Ekstra djevičansko maslinovo ulje i biokemijski biljezi ateroskleroze u bolesnika na antiretrovirusnoj terapiji

Kozić Dokmanović, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:750911

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Sanja Kozić Dokmanović

EXTRA VIRGIN OLIVE OIL AND ATHEROSCLEROSIS BIOMARKERS IN PATIENTS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

SANJA KOZIĆ DOKMANOVIĆ

EKSTRA DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE I BIOKEMIJSKI BILJEZI ATEROSKLEROZE U BOLESNIKA NA ANTIRETROVIRUSNOJ TERAPIJI

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Josip Begovac
doc. dr.sc. Nada Vrkić

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Klinici za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" u Zagrebu, u sklopu projekta "Epidemiološka i klinička obilježja zaraze HIV-om u Hrvatskoj" Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (108-1080116-0098)

Prof. dr. sc. Josip Begovac, specijalist infektologije, predstojnik je Klinike za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" u Zagrebu i voditelj Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje zaraze HIV-om. Redovni je profesor na Katedri za infektologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Doc. dr. sc. Nada Vrkić, specijalist medicinske biokemije, voditelj je Kliničkog zavoda za kemiju Kliničke bolnice "Sestre Milosrdnice" u Zagrebu. Docent je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

Prije svega, zahvaljujem se prof. dr. sc. Josipu Begovcu, izuzetnom čovjeku i znanstveniku, na stručnom vođenju i nesebičnoj pomoći oko mog doktorskog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Nadi Vrkić na stručnoj pomoći i nizu korisnih savjeta tijekom i nakon izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Renati Zrinski Topić na kritičkom čitanju doktorske disertacije i svim korisnim savjetima koje mi je tom prilikom prenijela.

VMS Korneliji Gedike zahvaljujem se na pomoći u organizaciji i provođenju istraživanja.

Zahvaljujem se svojoj šefici, mag. med. biochem. Krunoslavi Kolovrat, mag. med. biochem. Vedrani Jukić, dr.sc. Renati Laškaj, mag. med. biochem. Sanji Marević, dr. sc. Nori Nikolac, mr. sc. Renatu Mujagiću i dr. sc. Oktaviji Đaković Rode na praktičnoj pomoći u pojedinim segmentima ovog rada.

Za pomoć oko analiza maslinovog ulja zahvaljujem se dr. sc. Ani Mornar i dr. sc. Marijani Zovko Končić s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji.

SAŽETAK

Infekcija virusom humane imunodeficijencije (HIV) povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti jer uzrokuje trajnu upalu, a upala je ključni čimbenik u patogenezi ateroskleroze. Antiretrovirusno liječenje vrlo učinkovito suzbija umnožavanje HIV čestica, ali pri tome značajno mijenja metabolizam lipoproteina i uzrokuje dislipidemiju. Antiaterogeno djelovanje ekstra djevičanskog maslinovog ulja (EVOO) moglo bi umanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti u osoba zaraženih HIV-om. Cilj rada bio je ispitati učinak konzumacije EVOO na biljege upale i ateroskleroze u HIV-om zaraženih bolesnika koji se liječe antiretrovirusnim lijekovima. U randomizirano kontrolirano križno kliničko istraživanje uključeno je 39 muških ispitanika koji se liječe antiretrovirusnim lijekovima. Intervencijski periodi konzumacije EVOO, odnosno rafiniranog maslinovog ulja (ROO) - placebo trajali su po 20 dana, s prekidom od 14 dana, a dnevne doze iznosile su po 50 mL ulja. Koncentracija CRP-a, interleukina-6, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida, malondialdehida, fibrinogena, ox-LDL-a, katalitička koncentracija superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, aktivnost von Willebrand-ovog čimbenika te broj leukocita i brzina sedimentacije eritrocita određeni su na početku istraživanja i na kraju svakog intervencijskog perioda.

Rezultati su pokazali izražene čimbenike za aterosklerozu u više od 50% ispitanika, dok je više od 90% ispitanika imalo povećanu koncentraciju malondialdehida i povećanu katalitičku koncentraciju superoksid dismutaze. Udio rizičnih čimbenika bio je znatno veći u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze ili abakavirom. Konzumacija ROO smanjila je koncentraciju malondialdehida za 18% u svih ispitanika, dok je konzumacija EVOO smanjila koncentracije CRP-a za 151% i brzinu sedimentacije eritrocita za 62% u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze. Koncentracije CRP-a značajno su smanjene nakon konzumacije EVOO samo u ispitanika čija je suradljivost bila veća od 90%. Konzumacija maslinovih ulja nije smanjila rizik za koronarnu bolest srca i metabolički sindrom. Rizične čimbenike za kardiovaskularne bolesti potrebno je definirati u svih bolesnika s HIV infekcijom prije početka antiretrovirusnog liječenja te ih pratiti tijekom liječenja. Redovita konzumacija EVOO mogla bi umanjiti vjerojatnost razvoja kardiovaskularnih bolesti u bolesnika s HIV-om što bi trebalo dodatno potvrditi na većem broju ispitanika tijekom duljeg perioda konzumacije maslinovog ulja.

Ključne riječi: Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Virus humane imunodeficijencije, Upala, Biljezi ateroskleroze, Antiretrovirusno liječenje

SUMMARY

Introduction: Human immunodeficiency virus (HIV) infection is associated with permanent systemic inflammation that is a key factor in the pathogenesis of atherosclerosis and HIV-infected patients have a higher risk for cardiovascular disease than normal population. Although effective in HIV suppression, antiretroviral therapy may cause lipid profile disturbance. Beneficial effects of extra virgin olive oil (EVOO) could decrease the risk for cardiovascular disease in HIV-infected patients.

Objective: To assess whether the consumption of EVOO leads to the improvement of inflammation and atherosclerosis biomarkers in the population of HIV-infected patients receiving antiretroviral treatment

Examinees: A randomized crossover controlled trial was performed on 39 HIV positive male participants. Two intervention periods of 20 days were interrupted with a wash-out period of 14 days. During the intervention periods participants consumed daily doses of 50 mL of EVOO and refined olive oil (ROO) - placebo.

Methods: Concentrations of CRP, interleukin-6, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, oxidized LDL, malondialdehyde, fibrinogen, catalytic concentrations of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, activity of von Willebrand factor, leukocyte number and erythrocyte sedimentation rate were determined in blood samples before the first and after each of the two intervention periods.

Results: The atherosclerosis risk factors were affected in more than 50% of participants receiving antiretroviral therapy. In more than 90% of participants malondialdehyde concentrations and superoxide dismutase catalytic concentrations were increased. Risk factors were more affected in participants using protease inhibitors and abacavir containing antiretroviral therapy. After ROO administration, MDA concentration was 18% higher when compared to basic values. After EVOO administration, in participants using protease inhibitors containing antiretroviral therapy, erythrocyte sedimentation rate and CRP concentrations were 62% and 151% lower when compared to basic values, respectively. CRP concentrations showed a significant decrease after EVOO administration only in participants with >90% compliance. Olive oil consumption did not affect the risk for coronary heart disease and the metabolic syndrome diagnosis.

Conclusion: Cardiovascular disease risk factors should be recognized and followed in all HIV patients receiving antiretroviral therapy. Regular EVOO consumption could decrease cardiovascular disease onset but further studies on a larger sample size are needed to confirm these results.

Key words: Extra virgin olive oil, Human immunodeficiency virus, Inflammation, Atherosclerosis biomarkers, Antiretroviral therapy

SADRŽAJ

1 UVOD ... 1

1.1 VIRUS HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE ... 1

1.1.1 Građa i replikacijski ciklus ... 1

1.1.2 Imunopatogeneza i tijek infekcije ... 3

1.1.3 Dijagnostika ... 5

1.1.4 Liječenje ... 5

1.1.4.1 Nukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze ... 5

1.1.4.2 Nukleotidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze ... 6

1.1.4.3 Nenukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze ... 6

1.1.4.4 Inhibitori proteaze ... 6

1.1.4.5 Inhibitori fuzije ... 6

1.1.4.6 Inhibitori kemokinskih receptora ... 6

1.1.4.7 Inhibitori integraze ... 6

1.1.4.8 Neuspjesi i nuspojave liječenja ... 7

1.1.5 Epidemiologija HIV infekcije u svijetu ... 9

1.1.6 Epidemiologija HIV infekcije u Hrvatskoj ... 9

1.2 ATEROGENEZA ... 10

1.2.1 Oksidacijski stres ... 11

1.2.1.1 Citoprotektivni enzimi ... 16

1.2.1.2 Antioksidansi ... 17

1.2.2 Poremećaji endotela u upali ... 18

1.2.2.1 Biljezi upale ... 21

1.2.2.2 Biljezi povezani s oštećenjem endotela ... 23

1.2.3 Poremećaji metabolizma lipoproteina ... 25

1.2.4 Poremećaji koagulacije ... 28

1.2.5 Metabolički sindrom ... 30

1.3 MASLINOVO ULJE ... 31

1.3.1 Nazivi i definicije maslinovih ulja prema europskom zakonodavstvu ... 31

1.3.2 Djelovanje maslinovog ulja ... 33

1.3.2.1 Metabolizam maslinovog ulja ... 34

2 OBRAZLOŽENJE TEME ... 37

3 MATERIJALI I METODE ... 39

3.1 ISPITANICI ... 39

3.2 PLAN ISTRAŽIVANJA ... 40

3.3 MATERIJALI I METODE ... 41

3.3.1 Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u maslinovom ulju ... 41
3.3.1.1 Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja ... 41
3.3.1.2 Priprema standarda galne kiseline ... 41
3.3.1.3 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih polifenola ... 42
3.3.2 Priprema seruma, plazme i hemolizata eritrocita ... 43
3.3.3 Određivanje broja HIV-1 čestica u plazmi ... 43
3.3.4 Određivanje koncentracije glukoze u serumu ... 44
3.3.5 Određivanje broja CD4+ T-limfocita imunofenotipizacijom u punoj krvi ... 44
3.3.6 Određivanje katalitičke koncentracije superoksid dismutaze u hemolizatu eritrocita 45
3.3.7 Određivanje katalitičke koncentracije glutation peroksidaze u hemolizatu eritrocita 45
3.3.8 Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu ... 45
3.3.9 Određivanje brzine sedimentacije eritrocita ... 45
3.3.10 Određivanje broja leukocita u punoj krvi ... 46
3.3.11 Određivanje koncentracije CRP-a u serumu ... 46
3.3.12 Određivanje koncentracije interleukina-6 u serumu ... 46
3.3.13 Određivanje aktivnosti von Willebrand-ovog čimbenika u citratnoj plazmi ... 46
3.3.14 Određivanje koncentracije ukupnog kolesterola u serumu ... 46
3.3.15 Određivanje koncentracije HDL-kolesterola u serumu ... 47
3.3.16 Određivanje koncentracije LDL-kolesterola u serumu ... 47
3.3.17 Određivanje broja oksidiranih LDL-čestica u serumu ... 47
3.3.18 Određivanje koncentracije triglicerida u serumu ... 47
3.3.19 Određivanje koncentracije fibrinogena u citratnoj plazmi ... 47
3.3.20 Izračun 10-godišnjeg rizika za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-ovoj formuli ... 47
3.3.21 Utjecaj konzumacije maslinovih ulja na pojedine rizične čimbenike ... 48
3.3.22 Statističke metode ... 48
4 REZULTATI ... 50
4.1 KONCENTRACIJE POLIFENOLA U MASLINOVIM ULJIMA ... 50
4.2 ISPITANICI ... 51
4.3 REZULTATI ANKETA ... 54
4.4 RIZIČNI ČIMBENICI ... 58
4.4.1 Pušenje ... 58
4.4.2 Dob ... 59
4.4.3 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u ... 59
4.5 UČINAK LIJEČENJA ... 60
4.5.1 Antiretrovirusno liječenje ... 60

4.5.2 Antilipemici 61
4.6 UČINAK MASLINOVOG ULJA 62
4.6.1 Svi ispitanici koji su završili istraživanje 62
4.6.1.1 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u 66
4.6.2 Ispitanici liječeni inhibitorima proteaze 67
4.6.3 Ispitanici koji nisu liječeni inhibitorima proteaze 69
4.6.4 Ispitanici liječeni abakavirom 71
4.6.5 Ispitanici koji nisu liječeni abakavirom 72
4.7 SURADLJIVOST ISPITANIKA 74
4.7.1 Ispitanici suradljivi prema konzumaciji oba ulja 74
4.7.1.1 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u 77
4.7.2 Ispitanici suradljivi prema najmanje jednom ulju 78
4.8 METABOLIČKI SINDROM 80
5 RASPRAVA 82
6 ZAKLJUČCI 99
7 LITERATURA 101
8 PRILOZI 116
9 ŽIVOTOPIS 118

POPIS KRATICA

4-AAP	4-aminoantipirin
ADCC	Stanična citotoksičnost posredovana protutijelima (engl. *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*)
ADP	Adenozin difosfat
AIDS	Sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *Aquired immunodeficiency syndrome*)
AKS	Akutni koronarni sindrom
APTV	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
ATP III	Panel liječenja odraslih III (engl. *Adult treatment panel III)*
cAMP	Ciklički adenozin monofosfat
CCR	Kemokinski receptor (engl. *Chemokine receptor*)
CD	Stanični diferencijacijski antigen (engl. *Cluster of differentiation*)
CRABP-1	Stanični protein koji veže retinoičnu kiselinu (engl. *Cellular retinoic-acid binding protein-1*)
CRF	Cirkulirajuće rekombinantne forme (engl. *Circulating recombinant forms*)
CRP	C-reaktivni protein
CVD	Kardiovaskularne bolesti (engl. *Cardiovascular diseases*)
CXCR4	Kemokinski receptor tipa 4 (engl. *Chemokine receptor type 4*)
CYP	Citokrom P450
DHBS	3,5-dikloro-2-hidroksibenzen-sulfonat
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
DHAR	Dehidroaskorbat-reduktaza
EDTA	Etilendiaminotetraoctena kiselina
EGF	Epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor*)
ELISA	Enzimimunokemijska analiza (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*)
eNOS	Endotelna sintaza dušikovog (II) oksida (engl. E*ndothelial Nitric oxide synthase*)
EVOO	Ekstra djevičansko maslinovo ulje (engl. *Extra virgin olive oil*)
GC-MS	Plinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*)
GM-CSF	Čimbenik stimulacije granulocitnih i makrofagnih kolonija (engl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)*
Gp	Glikoprotein
GR	Glutation reduktaza
GSH-Px	Glutation peroksidaza
GSSG	Oksidirani glutation
GSH	Reducirani glutation
H_3PO_4	Fosforna kiselina
H_2O_2	Vodikov peroksid
HAART	Vrlo djelotvorna antiretrovirusna terapija (engl. *Highly active antiretroviral treatment*)
hsCRP	CRP određen metodom visoke osjetljivosti (engl. *High sensitivity CRP*)
HDL	Lipoproteini visoke gustoće (engl. *High density lipoproteins*)
HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*)
HMG-CoA	β-hidroksi- β -metil-glutaril koenzim A
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*)
HT	Hidroksitirosol (engl. *Hydroxytyrosol*)
IFCC	Međunarodna federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *International Federation for Clinical Chemistry*)
ICAM-I	Unutarstanične adhezijske molekule tipa I (engl. *Intercellular adhesion molecule type I*)
IDF	Međunarodna dijabetička federacija (engl. *International Diabetes Foundation*)
IL	Interleukini
IM	Infarkt miokarda
IP	Interval pouzdanosti
IQR	Interkvartilni raspon
JAK	Janus kinaza (engl. *Janus kinase*)
kb	Kilobaza
KKS	Kompletna krvna slika
LDL	Lipoproteini niske gustoće (engl. *Low density lipoproteins*)
LIF	Čimbenik inhibicije leukemija (engl. *Leukemia inhibitory factor*)
LOOH	Lipidni hidroperoksidi

LPL	Lipoprotein lipaza
LRP	Protein srodan LDL receptoru (engl. *Low density lipoprotein-receptor-related protein*)
LTR	Duge ponavljajuće sekvence (engl. *Long terminal repeat*)
MCP-1	Monocitni kemotaktički protein-1 (engl. *Monocyte chemoattractant protein-1*)
M-CSF	Čimbenik stimulacije kolonije monocita (engl. *Monocyte colony stimulating factor*)
MDA	Malondialdehid
MHC	Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)
M1dG	Pirimido-(1,2-α)purin-10(3H)-on deoksiriboza
MMP	Metaloproteinaze matriksa (engl. *Matrix metalloproteinase*)
MTP	Mikrosomska bjelančevina koja je prijenosnik triglicerida (engl. *Microsomal trygliceride transfer protein*)
MUFA	Mononezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated fatty acids*)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirani oblik)
NCEP	Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu - (engl. *National cholesterol educational program*)
NF-κB	Jezgrin transkripcijski čimbenik kappa B (engl. *Nuclear factor kappa B*)
NK stanice	Stanice prirodni ubojice (engl. *Natural killer cells*)
NO	Dušikov (II) oksid
NNRTI	Nukleozidni analozi-inhibitori reverzne transkriptaze (engl. *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)
NtRTI	Nukleotidni analozi-inhibitori reverzne transkriptaze (engl. *Nucleotide reverse transcriptase inhibitors*)
O-MHT	3-O-metil hidroksitirosol (engl. *3-O-methyl-hydroxytyrosol*)
OSM	Onkostatin M
ox-LDL	Oksidirane LDL-čestice (engl. *Oxidized LDL*)
PAI-1	Inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *Plasminogen activator inhibitor-1*)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)
PDGF	Čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (engl. *Platelet derived growth factor*)
PGI2	Prostaciklin
PI	Inhibitori proteaze (engl. *Protease inhibitors*)
PPAR	Receptor aktiviran peroksisomskim proliferatorom (engl. *Peroxisome proliferator activated receptor*)
PSGL-1	Glikoproteinski ligand-1 koji veže P-selektin (engl. *P-selectin glycoprotein ligand-1*)
PUFA	Polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*)
PV	Protrombinsko vrijeme
RNA	Ribonukleinska kiselina
ROO	Rafinirano maslinovo ulje (engl. *Refined olive oil*)
ROS	Reaktivni oblici kisika (engl. *Reactive oxygen species*)
RT	Reverzna transkriptaza (engl. *Reverse transcriptase*)
RxR	Retinoidni x receptor (engl. *Retinoid x receptor*)
SD	Standardna devijacija
SFA	Zasićene masne kiseline (engl. *Saturated fatty acid*)
SMK	Slobodne masne kiseline
SOD	Superoksid dismutaza
SREBP	Vezni protein regulacijskog elementa koji veže sterol (engl. *Sterol regulation element binding protein*)
STAT	Prenositelj signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal transducer and activator of transcription*)
T	Tirosol (engl. *Tyrosol)*
TF	Tkivni čimbenik (engl. *Tissue factor)*
TMB	3,3´,5,5´tetrametilbenzidin
TNF	Čimbenik tumorske nekroze (engl. *Tumor necrosis factor*)
TV	Trombinsko vrijeme
UNAIDS	UN-ov program borbe protiv AIDS-a (engl. *United Nations programme on HIV/AIDS*)
VCAM-1	Vaskularna adhezijska molekula-1 (engl.*Vascular cell adhesion molecule-1*)
VLDL	Lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *Very low density lipoproteins*)
vWf	Von Willebrand-ov čimbenik zgrušavanja (engl. *Von Willebrand factor*)
vWf Ri:Co	Ristocetinska aktivnost von-Willebrand-ovog čimbenika zgrušavanja
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organization*)

1 UVOD

1.1 Virus humane imunodeficijencije

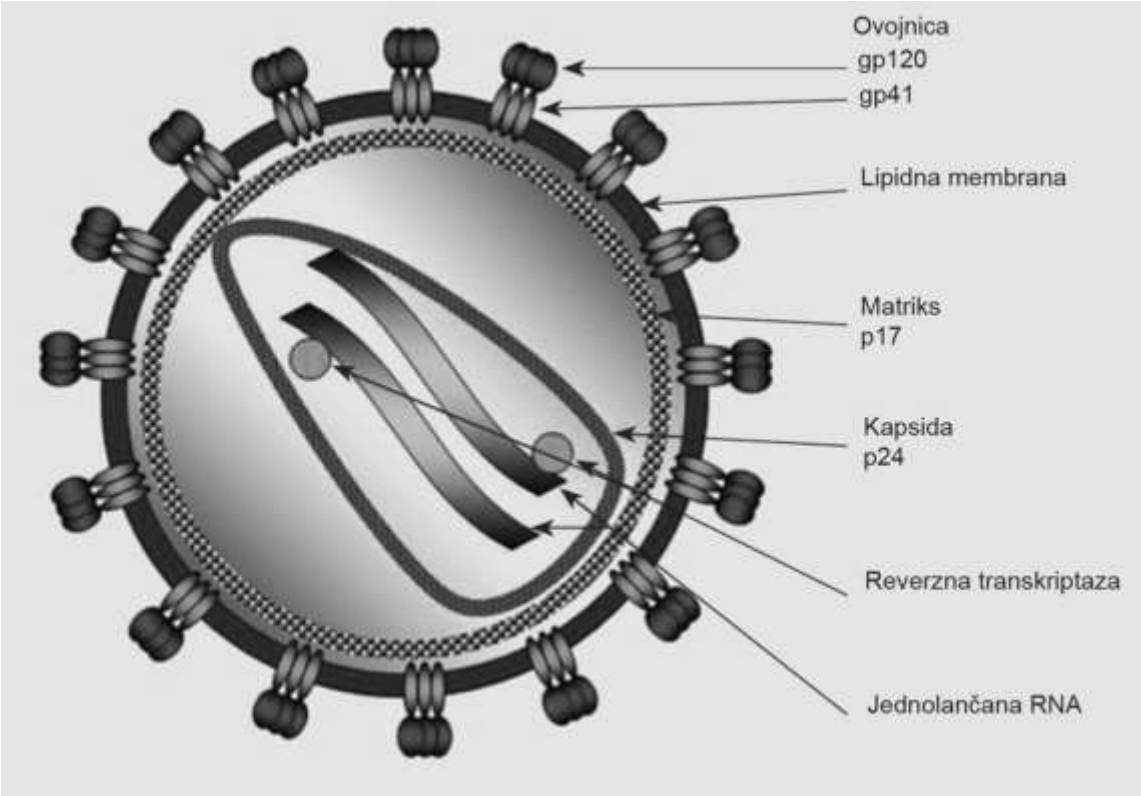
1.1.1 Građa i replikacijski ciklus

Virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV) pripada porodici *Retroviridae*, rod *Lentivirus*.

