipemičnih štakora nakon primjene SIMV (50 mg/kg/dan) i FENO (30 mg/kg/dan) uz korištenje oba supstrata bio je značajan, te veći nego u normolipemičnih štakora.

6. Ne postoji razlika u djelovanju veće doze hidrofilnog ROSU (10 mg/kg/dan) i obje doze lipofilnog SIMV na aktivnost PChE u mozgu normolipemičnih štakora. Oba antilipidna lijeka su izazvala porast aktivnosti PChE uz supstrat BTCh. Lipofilni SIMV je neovisno o korištenom supstratu i dozi izazvao povećanje aktivnosti PChE u mozgu oba soja štakora.

7. Aktivnost PChE nije značajno promijenjena u mozgu normolipemičnih štakora nakon primjene obje doze FENO (30 mg/kg/dan i 50 mg/kg/dan). U mozgu hiperlipemičnih štakora FENO (30 mg/kg/dan) je izazvao značajan porast aktivnosti PChE uz korištenje BTCh kao supstrata.

8. U plazmi normolipemičnih štakora veća doza ROSU je izazvala značajni porast koncentracije MDA, a veća doza SIMV značajni pad koncentracije MDA. Navedeno ukazuje da ROSU može djelovati prooksidacijski, a SIMV antioksidacijski. Obje doze FENO pokazale su antioksidacijski učinak, jer postoji značajni pad koncentracije MDA nakon obje doze i značajni porast GSH nakon veće doze.

9. U jetrima normolipemičnih štakora ROSU ne utječe na stvaranje reaktivnih radikala kisika, dok SIMV u većoj dozi zbog značajnog porasta koncentracije GSH može djelovati antioksidacijski. Obje doze FENO izazvale su značajan pad koncentracije GSH što ukazuje na izraziti prooksidacijski učinak.

10. U mozgu normolipemičnih štakora ROSU je u manjoj dozi značajno smanjio koncentraciju GSH, pa mu učinak može biti prooksidacijski. Zbog značajnog pada koncentracije MDA nakon primjene manje doze, SIMV može djelovati antioksidacijski. Obje doze FENO nisu izazvale značajne promjene koncentracija GSH i MDA.

11. U plazmi hiperlipemičnih štakora SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan nije značajno utjecao na koncentraciju GSH i MDA. FENO u dozi 30 mg/kg/dan je pokazao antioksidacijski učinak jer je izazvao značajni pad koncentracije MDA.

12. U jetrima hiperlipemičnih štakora SIMV i FENO u ispitivanim dozama djeluju prooksidacijski, jer su izazvali značajni pad koncentracije GSH.

13. U mozgu hiperlipemičnih štakora SIMV nije značajno utjecao na koncentracije MDA i GSH. Primjena FENO u dozi od 30 mg/kg/dan je izazvala značajni porast koncentracije MDA što je u usporedbi s učinkom iste doze na koncentraciju MDA u mozgu normolipemičnih životinja suprotan, prooksidacijski učinak.

14. Sva tri ispitivana antilipidna lijeka su u plazmi normolipemičnih štakora izazvala pad koncentracije triglicerida. Porast HDL kolesterola izmjeren je samo nakon primjene SIMV. Obje doze FENO smanjile su koncentraciju HDL kolesterola.

15. Kod hiperlipemičnih štakora SIMV nije utjecao na koncentracije HDL i triglicerida, dok je FENO izazvao značajni porast triglicerida i značajan pad HDL kolesterola.

8 KRATKI SADRŽAJ

Pseudokolinesteraza (PChE), osim što ima značajnu farmakološku ulogu, zajedno s acetilkolinesterazom sudjeluje u hidrolizi acetilkolina. Nova saznanja su da je acetilkolin protuupalna molekula, da postoji kolinergički protuupalni put i da PChE može predstavljati upalni biljeg kod sistemskih upala blažeg stupnja. Zato je važno poznavati lijekove koji mijenjaju aktivnost PChE. U ovom istraživanju su ispitivani učinci simvastatina, rosuvastatina i fenofibrata na aktivnost PChE i parametre oksidacijskog stresa kod normolipemičkih i hiperlipemičkih štakora, budući da je u patološkim stanjima, kao što su upala i hiperlipidemija prisutan i oksidacijski stres. Svi istraživani antilipidni lijekovi značajno su povećali aktivnost PChE u plazmi oba soja štakora. U mozgu normolipemičnih štakora porast aktivnosti PChE dokazan je nakon primjene statina, dok je u mozgu hiperlipemičnih štakora na porast aktivnosti utjecao i fenofibrat. U jetrima je porast aktivnosti bio izraženiji kod hiperlipemičnih štakora. Rezultati ispitivanja učinaka antilipidnih lijekova na parametre oksidacijskog stresa pokazuju da simvastatin i fenofibrat u plazmi i mozgu normolipemičnih štakora pokazuju antioksidacijski učinak, za razliku od rosuvastatina koji može djelovati prooksidacijski. U plazmi i mozgu hiperlipemičnih štakora simvastatin ne djeluje na parametre oksidacijskog stresa, dok fenofibrat u plazmi istog soja štakora djeluje antioksidacijski, a u mozgu prooksidacijski. U jetrima oba soja štakora fenofibrat djeluje izrazito prooksidacijski. Rezultati pokazuju da sva tri antilipidna lijeka utječu na aktivnost PChE i parametre oksidacijskog stresa u normalnim i patološkim uvjetima, te stoga mogu utjecati kako na farmakološku ulogu PChE tako i na tijek nekih patofizioloških procesa.

9 SUMMARY

Effects of antlipid drugs on cholinesterase and oxidative stress parameters of normolipemic and hyperlipemic rats

Beside significant pharmacological role pseudocolinesterase (PChE) is involved in hydrolysis of acetylcholine, an anti-inflammatory molecule. Drugs can alter PChE activity. Since oxidative stress is present in pathological conditions such as inflammation and hyperlipemia in this study the effects of simvastatin, rosuvastatin, and fenofibrate on PChE activity and parameters of oxidative stress in normolipemic and hyperlipemic rats were investigated. All investigated drugs significantly increased plasma PChE activity in both strains of rats. In the brain of normolipemic rats, increase in PChE activity was demonstrated after statin administration, whereas in hyperlipemic rat brain, an increase in activity was also after fenofibrate. In the liver, increase in activity was more pronounced in hyperlipemic rats. Unlike rosuvastatin, simvastatin and fenofibrate showed antioxidant effect in plasma and brain of normolipemic rats. In plasma of hyperlipemic rats fenofibrate showed antioxidant effects, and in brain pro-oxidant. In the liver of both strains of rats, the effects of fenofibrate were pro-oxidant, and effect of simvastatin was antioxidant in the liver of normolipemic and pro-oxidant in hyperlipemic rats. Investigated drugs influenced PChE activity and oxidative stress under normal and pathological conditions. The consequences could be change in pharmacological role of PChE and change in course of some pathophysiological processes.

Antonija Vukšić, 2020.

10 POPIS LITERATURE

1. Guyton A, Hall J. Medicinska fiziologija. 10th ed. Taradi S, Andreis I, editors. Zagreb: Medicinska Naklada; 2003. Str. 785–788.

2. Wood EJ. Harper's biochemistry 28th edition [Internet]. 28th ed. Biochemical Education. The McGraw-Hill Companies; 2009. 121–130 p. Dostupno na: https://awesomechem.files.wordpress.com/2016/10/harpers-illustrated-biochemistry-28th-ed-robert-k-murray-et-al-mcgraw-hill-2009.pdf

3. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RWJ, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. Int J Biol Sci. 2009 Jun;5(5):474–88.

4. Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. Curr Opin Lipidol [Internet]. 2016;27(3). Dostupno na: https://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2016/06000/Atherosclerosis___the_interplay_between_lipids_and.2.aspx

5. Actis Dato V, Chiabrando GA. The Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis and Inflammation. Int J Mol Sci. 2018 Jun 15;19(6):1780.

6. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. J Lipid Res. 1995 Feb;36(2):211–28.

7. van der Velde A-E. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. World J Gastroenterol. 2010/12/21. 2010 Dec 21;16(47):5908–15.

8. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. Atherosclerosis [Internet]. 1996 Jul 1;124:S11–20. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/0021-9150(96)05852-2

9. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. Eur J Clin Invest. 2003 Dec;33(12):1051–69.

10. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, i sur. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. N Engl J Med. 1993 Apr;328(17):1220–5.

11. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, i sur. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. Eur Heart J. 2016 Aug;37(29):2315–81.

12. Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. Clin Biochem [Internet]. 2007;40(9):575–84. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912007001403

13. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, 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 Jul;92(2):152–60.

14. Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes EH, i sur. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet (London, England). 2012 Aug;380(9841):581–90.

15. Breuer HW. Hypertriglyceridemia: a review of clinical relevance and treatment options: focus on cerivastatin. Curr Med Res Opin. 2001;17(1):60–73.

16. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen P, Hu T, i sur. Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. JAMA. 2007 Feb;297(5):499–508.

17. Frishman WH, Horn J. Statin-drug interactions: not a class effect. Cardiol Rev. 2008;16(4):205–12.

18. Gatto LM, Lyons MA, Brown AJ, Samman S. Trans fatty acids affect lipoprotein metabolism in rats. J Nutr. 2002 Jun;132(6):1242–8.

19. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPARalpha) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity. J Physiol Pharmacol. 2002 Sep;53(3):463–75.

20. Khan B, Wilcox HG, Heimberg M. Cholesterol is required for secretion of very-low-density lipoprotein by rat liver. Biochem J. 1989 Mar;258(3):807–16.

21. Krause BR, Newton RS. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. Atherosclerosis. 1995 Oct;117(2):237–44.

22. Kam NT, Albright E, Mathur S, Field FJ. Effect of lovastatin on acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase (ACAT) activity and the basolateral-membrane secretion of newly synthesized lipids by CaCo-2 cells. Biochem J [Internet]. 1990 Dec 1;272(2):427–33. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268271

23. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. Cerivastatin modulates plasma paraoxonase/arylesterase activity and oxidant-antioxidant balance in the rat. Pol J Pharmacol. 2002;54(2):143–50.

24. Hajar R. Statins: past and present. Heart Views. 2011 Jul;12(3):121–7.

25. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. Fundam Clin Pharmacol. 2005 Feb;19(1):117–25.

26. Niemi M. Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2010;87(1):130–3. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2009.197

27. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther. 2006;80(6):565–81.

28. Wood WG, Eckert GP, Igbavboa U, Müller WE. Statins and neuroprotection: A prescription to move the field forward. Ann N Y Acad Sci. 2010;1199:69–76.

29. Higaki K, Matsumura T, Inazawa K, Hasegawa H, Nakano M, Koike M. Liver-Specific Distribution of Rosuvastatin in Rats : Comparison With Abstract : Drug Metab Dispos. 2002;30(11):1158–63.

30. Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH. Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. Clin Med Insights Cardiol. 2012;6:17–33.

31. Wang D, Liu B, Tao W, Hao Z, Liu M. Fibrates for secondary prevention of cardiovascular disease and stroke. Cochrane database Syst Rev. 2015 Oct;(10):CD009580.

32. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, i sur. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. N Engl J Med. 1999 Aug;341(6):410–8.