Razlikujemo dva tipa virusa: HIV-1 i HIV-2. HIV-1 je odgovoran za pandemiju i glavni je uzročnik sindroma stečene imunodeficijencije (engl. *Aquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). HIV-2 ima slabiji virulentni potencijal i ograničen je na središnju i zapadnu Afriku.

Temeljem homologije između genomskih sekvenci HIV-1 virusa, napravljena je podjela na tri grupe: M (engl. *Major*), O (engl. *Outlier*) i N (engl. *non-M/non-O*). M grupa je najzastupljenija i dijeli se na 9 podtipova (engl. *Clades*), a podtipovi imaju još najmanje šest pod-podtipova (1).

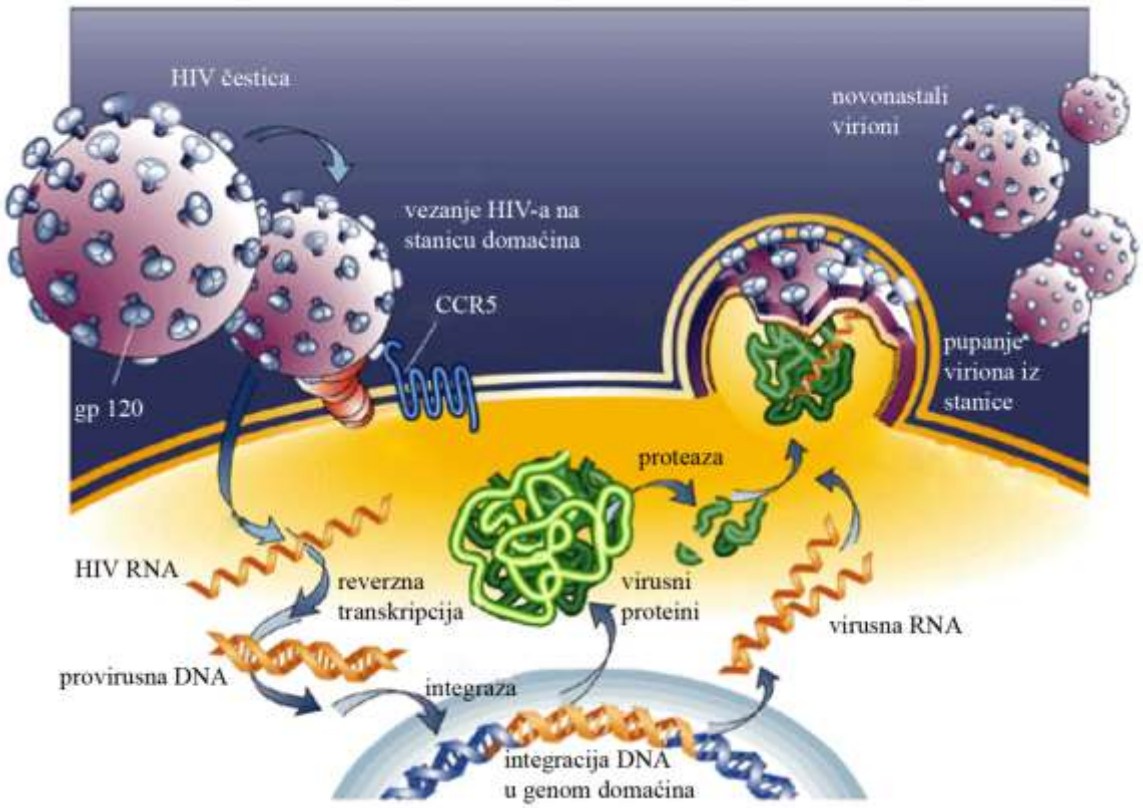
HIV čestica ima promjer oko 100 nm i okružena je lipoproteinskom membranom. Na površini membrane smješteni su glikoproteinski kompleksi sastavljeni od trimera gp120, koji su vezani preko transmembranskih glikoproteina gp41. Vezanje gp120 za gp41 nije kovalentno, pa se gp120 konstantno otpušta u mikrookoliš te se može detektirati u serumu i limfatičkom tkivu zaraženih osoba. Protein p17 usidren je s unutarnje strane lipoproteinske membrane, a kapsida virusa sastavljena je od polimera antigena jezgre p24. Unutar kapside nalaze se: genom HIV-a u nukleoproteinskom kompleksu, koji čine dvije identične jednolančane molekule ribonukleinske kiseline (RNA) pozitivnog polariteta, te enzimi: reverzna transkriptaza (RT), integraza, proteaza i ribonukleaza. Građu HIV-1 čestice prikazuje Slika 1.



Slika 1. Građa HIV-1 čestice, preuzeto iz (2)

Replikacijski ciklus HIV-a odvija se u šest osnovnih koraka. 1) Pomoću receptora gp120 i gp41 HIV se veže na stanice koje posjeduju stanični diferencijacijski antigen CD4+ (engl. *Clusters of differentiation*, CD) i kemokinske koreceptore (CCR5 i CXCR4). 2) Virusna ovojnica se spaja sa staničnom membranom i u stanicu oslobađa nukleoproteinski kompleks. 3) U citoplazmi virusna RT prepisuje virusnu RNA najprije u jednolančanu DNA, a potom sintetizira i drugi lanac na temelju prvog lanca kalupa. Provirusna DNA ima genom sastavljen od oko 8,5 kb (kilobaza) na čija se oba kraja nalaze duge ponavljajuće sekvence (engl. *Long terminal repeat*, LTR). U genomu HIV-a poznato je devet gena od kojih su tri strukturna: *gag, pol* i *env*, dva regulacijska: *tat* i *rev* i još četiri gena s nedovoljno poznatim funkcijama: *vpu, vpr, vif* i *nef*. Gen *gag* kodira strukturne proteine jezgre virusa, gen *env* kodira proteine ovojnice, dok gen *pol* kodira enzime reverznu transkriptazu, integrazu i proteazu, koje su važne za replikaciju virusa (3). 4) Dvolančana DNA ulazi u jezgru stanice i uz pomoć integraze ugrađuje se u genom domaćina. 5) U povoljnom trenutku za virus dolazi do aktivacije stanice i transkripcije provirusne DNA u mRNA. mRNA izlazi iz jezgre i na grubom endoplazmatskom retikulumu prevodi se u dugačke proteine prekursore. Navedeni proteini se uz pomoć proteaze virusa kidaju u funkcionalne proteine sposobne da zajedno s genetskim materijalom formiraju nove virusne čestice. 6) Stvaraju se nove virusne čestice,

koje pupaju i iz stanice izlaze kao zreli virioni. Replikacijski ciklus HIV-a prikazuje Slika 2.



Slika 2. Replikacijski ciklus HIV-a. Preuzeto iz (4)

1.1.2 Imunopatogeneza i tijek infekcije

Najčešći način prijenosa HIV infekcije u svijetu je heteroseksualni spolni odnos sa zaraženom osobom, a ostali načini prijenosa su homoseksualni spolni odnos između muškaraca, razmjena zaraženog pribora korisnika intravenskih droga, vertikalni prijenos s majke na dijete, prijenos putem transfuzije zaražene krvi ili transplantacijom zaraženih organa.

Infekcija HIV-om, kao i drugim predstavnicima roda *Lentivirus*, ima polagan tijek bolesti s dugim periodom kliničke latencije, perzistentnom virusnom replikacijom i pridruženim poremećajima središnjeg živčanog sustava. Patogeneza HIV infekcije i njezina progresija u AIDS posljedica je svojstava samog izolata virusa koji je uzrokovao infekciju i imunološkog odgovora domaćina. Infekcija HIV-om dovodi do trajnog i progresivnog oštećenja imunološkog sustava, gdje najviše bivaju uništeni CD4+ T-limfociti.

CD4+ biljeg se nalazi na površini oko 60% cirkulirajućih T-limfocita, njihovih prekursora, monocita/makrofaga, eozinofila, dendritičnih stanica i mikroglija stanica središnjeg živčanog sustava. CD4+ normalno funkcionira kao koreceptor glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC) tipa II, pomoću kojeg stanica prepoznaje

prerađeni antigen. Prerada (preuredba) antigena događa se u dendritičnim stanicama, koje se nalaze u cirkulaciji ili u sluznici, što ovisi o načinu prijenosa HIV-a. Dendritične stanice prenose prerađeni virus u limfne čvorove, gdje dolazi do njihovog kontakta s CD4+ T-limfocitima. Na ovaj način primarna infekcija HIV-om širi se najprije po limfnom tkivu, a zatim i kroz cirkulaciju. U isto vrijeme događa se intenzivna replikacija virusnih čestica. To je faza tzv. primarne viremije koja se javlja 3-6 tjedana nakon infekcije, a karakterizira ju smanjenje broja CD4+ T-limfocita. Klinički, ova faza bolesti može proći neopaženo, a mogu se javiti i simptomi slični gripi ili infektivnoj mononukleozi uz mogući makulopapulomatozni osip, oralne ulceracije, faringitis, malaksalost, mialgije, artralgije itd. Simptomi obično traju 2-3 tjedna.

Nakon primarne viremije uspostavlja se humoralni i stanični odgovor domaćina na infekciju. Protutijela sudjeluju u sprečavanju daljnje infekcije stanica, a poznat je i mehanizam citotoksičnosti posredovane protutijelima (engl. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC). Kao i kod većine virusnih infekcija, stanična imunost je važnija u obrani organizma. CD8+ citotoksični T-limfociti uz pomoć MHC klase I prepoznaju i eliminiraju stanice zaražene virusom. Obrambeni mehanizmi samo djelomično uništavaju populaciju virusa koji na razini organizma uspostavljaju latentnu infekciju, a istovremeno se intenzivno umnožavaju u limfnim čvorovima. Trajna prisutnost i umnožavanje HIV-a dovodi do lučenja proupalnih citokina interleukina-1 (IL-1), čimbenika tumorske nekroze-α (engl. *Tumor necrosis factor-α*, TNF-α), interleukina-6 (IL-6), čime se izaziva kronična sistemska upala. Limfni čvorovi postaju zaštićeni "rezervoari" virusa koji održavaju ekspresiju virusnih antigena na niskoj razini.

U neliječenih osoba, prosječno vrijeme od nastanka infekcije HIV-om, pa do smrti uzrokovane AIDS-om iznosi 11 godina. Kroz to vrijeme polako se razara arhitektura limfnih čvorova, a broj CD4+ T-limfocita se smanjuje. U zdravih osoba odnos CD4/CD8 T-limfocita iznosi oko 2:1. U osoba zaraženih HIV-om, zbog smanjenja broja CD4+ T-limfocita, ovaj odnos postaje obrnut. Kad se broj CD4+ T-limfocita smanji ispod 200 stanica u μL krvi, povećava se vjerojatnost nastanka oportunističkih infekcija uzrokovanih bakterijama, virusima, gljivama, parazitima, a češće se pojavljuju i neke vrste tumora. Tako uznapredovala faza infekcije HIV-om definira se kao AIDS.

1.1.3 Dijagnostika

Dijagnoza infekcije HIV-om temelji se na dokazivanju protutijela na virusne antigene (p24, gp41, gp120, gp160). Kod većine osoba inficiranih HIV-om, protutijela u serumu se pojavljuju u razdoblju od četiri do 10 tjedana i ≥95% zaraženih serokonvertira unutar šest mjeseci od trenutka izlaganja virusu (5). Protutijela se najčešće određuju enzimimunokemijskom analizom (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA), a kao potvrdni test koristi se Western blot kojim se određuje paleta protutijela prisutnih tijekom HIV infekcije.

Određivanje virusne RNA u plazmi moguće je 10 - 12 dana nakon infekcije pomoću metode lančane reakcije polimerazom uz reverznu transkriptazu (engl. *Reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR). Prema broju virusnih čestica određuje se početak antiretrovirusnog liječenja, te prati njegova učinkovitost.

Određivanje broja CD4+ T-limfocita metodom imunofenotipizacije koristi se za praćenje tijeka bolesti i učinkovitosti liječenja.

Dokazivanje HIV-a u staničnoj kulturi koristi se samo u istraživačke svrhe.

1.1.4 Liječenje

Prošlo je gotovo trideset godina od pronalaska uzročnika AIDS-a, no lijek koji bi u potpunosti izliječio oboljelu osobu, nije otkriven. Uvođenjem vrlo djelotvornog antiretrovirusnog liječenja (engl. *Highly Active Antiretroviral Treatment*, HAART) početkom prošlog desetljeća, postiglo se značajno smanjenje virusne replikacije. HAART je znatno ublažio tijek bolesti, omogućio očuvanje specifičnog imunološkog odgovora na HIV, smanjio pojavu virusnih mutacija, odgodio pojavu AIDS-a i smanjio vjerojatnost prijenosa virusa od strane zaraženih osoba na zdrave osobe (uključujući i vertikalni prijenos s majke na dijete).

Danas se u liječenju osoba zaraženih HIV-om koriste sljedeće skupine lijekova: nukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze, nukleotidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze, nenukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze, inhibitori proteaze, inhibitori fuzije, inhibitori kemokinskih receptora i inhibitori integraze (6).

1.1.4.1 Nukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze

Nukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze (engl. *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors*, NRTI) se nakon ulaska u stanicu fosforiliraju, a zatim kompetiraju s prirodnim nukleotidima za vezanje na reverznu transkriptazu, a time i za ugradnju u HIV DNA. NRTI se

razlikuju od fizioloških nukleotida po tome što na deoksiribozi NRTI-a nedostaje 3-OH skupina, čime se onemogućuje stvaranje fosfodiesterske veze sa sljedećim nukleotidom. Ugradnjom nukleozidnog analoga u HIV DNA lanac, zaustavlja se njegova elongacija. Predstavnici ove grupe lijekova su: zidovudin, didanozin, lamivudin, stavudin, abakavir i emtricitabin, te njihove kombinacije.

1.1.4.2 Nukleotidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze

Nukleotidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze (engl. *Nucleotide reverse transcriptase inhibitors*, NtRTI) djeluju na reverznu transkriptazu slično kao NRTI, ali od NRTI ih razlikuje prisutnost jedne molekule fosfata. Najvažniji je predstavnik tenofovir, koji postoji i u kombinaciji s drugim lijekovima.

1.1.4.3 Nenukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze

Nenukleozidni analozi - inhibitori reverzne transkriptaze (engl. *Non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitors*, NNRTI) se vežu na katalitički aktivno mjesto reverzne transkriptaze, koju na taj način inhibiraju. Predstavnici ove grupe lijekova su nevirapin, delavirdin, efavirenz i rilpivirin.

1.1.4.4 Inhibitori proteaze

Inhibitori proteaze (engl. *Protease inhibitors*, PI) se vežu na aktivno mjesto enzima proteaze, zbog čega proteaza ne može kidati *gag-pol* poliprotein u njegove funkcionalne podjedinice. Djelovanjem PI nastaju nezrele i nepatogene virusne čestice. Predstavnici ove grupe lijekova su sakvinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, atazanavir, tipranovir i darunovir.

1.1.4.5 Inhibitori fuzije

Inhibitori fuzije (engl. *Fusion inhibitors*) se vežu na gp41 i inhibiraju vezanje virusa na stanicu. Predstavnik je enfuvirtid.

1.1.4.6 Inhibitori kemokinskih receptora

Inhibitori kemokinskih receptora (engl. *Entry inhibitors*) blokiraju kemokinski koreceptor CCR5 kojeg HIV koristi prilikom ulaska u stanicu. Predstavnik je maravirok.

1.1.4.7 Inhibitori integraze

Inhibitori integraze (engl. *Integrase inhibitors*) djeluju tako da sprečavaju ugradnju HIV DNA u humani genom, čime se onemogućuje replikacija virusa. Predstavnik je raltegravir.

1.1.4.8 Neuspjesi i nuspojave liječenja

Uz sve navedene lijekove, kao i one koji su se u međuvremenu pojavili na tržištu, HIV još uvijek uspijeva izbjeći kontrolne mehanizme imunološkog sustava. Reverzna transkriptaza nema sposobnost popravka krivo prepisane baze, kao što ima DNA polimeraza u eukariota. Zbog toga se u prosjeku na svakih 1000 pb događa mutacija jedne baze, što uz veliku dnevnu produkciju virusa (10^{10} novih virusnih čestica) uzrokuje nastanak različitih genotipova virusa. Rekombinacija gena dvaju virusa koji istodobno ili jedan za drugim zaraze istu stanicu, dovodi do pojave cirkulirajućih rekombinantnih formi (engl. *Circulating recombinant forms*, CRF), što dodatno doprinosi stvaranju iznimno velikog broja genetski različitih HIV čestica. Tijekom liječenja HAART-om može se pojaviti rezistencija virusa na pojedini lijek ili grupu lijekova, što znači da se virus replicira u prisutnosti lijeka. Lijek smanji replikaciju divljeg tipa virusa, ali se u cirkulaciji mogu javiti mutirani virusi, na koje lijek ne može djelovati i koji se tada počinju intenzivnije umnožavati.

Jedna od najvažnijih nuspojava liječenja HAART-om je poremećena koncentracija lipida u serumu bolesnika.

Dislipidemija je najčešće opisana u bolesnika koji se liječe inhibitorima proteaze, a javlja se u kombinaciji ritonavira (iz grupe PI lijekova) sa stavudinom (iz grupe NRTI lijekova). Koncentracije lipida u serumu počinju se mijenjati u prosjeku mjesec dana nakon započetog liječenja pomoću PI, a promjene su najizraženije tri mjeseca nakon početka liječenja pomoću PI (7). PI u hepatocitima stimuliraju sintezu triglicerida, u manjoj mjeri i ukupnog kolesterola, te sekreciju apolipoproteina B (apo B), što rezultira prekomjernom produkcijom lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. Very low density lipoprotein, VLDL). PI također inhibiraju degradaciju veznog proteina regulacijskog elementa koji veže sterol (engl. *Sterol regulatory binding protein*, SREBP). SREBP proteini su porodica transkripcijskih čimbenika uključenih u regulaciju diferencijacije adipocita, sinteze kolesterola i masnih kiselina, te hormonskih receptora u jezgri kao što su retinoidni x receptor (engl. *Retinoid x receptor*, RxR) i receptor aktiviran peroksisomskim proliferatorom (engl. *Peroxisome proliferator activated receptor*, PPAR). Produljenim djelovanjem SREBP proteina povećava se proizvodnja kolesterola.

Ritonavir, lijek iz grupe PI, može smanjiti aktivnost lipoprotein-lipaze (LPL) i do 44% (8). Zbog smanjene aktivnosti LPL-a, iz VLDL-kolesterola se oslobađa manje slobodnih masnih kiselina (SMK). Osim toga, smanjen je i unos SMK u adipocite. To ukupno rezultira povećanim koncentracijama SMK u cirkulaciji bolesnika, što dodatno inhibira lipoprotein lipazu (LPL), jer nastaje tzv. inhibicija produktom. Smanjena aktivnost LPL-a dovodi do

smanjene razgradnje VLDL-a, što povećava njegovu koncentraciju.

PI inhibiraju virusnu proteazu na katalitičkom mjestu enzima, čija je struktura homologna s dva humana proteina uključena u metabolizam lipida. Jedan od njih je stanični protein koji veže retinoičnu kiselinu (engl. *Cellular retinoic-acid binding protein-1*, CRABP-1), a drugi je protein srodan LDL receptoru (engl. *Low density lipoprotein-receptor-related protein*, LRP). Inhibicija CRABP-1 povećava brzinu apoptoze adipocita i smanjuje diferencijaciju preadipocita u adipocite, što rezultira smanjenom pohranom triglicerida i povećanim otpuštanjem lipida u cirkulaciju. Inhibicija LRP-a dovodi do smanjenog ulaska hilomikrona u jetru i smanjene razgradnje triglicerida u endotelu, što rezultira hipertrigliceridemijom i rezistencijom na inzulin (9, 10).

Trenutne preporuke za liječenje dislipidemije kod HIV oboljelih kažu kako ovu populaciju bolesnika treba od dislipidemije liječiti slično kao i normalnu populaciju, a stanje se ponekad može popraviti promjenom kombinacije HAART-a (11).

Zbog dislipidemije, bolesnici koji se liječe pomoću PI, skloniji su obolijevanju od kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, rizični čimbenici, koji su preduvjet razvoja ateroskleroze u osoba zaraženih HIV-om, javljaju se ranije nego u zdravoj populaciji (12).

Lipoatrofija je gubitak tjelesne masti na ekstremitetima (ruke i noge) i obrazima, a lipohipertrofija je karakteristično nakupljanje tjelesne masti u području trupa. Lipoatrofija i lipohipertrofija se rijetko javljaju u općoj populaciji, ali su česte komplikacije tijekom liječenja HIV-a. Lipoatrofija se može javiti kao nuspojava liječenja stavudinom i zidovudinom, dok se lipohipertofija može javiti prilikom liječenja pomoću PI.

NRTI uzrokuju mitohondrijsku toksičnost jer inhibiraju polimerazu-gama, zbog čega je onemogućena replikacija mitohondrijske DNA. To dovodi do periferne lipoatrofije, laktacidoze, jetrene steatoze, periferne neuropatije i miopatije.