33. Grundy SM, Vega GL, Yuan Z, Battisti WP, Brady WE, Palmisano J. Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). Am J Cardiol. 2005 Feb;95(4):462–8.

34. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta. 1996 Jul;1302(2):93–109.

35. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation. 1998 Nov;98(19):2088–93.

36. Chapman MJ. Pharmacology of fenofibrate. Am J Med. 1987;83(5 SUPPL. 2):21–5.

37. Dalvi S, On N, Nguyen H, Pogorzelec M, W. D, M. G. The Blood Brain Barrier — Regulation of Fatty Acid and Drug Transport. Neurochemistry. 2014;3–36.

38. Waehre T, Yndestad A, Smith C, Haug T, Tunheim SH, Gullestad L, i sur. Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Circulation. 2004 Apr;109(16):1966–72.

39. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, i sur. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. Ann Neurol. 2003 Jun;53(6):743–51.

40. Hong K-S, Lee JS. Statins in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. J stroke [Internet].2015/09/30.2015Sep;17(3):282–301. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437994

41. Moon GJ, Kim SJ, Cho YH, Ryoo S, Bang OY. Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. J Clin Neurol. 2014 Apr;10(2):140–7.

42. Tsimihodimos V, Liberopoulos E, Elisaf M. Pleiotropic effects of fenofibrate. Curr Pharm Des. 2009;15(5):517–28.

43. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, i sur. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomis. Lancet (London, England). 2003 Apr;361(9364):1149–58.

44. Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, i sur. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2006 Sep;368(9542):1155–63.

45. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet (London, England). 1994 Nov;344(8934):1383–9.

46. Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol [Internet]. 2016;389(7):695–712. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1007/s00210-016-1252-4

47. Diomede L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, i sur. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Aug;21(8):1327–32.

48. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. Circ Res. 2017 Jan;120(1):229–43.

49. Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, i sur. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. Circ Res. 2006 Feb;98(3):361–9.

50. Nagashima T, Okazaki H, Yudoh K, Matsuno H, Minota S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation: A potential therapeutic approach to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2006;54(2):579–86.

51. Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, Chan D, MacManus D, Hunter K, i sur. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet (London, England). 2014 Jun;383(9936):2213–21.

52. Lee Y-C, Lin C-H, Wu R-M, Lin M-S, Lin J-W, Chang C-H, i sur. Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: a population-based study. Neurology. 2013 Jul;81(5):410–6.

53. Shinohara M, Sato N, Shimamura M, Kurinami H, Hamasaki T, Chatterjee A, i sur. Possible modification of Alzheimer's disease by statins in midlife: interactions with genetic and non-genetic risk factors. Front Aging Neurosci. 2014;6:71.

54. Haag MDM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BHC, Breteler MMB. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2009 Jan;80(1):13–7.

55. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. Immunol Invest. 2014;43(1):54–68.

56. de Oliveira DM, de Oliveira EML, Ferrari M de FR, Semedo P, Hiyane MI, Cenedeze MA, i sur. Simvastatin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Th1/Th17 response and cellular infiltration. Inflammopharmacology. 2015;23(6):343–54.

57. Ntolkeras G, Barba C, Mavropoulos A, Vasileiadis GK, Dardiotis E, Sakkas LI, i sur. On the immunoregulatory role of statins in multiple sclerosis: the effects on Th17 cells. Immunol Res. 2019;

58. Nath N, Giri S, Prasad R, Singh AK, Singh I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. J Immunol. 2004 Jan;172(2):1273–86.

59. Zeiser R. Immune modulatory effects of statins. Immunology. 2018 May;154(1):69–75.

60. Kumar A, Sharma N, Gupta A, Kalonia H, Mishra J. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. Brain Res. 2012 Aug;1471:13–22.

61. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Arch Neurol. 2000 Oct;57(10):1439–43.

62. Geifman N, Brinton RD, Kennedy RE, Schneider LS, Butte AJ. Evidence for benefit of statins to modify cognitive decline and risk in Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther. 2017 Feb;9(1):10.

63. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori CR, Mitro N, Ruscica M.

Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Apr 14;19(4):1197. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29662003

64. Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Jun;28(6):1050–9.

65. Ali FY, Armstrong PCJ, Dhanji A-RA, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA, i sur. Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 May;29(5):706–11.

66. Kockx M, Gervois PP, Poulain P, Derudas B, Peters JM, Gonzalez FJ, i sur. Fibrates suppress fibrinogen gene expression in rodents via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. Blood. 1999 May;93(9):2991–8.

67. Sahebkar A, Serban M-C, Mikhailidis DP, Toth PP, Muntner P, Ursoniu S, i sur. Head-to-head comparison of statins versus fibrates in reducing plasma fibrinogen concentrations: A systematic review and meta-analysis. Pharmacol Res. 2016 Jan;103:236–52.

68. Tsimihodimos V, Miltiadous G, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Fenofibrate: metabolic and pleiotropic effects. Curr Vasc Pharmacol. 2005 Jan;3(1):87–98.

69. Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, Hsu F-C, Riddle DR, Robbins ME. The PPARalpha agonist fenofibrate preserves hippocampal neurogenesis and inhibits microglial activation after whole-brain irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009

Nov;75(3):870–7.

70. Paumelle R, Staels B. Cross-talk Between Statins and PPARα in Cardiovascular Diseases: Clinical Evidence and Basic Mechanisms. Trends Cardiovasc Med. 2008;18(3):73–8.

71. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, i sur. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Jul;302(1):232–9.

72. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, i sur. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. Circ Res. 2007 May;100(10):1442–51.

73. Drew PD, Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK. Peroxisome proliferator-activated receptor agonist regulation of glial activation: relevance to CNS inflammatory disorders. Neurochem Int. 2006 Jul;49(2):183–9.

74. Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gele P, Gautier S, Laprais M, i sur. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. Biochem Soc Trans. 2006 Dec;34(Pt 6):1341–6.

75. Antonosante A, d'Angelo M, Castelli V, Catanesi M, Iannotta D, Giordano A, i sur. The Involvement of PPARs in the Peculiar Energetic Metabolism of Tumor Cells. Int J Mol Sci. 2018 Jun;19(7).

76. Josan K, Majumdar SR, McAlister FA. The efficacy and safety of intensive statin therapy: a meta-analysis of randomized trials. CMAJ. 2008 Feb;178(5):576–84.

77. Thompson PD, Panza G, Zaleski A, Taylor B. Statin-Associated Side Effects. J Am Coll Cardiol. 2016 May;67(20):2395–410.

78. Boudreau DM, Yu O, Johnson J. Statin use and cancer risk: a comprehensive review. Expert Opin Drug Saf. 2010 Jul;9(4):603–21.

79. Strom BL, Schinnar R, Karlawish J, Hennessy S, Teal V, Bilker WB. Statin Therapy and Risk of Acute Memory Impairment. JAMA Intern Med. 2015 Aug;175(8):1399–405.

80. Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BM, Doraiswamy PM. Statin-associated memory

loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. Pharmacotherapy. 2003 Jul;23(7):871–80.

81. Preiss D, Seshasai SRK, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, i sur. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. JAMA. 2011 Jun;305(24):2556–64.

82. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes M V, Engmann JEL, Shah T, i sur. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. Lancet (London, England). 2015 Jan;385(9965):351–61.

83. Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, i sur. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. Lancet (London, England). 2016 Nov;388(10059):2532–61.

84. FDA Drug Safety Communication: Important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs [Internet]. [cited 2019 Jul 2]. Dostupno na: https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-important-safety-label-changes-cholesterol-lowering-statin-drugs

85. Navarese EP, Buffon A, Andreotti F, Kozinski M, Welton N, Fabiszak T, i sur. Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus. Am J Cardiol. 2013 Apr;111(8):1123–30.

86. Evans MA, Golomb BA. Statin-associated adverse cognitive effects: survey results from 171 patients. Pharmacotherapy. 2009 Jul;29(7):800–11.

87. Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. Toxicology. 2008 Apr;246(1):2–8.

88. Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. Mol Pharmacol. 1998 Jan;53(1):14–22.

89. Coté CJ, Lerman JL, Todres D. Practice of Anesthesia in Infants and Children [Internet]. Saunders E. New York; 2009. 139 p. Dostupno na: https://the-eye.eu/public/Books/BioMed/Practice of Anesthesia in Infants and Children 4th ed - C. Cote%2C et al.%2C%28Saunders%2C 2009%29 WW.pdf

90. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. Pharmacol Ther. 2015 Apr;148:34–46.

91. Jbilo O, Bartels CF, Chatonnet A, Toutant J-P, Lockridge O. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. Toxicon [Internet]. 1994;32(11):1445–57. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010194904162

92. Darvesh S, Hopkins DA. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. J Comp Neurol. 2003 Aug;463(1):25–43.

93. Cokugras AN. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. Vol. 28, Turk. J. Biochem. 2003. Str. 54–61.

94. Pope CN, Brimijoin S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. Biochem Pharmacol. 2018 Jul;153:205–16.

95. Braun JBS, Ruchel JB, Adefegha SA, Coelho AP V., Trelles KB, Signor C, i sur. Neuroprotective effects of pretreatment with quercetin as assessed by acetylcholinesterase assay and behavioral testing in poloxamer-407 induced hyperlipidemic rats. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;88:1054–63. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.134

96. Reid GA, Darvesh S. Butyrylcholinesterase-knockout reduces brain deposition of fibrillar beta-amyloid in an Alzheimer mouse model. Neuroscience. 2015 Jul;298:424–35.

97. Darvesh S. Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. Chem Biol Interact. 2013 Mar;203(1):354–7.

98. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. Med Sci Monit. 2007 Dec;13(12):RA214-21.

99. Zila I, Mokra D, Kopincova J, Kolomaznik M, Javorka M, Calkovska A. Vagal-immune interactions involved in cholinergic anti-inflammatory pathway. Physiol Res. 2017 Sep;66(Supplementum 2):S139–45.

100. Han B, Li X, Hao J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases. Neurosci Biobehav Rev. 2017 Jun;77:358–68.

101. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. Ann Hepatol [Internet]. 2012;11(3):409–11. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681(19)30940-8

102. Xue L, Hou S, Yang W, Fang L, Zheng F, Zhan C-G. Catalytic activities of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase against (+)- and (-)-cocaine. Chem Biol Interact. 2013 Mar;203(1):57–62.

103. Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, Lockridge O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. Clin Chim Acta. 2007 Mar;378(1–2):128–35.

104. Duysen EG, Li B, Darvesh S, Lockridge O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (--)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. Toxicology. 2007 Apr;233(1–3):60–9.

105. Mesulam M-M, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience. 2002;110(4):627–39.

106. Clitherow Jw, Mitchard M, Harper Nj. The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature. 1963 Sep;199:1000–1.

107. Lawrence Sh, Melnick Pj. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, immunoelectrophoretic and quantitative studies. Proc Soc Exp Biol Med. 1961;107:998–1001.

108. Kutty KM, Rowden G, Cox AR. Interrelationship between serum -lipoprotein and cholinesterase. Can J Biochem. 1973 Jun;51(6):883–7.

109. Kutty KM, Jocob JC, Hutton CJ, Davis PJ, Peterson SC. Serum beta -- lipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. Clin Biochem. 1975 Dec;8(6):379–83.