HAART, a naročito PI, odgovorni su i za rezistenciju na inzulin, hiperinzulinemiju, hiperglikemiju i šećernu bolest tipa II.

Usprkos sličnom režimu liječenja, imunološkim karakteristikama i sličnom broju virusnih čestica u plazmi, navedene komplikacije ne događaju se kod svih HIV-1 bolesnika liječenih istom kombinacijom lijekova. Razlozi različitog terapijskog odgovora su genetski čimbenici domaćina, kao što je polimorfizam gena za apo E i apo CIII koje se u općoj populaciji povezuju s hiperlipidemijom i kardiovaskularnim bolestima (13, 14).

PI imaju inhibitorni učinak na citokrom CYP 3A4 koji sudjeluje u metabolizmu statina. Smanjena sposobnost metaboliziranja statina u tom slučaju dovodi do njegove povećane koncentracije u cirkulaciji, a time i pojačane toksičnosti za jetru i skeletne mišiće (14).

1.1.5 Epidemiologija HIV infekcije u svijetu

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World health organization*, WHO) iz prosinca 2009. godine, oko 33,3 milijuna ljudi u svijetu bilo je zaraženo HIV-om. Tijekom iste godine zabilježeno je 2,6 milijuna novoinficiranih osoba, a umrlo je 1,8 milijuna HIV-om zaraženih osoba (16).

1.1.6 Epidemiologija HIV infekcije u Hrvatskoj

Prema podacima Službe za epidemiologiju zaraznih bolesti Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, od pojave prve zaraze HIV-om u Hrvatskoj (1985. godine), pa do 1. prosinca 2010. godine registrirano je ukupno 846 osoba zaraženih HIV-om. U tom razdoblju 319 osoba razvilo je AIDS, a umrlo je ukupno 176 oboljelih osoba. Među svim osobama s HIV infekcijom 87% posto su muškarci. Dominantni put prijenosa HIV-a je spolni odnos muškaraca sa zaraženim muškarcima. Najveći broj infekcija registrira se u dobnoj skupini od 25 do 49 godina (17).

1.2 Aterogeneza

Kardiovaskularne bolesti (engl. *Cardiovascular Disease*, CVD) najčešći su uzrok smrti u osoba iznad 60 godina starosti, a gotovo redovno imaju u podlozi aterosklerozu. Ateroskleroza je upalna, degenerativna bolest srednjih i velikih arterija koja se razvija godinama, a vrlo često počinje u ranoj životnoj dobi. Ako ateroskleroza zahvati koronarne arterije, moguća je pojava koronarne bolesti srca (engl. *Coronary Heart Disease*, CHD) gdje je smanjena opskrba srca kisikom, tj. ishemija. Tri su opća rezultata ishemije srca: kongestivna srčana bolest, angina pektoris i infarkt miokarda (18). Ateroskleroza je najčešće asimptomatski poremećaj sve dok se lumen stijenke arterije ne smanji za 70 - 80%, a to se u koronarnoj cirkulaciji manifestira kao angina pektoris. Ipak, većina akutnih i cerebrovaskularnih sindroma (nestabilna angina, infarkt miokarda, iznena smrt i cerebrovaskularni inzult) događa se kod stenoze gdje je lumen krvne žile smanjen za manje od 50%, pa se kod takvih slučajeva najčešće radi o rupturi plaka. Razlikujemo dvije vrste aterosklerotskih plakova: stabilne i nestabilne. Stabilni plak je uglavnom sastavljen od malog lipidnog lumena koji je pokriven debelom fibromuskularnom ovojnicom. Lumen nestabilnog plaka se sastoji od veće količine lipoproteina, a pokriven je tankom ovojnicom i velikim brojem upalnih stanica. Nestabilni plak je skloniji rupturi nego stabilni.

Rizični čimbenici koji se mogu povezati s nastankom ateroskleroze su genetska predispozicija, dob, spol, hiperkolesterolemija, hiperhomocisteinemija, povišen krvni tlak, pušenje, debljina, šećerna bolest, infektivni agensi i fizička neaktivnost.

Donedavno se smatralo da je ateroskleroza "lipid storage disease" i da je plak koji opstruira krvnu žilu uzrokovan isključivo akumulacijom lipida unutar arterijske stijenke. Ipak, s vremenom se pokazalo da plak uz ekstracelularne lipide, sadrži i vezivno tkivo, pjenaste stanice, makrofage, dendritične stanice i limfocite. Takva slika je posljedica vrlo kompleksnog poremećaja koji najčešće uključuje oksidacijski stres, promijenjen metabolizam lipoproteina, disfunkciju endotela krvnih žila, poremećaj regulacije krvnog tlaka i promjene koje utječu na hemostazu. U poodmaklom stadiju ateroskleroze, unutar aterosklerotskog plaka formira se njegova vlastita mikrocirkulacija, ali novonastale krvne žilice imaju tanke stijenke sklone pucanju, što dovodi do krvarenja u unutrašnjost plaka. Navedena krvarenja pogoduju progresiji ateroskleroze (19).

1.2.1 Oksidacijski stres

Slobodni radikali su atomi ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali, zbog čega su visoko reaktivni.

Izvori slobodnih radikala mogu biti vanjski (npr. ionizirajuće zračenje) i unutarstanični. Glavno mjesto stvaranja slobodnih radikala u stanici je unutrašnja membrana mitohondrija, gdje se slobodni radikali stvaraju prilikom transporta elektrona kroz respiracijski lanac. Ostala mjesta nastanka slobodnih radikala u stanici su jezgrina membrana i membrana endoplazmatskog retikuluma.

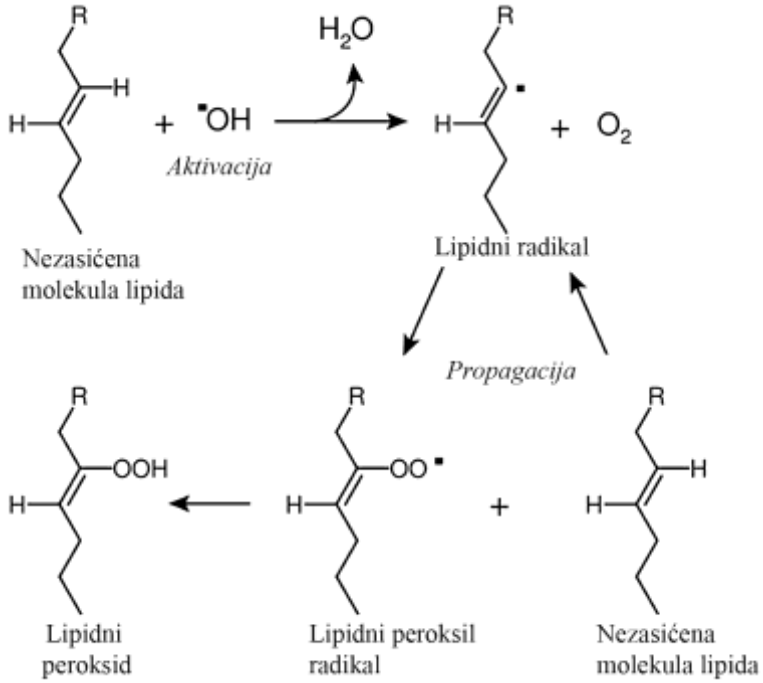
Najzastupljeniji slobodni radikali u organizmu su kisikovi radikali (superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$), perhidroksilni radikal ($HO_2^{\cdot}$), hidroksilni radikal ($HO^{\cdot}$), radikal dušikovog (II) oksida ($NO^{\cdot}$), protonirani aminoradikal (H_3N^+), hipokloritni anion (OCl^-), akvatizirani elektron (e_{aq}), te međuproizvodi metaboličkih puteva (20).

Poluživot slobodnih radikala je kratak (traje od nekoliko μs do ms). Prema spojevima s kojima reagiraju pokazuju nisku specifičnost, pa su njihove ciljne molekule, odnosno mjesta djelovanja slobodnih radikala, vrlo raznolike. Vezanjem na dostupne molekule, slobodni radikali pokreću neenzimske lančane reakcije, a mnogi novonastali spojevi također imaju svojstva slobodnih radikala. Osobito su važni slobodni radikali malih molekula, jer kao takvi lako difundiraju kroz membrane i dostupna im je većina staničnih struktura.

Da bi sparili svoj slobodni elektron i formirali stabilan spoj, slobodni radikali se spajaju s makromolekulama (proteini, lipidi, ugljikohidrati i DNA). Ipak, takva stabilizacija dovodi uglavnom do nepovoljnih učinaka na organizam, a najvažniji od njih su oštećenja, aktivacija signalnih putova koji induciraju ili inhibiraju važne gene i/ili enzime, starenje, maligna transformacija, apoptoza i nekroza stanica. Najčešća meta oksidacijskih oštećenja su lipidne molekule, i to one koje sadrže veliki udio polinezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Kod takvih oksidacijskih oštećenja stvara se veliki broj sekundarnih produkata, najčešće aldehida.

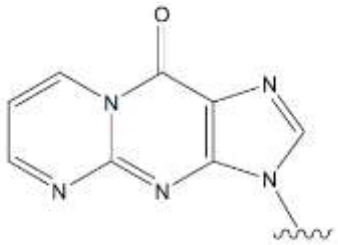
Lipidna peroksidacija započinje vezanjem slobodnog radikala na metilensku skupinu ($-CH_2-$) polinezasićene masne kiseline. Nakon vezanja slobodnog radikala iz metilenske skupine izdvaja se vodikov ion, a na ugljikovu atomu ostaje nespareni elektron ($-^{\cdot}CH$). Novonastali radikal postaje mjesto molekularne pregradnje prilikom koje se formiraju dieni. Dieni se, u aerobnim uvjetima, mogu spajati s kisikom i stvarati peroksilne radikale koji mogu oduzeti atom vodika drugoj masnoj kiselini i tako nastaviti lančanu reakciju, a taj se proces zove

propagacija. Produkti lančane reakcije su lipidni hidroperoksidi (LOOH) i reaktivni ugljikovi radikali. Tijekom propagacije, LOOH u prisutnosti željeza disocira na $LO^{\cdot}$ i $LOO^{\cdot}$, koji ponovno mogu pokrenuti proces peroksidacije. Krajnji produkti su aldehidi, ketoni, različiti ugljikovodici, epoksidi i drugi radikali. Shemu lipidne peroksidacije prikazuje Slika 3.



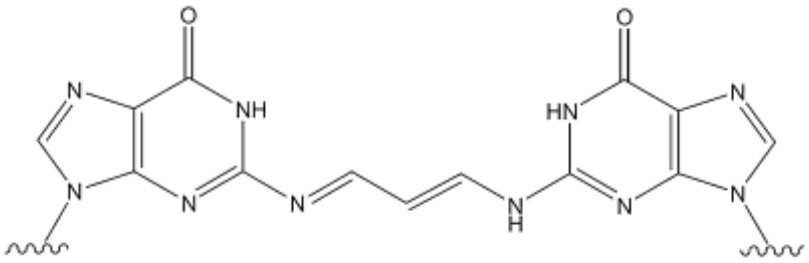
Slika 3. Shema lipidne peroksidacije. Preuzeto iz (21)

Aldehidi, koji nastaju kao produkti lipidne peroksidacije, su dugoživuće i vrlo reaktivne molekule sposobne djelovati unutar stanica i izvan njih. Reagiraju s drugim biomolekulama (proteini i nukleinske kiseline) i dovode do njihovog ireverzibilnog oštećenja. To je osobito razorno za biološke membrane, koje su uglavnom sazdane od PUFA. Oštećenja membrana imaju za posljedicu gubitak fluidnosti, promjene membranskog potencijala, povećanje permeabilnosti prema nekim ionima, a moguće su i rupture (22). Malondialdehid (MDA) je najvažniji produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Može nastati lipidnom peroksidacijom i enzimskim procesima iz različitih prostaglandina. Pri neutralnom pH MDA je prisutan kao enolatni anion, koji se veže na nukleinske kiseline pri čemu nastaje pirimido-(1,2-α)purin-10(3H)-on deoksiriboza (M1dG) (23), što prikazuje Slika 4.



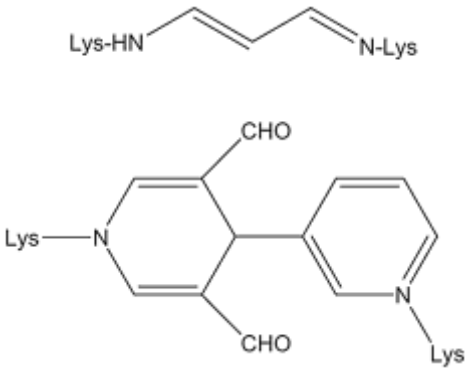
Slika 4. **Struktura glavnog produkta interakcije između MDA i DNA: pirimido-(1,2-α)purin-10(3H)-on deoksiriboza (M1dG). Preuzeto iz (23).**

M1dG dovodi do mutacija koje pomiču okvir čitanja DNA ili može uzrokovati supstituciju pojedinih baza u stanicama bakterija i sisavaca (24). Drugi mehanizam MDA genotoksičnosti je formiranje poprečnih veza između različitih lanaca DNA (25) što prikazuje Slika 5.



Slika 5. **Predloženi mehanizam kojim MDA stvara poprečne veze između lanaca DNA. Preuzeto iz (25).**

MDA sudjeluje i u stvaranju veza između DNA i histona (26). MDA reagira s primarnim aminima i formira N^{ε} - (2-propenal) lizin te na taj način stvara poprečne veze lizin-lizin s 1-amino-3 iminopropenom i piridil-dihidropiridinom, kao što prikazuje Slika 6 (27).



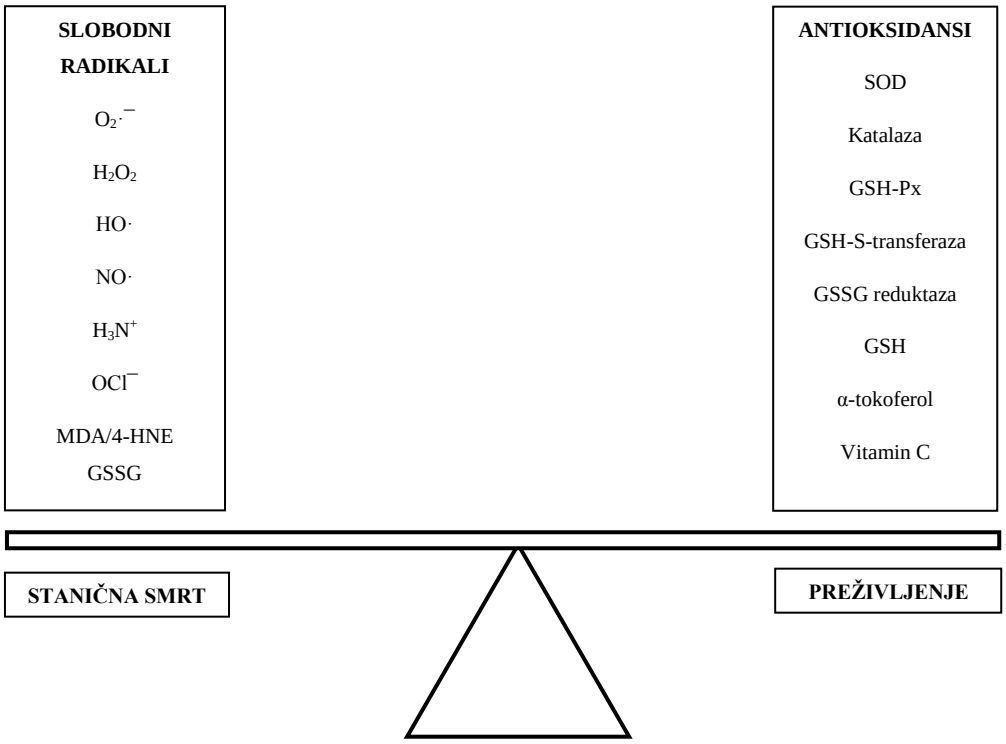
Slika 6. **Strukture veza lizin-lizin koje nastaju reakcijom MDA i primarnih amina. Preuzeto iz 23.**

Stvaranje poprečnih veza lizin - lizin u molekuli apo B unutar čestice oksidiranog lipoproteina male gustoće (engl. *Oxidized low density lipoprotein*, ox-LDL) smanjuje vezna svojstva apo B za LDL receptore. MDA formira poprečne veze između kolagenskih vlakana, zbog čega se smanjuje elastičnost kardiovaskularnog tkiva. Trans-4-hidroksi-2-nonenal je produkt lipidne peroksidacije, koji s molekulama DNA formira tzv. eteno-DNA adukte, koji se nakupljaju nakon dugotrajnog izlaganja karcinogenima, te kod nekih kroničnih bolesti. Izlučuju se urinom i mogu služiti kao biljeg lipidne peroksidacije koja oštećuje DNA (28).

Organizam je od fiziološke količine slobodnih radikala zaštićen pomoću nekoliko mehanizama: 1) enzimske reakcije kojima se radikali prevode u manje toksične molekule. Najznačajniji enzimi, koji sudjeluju u pretvorbi slobodnih radikala, su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza, glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR) i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR); 2) uklanjanje radikala ligandnim reakcijama s antioksidansima (vitamini K, A, C, E, koenzim Q, cistein, metionin, glutation, ubikvinon, glukoza i katabolički peptidi u stanici).

Zasebna skupina izvanstaničnih antioksidansa su proteini koji vežu hemoglobin i hemsko željezo, te na taj način sprečavaju reakciju željeza sa slobodnim radikalima (haptoglobin, hemopeksin, laktoferin, transferin i albumin), ceruloplazmin koji veže bakar, bilirubin i urati koji vežu slobodne radikale te enzimi koji reduciraju željezo (citokrom P-450, NADPH-reduktaza).

Oksidacijski stres nastaje ako je proizvodnja slobodnih radikala veća u odnosu na mehanizme kojima se takvi spojevi razgrađuju. Isti učinak može nastati i zbog smanjene razgradnje slobodnih radikala. Ravnotežu između oksidacijskog stresa i antioksidacijskih mehanizama prikazuje Slika 7.



Slika 7. Ravnoteža između oksidacijskog stresa i antioksidacijskih mehanizama. Preuzeto iz (29).

U skladu s teorijom slobodnih radikala, i starenje je rezultat oksidacijskog oštećenja, uglavnom mitohondrija tijekom životnog vijeka. Mitohondriji su jako osjetljivi na oštećenja slobodnim radikalima, zbog prisutnosti dvostrukih veza među ugljikovim atomima u hidrofobnim repovima njihovih fosfolipida. Što je manji udio polinezasićenih, a veći udio mononezasićenih masnih kiselina u njihovim membranama, manja je izloženost oksidacijskom stresu (30).

Slobodni radikali također mogu nastati u endotelnim stanicama kao odgovor na hiperkolesterolemiju i hipertenziju. Slobodni radikali su različitim putovima uključeni u aterogenezu, a jedan od važnijih je sudjelovanje u oksidaciji LDL čestica, čime one dobivaju jaka aterogena svojstva.

1.2.1.1 Citoprotektivni enzimi

Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira razgradnju reaktivnih kisikovih spojeva prevodeći ih u vodikov peroksid i molekularni kisik, što je jedan od mehanizama zaštite organizma od oksidacijskog stresa.

$$O_2^{-}\cdot + O_2\cdot \xrightarrow{\textit{superoksid dismutaza}} H_2O_2 + O_2 \qquad [1]$$

U ljudi postoje tri oblika enzima: 1) citosolni (Zn/Cu-SOD), 2) mitohondrijski (Mn-SOD) i 3) izvanstanični (EC-SOD) (31). SOD je u različitim koncentracijama distribuiran po tkivima. Najveće katalitičke koncentracije EC-SOD nalaze se u endotelu krvih žila, bubregu, maternici, i to na staničnoj površini te u ekstracelularnom matriksu gdje su katalitičke koncentracije i do 20 puta veće nego u serumu (32). Ekspresija EC-SOD-a na površini glatkih mišićnih stanica kontrolirana je nizom vazoaktivnih čimbenika. Histamin, vazopresin, oksitocin, endotelin-1, angiotenzin-II i serotonin putem G-proteina, te heparin i heparan-sulfat putem mehanizma protein-kinaze potiču ekspresiju EC-SOD-a. Ekspresija EC-SOD-a je smanjena djelovanjem trombocitnih čimbenika rasta (PDGF-AA i PDGF-BB) i epidermalnog čimbenika rasta (EGF). EC-SOD pokazuje polimorfizam s obzirom na različit afinitet prema heparinu i heparan-sulfatu, gdje fenotipska varijanta sa smanjenim afinitetom rezultira s deseterostruko većom katalitičkom koncentracijom (33). Katalitičku koncentraciju EC-SOD-a povećava NO, pa u stanju oksidacijskog stresa, povećana koncentracija $O_2^{\cdot -}$ dovodi do smanjene sinteze NO, zbog čega je smanjena katalitička koncentracija SOD-a (34).

Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GSH-Px) je glavni enzim koji katalizira razgradnju vodikovog peroksida nastalog djelovanjem SOD-a. Vodikov peroksid se uklanja u prisutnosti reduciranog glutationa, pri čemu nastaje voda i oksidirani glutation:

$$2H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\textit{glutation peroksidaza}} GSSG + 2H_2O \qquad [2]$$

Enzim GSH-Px je smješten na unutarnjoj strani stanične membrane. Postoje četiri oblika GSH-Px u organizmu: stanični, gastrointestinalni, plazmatski i fosfolipid-hidroperoksid-glutation-peroksidaza (31).

Katalitička koncentracija GSH-Px-a je smanjena kod bolesti kardiovaskularnog sustava.

Muškarci imaju manje katalitičke koncentracije u odnosu na žene, a katalitičke koncentracije su manje i u pušača u odnosu na nepušače. Smatra se da je najvažnija funkcija GSH-Px-a prevencija oksidacijskog stresa, a time i procesa ateroskleroze (35). U eksperimentalnih životinja dokazano je da smanjena ekspresija GSH-Px-a povećava oksidaciju LDL-kolesterola (36).