110. Inacio Lunkes G, Stefanello F, Sausen Lunkes D, Maria Morsch V, Schetinger MRC, Goncalves JF. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. Diabetes Res Clin Pract. 2006 Apr;72(1):28–32.

111. Chen VP, Gao Y, Geng L, Stout MB, Jensen MD, Brimijoin S. Butyrylcholinesterase Deficiency Promotes Adipose Tissue Growth and Hepatic Lipid Accumulation in Male Mice on High-Fat Diet. Endocrinology. 2016 Aug;157(8):3086–95.

112. Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. J Clin Lab Anal. 1994;8(4):247–50.

113. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. Chem Biol Interact. 2008 Sep;175(1–3):115–8.

114. Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. Clin Biochem. 2005 Sep;38(9):799–805.

115. Ziobro A, Duchnowicz P, Mulik A, Koter-Michalak M, Broncel M. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome. Mol Cell Biochem. 2013 Jun;378(1–2):267–73.

116. Duchnowicz P, Ziobro A, Rapacka E, Koter-Michalak M, Bukowska B. Changes in Cholinesterase Activity in Blood of Adolescent with Metabolic Syndrome after Supplementation with Extract from Aronia melanocarpa. Biomed Res Int. 2018;2018:5670145.

117. Argiles JM. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. Prog Lipid Res. 1989;28(1):53–66.

118. Madhavan Kutty K, Jain R, Kean KT, Peper C. Cholinesterase activity in the serum and liver of Zucker fat rats and controls. Nutr Res [Internet]. 1984;4(1):99–104. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531784801384

119. Brimijoin S, Chen VP, Pang Y-P, Geng L, Gao Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. Chem Biol Interact. 2016 Nov;259(Pt B):271–5.

120. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. Endocrinology. 2004 Nov;145(11):4997–5005.

121. Darvesh S, Reid GA, Martin E. Biochemical and histochemical comparison of cholinesterases in normal and Alzheimer brain tissues. Curr Alzheimer Res. 2010 Aug;7(5):386–400.

122. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in Brain Cholinesterases in Senile Dementia of Alzheimer Type. Neuropathol Appl Neurobiol. 1978;4(4):273–7.

123. Diamant S, Podoly E, Friedler A, Ligumsky H, Livnah O, Soreq H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2006 Jun 6;103(23):8628 LP – 8633. Dostupno na: http://www.pnas.org/content/103/23/8628.abstract

124. Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJ, Heine RJ. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? Clin Sci (Lond). 2001 Jul;101(1):29–35.

125. Randell EW, Rogers B, Smith E. Production of butyrylcholinesterase by Caco-2 cells: lack of relationship with triglyceride production. Cell Mol Life Sci. 2001 Aug;58(9):1327–32.

126. Sicinska P, Bukowska B, Pajak A, Koceva-Chyla A, Pietras T, Nizinkowski P, i sur. Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Arch Med Sci. 2017 Apr;13(3):645–51.

127. Lucic Vrdoljak A, Bradamante V, Radic B, Peraica M, Fuchs R, Reiner Z. Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. Acta Pharm. 2005 Jun;55(2):177–85.

128. Bradamante V, Kunec-Vajic E, Lisic M, Dobric I, Beus I. Plasma cholinesterase activity in patients during therapy with dexamethasone or prednisone. Eur J Clin Pharmacol. 1989;36(3):253–7.

129. Barabas E, Zsigmond EK, Kirkpatrick AF. The inhibitory effect of esmolol on human plasmacholinesterase. Can Anaesth Soc J. 1986 May;33(3 Pt 1):332–5.

130. Bradamante V, Krnic Z, Zrinski R, Konjevoda P, Reiner Z. Changes in butyrylcholinesterase activity and serum lipids after oxprenolol and glibenclamide treatments in non-diabetic rats. Arzneimittelforschung. 2006;56(2):64–9.

131. Darvesh S, Martin E, Walsh R, Rockwood K. Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. Clin Biochem. 2004 Jan;37(1):42–9.

132. Kunec-Vajić E, Bernat N, Muačević-Katanec D. Effect of hypolipidemic drugs on cholinesterase activity in the rat. Gen Pharmacol. 1992;23(2):217–9.

133. Bradamante, Vrkić, Lucić, Radić, Macan. Interrelated effects of high sucrose diet and gemfibrozil on butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in rats. Period Biol. 2005;107:189–93.

134. Cibickova L, Palicka V, Cibicek N, Cermakova E, Micuda S, Bartosova L, i sur. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. Physiol Res. 2007;56(6):765–70.

135. Macan M, Vuksic A, Zunec S, Konjevoda P, Lovric J, Kelava M, i sur. Effects of

simvastatin on malondialdehyde level and esterase activity in plasma and tissue of normolipidemic rats. Pharmacol Rep. 2015 Oct;67(5):907–13.

136. Muacevic-Kataneca D, Bradamante V, Reinec Z, Sucic M, Poljicanin T, Busljeta I, i sur. Clinical study on the effect of simvastatin on butyrylcholinesterase activity. Arzneimittelforschung. 2005;55(5):271–5.

137. Pytel E, Bukowska B, Koter-Michalak M, Olszewska-Banaszczyk M, Gorzelak-Pabis P, Broncel M. Effect of intensive lipid-lowering therapies on cholinesterase activity in patients with coronary artery disease. Pharmacol Rep. 2017 Feb;69(1):150–5.

138. AbdulSalam SF, Thowfeik FS, Merino EJ. Excessive reactive oxygen species and exotic DNA lesions as an exploitable liability. Biochemistry. 2016;55(38):5341–52.

139. Lovrić J, Žarković N KR. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Zagreb: Medicinska Naklada; 2002.

140. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. Redox Biol [Internet]. 2015;4:180–3. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002

141. Palade F, Alexa ID, Azoicai D, Panaghiu L, Ungureanu G. Oxidative stress in atherosclerosis. Rev medico-chirurgicala a Soc Medici şi Nat din Iaşi. 2003;107(3):502–11.

142. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D KA, i sur. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2015;23(14):1144–70.

143. Lovrić J. Priručnik za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine. 3rd ed. Zagreb: Medicinska Naklada; 2017.

144. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem. 1997;272(34):20963–6.

145. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2005;15(4):316–28.

146. Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res. 1998

Jun;28(6):659–71.

147. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. Vol. 15, Antioxidants and Redox Signaling. 2011. p. 1583–606.

148. Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 1993;364(6435):362.

149. Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS CV. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(21):5964–9.

150. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. Clin Chem. 1995 Jun;41(6 Pt 1):867–71.

151. Hool LC, Corry B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2007 Apr;9(4):409–35.

152. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 2007 Aug;7(4):355–9.

153. Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: The great exploration. Vol. 2012, Experimental Diabetes Research. 2012.

154. Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, Mansour MA. Chemico-Biological Interactions Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. Chem Biol Interact [Internet]. 2011;192(3):233–42. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.03.014

155. Abareshi A, Norouzi F, Asgharzadeh F, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, i sur. Effect of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor on Cardiac Fibrosis and Oxidative Stress Status in Lipopolysaccharide-induced Inflammation Model in Rats. Int J Prev Med. 2017;8:69.

156. Weglarz L, Drozdz M, Goss M. Effect of anti-inflammatory drugs on the activity of antioxidant enzymes and in vivo peroxidation products in the liver and kidney of rat. Comp Biochem Physiol C. 1990;96(1):83–5.

157. Aviram M, Dankner G, Cogan U, Hochgraf E, Brook JG. Lovastatin inhibits low-

density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies. Metabolism. 1992 Mar;41(3):229–35.

158. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. Atherosclerosis. 1998 Jun;138(2):271–80.

159. Erdos B, Snipes JA, Tulbert CD, Katakam P, Miller AW, Busija DW. Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Mar;290(3):H1264-70.

160. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, i sur. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Feb;22(2):300–5.

161. Schirris TJJ, Renkema GH, Ritschel T, Voermans NC, Bilos A, van Engelen BGM, i sur. Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. Cell Metab. 2015 Sep;22(3):399–407.

162. Bruder-Nascimento T, Callera GE, Montezano AC, Belin de Chantemele EJ, Tostes RC, Touyz RM. Atorvastatin inhibits pro-inflammatory actions of aldosterone in vascular smooth muscle cells by reducing oxidative stress. Life Sci [Internet]. 2019;221(October 2018):29–34. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.043

163. Antonopoulos AS, Margaritis M, Shirodaria C, Antoniades C. Translating the effects of statins: From redox regulation to suppression of vascular wall inflammation. Thromb Haemost. 2012;108(5):840–8.

164. Kojanian H, Szafran-Swietlik A, Onstead-Haas LM, Haas MJ, Mooradian AD. Statins Prevent Dextrose-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Endothelial and HepG2 Cells. Am J Ther. 2016;23(6):e1456–63.

165. Mohamadin AM, Elberry AA, Gawad HSA, Morsy GM, Al-abbasi FA. Protective Effects of Simvastatin , a Lipid Lowering Agent , against Oxidative Damage in Experimental Diabetic Rats. 2011;2011.

166. Su Y, Xu Y, Sun Y-M, Li J, Liu X-M, Li Y-B, i sur. Comparison of the effects of

simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. J Cardiovasc Pharmacol. 2010 Jan;55(1):21–5.

167. Puccetti L, Santilli F, Pasqui AL, Lattanzio S, Liani R, Ciani F, i sur. Effects of atorvastatin and rosuvastatin on thromboxane-dependent platelet activation and oxidative stress in hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2011 Jan;214(1):122–8.

168. Desideri G, Croce G, Tucci M, Passacquale G, Broccoletti S, Valeri L, i sur. Effects of bezafibrate and simvastatin on endothelial activation and lipid peroxidation in hypercholesterolemia: evidence of different vascular protection by different lipid-lowering treatments. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Nov;88(11):5341–7.

169. Rasmussen ST, Andersen JT, Nielsen TK, Cejvanovic V, Petersen KM, Henriksen T, i sur. Simvastatin and oxidative stress in humans: A randomized, Double-blinded, Placebo-controlled clinical trial. Redox Biol [Internet]. 2016;9:32–8. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.007

170. Ahmadi Y, Ghorbanihaghjo A, Naghi-Zadeh M, Yagin NL. Oxidative stress as a possible mechanism of statin-induced myopathy. Inflammopharmacology. 2018 Jun;26(3):667–74.

171. Chen C-L, Zhang L, Yeh A, Chen C-A, Green-Church KB, Zweier JL, i sur. Site-specific S-glutathiolation of mitochondrial NADH ubiquinone reductase. Biochemistry. 2007 May;46(19):5754–65.

172. Zeng H, Liu Z. Atorvastatin Induces Hepatotoxicity in Diabetic Rats via Oxidative Stress, Inflammation, and Anti-Apoptotic Pathway. Med Sci Monit. 2019 Aug;25:6165–73.

173. Scheffer PG, Schindhelm RK, van Verschuer VMT, Groenemeijer M, Simsek S, Smulders YM, i sur. No effect of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in patients at high risk for cardiovascular disease. Neth J Med. 2013 Sep;71(7):359–65.

174. Fassett RG, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP, Coombes JS. Effects of atorvastatin on oxidative stress in chronic kidney disease. Nephrology (Carlton). 2015 Oct;20(10):697–705.

175. Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, i sur. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu2+,Zn2+-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. Metabolism. 2001 Jan;50(1):3–11.