Katalaza

Katalaza je enzim, koji također katalizira razgradnju vodikovog peroksida:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{katalaza} H_2O + O_2 \qquad [3]$$

Katalaza se sastoji od četiri podjedinice s atomom željeza u aktivnom centru enzima. Smještena je unutar peroksisoma, gdje se nalazi i glikolat-oksidaza, koja sudjeluje u stvaranju vodikovog peroksida. Time se skraćuje vrijeme štetnog djelovanja vodikovog peroksida na druge strukture u stanici (31).

1.2.1.2 Antioksidansi

Antioksidansi su heterogena grupa spojeva koji na različite načine smanjuju oksidaciju supstrata. Najčešći učinci antioksidansa:

- uklanjanje kisika
- uklanjanje metalnih iona
- uklanjanje slobodnih radikala kao što su superoksid i vodikov peroksid
- uklanjanje singletnog kisika (22)

Vitamini

Najznačajniji vitamini koji imaju ulogu antioksidansa u stanicama su C, E i A. Vitamin C je hidrofilni antioksidans smješten u citoplazmi. U svom dehidro-obliku reducira α-tokoferolni, superoksidni i hidroksilni radikal, perokside i hipoklorit.

Vitamin E čine α, β, γ i λ-tokoferoli, od kojih su najzastupljeniji α-tokoferoli. Vitamin E je sastavni dio membrana stanica i lipoproteina, koje štiti od lipidne peroksidacije, jer uklanja peroksilne i alkoksilne radikale. U toj reakciji nastaje slabo reaktivni α-tokoferoksil radikal.

Provitamin A ili β-karoten je lipofilni antioksidans. Koncentracija β-karotena u plazmi je puno manja od koncentracija vitamina C i E, no ima sličnu funkciju uklanjanja peroksilnog i

alkoksilnog radikala.

Reducirani glutation

Glutation je relativno mala molekula koja u svom reduciranom obliku (GSH) štiti stanice od oksidacijskog oštećenja. U metaboličkim procesima većine stanica konstantno se stvaraju reaktivni kisikovi spojevi, vodikov peroksid i lipidni peroksidi, dok GSH sudjeluje u njihovoj redukciji, pri čemu se sam oksidira (GSSG). GSSG se regenerira u "glutation redoks ciklusu" čime ponovno prelazi u reducirani oblik (31).

Fenolni antioksidansi

Fenolni antioksidansi su najzastupljeniji antioksidansi u hrani. Polifenoli su česte sastavnice hrane biljnog porijekla, a sastoje se od jednog ili više aromatskih prstena, te jedne ili više hidroksilnih grupa. Molekule s jednim aromatskim prstenom mogu biti fenolne kiseline ili fenolni alkoholi. Polifenoli u organizmu smanjuju prisutnost staničnih adhezijskih molekula, povećavaju količinu NO, smanjuju agregaciju trombocita, sprečavaju oštećenje DNA i formiranje lipidnih peroksida.

1.2.2 Poremećaji endotela u upali

Upala je važan čimbenik u inicijaciji i progresiji ateroskleroze. To je homeostatska reakcija organizma na infekcije i rane, koja je u normalnim uvjetima samoograničavajuća. Kada organizam ne može neutralizirati početni upalni događaj ili su mehanizmi ograničavanja upale poremećeni, upala postaje kronična. U patogenezi ateroskleroze etiološku ulogu mogu imati infektivni agensi kao što su Chlamydophila pneumoniae (ranije uvriježen naziv Chlamydia), cytomegalovirus, Helicobacter pylori, neke vrste enterovirusa, virus hepatitisa i herpes virus.

Povezanost upale i ateroskleroze proizlazi iz činjenice da su neki od biljega upale ujedno i pokazatelji subkliničke ateroskleroze. C-reaktivni protein (CRP) je reaktant akutne faze koji je povišen u plazmi kod infekcija, oštećenja tkiva i drugih upalnih stanja. Klinički podaci govore u prilog tome da fibrinogen, CRP i amiloid A imaju važnu ulogu u upali i aterogenezi (37).

Prve promjene vezane uz aterosklerozu događaju se na razini endotela. Endotel se dugo smatrao inertnom barijerom između cirkulacije i tkiva, ali kasnije se pokazalo da je taj monosloj stanica aktivna biološka tromborezistentna barijera između izrazito trombogenog subendotela i krvi. Funkcije endotela su kontrola koagulacije i fibrinolize, regulacija tonusa krvnih žila, lučenje čimbenika rasta te regulacija upale i imunološkog odgovora. U normalnim

uvjetima, endotel održava tonus krvnih žila u relativno dilatiranom stanju. Kod promjene brzine protoka krvi endotel reagira otpuštanjem NO, koji djeluje vazodilatacijski. NO nastaje prilikom pretvorbe aminokiseline L-arginina u citrulin uz pomoć endotelne sintaze dušikovog (II) oksida (engl. *Endothelial Nitric oxide synthase*, eNOS).

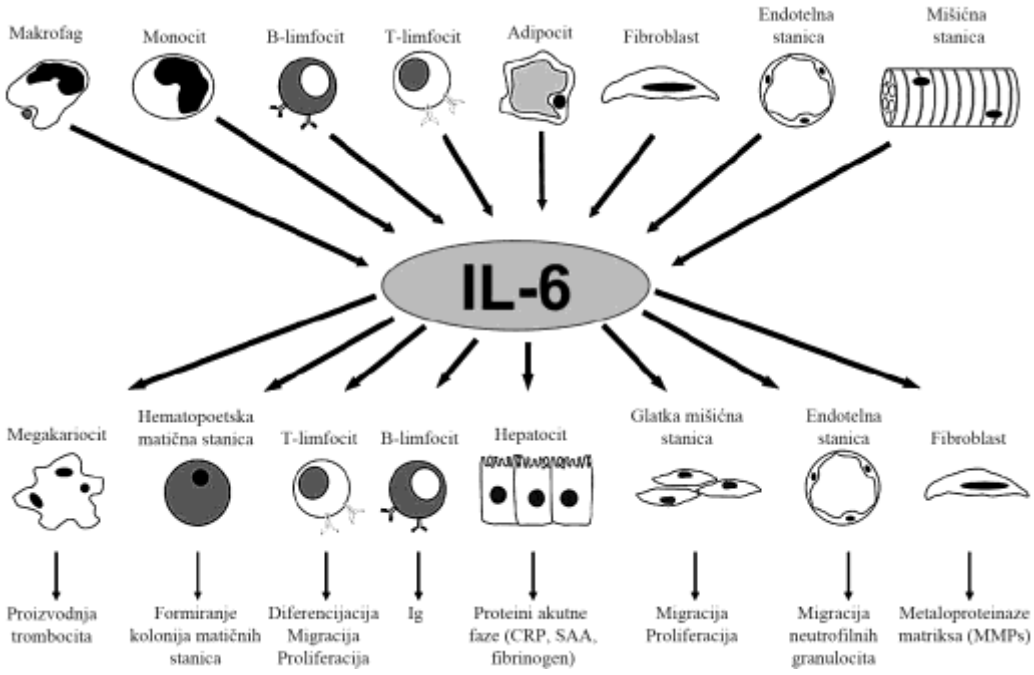
Dugotrajni podražaji kao što su hipertenzija i hiperkolesterolemija, trajno oštećuju endotel, a time se onemogućuje kompenzacija normalnog tonusa endotela. Hipertenzija također aktivira proizvodnju slobodnih radikala i time dovodi do oksidacijskog stresa. Slobodni radikali djeluju kao regulatorne molekule, koje potiču sintezu jezgrinog transkripcijskog čimbenika (engl. *Nuclear factor kappa B*, NF-κB). NF-κB u jezgri stanice aktivira gene odgovorne za sintezu upalnih proteina, što se događa i tijekom reakcije organizma na ozljedu i infekciju, a osim toga, NF-κB potiče i sintezu adhezijskih molekula. Adhezijske molekule omogućuju adheziju monocita na endotel, a najvažnije su vaskularna adhezijska molekula-1 (engl. *Vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), unutarstanična adhezijska molekula tipa I (engl. *Intercellular adhesion molecule type I*, ICAM-I) i selektini, od kojih u aterosklerozi prevladava P-selektin. Limfociti i monociti imaju ligande za vezanje na adhezijske molekule preko kojih se vežu na endotel. Nakon adheriranja, limfociti i monociti migriraju u intimu arterije (38).

Gp120, koji se nalazi u sastavu HIV čestice, potiče proizvodnju tkivnog čimbenika u endotelnim stanicama (39), a dovodi i do ubrzane apoptoze endotelnih stanica (12). Geni HIV-a *tat* i *nef* induciraju ekspresiju adhezijskih molekula endotela, te uzrokuju otpuštanje upalnih čimbenika iz makrofaga (40).

U *in vitro* uvjetima, ekspresija adhezijskih molekula je pojačana pod uvjetima visokih koncentracija ox-LDL-a, Lipoproteina (a) (Lp(a)) i određenih citokina (41). U hiperkolesterolemičnih pokusnih životinja blokiranje adhezijskih molekula specifičnim protutijelima dovodi do smanjenog nakupljanja stanica u intimi krvne žile (42).

Migraciju leukocita unutar intime usmjeravaju kemoatraktilni kemokini, od kojih je najvažniji monocitni kemotaktički protein-1 (engl. *Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1). Kemoatraktilni kemokini luče se iz stanica stijenke krvne žile kad su te stanice izložene upalnom medijatoru, interferonu-γ, nastalom posredstvom aktiviranih T-limfocita. MCP-1 reagira s kemokinskim receptorima na monocitima (CCR2) čime se olakšava dijapedeza monocita između endotelnih stanica. Monociti, sada smješteni u intimi arterije, diferenciraju u makrofage. Aktivnošću makrofaga, koji su stanice prirođene, nespecifične imunosti, upravlja puno manja populacija T-limfocita (efektorske stanice stečene, specifične imunosti). U ranoj

fazi ateroskleroze prevladavaju T-limfociti prirodni ubojice (engl. *Natural Killers*, NK) koji prepoznaju lipidne antigene. Interferon-γ aktivira makrofage i potiče lučenje proupalnih citokina iz aktiviranih stanica endotela. Najvažniji proupalni citokini su IL-1 i TNF-α, koji citokinskom kaskadom potiču lučenje IL-6 u različitim tkivima (43), što prikazuje Slika 8.

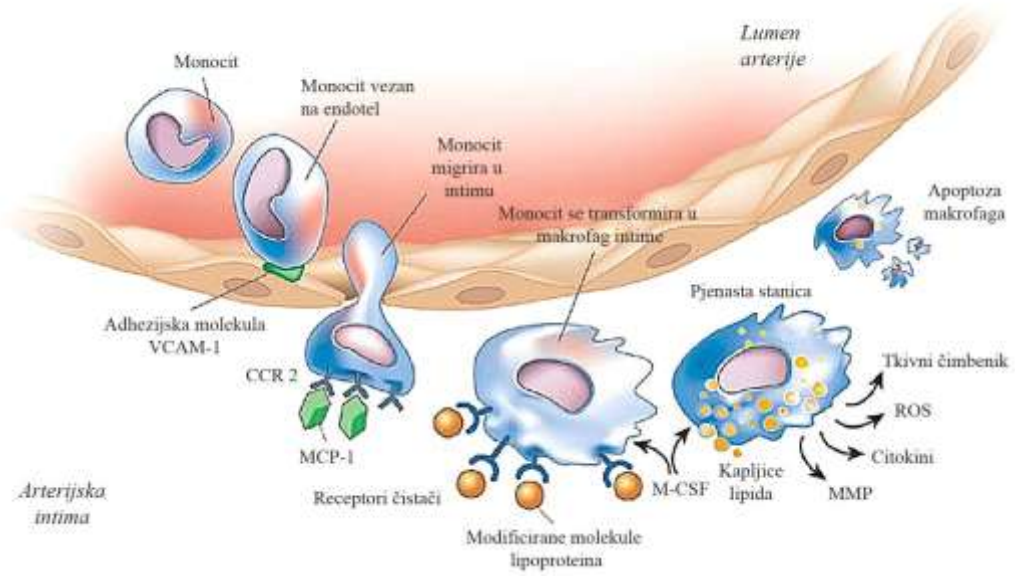


Slika 8. Mjesta lučenja i djelovanja interleukina-6 (IL-6). Preuzeto iz (44).

Navedeni citokini djeluju u udaljenim tkivima u odnosu na mjesto sinteze, a djelovanje im je vrlo učinkovito, iako se njihove koncentracije u plazmi mjere u pikomolima po litri.

Unutar aterosklerotskog plaka detektirana je posebna populacija monocita, koji na svojoj površini imaju veći broj glikoproteinskih liganda-1 koji vežu P-selektin (engl. *P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL-1), zbog čega navedeni monociti imaju proupalna svojstva (45).

Medijator sazrijevanja monocita u makrofage unutar intime je čimbenik stimulacije kolonija monocita (engl. *Monocyte colony stimulating factor*, M-CSF), čija je koncentracija povećana u aterosklerotskim lezijama, a sposoban je i inducirati ekspresiju receptora čistača (engl. *Scavenger receptor*). Makrofagi unutar intime proliferiraju, čime se pojačava upalni proces i izlučuju čimbenici rasta, citokini, tkivni čimbenik (engl. *Tissue factor*, TF) i metaloproteinaze matriksa (engl. *Matrix metalloproteinase*, MMP), koje razgrađuju ekstracelularni matriks. (46). Makrofagi smješteni u intimi fagocitiraju ox-LDL čestice. Citoplazma makrofaga, koji fagocitiraju ox-LDL čestice, izgleda poput pjene, a takvi makrofagi nazivaju se pjenastim stanicama (engl. *Foamy cells*). Transformaciju monocita u makrofage i nastanak pjenastih stanica prikazuje Slika 9.



Slika 9: Mononuklearni fagociti u aterogenezi. Preuzeto iz (46).

Pjenaste stanice mogu nastati i transformacijom glatkih mišićnih stanica smještenih u intimi arterija. Oštećenje endotela, uz djelovanje interferona-γ, stimulira umnožavanje glatkih mišićnih stanica i njihovu migraciju u intimu krvnih žila. Glatke mišićne stanice time dobivaju nova svojstva, gube kontraktilnu funkciju, a povećava im se sekrecijska funkcija. Povećava se proizvodnja i sekrecija kolagena te proteoglikana, što pridonosi bržoj transformaciji plaka iz lipidnog u fibrolipidni (38). Glatke mišićne stanice u dubini aterosklerotske lezije pojačano se raspadaju i s vremenom kalcificiraju, čime se pridonosi smanjenoj elastičnosti arterijskih stijenki (19).

Nakupine pjenastih stanica na arteriji makroskopski izgledaju kao masne pruge (engl. *Fatty streaks*) i progrediraju do patoloških lezija ovisno o genetskim čimbenicima i čimbenicima okoliša. Stvaranje plaka traje godinama, a kroz to vrijeme događaju se procesi, koji mogu ubrzati, usporiti, pa čak dovesti i do regresije ateroskleroze.

1.2.2.1 Biljezi upale

Sedimentacija eritrocita

Mjerenje brzine sedimentacije eritrocita je nespecifična, ali vrlo osjetljiva pretraga povezana s nizom upalnih i drugih patoloških stanja. Brzina sedimentacije eritrocita ovisi o broju i obliku eritrocita, te sastavu proteina plazme. Povećane razine proteina plazme, a naročito reaktanata akutne faze (CRP, fibrinogen, α-globulini i γ-globulini) dovode do povećane brzine

sedimentacije eritrocita (47).

Broj leukocita

Leukociti su najvažnije obrambene stanične komponente u perifernoj krvi. Sve leukocitne vrste (neutrofilni, eozinofilni i bazofilni granulociti, nesegmentirani neutrofilni granulociti, monociti i limfociti) potječu od pluripotentnih matičnih stanica. Leukociti diferenciraju, proliferiraju i sazrijevaju u koštanoj srži, osim T-limfocita, koji potpuno sazrijevaju u timusu. Nakon sazrijevanja otpuštaju se u cirkulaciju, a na poticaj patogena migriraju u tkiva gdje obavljaju obrambenu funkciju. Prilikom upale i/ili infekcije mijenja se broj, odnos i morfologija pojedinih leukocitnih vrsta u punoj krvi (48).

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je ime za cijelu porodicu citokina, od kojih su neki interleukin-11 (IL-11), interleukin-27 (IL-27), čimbenik inhibicije leukemije (engl. *Leukemia inhibitory factor*, LIF) i onkostatin M (OSM). Svi članovi IL-6 porodice citokina vežu se na receptor IL-6R koji se nalazi samo na hepatocitima, monocitima, te inaktivnim T i B-limfocitima, a za svoje djelovanje trebaju i gp130 koji služi kao koreceptor. Vezanje IL-6 za IL-6R na površini stanice dovodi do migracije dviju podjedinica gp130, te do njihova međusobnog kompleksiranja i stvaranja dimera. Dimerizacija je početni korak u signalnoj kaskadi koja ima za cilj sintezu i lučenje proteina akutne faze iz jetre (fibrinogen, CRP). Međukoraci u kaskadi su dimerizacija jedne vrste tirozin-kinaze, tzv. Janus kinaze (engl. *Janus kinase*, JAK) koja se nalazi unutar stanice, što pokreće fosforilaciju proteina prenositelja signala i aktivatora transkripcije (tzv. STAT proteini) u citoplazmi, translokaciju STAT proteina u jezgru, vezanje na promotorsku regiju ciljnih gena, što potiče njihovu ekspresiju, a time i sintezu proteina akutne faze (44).

IL-6 ima ulogu proksimalnog medijatora upalne kaskade, ali s obzirom na kratko vrijeme poluživota u plazmi, vrlo niske koncentracije i velike intraindividualne razlike, rutinski se određuju distalni upalni medijatori, kao što su fibrinogen i CRP.

C- reaktivni protein

C-reaktivni protein (CRP) je jedan od glavnih biljega upale. Svrstava se u porodicu visoko konzerviranih proteina zvanih pentraksini. Sadrži pet nekovalentno vezanih protomera smještenih simetrično oko centralne šupljine, a molarna masa molekule iznosi 118 kDa. Kako u upali sinteza CRP-a raste, tom prilikom se javljaju i novi epitopi, koji ne postoje (ili su skriveni) u nativnom obliku molekule. U literaturi se takvi oblici nazivaju modificiranim ili

monomernim CRP-om (mCRP) (49).

CRP se uglavnom sintetizira u hepatocitima, no novija istraživanja pokazuju i druga mjesta sinteze, kao što su aterosklerotske lezije, bubreg, neuroni, alveolarni makrofagi (50, 51, 52). Njegovu transkripciju regulira IL-6, uz sinergističko djelovanje IL-1. Poluživot CRP-a u plazmi iznosi oko 19 sati, a njegova koncentracija u plazmi uvjetovana je brzinom stvaranja. CRP ima najvažniju kliničku primjenu kao biljeg za razlikovanje bakterijske i virusne etiologije upale, jer su koncentracije CRP-a veće kod bakterijskih u odnosu na virusne infekcije. Posljednjih godina CRP se opisuje kao rani biljeg ateroskleroze, jer je dokazana povećana učestalost obolijevanja od bolesti srca i krvožilnog sustava kod osoba čije su koncentracije CRP-a veće od 3 mg/L. Zbog toga, koncentracija CRP-a manja od 1 mg/L znači mali rizik, 1-3 mg/L umjereni rizik i koncentracija veća od 3 mg/L znači visoki rizik obolijevanja od bolesti srca i krvožilnog sustava (53). U tu svrhu povećana je osjetljivost testa, pa se CRP sve češće mjeri metodom visoke osjetljivosti (engl. *High sensitivity CR*P, hsCRP) koja je prilagođena mjerenju u području niskih koncentracija CRP-a.

1.2.2.2 Biljezi povezani s oštećenjem endotela

Biljezi oštećenja endotela trebali bi imati sljedeća svojstva: da su produkt endotelnih stanica, da su specifični i stabilni.

von Willebrand-ov čimbenik zgrušavanja

von Willebrand-ov čimbenik zgrušavanja (engl. *von Willebrand factor*, vWf) se sintetizira u endotelnim stanicama i megakariocitima. Nakon sinteze, vWf se pohranjuje u intracelularnim granulama (Weibel-Palade-ovim strukturama endotela, odnosno α-granulama trombocita). Endotelne stanice koje secerniraju vWf su ujedno i stanice uključene u održavanje vaskularnog tonusa, hemostazu, fibrinolizu i leukocitnu adheziju. vWf je multimerni protein sastavljen od niza istovrsnih podjedinica - monomera, a svaka od njih ima dva vezna mjesta, jedno za glikoprotein Ib/IX (GpIb/IX) smješten na površini trombocita i drugo za kolagen iz subendotela krvne žile. Na taj način vWf služi kao most koji omogućuje adheziju trombocita na subendotel i tako sudjeluje u primarnoj hemostazi.

vWf sudjeluje i u sekundarnoj hemostazi, kompleksirajući s čimbenikom zgrušavanja VIII (FVIII), stabilizirajući i osiguravajući dovoljnu količinu FVIII važnu za nastanak velike količine trombina. Iako molekule vWf čine vrlo heterogenu populaciju u cirkulaciji (zbog multimera različite duljine), svaki multimer veže samo jednu molekulu FVIII.

Kvalitativni ili kvantitativni nedostatak vWf naziva se von Willebrandova bolest i najčešći je nasljedni hemostatski poremećaj. Javlja se zbog mutacija na genu, koji kodira monomerni protein. Postoji i stečena forma, von Willebrandov sindrom, koji se javlja kod limfoproliferativnih bolesti uslijed razgradnje vWf auto-protutijelima (54). U fiziološkim uvjetima trombociti i endotel su razdvojeni, ali kod velikih sila smicanja (engl. *Shear stress*) koje nastaju u kapilarama i na mjestima aterosklerotskih plakova, intenzivnija je interakcija GpIb/IX i vWf, a time i adhezija trombocita na endotel. Velike multimerne molekule vWf osiguravaju veći broj veznih mjesta za trombocite (55). Pokusi na životinjama pokazuju da inaktivacija vWf ili inhibicija GpIb odgađaju nastanak masne pruge (56, 57), ali još uvijek nema dokaza da su osobe, koje boluju od von Willebrandove bolesti, zaštićene od bolesti krvožilnog sustava.

Studije na kultiviranim endotelnim stanicama otkrile su veliki broj agonista sekrecije vWf. U prvu grupu agonista, čiji je efekt posredovan kalcijevim ionima, ulaze histamin, trombin, superoksidni anioni, te drugi medijatori upale i tromboze. U drugu grupu agonista, koji potiču egzocitozu vWf-a iz Weibel-Palade-ovih tjelešaca, spadaju vazoaktivni hormoni adrenalin i vazopresin. Koncentracija vWf u plazmi raste prilikom aktivacije endotelnih stanica, no znatno veće koncentracije se nalaze kod samog oštećenja endotelnih stanica, što je osobina ateroskleroze.

Neki radovi ukazuju na povezanost povećane koncentracije vWf i rizičnih čimbenika za aterosklerozu (pušenje, povišen krvni tlak, debljina, šećerna bolest i dislipidemija) (58, 59).

Koncentracija vWf se povećava kod niza blažih i težih oblika upale (reumatoidni artritis, vaskulitis itd.), a njegovo lučenje potiču citokini i drugi medijatori upale. Povećane koncentracije vWf javljaju se i u reakcijama akutne faze, vježbanju i trudnoći. Dijagnostičko značenje vWf-a smanjuje njegova velika interindividualna varijabilnost. Poznato je da osobe krvne grupe nula imaju značajno niže vrijednosti vWf u odnosu na ostale krvne grupe, a naročito u odnosu na krvnu grupu AB (60).

1.2.3 Poremećaji metabolizma lipoproteina

Lipoproteini su čestice sastavljene od hidrofobne jezgre (esteri kolesterola i trigliceridi) i hidrofilne površine (fosfolipidi, slobodni kolesterol i apoproteini). Glavne čestice lipoproteina u serumu su: hilomikroni, VLDL, LDL, lipoproteini srednje gustoće (engl. Intermediate density lipoproteins, IDL) i lipoproteini visoke gustoće (engl. High density lipoproteins, HDL). Glavna funkcija lipoproteina je transport i izmjena sastojaka između pojedinih lipoproteinskih vrsta, te između lipoproteina i stanica. Postoje dva metabolička puta metaboliziranja lipoproteina: egzogeni i endogeni. Lipoproteini nastali u epitelnim stanicama tankog crijeva preradom masti iz hrane nazivaju se hilomikroni i predstavljaju egzogeni put metabolizma lipida. Sastoje se od triglicerida koji se pomoću enzima LPL iz endotela hidroliziraju do SMK. SMK se unose u stanice mišića i masnog tkiva gdje služe kao zaliha energije.

Endogeni put metaboliziranja lipida započinje stvaranjem VLDL-čestica u jetri. VLDL-čestice se sastoje od endogenih triglicerida, koji se, kao i trigliceridi hilomikrona, hidroliziraju pomoću LPL do SMK, a VLDL prelazi u IDL. Oko 50% IDL-a se dalje hidrolizira i prelazi u LDL, a ostatak IDL-a se veže za receptore u jetri. LDL-čestice su glavni prijenosnik kolesterola u krvi, a u stanice ulaze preko specifičnih LDL-receptora. U normalnim uvjetima LDL-receptori reguliraju unos kolesterola u stanicu djelujući na vlastitu ekspresiju na površini stanica preko sustava negativne povratne sprege. Ukoliko u stanici ima dovoljno kolesterola, inhibirat će se unutarstanični enzim β-hidroksi-β-metil-glutaril koenzim A reduktaza (HMG-CoA reduktaza) koji katalizira sintezu endogenog kolesterola. U odstranjenju LDL-kolesterola iz cirkulacije sudjeluju HDL-čestice koje od LDL-čestica i iz perifernog tkiva preuzimaju estere kolesterola i prenose ih u jetru. U jetri takav kolesterol služi za sintezu žučnih kiselina i steroidnih hormona. Postoje četiri podskupine LDL-čestica (označene kao LDL I, II, III i IV) koje se razlikuju po gustoći, sastavu, veličini, metabolizmu i aterogenosti. Najveći stupanj aterogenosti posjeduju LDL IV, to jest, male guste LDL-čestice koje su bogate proteinima, a imaju manji udio fosfolipida i neesterificiranog kolesterola. Male guste LDL-čestice zbog manjih dimenzija lakše ulaze u subendotel krvnih žila i podložnije su oksidaciji u usporedbi s ostalim LDL-česticama. Male LDL-čestice nastaju pregradnjom iz velikih, trigliceridima bogatih VLDL1-čestica (61).

U metaboliziranju lipoproteinskih čestica važnu ulogu imaju apolipoproteini. Lipoproteinske čestice sadrže jedan ili više apolipoproteina, koji uglavnom služe kao aktivatori lipolitičkih enzima (apo A, apo C) ili kao ligandi za lipoproteinske receptore (apo B, apo E).

Ukoliko je kroz duži vremenski period povećan broj LDL-čestica, a permeabilnost endotela povećana uslijed njegova oštećenja, LDL-čestice lakše ulaze u endotelni prostor. U aterosklerotskom plaku se još mogu naći i IDL-čestice, te Lp(a). Lp(a) ne sudjeluje u nastanku pjenastih stanica, već se zadržava ekstracelularno. Lp(a) je strukturno sličan plazminogenu te s njim kompetira za vezna mjesta na fibrinu i time ometa fibrinolitičku aktivnost plazminogena (62). Lp(a) djeluje kao proupalni medijator koji sudjeluje u stvaranju trombotičkih lezija (63).

LDL-čestice se oksidiraju unutar endotelnog prostora pod djelovanjem lipoperoksidaze endotelnih stanica i slobodnih radikala, također podrijetlom iz endotelnih stanica, makrofaga, i glatkih mišićnih stanica. Osjetljivost LDL-čestica na oksidaciju ovisna je o sastavu masnih kiselina LDL-a, te o antioksidansima prisutnim u LDL-u i u cirkulaciji. Iako mnoge komponente LDL-a, uključujući apo B, fosfolipide, kolesterol i nezasićene masne kiseline podliježu oksidaciji, oksidacija LDL-a slobodnim radikalima najčešće podrazumijeva oksidaciju njegovih masnih kiselina, pri čemu nastaju vodikov peroksid i aldehidi, od kojih je najznačajniji MDA. MDA modificira lizinski prsten na apo B i time povećava afinitet LDL-čestice prema receptorima čistačima na makrofagima. Zbog toga ox-LDL za ulazak u stanice ne treba "klasične" LDL-receptore. Jedan od receptora čistača na površini makrofaga je CD36, koji prepoznaje oštećenu molekulu masne kiseline i oksidirani fosfatidilkolin. Nakon fagocitoze ox-LDL-a pomoću CD36 receptora, bioaktivni lipidi iz ox-LDL-a aktiviraju jezgrine receptore kao što je PPAR-γ i pojačanom transkripcijom dodatno aktiviraju ekspresiju CD36 receptora, čime se njihov broj na površini makrofaga povećava (64). Povećanjem broja receptora raste unos ox-LDL-a u makrofage koji postaju prepunjeni lipidima. Dugotrajna akumulacija kolesterola u stanicama dovodi do disfunkcije mitohondrija, nekroze stanica i posljedičnog otpuštanja proteaza i upalnih citokina. Prilikom oštećenja endotela ox-LDL česticama, organizam razvija imunološki odgovor, a to rezultira proizvodnjom protutijela na ox-LDL. Antigena struktura koja dovodi do aktivacije imunološkog odgovora je modificirani lizinski prsten s apo B čestice. Protutijela na ox-LDL mogu se naći u samom aterosklerotskom plaku, ali i u plazmi osoba u kojih se razvila ateroskleroza. Titar protutijela na ox-LDL raste tijekom mjesec dana od pojave akutnog koronarnog sindroma i veći je nego u bolesnika s kroničnim srčanim bolestima ili u osoba zdravih koronarnih arterija (19). Ox-LDL se može detektirati u cirkulaciji, a za njegovo otpuštanje u cirkulaciju postoji više mogućih mehanizama kao što su rupturirani ili permeabilni plak i ishemijsko oštećenje koje dovodi do povećane permeabilnosti staničnih

membrana. Tablica 1 opisuje proaterogene učinke ox-LDL čestica te mehanizme kojima do njih dolazi.

Tablica 1. Mogući proaterogeni učinci oksidiranih LDL-čestica. Preuzeto iz (63).

Proaterogeni efekti	Mogući mehanizmi
Adhezija monocita na endotelne stanice	Pojačana ekspresija adhezijskih molekula na endotelnim stanicama
Kemotaksija monocita i T-limfocita	Pojačana proizvodnja MCP-1 koji djeluje kemoatraktilno
Nastanak pjenastih stanica	Povećan unos oksidiranog LDL-a u stanice preko receptora čistača
Indukcija proupalnih gena	Aktivacija NF-κB i povišenog cAMP-a
Učestala stanična smrt	Aktivacija apoptoze i formiranje kristala kolesterola
Tromboza	Indukcija tkivnog čimbenika, pojačana agregacija trombocita
Poremećene funkcije krvnih žila	Poremećaj funkcije endotelina i NO
Ruptura plaka	Pojačana proizvodnja MMP

MCP-1, Monocitni kemotaktički protein-1; NF-κB, Jezgrin transkripcijski čimbenik; cAMP, ciklički adenozin monofosfat; NO, Dušikov monoksid; MMP, Metaloproteinaze matriksa; LDL. lipoproteini niske gustoće

Receptor CD 36 ima ulogu regulacije stanične mobilnosti. Makrofagi u intimi krvne žile koji pojačano fagocitiraju, dovode do progresije lezije, no ako makrofagi napuštaju intimu, dolazi do regresije plaka. Park sa suradnicima je otkrio da signalizacija između CD 36 i oksidiranog LDL-a dovodi do polimerizacije aktina između stanica i pojačavanja adhezijskih sila. Pjenaste stanice proizvode reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) koji indirektno aktiviraju fokalnu adhezijsku kinazu, a ona pomaže polimerizaciju aktina (65).

1.2.4 Poremećaji koagulacije

Intaktan endotel ima antiagregacijska svojstva. Prilikom oštećenja endotela krvne žile, što se događa u početnom stadiju ateroskleroze, smanjuje se sinteza prostaciklina (PGI2) koji posjeduje antiagregacijska svojstva. Veće oštećenje endotela dovodi do otkrivanja kolagena iz subendotela te do njegovog kontakta s trombocitima. Trombociti i subendotel su u fiziološkim uvjetima odvojeni, ali kad dođu u dodir jedan s drugim, pokazuju jak međusobni afinitet. vWf posreduje u vezanju trombocita na subendotel i veže se na receptore GpIb/IX koji se nalaze na površini trombocita i na kolagenu. Adherirani trombociti se aktiviraju i počinju lučiti čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *Platelet derived growth factor*, PDGF). PDGF stimulira proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije arterije u intimu, gdje se poput makrofaga, mogu transformirati u pjenaste stanice.

Aktivacija adheriranih trombocita dovodi do promjene oblika trombocita iz diskoidnog u oblik bogat pseudopodijima, prelaska negativno nabijenih fosfolipida iz unutrašnje na vanjsku stranu membrane, ekspresije receptora GpIIb/IIIa koji vežu fibrinogen i tako povezuju više trombocita u agregate, te sekrecije trombocitnih granula, koje su bogate agonistima agregacije (adenozin difosfat (ADP), serotonin i tromboksan A2). Agregacija trombocita na mjestu učestalih vaskularnih oštećenja povećava vjerojatnost nastanka mikrotromba.

Mehanizam rupture plaka nije potpuno razjašnjen, ali poznato je da nakupljanje makrofaga i T limfocita ima neospornu ulogu jer makrofagi produciraju MMP koje razgrađuju plak, što može imati za posljedicu njegovu rupturu (66). Lučenje MMP iz makrofaga potiču citokini prisutni u leziji, kao što su TNF-α, IL-1 i čimbenik stimulacije granulocitnih i makrofagnih kolonija (engl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) (67). Ukoliko se radi o površinskoj eroziji, tada dolazi do kontakta trombocita i subendotela, čime se potiče agregacija trombocita na mjestu ozljede. Ako se radi o većoj rupturi fibroznog plaka, lipidi iz središta aterosklerotske lezije bogati tkivnim čimbenikom, aktiviraju vanjski put zgrušavanja djelujući najprije na čimbenik VII (FVII). Aktivirani FVII (FVIIa) u kompleksu s tkivnim čimbenikom aktivira FIX i FX, a aktivirani FX (Xa) zajedno s kofaktorom Va prevodi protrombin (FII) u trombin (FIIa), koji je najjači fiziološki agonist agregacije trombocita. Trombin stvoren na ovaj način nije dovoljan za prevođenje fibrinogena u fibrin, ali je dovoljan za aktivaciju trombocita. Aktivirani trombociti na svoju površinu vežu neke aktivirane čimbenike zgrušavanja (FVa, FVIIIa, FXIa), što je preduvjet za nastanak prokoagulacijskih kompleksa i plazmatsku fazu zgrušavanja, koja će na kraju dovesti do nastanka fibrinskog ugruška, tzv. tromba (68). Tromb može opstruirati krvnu žilu i dovesti do

ishemije tkiva, a ukoliko se odvoji od mjesta na kojem je nastao i krene kroz cirkulaciju, govorimo o embolusu. Embolus najčešće opstruira male krvne žile srca ili mozga dovodeći do infarkta, što može imati smrtni ishod. Iako globalni koagulacijski testovi (protrombinsko vrijeme, PV; aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, APTV; trombinsko vrijeme, TV) mogu ukazati na povećanu hiperkoagulabilnost, oni nisu dovoljno osjetljivi i specifični da bi se mogli upotrijebiti kao biljezi povećane sklonosti prema trombozi. Neki od novijih indikatora hiperkoagulabilnosti su povećane koncentracije homocisteina i fibrinogena, a na smanjenu fibrinolitičku aktivnost ukazuju povećane koncentracije inhibitora aktivatora plazminogena (engl. *Plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1). Povećana koncentracija fibrinogena povećava viskoznost krvi, ali predstavlja i veću količinu supstrata za trombin te tako povećava sklonost prema trombozi. Koncentracija fibrinogena starenjem raste (37).

Fibrinogen (poznat kao čimbenik I, FI) čini oko 2% ukupne količine svih proteina plazme i najzastupljeniji je koagulacijski protein plazme. Fibrinogen je plazmatski glikoprotein velike molarne mase (350 kDa). Sastoji se od tri para različitih polipeptidnih lanaca (Aα2, Bβ2, γ2), koji su kodirani od strane tri različita gena na kromosomu 4. Sinteza se zbiva u jetri iz koje se fibrinogen otpušta u plazmu. Trombociti ga djelomično apsorbiraju iz plazme i pohranjuju u α-granule. Fibrinogen sudjeluje u primarnoj hemostazi tako da međusobno povezuje aktivirane trombocite vežući se za njihove receptore GpIIb/IIIa. U sekundarnoj hemostazi fibrinogen predstavlja zajednički čimbenik zgrušavanja unutarnjeg i vanjskog puta. Djelovanjem trombina, od molekule fibrinogena se odcjepljuju fibrinopeptid A i fibrinopeptid B. Time nastaje fibrin monomer koji se najprije spontano polimerizira u polimere fibrina, a tek pod utjecajem FXIII dolazi do potpune stabilizacije ugruška. Fibrinogen je također i jedan od reaktanata akutne faze, čija je sinteza u tim okolnostima pod utjecajem IL-6 (69).

1.2.5 Metabolički sindrom

Metabolički sindrom je skup metaboličkih poremećaja koji sadrže nekoliko rizičnih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih bolesti.

U definiciji metaboličkog sindroma danas se najčešće koriste sljedeći kriteriji: kriterij Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu - Panel liječenja odraslih III (engl. *National Cholesterol Educational Program - Adult Treatment Panel III*, NCEP ATP III) i program Međunarodne dijabetičke federacije (engl. *International Diabetes Foundation*, IDF).

NCEP ATP III kriterij (70) revidiran je 2005. godine, a njime se definira metabolički sindrom kao prisutnost najmanje tri od sljedećih pet parametara (podaci samo za muškarce):

1. Opseg struka >102 cm
2. Koncentracija triglicerida >1,7 mmol/L
3. Koncentracija HDL kolesterola <1,0 mmol/L
4. Krvni tlak ≥130/ ≥85 mm Hg
5. Koncentracija glukoze ≥5,6 mmol/L

IDF kriterij (71) iz 2005. godine podrazumijeva visceralnu pretilost kao nužan kriterij za postavljanje dijagnoze, i to za muškarce europskog podrijetla ≥94 cm, a uz nju su potrebna još najmanje dva od pet parametara NCEP ATP III kriterija.

Metabolički sindrom sadrži neke kriterije od ranije poznate kao rizični čimbenici za nastanak kardiovaskularnih bolesti, dok su neki od njih tek nedavno prepoznati kao takvi (visceralna pretilost). Velika prospektivna istraživanja, koja su u tijeku, mogla bi odgovoriti na pitanja kolika je klinička značajnost pojedinih kriterija, kao i samog metaboličkog sindroma (72).

1.3 Maslinovo ulje

Maslinovo ulje se dobiva iz ploda masline. Najzastupljenija vrsta masline na Mediteranu je *Olea Europaea* L. = *O. sativa* (Hoffmg. et Lk.) Fiori iz porodice *Oleaceae* (73), koja postoji u više od 700 različitih lokalnih sorti koje nazivamo kultivarima. Masline se uzgajaju na području koje se prostire između 35. i 45. paralele sjeverne zemljopisne širine, čiji klimatski uvjeti odgovaraju njezinim potrebama u smislu minimalne i maksimalne temperature.

Prije početka sazrijevanja, plodovi masline još uvijek ne sadrže ulje, već niz organskih kiselina i šećera. Ulje se počinje stvarati tijekom sazrijevanja ploda, te dostiže najveću količinu u trenutku kada maslina dostigne svoju najintenzivniju boju koja ovisno o sorti masline može biti od svijetlo zelene do tamno ljubičaste. Kad plod masline sazrije, njegov sastav je sljedeći: 50% voda, 20 - 24% ulje, 20% ugljikohidrati, 6% celuloza, 1,5% proteini i 1,5% pepeo.

Kvaliteta maslinovog ulja se procjenjuje kemijsko-fizičkim analizama, koje utvrđuju postotak masne tvari i stupanj kiselosti, te senzorskim analizama koje ocjenjuju vizualna, mirisna i okusna svojstva.

1.3.1 Nazivi i definicije maslinovih ulja prema europskom zakonodavstvu

DJEVIČANSKA MASLINOVA ULJA:

Ulja koja se dobivaju od ploda masline isključivo mehaničkim ili drugim fizičkim postupcima, u uvjetima koji ne uzrokuju neželjene promjene i koja nisu pretrpjela nikakav dodatni tretman osim pranja, dekantiranja, centrifugiranja i filtriranja, a izuzevši ulja dobivena otapalima ili primjenom pomoćnih tvari s kemijskim ili biokemijskim djelovanjem, ili postupcima reesterifikacije, te miješanjem s drugim uljima.

Navedena ulja se klasificiraju i nazivaju na sljedeći način:

DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE EKSTRA:

Djevičansko maslinovo ulje ekstra (engl. *Extra Virgin Olive Oil,* EVOO) ima udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina najviše 0,8 g u 100 g i organoleptičku ocjenu 6,5 ili više.

DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE:

Djevičansko maslinovo ulje ima udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina najviše 2 g u 100 g i organoleptičku ocjenu 5,5 ili više.

DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE LAMPANTE:

Djevičansko maslinovo ulje lampante ima udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina veći od 2 g u 100 g i organoleptičku ocjenu manju od 3,5. Prema hrvatskom zakonodavstvu, ovo maslinovo ulje je neprihvatljivog okusa i mirisa propisanog za djevičanska ulja, a u ovu kategoriju izravno ulazi ako ima više od 3,3 g u 100 g slobodnih masnih kiselina.

RAFINIRANO MASLINOVO ULJE:

Rafinirano maslinovo ulje (engl. *Refined Olive Oil*, ROO) dobiveno je rafiniranjem djevičanskih maslinovih ulja, a udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina iznosi najviše 0,3 g u 100 g.

MASLINOVO ULJE:

Maslinovo ulje u užem smislu dobiveno je miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja različitih od ulja lampante, čiji je udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska najviše 1,0 g u 100 g.

SIROVO ULJE KOMINE MASLINA:

Sirovo ulje komine maslina dobiveno je iz krutog ostatka u proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja nakon obrade otapalom ili fizičkim postupcima, odnosno to je ulje koje odgovara maslinovom ulju lampante osim u određenim karakteristikama, izuzevši ulja dobivena postupcima ponovne esterifikacije ili bilo kakvim miješanjem s drugim uljima.

RAFINIRANO ULJE KOMINE MASLINA:

Rafinirano ulje komine maslina dobiveno je rafiniranjem sirovog ulja komine maslina, čiji je udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina iznosi najviše 0,3 g u 100 g.

ULJE KOMINE MASLINA:

Ulje komine maslina dobiveno je miješanjem rafiniranog ulja komine maslina i maslinovih ulja različitih od ulja lampante, a udio slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina iznosi najviše 1,0 g u 100 g (74).