176. Ciriolo MR, Mavelli I, Rotilio G, Borzatta V, Cristofari M, Stanzani L. Decrease of

superoxide dismutase and glutathione peroxidase in liver of rats treated with hypolipidemic drugs. FEBS Lett. 1982 Aug;144(2):264–8.

177. Ciriolo MR, Rossi L, Mavelli I, Rotilio G, Borzatta V, Cristofori M, i sur. The effects of hypolipidemic agents derived from procetofenic acid on the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase and on malonyl dialdehyde production of rat liver. Arzneimittelforschung. 1984;34(4):465–7.

178. Lores Arnaiz S, Travacio M, Monserrat AJ, Cutrin JC, Llesuy S, Boveris A. Chemiluminescence and antioxidant levels during peroxisome proliferation by fenofibrate. Biochim Biophys Acta. 1997 May;1360(3):222–8.

179. Rosenson RS, Wolff DA, Huskin AL, Helenowski IB, Rademaker AW. Fenofibrate therapy ameliorates fasting and postprandial lipoproteinemia, oxidative stress, and the inflammatory response in subjects with hypertriglyceridemia and the metabolic syndrome. Diabetes Care. 2007 Aug;30(8):1945–51.

180. Melenovsky V, Malik J, Wichterle D, Simek J, Pisarikova A, Skrha J, i sur. Comparison of the effects of atorvastatin or fenofibrate on nonlipid biochemical risk factors and the LDL particle size in subjects with combined hyperlipidemia. Am Heart J. 2002;144(4).

181. Le N-A, Farkas-Epperson M, Sweeney ME, Wilson PWF, Virgil Brown W. Effect of ABT-335 (fenofibric acid) on meal-induced oxidative stress in patients with metabolic syndrome. Atherosclerosis. 2013 Dec;231(2):268–73.

182. Kei A, Tellis C, Liberopoulos E, Tselepis A, Elisaf M. Effect of switch to the highest dose of rosuvastatin versus add-on-statin fenofibrate versus add-on-statin nicotinic acid/laropiprant on oxidative stress markers in patients with mixed dyslipidemia. Cardiovasc Ther. 2014 Aug;32(4):139–46.

183. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. Vol. 11, Annals of hepatology. Mexico; 2012. p. 409–11.

184. Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B. The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. Food Chem Toxicol. 2007 Sep;45(9):1709–18.

185. Ellman Gl, Courtney Kd, Andres Vj, Feather-Stone Rm. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961 Jul;7:88–95.

186. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RW. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. Clin Chim Acta. 1997 Jul;263(2):177–85.

187. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 1984;105:93–104.

188. ELLMAN GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch Biochem Biophys. 1958 Apr;74(2):443–50.

189. Rowe P. Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences [Internet]. Chichester, UK: Wiley; 2007. Dostupno na: https://epdf.pub/queue/essential-statistics-for-the-pharmaceutical-sciences.html

190. Cibickova L, Hyspler R, Micuda S, Cibicek N, Zivna H, Jun D, i sur. The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. Steroids. 2009 Jan;74(1):13–9.

191. Macan M. Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora [The influence of antilipid drugs on esterases, lipids and leptin in rats]. 2012 Jan 25; Dostupno na: http://medlib.mef.hr/1560/1/Macan_M_disertacija_rep_1560.pdf

192. Butler EG, England PJ, Williams GM. Effect of peroxisome proliferating hypolipidemic agents on serum activity levels of arylesterase and cholinesterase in rats and mice. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1988 Apr;60(1):125–8.

193. Siskova K, Bilka F, Adameova A, Balazova A, Mydla M, Paulikova I. Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency. Pharmazie. 2012 Apr;67(4):345–50.

194. Hashimoto F, Ishikawa T, Hamada S, Hayashi H. Effect of gemfibrozil on lipid biosynthesis from acetyl-CoA derived from peroxisomal β-oxidation. Biochem Pharmacol. 1995;49(9):1213–21.

195. Cibickova L, Radomir H, Stanislav M, Norbert C, Helena Z, Daniel J, i sur. The influence of simvastatin , atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity , amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. 2008;4:13–9.

196. Dalla Y, Singh N, Jaggi AS, Singh D. Memory restorative role of statins in experimental dementia: an evidence of their cholesterol dependent and independent actions. Pharmacol Rep. 2010;62(5):784–96.

197. Seker FB, Kilic U, Caglayan B, Ethemoglu MS, Caglayan AB, Ekimci N, et al. HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via

mechanisms involving eNOS. Neuroscience. 2015 Jan;284:349–59.

198. Uekawa K, Hasegawa Y, Ma M, Nakagawa T, Katayama T, Sueta D, i sur. Rosuvastatin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of superoxide formation and nuclear factor-kappa B activation in rats. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014 Jul;23(6):1429–39.

199. Ferreira AVM, Menezes-Garcia Z, Mario EG, Delpuerto HL, Martins AS, Botion LM. Increased expression of oxidative enzymes in adipose tissue following PPARα-activation. Metabolism [Internet]. 2014;63(4):456–60. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.12.009

200. Kallai-Sanfacon MA, Cayen MN, Dubuc J, Greselin E, Dvornik D. Effect of AY-25,712 and other lipid-lowering agents on liver catalase and liver carnitine acetyltransferase in rats. Proc Soc Exp Biol Med. 1983 Jul;173(3):367–71.

201. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, i sur. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. Liver Int. 2006 Jun;26(5):613–20.

202. Karahashi M, Hoshina M, Yamazaki T, Sakamoto T, Mitsumoto A, Kawashima Y, i sur. Fibrates reduce triacylglycerol content by upregulating adipose triglyceride lipase in the liver of rats. J Pharmacol Sci. 2013;123(4):356–70.