1.3.2 Djelovanje maslinovog ulja

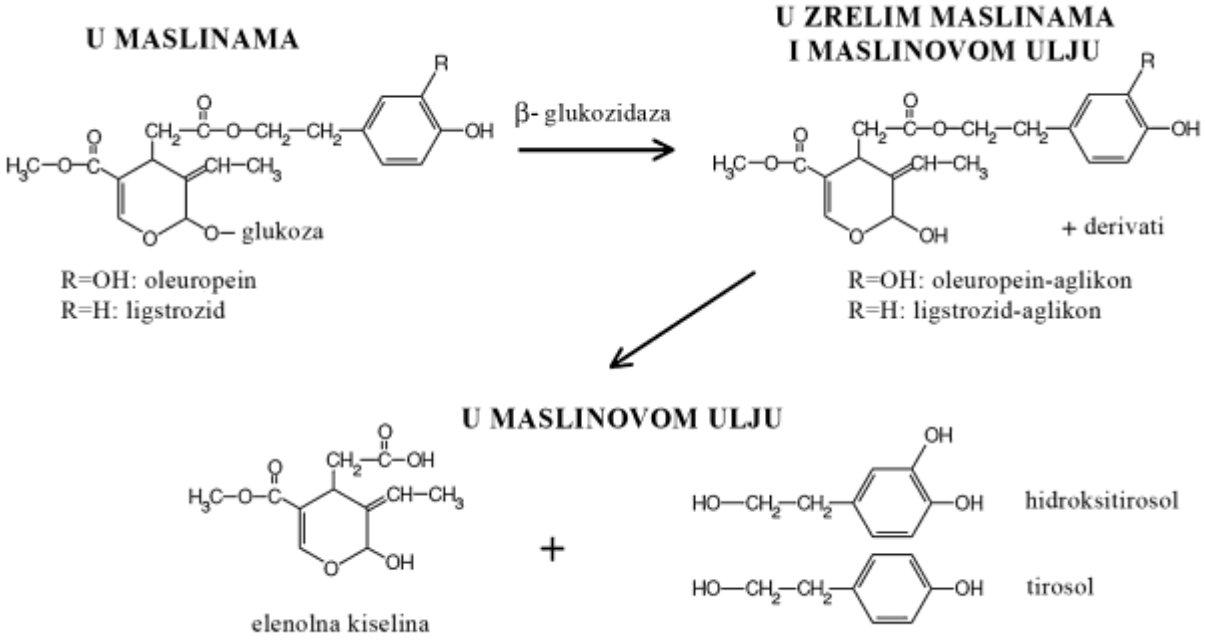
U mediteranskim zemljama masnoće iz maslinovog ulja vrlo često predstavljaju glavni izvor energije (30), a maslinovo ulje je jedan od ključnih sastojaka mediteranske prehrane. Pojam *mediteranska prehrana* prvi je opisao Angel Keys 1960. godine, a temeljio se na njegovim zapažanjima prehrambenih navika u populacijama koje žive u mediteranskim zemljama. Osim maslinovog ulja, ova vrsta prehrane podrazumijeva i unos voća, povrća, orašastih plodova, mahunarki, cjelovitih žitarica, ribe i umjerene količine alkohola. Pokazalo se da osobe na tzv. Mediteranskoj dijeti imaju manji rizik obolijevanja od bolesti krvožilnog sustava, te drugih kroničnih bolesti (šećernu bolest tipa II, metabolički sindrom, debljina) u usporedbi s osobama koje konzumiraju hranu bogatu zasićenim masnim kiselinama (engl. *Saturated fatty acid*, SFA) (75).

Maslinovo ulje ima veliki udio mononezasićenih masnih kiselina (engl. *Monounsaturated fatty acids*, MUFA) i PUFA. Oleinska kiselina najzastupljenija je MUFA u maslinovom ulju. Oleinska kiselina se ugrađuje u LDL-čestice i otpornija je prema oksidaciji u odnosu na PUFA ili SFA. Osim toga, oleinska kiselina utječe na sastav trombocitnih membrana smanjući afinitet trombocita za kolagen endotela, te dokazano smanjuje PAI-1 i FVII (76).

Postotni udio nezasićenih masnih kiselina u maslinovom ulju je sljedeći:

1) mononezasićene masne kiseline 77,0%, od čega oleinska kiselina čini 75,7%
2) polinezasićene masne kiseline 8,7%, od čega linolna kiselina čini 8,1%, a linolenska kiselina 0,6%
3) zasićene masne kiseline 4,3%

Najvažnija odlika ploda masline i EVOO je visok sadržaj fenolnih komponenti koje se razlikuju po sastavu i zastupljenosti. Fenolne komponente u plodovima masline su polarni glikozidi: oleuropein i ligstrozid. Oleuropein je ester elenolne kiseline i hidroksitirosola (HT). Ligstrozid je ester elenolne kiseline i tirosola (T). Zrenjem maslina raste aktivnost β-glukozidaze čijim djelovanjem nastaju nepolarni oleuropein- i ligstrozid- aglikoni, što prikazuje Slika 10. Tirosol, hidroksitirosol i njihovi sekoiridoidni derivati čine oko 90% ukupnih fenola prisutnih u maslinovom ulju (77).



Slika 10. Polifenoli u maslinama i maslinovom ulju. Preuzeto iz (77).

1.3.2.1 Metabolizam maslinovog ulja

Maslinova ulja se razlikuju od ostalih biljnih ulja po većem udjelu oleinske kiseline, a dodatna specifičnost EVOO-a je značajan udio polifenola.

Regulacija staničnih funkcija djelovanjem oleinske kiseline i polifenola može se odvijati na dvije razine: 1) ne-genskim efektom, kod kojeg se modulira sastav masnih kiselina u staničnim membranama i 2) genskim efektom kod kojeg se djeluje na transkripciju određenih gena.

Sastav masnih kiselina u trigliceridima iz hrane odražava se i na sastav triglicerida u hilomikronima. Na veličinu hilomikrona utječe stupanj zasićenosti (78) i konfiguracija dvostrukih veza (79) unutar masnih kiselina koje sačinjavaju trigliceride. Za razliku od drugih biljnih ulja, nakon apsorpcije maslinovog ulja raste broj hilomikrona, što se objašnjava boljom efikasnošću pakiranja lipoproteinskih čestica. Vjerojatno maslinovo ulje djeluje na promjenu aktivnosti ili ekspresije mikrosomske bjelančevine koja je prijenosnik triglicerida (engl. *Microsomal trygliceride transfer protein*, MTP), smještene na enterocitima, koji sudjeluju u sekreciji hilomikrona. Veličina i broj hilomikrona određuju njihovu daljnju sudbinu, pa tako male hilomikrone nastale nakon obroka s maslinovim uljem uglavnom hidrolizira jetrena lipaza (za razliku od većih hilomikrona koji se uglavnom hidroliziraju

pomoću LPL). Nakon hidrolize hilomikrona, njihove ostatne čestice metabolizira jetra, koja ujedno sintetizira čestice bogate endogenim trigliceridima - VLDL. Konzumacija određene vrste masnih kiselina utječe na sastav VLDL-čestica, a posljedično i na sastav kolesterol estera i fosfolipida u LDL-česticama (80).

Kliničke i pretkliničke studije pokazale su da se fenoli maslinovog ulja vrlo dobro apsorbiraju u probavnom traktu proporcionalno dozi, a Visioli je sa suradnicima 2000. godine to potvrdio na dozama polifenola koje su znatno veće od doza prisutnih u maslinovom ulju (487,5-1950 mg/L) (81). Apsorpcija polifenola se najčešće prati određivanjem koncentracije T i HT u 24 h urinu. U urinu se prosječno izluči 20-22% T i 30-60% HT od ukupne količine unesene putem hrane. Ostala količina ovih polifenola se izlučuje putem crijeva, žuči i akumulira u nekim tkivima.

Nakon apsorpcije, polifenoli podliježu biotransformaciji prve i druge faze. Prilikom biotransformacije druge faze uglavnom se stvaraju glukuronidi, a nešto manje sulfati. Ako se polifenoli apsorbiraju u vrlo velikim dozama, tada se puno veće količine izlučuju u obliku glukuronida, a slobodni polifenoli ostaju zastupljeni u manjem postotku.

Kod uzimanja jednokratnih doza maslinovog ulja koncentracije T, HT i 3-O-metil hidroksitirosola (O-MHT) rastu u plazmi i postižu svoj maksimum oko dva sata nakon konzumacije, dok se u urinu maksimum postiže nakon četiri sata. 12 sati nakon konzumacije, koncentracije T, HT i O-MHT u plazmi i urinu ponovno poprimaju bazične koncentracije (82, 83).

Djelovanje maslinovog ulja na zdravlje čovjeka može se objasniti i na staničnoj razini. Razvoj bolesti nastalih zbog utjecaja neadekvatne prehrane uključuje mnoge genske produkte, kao i proteine uključene u sintezu i oksidaciju lipida, termogenezu i staničnu diferencijaciju. Hrana koju jedemo jedan je od najutjecajnijih okolišnih čimbenika koji djeluju kao regulatori genske transkripcije, procesiranja mRNA, degradacije i translacije mRNA, te posttranslacijskih modifikacija pojedinih proteina (84). EVOO sadrži mješavinu polifenola s jednom i s dvjema hidroksilnim skupinama. Polifenoli s dvije ili više hidroksilnih skupina imaju svojstva antioksidansa *in vitro*, dok je kod polifenola s jednom hidroksilnom grupom taj efekt puno slabiji, ili ga nema (85, 86). Nakon unosa i probave maslinovog ulja, polifenoli se u cirkulaciji vežu za LDL-čestice i sprečavaju njihovu oksidaciju (87). Polifenoli također smanjuju agregaciju trombocita, oštećenja DNA (antikancerogeno djelovanje), formiranje lipidnih peroksida, vaskularnu upalu i ekspresiju adhezijskih molekula. Inhibicija agregacije trombocita, izazvana hidroksitirosolom, jednako je učinkovita kao aspirin. Polifenoli iz

EVOO smanjuju krvni tlak pojačavajući ekspresiju eNOS, a NO djeluje kao vazodilatator (75).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Bolesnici zaraženi HIV-om izloženi su većem riziku od kardiovaskularnih bolesti zbog same HIV infekcije, nuspojava HAART-a i neovisnih rizičnih čimbenika za pojavu CVD. Kako broj novooboljelih osoba raste, tako raste i broj onih koji će doživotno uzimati HAART i biti izloženi nuspojavama liječenja.

HIV direktno djeluje na krvne žile izazivajući upalu i metaboličke promjene. Glikoprotein 120 dovodi do ubrzane apoptoze endotelnih stanica te potiče proizvodnju tkivnog čimbenika iz endotelnih stanica. Produkti gena *tat* i *nef* prisutnih u HIV virusu induciraju ekspresiju adhezijskih molekula na endotelu krvnih žila, otpuštaju upalne čimbenike iz makrofaga te olakšavaju migraciju i tkivnu infiltraciju upalnih stanica. Kronična upala kod bolesnika zaraženih HIV-om rezultira stanjem oksidacijskog stresa, zbog nesrazmjerne proizvodnje i inaktivacije slobodnih radikala.

Liječenje HIV infekcije HAART-om promijenilo je prirodni tijek bolesti i značajno pomoglo produženju života bolesnika. Produžen metabolički disbalans, kao posljedica HAART-a, značajno utječe na dugotrajnu prognozu bolesti zbog rastućeg rizika od pojave kardiovaskularnih bolesti. Bolesnici liječeni abakavirom i bolesnici liječeni didanozinom imaju veću učestalost infarkta miokarda u odnosu na bolesnike liječene drugim kombinacijama lijekova. Prestankom korištenja ovih lijekova rizik od infarkta miokarda se smanjuje.

Rizični čimbenici koji u općoj populaciji prethode aterosklerozi i kardiovaskularnim bolestima, ranije se javljaju u bolesnika zaraženih HIV-om.

Primjena klasičnih antilipidnih lijekova u osoba inficiranih HIV-om otežana je interakcijom antilipemika s HAART-om. Međutim, antiaterogeno djelovanje maslinovog ulja moglo bi umanjiti rizik od CVD u osoba inficiranih HIV-om.

Hipoteza istraživanja je da će redovita konzumacija EVOO smanjiti vjerojatnost razvoja CVD u osoba inficiranih HIV-om koji se liječe antiretrovirusnim lijekovima.

Glavni cilj doktorskog rada je ispitati učinak konzumacije EVOO na biljege upale i ateroskleroze u ispitanika zaraženih HIV-om koje se liječe antiretrovirusnim lijekovima.

Specifični ciljevi doktorskog rada su:

1) Odrediti broj leukocita u perifernoj krvi, brzinu sedimentacije eritrocita, koncentraciju CRP-a, IL-6, ukupnog kolesterola, triglicerida, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, broja ox-LDL-čestica u serumu, koncentraciju fibrinogena i aktivnost vWf u citratnoj plazmi te katalitičku koncentraciju GSH-Px i SOD u serumu ispitanika zaraženih HIV-om koji su na određenoj vrsti antiretrovirusnog liječenja prije te nakon konzumacije EVOO. Zasebno će se obraditi ispitanici čije liječenje uključuje abakavir i inhibitore proteaze.

2) Odrediti koji je rizični čimbenik (upala, hiperkoagulabilnost, dislipidemija ili oksidacijski stres) najizraženiji u ispitanika s HIV infekcijom, koji se liječe antiretrovirusnim lijekovima, ali ne konzumiraju maslinovo ulje.

3) Odrediti koji se rizični čimbenik (upala, hiperkoagulabilnost, dislipidemija ili oksidacijski stres) najviše promijenio nakon konzumacije EVOO, odnosno ROO u ispitanika s HIV infekcijom, koji se liječe antiretrovirusnim lijekovima.

4) Odrediti broj ispitanika s metaboličkim sindromom.

5) Procijeniti 10-godišnji rizik od pojave koronarne bolesti srca po Framinghamovoj formuli u svim grupama ispitanika prije te poslije konzumacije EVOO.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U istraživanje je uključeno 39 muških ispitanika zaraženih HIV-om u dobi od 18. do 60. godine života koji se liječe i kontroliraju u Ambulanti za HIV/AIDS u Klinici za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" u Zagrebu. Anamnestički podaci bolesnika pomogli su u odabiru ispitanika za istraživanje.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje: koncentracija glukoze u serumu 4,2-6,0 mmol/L za osobe do 30 godina i 4,4-6,4 mmol/L za osobe starije od 30 godina (88), nedetektabilna količina HIV virusnih čestica u plazmi u trajanju od najmanje 6 mjeseci (određena visoko osjetljivom molekularnom metodom Amplicor HIV-1 Monitor verzija 1.5)

U istraživanje nisu uključene HIV-om zaražene osobe s popratnim akutnim ili težim kroničnim bolestima. Isključeni su bolesnici sa šećernom bolesti tipa I, te hepatitisom tipa B i/ili C.

Ispitanici uključeni u istraživanje su 14 dana prije početka istraživanja te cijelo vrijeme trajanja istraživanja trebali izbjegavati vitaminske i slične pripravke.

Ispitanici su liječeni jednom od tri kombinacije antiretrovirusnih lijekova: 1) NRTI/NtRTI/PI (*N*=10), 2) NRTI/NtRTI/NNRTI (*N*=28), i 3) NNRTI /PI (*N*=1).

Ispitanici su slučajnim odabirom podijeljeni u dvije skupine prema redoslijedu konzumacije pojedine vrste maslinovog ulja.

Ispitanici su potpisali informirani pristanak, anketirani su o dosadašnjim prehrambenim navikama vezanim uz mediteransku prehranu, prisutnosti nuspojava tijekom istraživanja, te o životnim navikama (pušenje) i konzumaciji lijekova (antilipemici, lijekovi za smanjivanje visokog krvnog tlaka). Ispitanicima je izmjeren i opseg struka i bokova, tjelesna težina, krvni tlak, te su uzeti klinički podaci koji bi mogli dati važne informacije o tijeku bolesti, kao što je prisutnost neke oportunističke infekcije. Kliničke podatke uzimali su djelatnici Ambulante za HIV/AIDS: liječnik specijalist infektolog i medicinske sestre.

3.2 Plan istraživanja

Istraživanje je planirano kao randomizirani kontrolirani križni klinički pokus.

Plan tretiranja ispitanika s maslinovim uljem prikazuje Tablica 2. Uzorkovanje krvi provedeno je nultog, 21. i 55. dana. Skupina A je najprije konzumirala EVOO (ulje 1), a zatim ROO (ulje 2), dok je skupina B najprije konzumirala ROO (ulje 2), a zatim EVOO (ulje 1).

Tablica 2: Plan istraživanja

	skupina A	**skupina B**
14 dana prije istraživanja	početak prehrane bez maslina i maslinovog ulja	
prvi dolazak ***(0. dan)***	*PRVO VAĐENJE KRVI*	
20 dana konzumacije maslinovog ulja	50 mL dnevno EVOO (ulje 1)	50 mL dnevno ROO (ulje 2)
drugi dolazak ***(21. dan)***	*DRUGO VAĐENJE KRVI*	
14 dana "wash out"	prehrana bez maslina i maslinovog ulja	prehrana bez maslina i maslinovog ulja
20 dana konzumacije maslinovog ulja	50 mL dnevno ROO (ulje 2)	50 mL dnevno EVOO (ulje 1)
treći dolazak ***(55. dan)***	*TREĆE VAĐENJE KRVI*	

3.3 Materijali i metode

3.3.1 Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u maslinovom ulju

Koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktu maslinovog ulja određena je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteau (89). Polifenoli reduciraju fosfovolframovu i fosfomolibdensku kiselinu u plavo obojene spojeve. Intenzitet obojenja je proporcionalan količini polifenola u uzorku. Rezultati su izraženi u miligramima polifenola po kilogramu ulja.

3.3.1.1 Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja

REAGENCIJE:

n-Heksan

98 % Metanol

Redestilirana voda

POSTUPAK:

10 mg maslinovog ulja pomiješa se s 5 mL heksana. Smjesa se prenese u lijevak za odjeljivanje i doda 10 mL mješavine metanola i redestilirane vode (volumni odnos 6:4) te lagano promućka. Nakon nekoliko minuta stajanja odijeli se hidrofilni sloj (donji sloj u kojem su polifenoli) od hidrofobnog sloja. Hidrofilni sloj se odijeli u čistu posudu. Postupak ekstrakcije s mješavinom metanola i vode ponovi se još dva puta s hidrofobnim ostatkom u lijevku. Dobiveni ekstrakti se spoje u odmjernoj tikvici i nadopune redestiliranom vodom do 50 mL. 1 mL razrijeđenog ekstrakta pipetira se u odmjerne tikvice od 10 mL.

3.3.1.2 Priprema standarda galne kiseline

REAGENCIJE:

Primarni standard galne kiseline (40 mg/L):

Galna kiselina	40 mg
98 % Metanol	100 mL
Redestilirana voda	do 1000 mL

Sekundarni standardi galne kiseline:

Sekundarni standardi galne kiseline pripremaju se razrjeđenjem primarnog standarda galne kiseline s redestiliranom vodom prema protokolu koji prikazuje Tablica 3.

Tablica 3. Koncentracije sekundarnih standarda galne kiseline i volumeni primarnog standarda i redestilirane vode potrebni za njihovu pripremu

Broj sekundarnog standarda	Sekundarni standardi galne kiseline (mg/L)	Primarni standard (μL)	Redestilirana voda (μL)
1	0,2	50	9950
2	0,4	100	9900
3	0,8	200	9800
4	1,6	400	9600
5	2,4	600	9400
6	3,2	800	9200
7	4,0	1000	9000
8	6,0	1500	8500
9	8,0	2000	8000

3.3.1.3 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih polifenola

REAGENCIJE:

Folin-Ciocalteau reagens

7,5% otopina Na_2CO_3

POSTUPAK:

Radna otopina Folin-Ciocalteau reagensa priprema se neposredno prije uporabe razrjeđivanjem s redestiliranom vodom u omjeru 1:3. U odmjerne tikvice volumena 10 mL pipetira se po 1 mL određenog sekundarnog standarda galne kiseline (Standard), po 1 mL određenog ekstrakta maslinovog ulja (Proba) te po 1 mL metanola (Slijepa proba) te doda po 1 mL radne otopine Folin-Ciocalteau reagensa. Smjesa se inkubira 5 minuta te doda po 1 mL 7,5% otopine Na_2CO_3, nadopuni tikvice redestiliranom vodom do 10 mL i inkubira u zamračenom prostoru sat vremena. Nakon sat vremena mjere se apsorbancije standarda i proba prema slijepoj probi na valnoj duljini od 760 nm. Koncentracija polifenola u ekstraktima maslinovog ulja odredi se iz baždarnog pravca i preračuna na kilogram maslinovog ulja.

3.3.2 Priprema seruma, plazme i hemolizata eritrocita

Uzorkovanje krvi provedeno je natašte. Serum je dobiven centrifugiranjem krvi bez antikoagulansa na 2530 x g kroz 15 minuta. Koncentracija glukoze, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i CRP-a je određena odmah, a ostatak uzorka je pohranjen na -80°C za sljedeće analize: MDA, IL-6 i ox-LDL. Kompletna krvna slika je napravljena u uzorku krvi s antikoagulansom K_3EDTA. Nakon toga je ostatni uzorak krvi s K_3EDTA centrifugiran na 2350 x g kroz 10 minuta. Plazma je odvojena i pohranjena na -80°C za daljnje analize. Talog eritrocita je dva puta ispran s fiziološkom otopinom (omjer volumena eritrocita i fiziološke otopine = 1:1) i centrifugiran na 2350 x g kroz pet minuta. Hemolizat eritrocita je pohranjen na -80°C za određivanje katalitičke koncentracije SOD-a i GSH-Px-a. Krv uzeta s K-citrat antikoagulansom je centrifugirana na 2000 x g kroz 15 minuta. U citratnoj plazmi je određena koncentracija fibrinogena, a ostatak plazme pohranjen je na -80°C za određivanje aktivnosti vWf.

3.3.3 Određivanje broja HIV-1 čestica u plazmi

Broj virusnih čestica u mililitru plazme određen je pomoću komercijalnog ultraosjetljivog testa COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Testa, v.1.5, (Roche Diagnostics, SAD) na COBAS AmpliPrep instrumentu.

Uzorak se centrifugira na 23600 g kako bi se ukoncentrirale virusne čestice, zatim se prenosi u COBAS AmpliPrep instrument, gdje se na talog dodaje reagens koji razgrađuje ovojnice virusnih čestica. Dodatkom metanola HIV-1 RNA se istaloži. Reagens za izolaciju virusnih

čestica sadrži i HIV-1 kvantitativni standard sastavljen od poznatog broja kopija RNA transkripta koji ima ista vezna mjesta za klice (engl. *Primers*) kao i HIV-1 RNA. Navedeni standard prolazi kroz cijeli proces u istom alikvotu s uzorkom.

Epruvete s izoliranom HIV-1 RNA prenose se u COBAS AMPLICOR analizator gdje se HIV-1 RNA i HIV-1 standard pomoću reverzne transkriptaze prevode u komplementarnu DNA (cDNA). Ovaj test ima klice koje, zajedno s ostalim reagensima za umnožavanje DNA, omogućuju umnožavanje segmenta od 155 pb unutar visoko konzerviranog *gag* gena koji je dio HIV genoma. Tijekom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) dolazi do paralelnog umnožavanja HIV-1 RNA iz uzorka i HIV-1 standarda. PCR se događa u zadanom broju ciklusa, a u svakom ciklusu iz jedne DNA molekule nastanu dvije. Nakon završenog umnožavanja uzorak se denaturira (alkalnim reagensom se dvostruka DNA razdvoji u jednostruke lance) i dijeli u dva alikvota. U jedan alikvot se dodaje komplementarni lanac za DNA uzorka, a u drugom alikvotu se odvija jednak postupak s komplementarnim lancem DNA standarda. Ovi lanci su vezani za magnetske čestice, čime se omogućuje njihova imobilizacija uz stijenke reakcijskih posudica tijekom budućih ispiranja. Komplementarni lanci vežu jednolančanu DNA iz uzoraka i standarda, a na hibridne DNA koje imaju na sebi vezan biotin (klice koje se dodaju u reakcijsku smjesu obilježene su biotinom), vezat će se avidinom obilježena peroksidaza. Nakon ispiranja nevezanih lanaca i suviška peroksidaze, dodaje se supstrat 3,3´,5,5´ tetrametilbenzidin (TMB) koji se u prisutnosti peroksidaze oksidira i formira obojeni kompleks. Intenzitet obojenja na valnoj duljini od 660 nm proporcionalan je broju kopija virusa, a računa se pomoću poznatog broja kopija standarda. COBAS AMPLICOR MONITOR HIV-1 Test ima granicu detekcije od 50 kopija/mL plazme.

3.3.4 Određivanje koncentracije glukoze u serumu

Koncentracija glukoze u serumu je određena IFCC (engl. *International Federation for Clinical Chemistry*) preporučenom metodom gdje se glukoza uz pomoć enzima glukoza oksidaze prevodi u glukonsku kiselinu i H_2O_2. Analiza je izvedena na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 640 s test reagencijama Thermo Fischer Scientific Company, Middletown, SAD.

3.3.5 Određivanje broja CD4+ T-limfocita imunofenotipizacijom u punoj krvi

Apsolutni broj CD4+ T-limfocita u punoj krvi određen je imunofenotipizacijom pomoću fluorescentno obilježenih protutijela (Flow-Count Fluorospheres) na analizatoru Beckman

Coulter Epics XL-MCL, SAD.

3.3.6 Određivanje katalitičke koncentracije superoksid dismutaze u hemolizatu eritrocita

Katalitička koncentracija SOD određena je u lizatu eritrocita spektrofotometrijskom metodom na sljedeći način: ksantin oksidaza (XOD) iz reagensa prevodi ksantin u mokraćnu kiselinu, pri čemu nastaje superoksidni radikal. Superoksidni radikal može biti reduciran pomoću {2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid)} (INT), ali može biti i preveden u H_2O_2 uz pomoć SOD-a. Veća katalitička koncentracija SOD-a smanjuje reakciju superoksidnog radikala i INT-a, a time i intenzitet obojenja koje se mjeri na valnoj duljini od 505 nm. Analiza je izvedena na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 400 uz pomoć reagensa Ransod SD 125 (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Velika Britanija). Katalitička koncentracija SOD-a izražena je na gram hemoglobina.

3.3.7 Određivanje katalitičke koncentracije glutation peroksidaze u hemolizatu eritrocita

Katalitička koncentracija GSH-Px-a određena je u lizatu eritrocita spektrofotometrijskom metodom na sljedeći način: GSH-Px katalizira oksidaciju glutationa (GSH) izopropil-hidroperoksidom, pri čemu nastaje oksidirani oblik glutationa (GSSG). U prisutnosti glutation reduktaze (GR) i koenzima NADPH, GSSG se prevodi u GSH uz istovremenu oksidaciju NADPH u NADP+. Mjeri se pad apsorbancije koji je proporcionalan katalitičkoj koncentraciji GSH-Px-a. Analiza je izvedena na automatskom analizatoru marke Beckman Coulter 400 uz pomoć reagensa Ransel (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Velika Britanija). Katalitička koncentracija GSH-Px-a izražena je na gram hemoglobina.

3.3.8 Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu

Koncentracija MDA u serumu određena je modificiranom metodom po Yagi-u iz 1976. godine (90). MDA stvara kompleks s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA) u kiselom mediju (1% H_3PO_4) uz kuhanje na 90°C kroz 30 min. Apsorbancija kompleksa se mjeri na 532 nm. Ovom metodom određuje se koncentracija ukupnog MDA, jer se kuhanjem u kiselom mediju oslobađa frakcija MDA vezana na proteine.

3.3.9 Određivanje brzine sedimentacije eritrocita

Brzina sedimentacije eritrocita određena je metodom po Westergren-u.

3.3.10 Određivanje broja leukocita u punoj krvi

Broj leukocita u punoj krvi određen je na hematološkom brojaču LH 750 (Beckman Coulter), SAD.

3.3.11 Određivanje koncentracije CRP-a u serumu

Koncentracija CRP-a u serumu određena je imunonefelometrijskom metodom visoke osjetljivosti test reagencijama CardioPhase® hsCRP (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Njemačka, na aparatu BN ProSpec II.

3.3.12 Određivanje koncentracije interleukina-6 u serumu

Koncentracija IL-6 u serumu određena je ELISA imunokemijskom metodom pomoću testa Quantikine (R&D Systems Europe, Abingdon, Velika Britanija). Monoklonska protutijela na antigene determinante IL-6 vezana su na čvrstu fazu (mikrotitarska pločica). Tijekom inkubacije dolazi do vezanja IL-6 iz seruma na imobilizirana protutijela, a nevezani suvišak se ispire. Drugo poliklonsko protutijelo konjugirano s peroksidazom veže se na drugi epitop imobiliziranog IL-6. Nakon inkubacije suvišak konjugiranog nevezanog protutijela se ispire i dodaje se supstrat 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidin (TMB) koji djelovanjem peroksidaze razvija boju, čija je apsorbancija određena spektrofotometrijski na 450 nm.

3.3.13 Određivanje aktivnosti von Willebrand-ovog čimbenika u citratnoj plazmi

Aktivnost vWf u citratnoj plazmi određena je turbidimetrijskom metodom uz kofaktor ristocetin (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Njemačka). Ristocetin posreduje u vezanju vWf na GpIb s površine trombocita. Plazmi ispitanika dodaje se reagens koji sadrži ristocetin i stabilizirane trombocite, a oni zajedno s vWf iz plazme stvaraju aglutinate trombocita. Analizator mjeri promjenu apsorbancije, te na temelju kalibracijske krivulje standardne humane plazme računa aktivnost vWf u uzorku izraženu u postotku.

3.3.14 Određivanje koncentracije ukupnog kolesterola u serumu

Koncentracija ukupnog kolesterola u serumu određena je preporučenom IFCC metodom na automatskom analizatoru Beckman Coulter 400 pomoću test reagencija Thermo (Electron Corporation Inc, Victoria, Australija).

3.3.15 Određivanje koncentracije HDL-kolesterola u serumu

Koncentracija HDL-kolesterola određena je standardnom enzimskom metodom nakon selektivne precipitacije na automatskom analizatoru marke Beckman Coulter AU 400 s test reagencijama Herbos (Herbos Dijagnostika d.o.o, Hrvatska).

3.3.16 Određivanje koncentracije LDL-kolesterola u serumu

Koncentracija LDL-kolesterola u serumu određena je standardnom metodom na automatskom analizatoru marke Beckman Coulter 400 s test reagencijama Herbos (Herbos Dijagnostika d.o.o, Hrvatska).

3.3.17 Određivanje broja oksidiranih LDL-čestica u serumu

Broj oksidiranih LDL-čestica je određen ELISA imunokemijskom metodom (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Njemačka). Monoklonska protutijela na antigene determinante ox-LDL-a vezana su na čvrstu fazu mikrotitarske pločice. Tijekom inkubacije dolazi do vezanja ox-LDL-a iz seruma na imobilizirana protutijela, a nevezani suvišak se ispire. Drugo protutijelo, konjugirano s peroksidazom, veže se na drugi epitop imobiliziranog oksidiranog LDL-kolesterola. Nakon inkubacije, suvišak konjugiranog nevezanog protutijela se ispire i dodaje se supstrat 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidin (TMB), koji djelovanjem peroksidaze razvija boju, čija je apsorbancija određena spektrofotometrijski na 450 nm.

3.3.18 Određivanje koncentracije triglicerida u serumu

Koncentracija triglicerida u serumu je određena standardnom fotometrijskom metodom uz glicerolfosfat-oksidazu na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 400 pomoću reagensa Thermo (Electron Corporation Inc, Victoria, Australija).

3.3.19 Određivanje koncentracije fibrinogena u citratnoj plazmi

Koncentracija fibrinogena u citratnoj plazmi određena je modificiranom metodom po Clauss-u (91) na BCT koagulometru (Siemens Healthcare Diagnostics, Njemačka).

3.3.20 Izračun 10-godišnjeg rizika za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-ovoj formuli

10-godišnji rizik od koronarne srčane bolesti (CHD) izračunat je pomoću Framingham formule dostupne na mrežnoj stranici:

http://hp2010.nhlbihin.net/atpiii/calculator.asp?usertype=prof.

Temeljem podataka o dobi, spolu, koncentraciji ukupnog kolesterola, koncentraciji HDL-kolesterola, krvnom tlaku, pušenju i uzimanju lijekova za sniženje tlaka (92).

3.3.21 Utjecaj konzumacije maslinovih ulja na pojedine rizične čimbenike

Određenim skupom biokemijskih i hematoloških pretraga definirani su rizični čimbenici za nastanak ateroskleroze. Upala je definirana povećanim brojem leukocita u punoj krvi, povećanom brzinom sedimentacije, te povećanim koncentracijama CRP-a i IL-6. Dislipidemija je definirana povećanim koncentracijama ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida, te smanjenim koncentracijama HDL-kolesterola. Oksidacijski stres je definiran povećanim koncentracijama MDA i povećanim brojem ox-LDL-čestica, te smanjenim katalitičkim koncentracijama SOD-a i GSH-Px. Hiperkoagulabilnost je definirana povećanom koncentracijom fibrinogena i povećanom aktivnošću vWf. Ovisno o referentnim intervalima biokemijskih i hematoloških pretraga određen je broj i postotak mjerenja u kojima su postojala odstupanja od referentih intervala prije i nakon konzumacije ulja.

3.3.22 Statističke metode

Broj ispitanika potreban za istraživanje određen je testom analize snage uz zadanu vrijednost α=0,05 i snagu (1-β) >80%.

Statistička obrada rezultata napravljena je MedCalc programu, verzija 12.1.0.0. (MedCalc Software, Belgija) i dijelom u SAS programu, verzija 9.1.3, (SAS Institute Inc, Cary, Sjeverna Karolina).

Brojčani podaci s normalnom raspodjelom opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), dok su podaci, koji nisu slijedili normalnu raspodjelu, opisani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR).

Za usporedbu zavisnih brojčanih podataka iz tri skupine korišten je ANOVA test, i to Repeated Measurements ANOVA za normalnu raspodjelu i Friedman ANOVA za nenormalnu raspodjelu. Usporedba nezavisnih brojčanih podataka iz dviju skupina napravljena je Mann-Whitney testom.

U grupi ispitanika koji su pokazali suradljivost u uzimanju najmanje jednog od ulja, razlike između njihovih vrijednosti napravljene su analizom linearnog miješanog modela (engl. *Linear-Mixed Models*) što se uobičajeno koristi kod križnih kliničkih pokusa kad nedostaju neki podaci. Model definira Sequence (slijed), Period (razdoblje) i Treatment (vrsta pripravka) kao fiksne varijable, dok intra-individualni slijed uzimanja pripravka definira kao

slučajnu varijablu (engl. *Random effect*).

Usporedba zavisnih kategoričkih podataka napravljena je Cochraneovim testom razlike proporcija.

Testovi su se smatrali statistički značajnima ukoliko je vrijednost p iznosila manje od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 Koncentracije polifenola u maslinovim uljima

Koncentracija polifenola određena je u komercijalno dostupnim i domaćim maslinovim uljima. Vrijednosti koncentracija polifenola prikazuje Tablica 4.

Tablica 4. Koncentracije polifenola u pojedinim vrstama maslinovog ulja

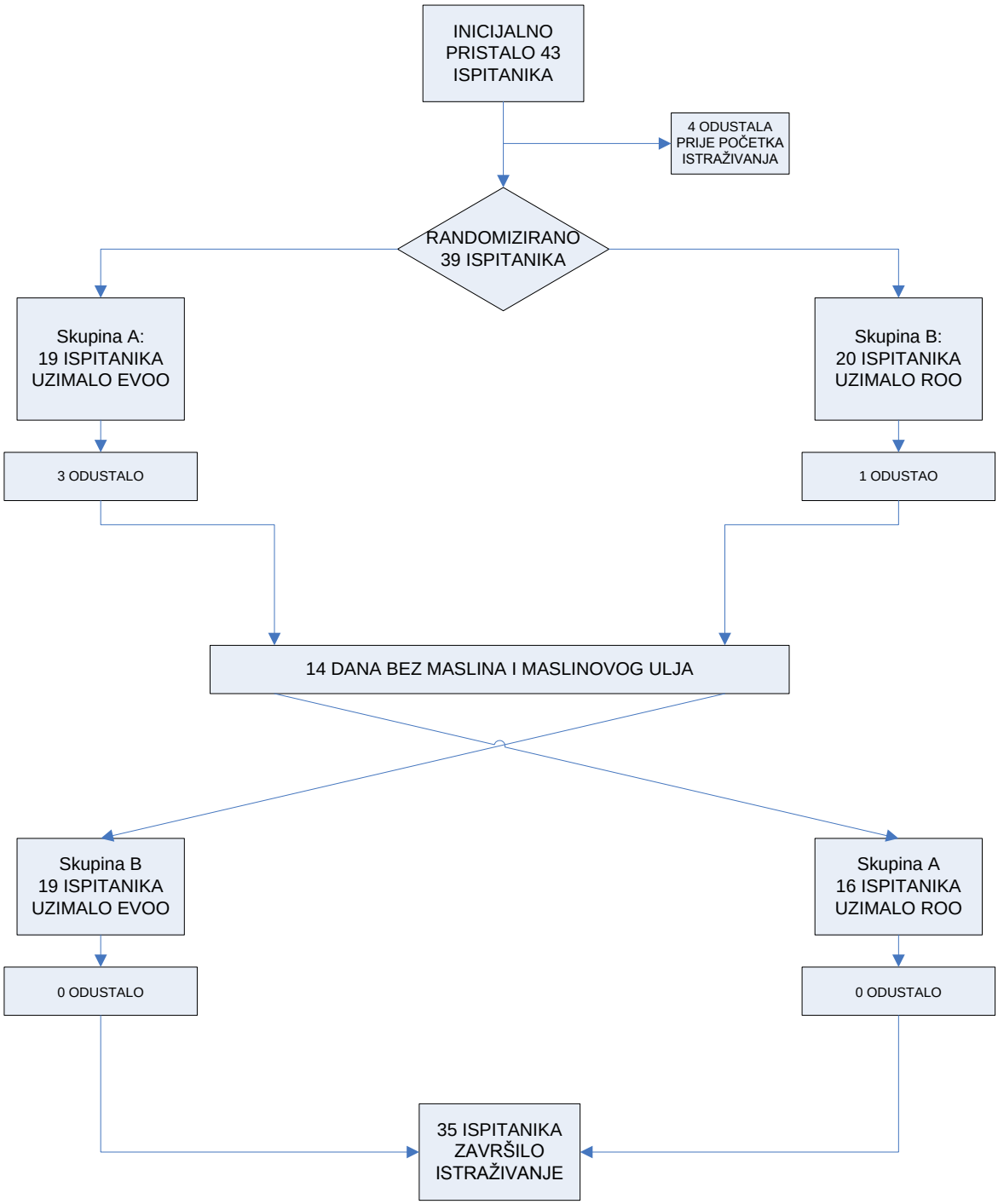
VRSTA MASLINOVOG ULJA	**KONCENTRACIJA POLIFENOLA (mg/kg ulja)**
EVOO (*SMS*)	**226**
EVOO (*ZVIJEZDA d.o.o. Zagreb, ulje iz domaćih maslinika)*	**236**
EVOO (*AGROLAGUNA d.d. Poreč*)	**112**
Domaće ulje 1	**298**
Domaće ulje 2	**162**
Domaće ulje 3	**296**
Mješavina 80% ROO i 20% EVOO (*ZVIJEZDA d.o.o. Zagreb)*	**57**

EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Za istraživanje na ispitanicima izabrano je EVOO *ZVIJEZDA ulje iz domaćih maslinika*, iako su druga domaća ulja imala veće koncentracije polifenola. EVOO *ZVIJEZDA ulje iz domaćih maslinika* je komercijalno dostupno ulje u slobodnoj prodaji koje se moglo nabaviti u većim količinama uz manju vjerojatnost varijacija u koncentracijama polifenola između pojedinačnih pakiranja. Kao placebo izabrano je jedino dostupno ROO na našem tržištu, a to je *ZVIJEZDA* mješavina 80% ROO i 20% EVOO ulja.

4.2 Ispitanici

Testom analize snage utvrđeno je da je za istraživanje dovoljno 30 ispitanika. Izuzetak je određivanje koncentracije CRP-a gdje je utvrđeno da je dovoljno 35 ispitanika. Shemu tijeka istraživanja prikazuje Slika 11.



Slika 11. **Shematski prikaz tijeka istraživanja.**
EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje.

Početno su pristala 43 ispitanika, ali do početka istraživanja četiri ispitanika su odustala, pa je

randomizirano 39 ispitanika (Slika 11). Skupina A, koju je činilo 19 ispitanika, najprije je uzimala ulje 1 - EVOO, a nakon wash-out perioda ulje 2 - ROO. Skupina B koju je činilo 20 ispitanika uzimala je najprije ulje 2 - ROO, a nakon wash-out perioda ulje 1 - EVOO. U prvoj fazi pokusa odustalo je troje ispitanika s iz skupine A i jedan ispitanik iz skupine B. U drugoj fazi pokusa (nakon wash-out perioda) nije odustao niti jedan ispitanik. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja za 39 ispitanika, koji su randomizirani prikazuje Tablica 5. Referentni intervali većine laboratorijskih parametara preporučeni su od strane Hrvatske komore medicinskih biokemičara (88), dok su za IL-6, MDA, GSH-Px, SOD, ox-LDL, broj CD4+ limfocita referentni intervali preuzeti iz pakiranja proizvođača reagensa ili iz literature.

Preporučena vrijednost za koncentraciju CRP u serumu <3 mg/L, povezana je s malim rizikom za razvoj CVD (53). Preporučene vrijednosti sistoličkog tlaka preuzete su od (93), dok su preporučene vrijednosti za puls preuzete od (94).

Tablica 5. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u 39 randomiziranih ispitanika

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOST (*N*=39)	REFERENTNI INTERVALI ILI PREPORUČENE VRIJEDNOSTI	BROJ (%) ISPITANIKA KOJI ODSTUPAJU OD REF. INTERVALA ILI PREPORUČENIH VRIJEDNOSTI
Glukoza (mmol/L)*	5,6 (0,6)	(4,2-6,0[a] ; 4,4-6,4[b])	0 (0)
Broj leukocita (x10^9/L)*	6,0 (1,5)	(3,4-9,7)	0 (0)
Sedimentacija (mm/h)*	13 (11)	(2-13[c]; 2-23[d])	15 (38)
CRP (mg/L)**	1,56 (1,00-2,34)	(<3)	7 (18)
Interleukin-6 (ng/L)*	1,99 (1,33)	(<1)	30 (77)
Fibrinogen (g/L)*	3,3 (0,8)	(1,8-3,5)	11 (28)
Ukupni kolesterol (mmol/L)*	5,8 (1,3)	(<5)	29 (74)
LDL-kolesterol (mmol/L)*	3,3 (1,0)	(<3)	25 (64)
HDL-kolesterol (mmol/L)*	1,2 (0,2)	(>1)	2 (5)
Trigliceridi (mmol/L)**	2,2 (1,5-3,2)	(<1,7)	27 (69)
Malondialdehid (µmol/L)*	5,4 (2,3)	(1,3-3,5)	35 (90)
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)*	85,5 (27,9)	(27,5-73,6)	26 (67)
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)*	1925 (243)	(1102-1601)	37 (95)
Oksidirani LDL (mg/L)**	0,83 (0,51-2,89)	(0,11-0,24)	34 (87)
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)*	151 (65)	(58-172)	12 (31)
Broj CD4+ limfocita (/µL)**	486 (413-602)	(500-1500)	24 (62)
Puls (otkucaji/min)*	82 (10)	(60-100)	2 (5)
Sistolički tlak (mmHg)*	128 (17)	(<139)	14 (36)

* parametri koji slijede normalnu razdiobu prikazani su kao srednja vrijednost (standar devijacija), **parametri koji ne slijede normalnu razdiobu prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon), [a] za dob mlađu od 30 godina, [b] za dob stariju od 30 godina, [c] za dob mlađu od 50 godina, [d] za dob stariju od 50 godina; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Podaci u Tablici 5 pokazuju da za početne vrijednosti u 39 randomiziranih ispitanika nije bilo odstupanja od referentnog intervala u broju leukocita i koncentraciji glukoze.