203. Landrier J-F, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, i sur. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent. J Biol Chem. 2004 Oct;279(44):45512–8.

204. Feidt DM, Klein K, Hofmann U, Riedmaier S, Knobeloch D, Thasler WE, i sur. Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2010 Sep;38(9):1589–97.

205. Kobayashi M, Gouda K, Chisaki I, Ochiai M, Itagaki S, Iseki K. Regulation mechanism of ABCA1 expression by statins in hepatocytes. Eur J Pharmacol. 2011 Jul;662(1–3):9–14.

206. Roy A, Pahan K. PPARα Signaling in the Hippocampus: Crosstalk Between Fat and Memory. J Neuroimmune Pharmacol. 2015;10(1):30–4.

207. Berger J, Dorninger F, Forss-Petter S, Kunze M. Peroxisomes in brain development

and function. Biochim Biophys Acta. 2016 May;1863(5):934–55.

208. Shinn AH, Carr-Lopez SM, Smith JW, Elledge EA, Smith TJ. Effects of switching pravastatin to cerivastatin on C-reactive protein, butyrylcholinesterase, and lipids. Curr Med Res Opin. 2005;21(2):207–13.

209. Ehrmann JJ, Vavrusova N, Collan Y, Kolar Z. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2002 Dec;146(2):11–4.

210. Park J, Kwon OS, Cho SY, Paick J-S, Kim SW. Chronic administration of atorvastatin could partially ameliorate erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. PLoS One. 2017;12(2):e0172751.

211. Weydert C, Cullen J. Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue. Meas Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase Cult Cells Tissue. 2011;5(1):51–66.

212. Nieradko-Iwanicka B, Borzecki A. The 28-day exposure to fenpropathrin decreases locomotor activity and reduces activity of antioxidant enzymes in mice brains. Pharmacol Rep. 2016 Apr;68(2):495–501.

213. Kakkar R, Kalra J, Mantha S V, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol Cell Biochem. 1995 Oct;151(2):113–9.

214. Kocak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, i sur. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. Diabetes Nutr Metab. 2000 Dec;13(6):308–18.

215. Stefek M, Sotnikova R, Okruhlicova L, Volkovova K, Kucharska J, Gajdosik A, i sur. Effect of dietary supplementation with the pyridoindole antioxidant stobadine on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. Acta Diabetol. 2000;37(3):111–7.

216. Cumao A, Ozansoy G, Murat A, Ar A, Karasu Ç, Ar N. Effect of long term , non cholesterol lowering dose of fl uvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. 2011;654:80–5.

217. E S, S T, Z S, M D. Effects of thiamine treatment on oxidative stress in experimental diabetes. Bratisl Lek Listy. 2020;121(3):235–41.

218. Mikrut K, Kupsz J, Kozlik J, Krauss H, Pruszynska-Oszmalek E, Gibas-Dorna M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress intensity in hyperglicemic conditions in rats independently from bradykinin receptor inhibitors. Croat Med J. 2016 Aug;57(4):371–80.

219. Kurhaluk N, Bojkova B, Winklewski PJ. Liver antioxidant and aerobic status improves after metformin and melatonin administration in a rat model of high-fat diet and mammary carcinogenesis. Can J Physiol Pharmacol. 2018 Aug;96(8):790–7.

220. Liu X, Chen C, Zhang X. Drug-drug interaction of acetaminophen and roxithromycin with the cocktail of cytochrome P450 and hepatotoxicity in rats. Int J Med Sci. 2020;17(3):414–21.

221. Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. J Biol Chem. 1980 Oct;255(20):9530–3.

222. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. Eur J Biochem. 2000 Aug;267(16):4912–6.

223. Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. Biol Chem. 2003 Apr;384(4):505–16.

224. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, i sur. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. Mol Cell Biochem. 2018;437(1–2):109–18.

225. Gonzalez FJ, Peters JM, Cattley RC. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor. J Natl Cancer Inst. 1998;90(22):1702–9.

226. Jiao H, Zhao B. Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol. 2002 Dec;185(3):172–9.

227. Adekunle AS, Fatoki JO, Adelusi TI. Antihyperlipidemic and antiatherogenic activity of simvastatin may involve modulation of the expression of lecithin:cholesterol acyl transferase. Acta Biochim Pol. 2013;60(4):579–83.

228. Wulfert E. [How does fenofibrate exert its cholesterol-lowering effect? (author's transl)]. Nouv Presse Med. 1980 Dec;9(49):3733–6.

229. Soria A, Bocos C, Herrera E. Opposite metabolic response to fenofibrate treatment in pregnant and virgin rats. J Lipid Res. 2002;43(1):74–81.

230. Krause BR, Barnett BC, Essenburg AD, Kieft KA, Auerbach BJ, Bousley R, i sur. Opposite effects of bezafibrate and gemfibrozil in both normal and hypertriglyceridemic rats. Atherosclerosis. 1996;127(1):91–101.

11 KRATKA BIOGRAFIJA

Rođena sam 12. listopada 1982. godine u Šibeniku gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u Prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji 2001. godine, upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem sam diplomirala 2008. godine. U Kliničkoj bolnici „Sestre milosrdnice“ 2009. godine odradila sam obavezni pripravnički staž. Iste godine položila sam državni ispit. Tijekom 2010. godine radila sam kao liječnik obiteljske medicine i hitne službe u Domu zdravlja Gračac. Od lipnja 2010. godine radim u Poliklinici Bonifarm kao liječnik suradnik i koordinator u kliničkim ispitivanjima. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2013. godine upisala sam znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. Specijalizaciju iz neurologije započela sam 2014. godine na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, te 2020. godine položila specijalistički ispit. Članica sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog neurološkog društva i Hrvatskog društva farmakologa.