Manje od 50% randomiziranih ispitanika imalo je ubrzanu sedimentaciju eritrocita, povećanu koncentraciju CRP-a i fibrinogena, povećanu aktivnost vWf, smanjenu koncentraciju HDL-kolesterola te povećane vrijednosti sistoličkog tlaka. Više od 50% randomiziranih ispitanika imalo je povećanu koncentraciju IL-6, ukupnog i LDL-kolesterola, triglicerida, povećan broj ox-LDL čestica, smanjen broj CD4+ T-limfocita te povećanu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a. Povećanu koncentraciju MDA i povećanu katalitičku koncentraciju SOD-a imalo je više od 90% randomiziranih ispitanika.

Podjela ispitanika na skupinu A i skupinu B bila je nasumična. Kako bi ispitali kvalitetu randomizacije napravljena je usporedba početnih vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u obje skupine ispitanika (Tablica 6).

Tablica 6. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u randomiziranim skupinama ispitanika na antiretrovirusnoj terapiji

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	SKUPINA A (*N*=19)	SKUPINA B (*N*=20)	p
Glukoza (mmol/L)	5,3 (5,1-6,0)	5,7 (5,2-6,2)	0,122
Broj leukocita (x10^9/L)	5,4 (4,7-6,5)	5,6 (5,2-6,7)	0,339
Sedimentacija (mm/h)	11 (6-22)	10 (6-16)	0,643
CRP (mg/L)	2,14 (1,06-2,60)	1,56 (0,97-2,18)	0,703
Interleukin-6 (ng/L)	1,83 (1,22-2,17)	1,77 (1,01-2,99)	0,633
Fibrinogen (g/L)	3,3 (2,9-3,5)	3,1 (2,7-3,7)	0,757
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,6 (4,7-6,5)	5,6 (5,0-6,8)	0,747
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,4 (2,5-3,9)	3,1 (2,8-4,0)	0,623
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3 1,1-1,3)	1,2 (1,1-1,4)	0,989
Trigliceridi (mmol/L)	2,3 (1,3-3,3)	2,0 (1,6-3,1)	0,888
Malondialdehid (µmol/L)	4,02 (3,86-5,38)	5,68 (4,11-8,01)	0,068
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	81,6 (58,7-106,0)	82,9 (64,45-97,60)	0,822
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1941 (1812-2073)	1745 (1747-2126)	0,369
Oksidirani LDL (mg/L)	0,82 (0,57-2,89)	0,84 (0,21-3,65)	0,623
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)	125 (83-198)	150 (130-188)	0,518
Broj CD4+ limfocita (/µL)	464 (407-584)	490 (437-692)	0,286
Puls (otkucaji/min)	82 (80-96)	80 (72-86)	0,231
Sistolički tlak (mmHg)	125 (115-140)	125 (113-140)	0,804
Tjelesna masa (kg)	74 (69-84)	77 (73-84)	0,546
Opseg struka (cm)	86 (76-95)	90 (86-94)	0,347

Sve izmjerene vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara ne razlikuju se između ispitanika u skupini A i skupini B..

4.3 Rezultati anketa

Prije početka istraživanja provedena je anketa o dosadašnjim navikama ispitanika prema mediteranskoj prehrani (95) te anketa o nuspojavama. Nakon provedenog istraživanja, ponovno je provedena anketa o nuspojavama, te anketa o suradljivosti prilikom konzumacije maslinovih ulja.

Aritmetička sredina (SD) rezultata suradljivosti randomiziranih ispitanika prema mediteranskoj prehrani prije početka istraživanja iznosila je 6 (2).

Ispitanici u skupini A nisu se razlikovali u suradljivosti prema mediteranskoj prehrani od ispitanika u skupini B (p=0,453).

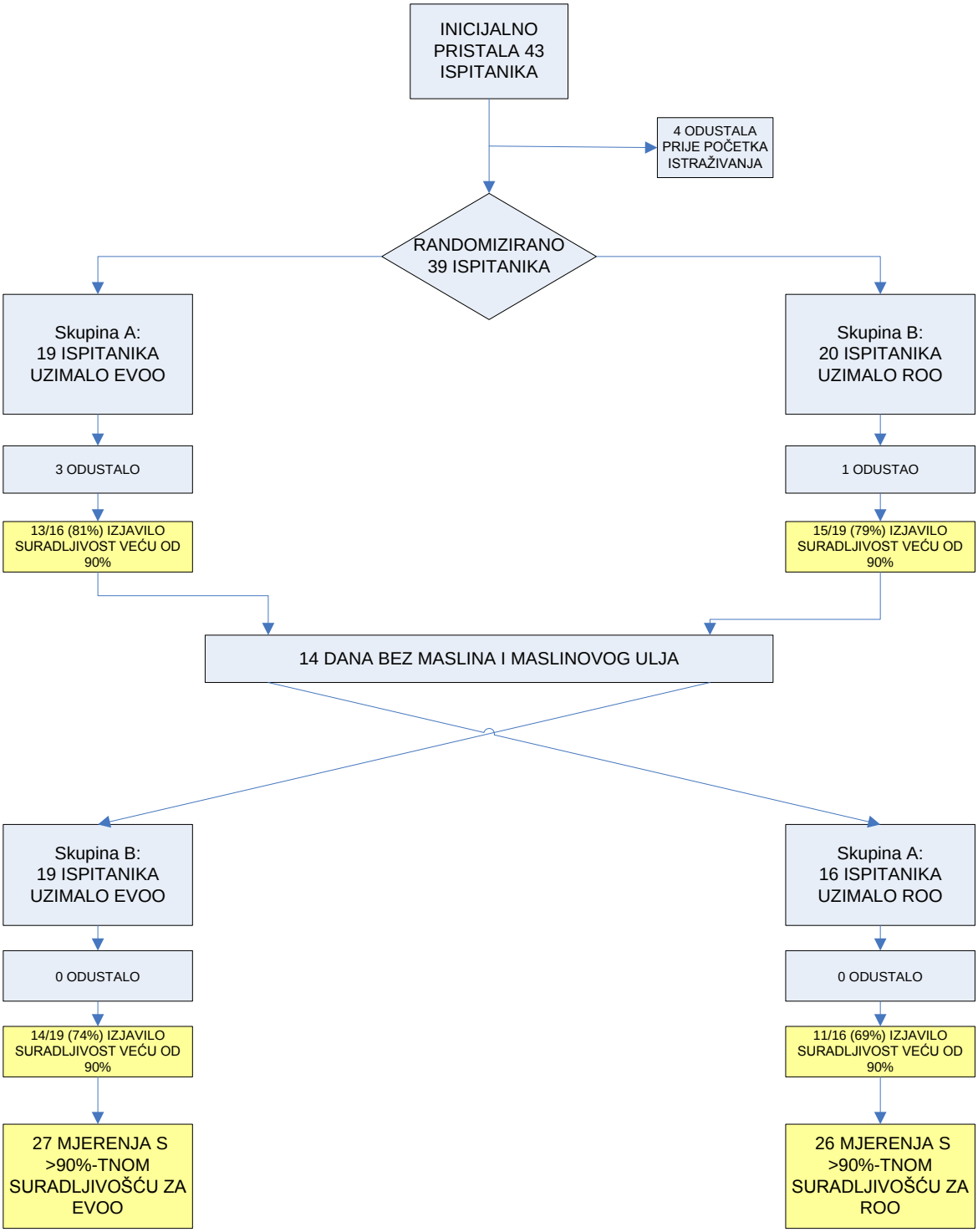
Tablica 7. Rezultati ankete o nuspojavama tijekom konzumiranja maslinovog ulja

NUSPOJAVE		POČETNO	EVOO	ROO
1) Umor ili smanjenje energije?	NE	24	27	26
	DA	11	8	9
2) Vrućica, zimica ili preznojavanje?	NE	34	33	34
	DA	1	2	1
3) Omaglica ili vrtoglavica?	NE	33	34	33
	DA	2	1	2
4) Bol, trnci, obamrlost ili bockanje u rukama ili nogama?	NE	29	29	29
	DA	6	6	6
5) Teškoće prisjećanja?	NE	31	33	32
	DA	4	2	3
6) Mučnina ili povraćanje?	NE	34	33	33
	DA	1	2	2
7) Proljev ili mekana (vodenasta) stolica?	NE	23	29	29
	DA	12	6	6
8) Osjećaj tuge ili depresivnosti?	NE	27	28	27
	DA	8	7	8
9) Nervoza ili anksioznost?	NE	26	26	25
	DA	9	9	10
10) Smetnje spavanja?	NE	30	30	31
	DA	5	5	4
11) Problemi s kožom?	NE	30	31	29
	DA	5	4	6
12) Kašalj ili teškoće „hvatanja“ daha?	NE	31	32	33
	DA	4	3	2
13) Glavobolja?	NE	32	33	33
	DA	3	2	2
14) Smanjenje apetita ili promjena okusa hrane?	NE	34	34	35
	DA	1	1	0
15) Nadutost, bol ili plinovi u trbuhu?	NE	28	28	30
	DA	7	7	5
16) Bol u mišićima ili opća bol?	NE	31	30	30
	DA	4	5	5
17) Problemi kod spolnih odnosa?	NE	28	30	28
	DA	7	5	7
18) Promjene u izgledu tijela, kao što su premještanje masnog tkiva ili dobivanje na težini?	NE	28	30	29
	DA	7	5	6
19) Gubljenje na težini ili propadanje?	NE	34	34	34
	DA	1	1	1
20) Gubitak kose ili promjene izgleda kose?	NE	34	34	34
	DA	1	1	1

EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Rezultati ankete o nuspojavama tijekom konzumacije maslinovih ulja prikazuje Tablica 7. Pojedine nuspojave su različito zastupljene, a najizraženije su umor i proljev. Nuspojave koje su ispitanici imali prije početka istraživanja nisu se znakovito promijenile tijekom trajanja konzumacije EVOO i ROO, osim za nuspojavu proljeva koju je na početku imalo 12 ispitanika (34%) a nakon EVOO šest ispitanika (17%).

Nakon konzumacije EVOO i ROO ispitanici su na skali od 1-100% potvrdili svoju suradljivost prema uzimanju ulja tijekom istraživanja. Slika 12 prikazuje broj suradljivih ispitanika obzirom na tijek pokusa. Suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja pokazalo je 23 ispitanika. 30 ispitanika pokazalo je suradljivost veću od 90% prema najmanje jednom ulju i to tri ispitanika samo prema konzumaciji EVOO, a četvorica samo prema konzumaciji ROO. Ukupno je bilo 53 mjerenja kliničkih i laboratorijskih parametara sa suradljivošću većom od 90%.



Slika 12. **Shematski prikaz suradljivosti ispitanika prema konzumaciji ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja**

4.4 Rizični čimbenici

4.4.1 Pušenje

Prema anamnestičkim podacima 16 od 39 ispitanika (41%) su pušači. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u pušača i nepušača prikazuje Tablica 8.

Tablica 8. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara te statistička značajnost razlike u pušača i nepušača na antiretrovirusnoj terapiji

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	PUŠAČI (*N*=16)	NEPUŠAČI (*N=23)*	p
Glukoza (mmol/L)	5,7 (5,3-6,0)	5,3 (5,1-6,0)	0,539
Broj leukocita ($x10^9$/L)	6,1 (5,5-7,8)	5,3 (4,8-6,1)	**0,037**
Sedimentacija (mm/h)	12 (6-17)	8 (6-15)	0,658
CRP (mg/L)	1,60 (1,00-3,27)	1,56 (1,01-2,34)	0,754
Interleukin-6 (ng/L)	1,89 (1,41-2,13)	1,46 (0,97-2,68)	0,607
Fibrinogen (g/L)	3,4 (2,6-4,0)	3,2 (2,9-3,5)	0,558
Ukupni kolesterol (mmol/L)	6,0 (5,5-7,2)	5,1 (4,7-5,9)	**0,047**
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,4 (2,9-4,2)	3,2 (2,7-3,6)	0,458
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,2 (1,1-1,4)	1,3 (1,1-1,3)	0,875
Trigliceridi (mmol/L)	2,7 (2,0-4,1)	1,9 (1,4-2,9)	0,171
Malondialdehid (μmol/L)	4,25 (3,93-6,51)	4,56 (3,86-7,04)	0,539
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	74,6 (56,20-89,10)	88,5 (72,28-88,88)	0,087
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1877 (1783-2026)	1941 (1779-2143)	0,368
Oksidirani LDL (mg/L)	1,19 (0,52-3,18)	0,82 (0,51-2,29)	0,808
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)	161 (105-231)	145 (118-166)	0,511
Puls (otkucaji/min)	80 (74-88)	80 (76-87)	0,720
Sistolički tlak (mmHg)	130 (120-140)	120 (110-140)	0,387

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Pušači imaju 15% veći medijan za broj leukocita (p=0,037) i 17% veći medijan za koncentraciju ukupnog kolesterola (p=0,047) u odnosu na nepušače. Udio pušača i nepušača bio je jednak u randomiziranim skupinama A i B.

4.4.2 Dob

Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika podijeljenih prema dobi na ispitanike mlađe od 40 godina i ispitanike starije od 40 godina prikazuje Tablica 9.

Tablica 9. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika ovisno o dobi

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	ISPITANICI ≤40 godina (*N=14*)	ISPITANICI >40 godina (*N=25*)	p
Glukoza (mmol/L)	5,3 (5,1-5,7)	5,9 (5,2-6,1)	0,046
Broj leukocita (x10^9/L)	5,5 (4,9-6,9)	5,5 (5,2-6,1)	0,965
Sedimentacija (mm/h)	10 (5-15)	10 (8-18)	0,429
CRP (mg/L)	1,28 (0,83-2,22)	1,82 (1,37-2,44)	0,198
Interleukin-6 (ng/L)	1,59 (0,98-1,95)	1,95 (1,19-2,71)	0,473
Fibrinogen (g/L)	3,0 (2,6-3,6)	3,3 (2,9-3,7)	0,193
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,1 (4,6-6,6)	5,6 (5,1-6,6)	0,327
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,3 (2,3-4,0)	3,3 (2,9-3,9)	0,380
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,2 (1,0-1,3)	1,3 (1,1-1,3)	0,274
Trigliceridi (mmol/L)	1,9 (1,2-3,2)	2,2 (1,8-3,3)	0,356
Malondialdehid (μmol/L)	4,6 (3,9-7,0)	4,3 (3,9-6,9)	0,578
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	80,6 (65,4-106,5)	81,6 (55,6-98,0)	0,539
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1877 (1792-2017)	1931 (1772-2180)	0,548
Oksidirani LDL (mg/L)	1,68 (0,51-3,45)	0,83 (0,50-1,62)	0,501
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)	132 (71-169)	150 (118-204)	0,306
Puls (otkucaji/min)	86 (80-88)	80 (72-84)	0,083
Sistolički tlak (mmHg)	120 (110-130)	130 (120-145)	0,096

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Ispitanici mlađi od 40 godina razlikuju se od ispitanika starijih od 40 godina samo po početnim koncentracijama glukoze. Medijan koncentracije glukoze u mlađih ispitanika je 11% manji (p=0,046) u odnosu na ispitanike starije od 40 godina.

4.4.3 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u

Prema Framingham-u razlikuju se tri razine rizika za pojavu CHD. Rezultati manji od 10% znače mali rizik za pojavu CHD, rezultati između 10% i 20% znače umjereni rizik za pojavu CHD, a rezultati veći od 20% znače visoki rizik za pojavu CHD u sljedećih 10 godina.

Prema podacima na početku istraživanja najveći broj ispitanika, 23/39 (59%) imao je mali rizik; 15/39 (38%) imao je umjereni rizik, dok je samo jedan (3%) ispitanik imao visoki rizik za pojavu CHD u sljedećih 10 godina prema podacima na početku istraživanja.

4.5 Učinak liječenja

4.5.1 Antiretrovirusno liječenje

Prema vrsti antiretrovirusnog liječenja ispitanici su podijeljeni u 3 skupine: 1) ispitanici koji su u svoje liječenje imali uključene PI (*N*=10), 2) ispitanici koji su u svoje liječenje imali uključene NNRTI, a nisu imali uključene PI (*N*=28), te 3) ispitanici koji su u svoje liječenje imali uključene i NNRTI i PI (*N*=1).

Ispitanik koji se liječi kombinacijom NNRTI/PI nije uključen u statističku obradu.

Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika liječenih kombinacijom lijekova, koja je sadržavala PI, i ispitanika liječenih kombinacijom lijekova koja nije sadržavala PI, prikazuje Tablica 10.

Tablica 10. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara ovisno o kombinaciji antiretrovirusnog liječenja

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	PI+ (*N=10)*	PI- (*N=28)*	p
Glukoza (mmol/L)	5,2 (5,0-5,5)	5,7 (5,3-6,1)	**0,040**
Broj leukocita (x10^9/L)	5,5 (5,3-6,8)	5,6 (5,0-6,6)	0,842
Sedimentacija (mm/h)	21 (10-36)	8 (6-14)	**0,008**
CRP (mg/L)	2,21 (1,82-5,47)	1,38 (0,94-2,30)	0,104
Interleukin-6 (ng/L)	2,38 (1,59-3,41)	1,53 (0,86-2,01)	**0,030**
Fibrinogen (g/L)	3,9 (3,3-4,4)	3,0 (2,7-3,4)	**0,004**
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,9 (4,5-5,9)	5,6 (5,1-7,0)	0,136
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,9 (2,4-4,0)	3,4 (2,9-4,0)	0,267
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,1 (1,0-1,2)	1,3 (1,1-1,4)	**0,017**
Trigliceridi (mmol/L)	2,7 (1,9-3,8)	2,2 (1,4-3,1)	0,336
Malondialdehid (µmol/L)	4,56 (4,02-7,84)	4,57 (3,84-6,91)	0,573
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	79,6 (64,0-89,2)	85,1 (60,9-106,1)	0,362
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1868 (1743-2011)	1936 (1798-2134)	0,389
Oksidirani LDL (mg/L)	0,83 (0,47-2,08)	0,79 (0,54-2,81)	0,631
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)	156 (56-220)	142 (115-178)	0,960
Puls (otkucaji/min)	80 (78-88)	82 (76-88)	0,958
Sistolički tlak (mmHg)	120 (110-140)	130 (120-140)	0,322

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); PI, inhibitori proteaze; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Ispitanici liječeni pomoću PI imaju 11% manji medijan koncentracije glukoze (p=0,040) i 27% manji medijan koncentracije HDL-kolesterola (p=0,017) u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni pomoću PI. Medijan brzine sedimentacije eritrocita je 162% (p=0,008) veći, medijan koncentracije IL-6 je 56% (p=0,030) veći, a medijan koncentracije fibrinogena 30% (p=0,004) veći u ispitanika liječenih pomoću PI u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni pomoću PI.

Prema vrsti antiretrovirusnog liječenja, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine ovisno o tome jesu li liječeni abakavirom ili nisu. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika liječenih abakavirom i ispitanika koji nisu liječeni abakavirom prikazuje Tablica 11.

Tablica 11. Početne vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika liječenih abakavirom i ispitanika koji nisu liječeni abakavirom

KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI	Abakavir + (*N*=11)	Abakavir - (*N*=28)	p
Glukoza (mmol/L)	5,3 (5,1-5,9)	5,7 (5,2-6,0)	0,454
Broj leukocita (x10^9/L)	5,5 (4,9-7,9)	5,6 (5,0-6,5)	0,864
Sedimentacija (mm/h)	16 (8-32)	9 (6-14)	0,122
CRP (mg/L)	2,20 (0,86-5,54)	1,40 (1,00-2,23)	0,454
Interleukin-6 (ng/L)	2,07 (1,43-3,44)	1,65 (0,95-2,13)	0,142
Fibrinogen (g/L)	3,5 (2,9-4,4)	3,2 (2,8-3,5)	0,195
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,9 (5,0-6,8)	5,6 (4,8-6,2)	0,502
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,4 (2,8-4,2)	3,2 (2,8-3,7)	0,553
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,2 (1,1-1,3)	1,3 (1,1-1,4)	0,522
Trigliceridi (mmol/L)	2,3 (1,7-3,7)	2,2 (1,4-3,1)	0,483
Malondialdehid (µmol/L)	4,55 (4,00-5,13)	4,56 (3,84-7,38)	0,767
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	56,9 (54,9-74,6)	89,4 (75,9-109,0)	**0,002**
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1843 (1751-1910)	1951 (1795-2187)	0,095
Oksidirani LDL (mg/L)	1,32 (0,71-3,06)	0,73 (0,43-2,81)	0,175
vonWillebrandov čimbenik (% akt.)	125 (102-193)	148 (116-194)	0,502
Puls (otkucaji/min)	82 (80-88)	80 (74-88)	0,908
Sistolički tlak (mmHg)	118 (110-140)	130 (120-140)	0,320

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Ispitanici koji su liječeni abakavirom imaju 57% manji medijan katalitičke koncentracije GSH-Px u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni abakavirom (p=0,002).

4.5.2 Antilipemici

Kako je samo dva od 39 randomiziranih ispitanika koristilo lijekove za regulaciju koncentracije lipoproteina u krvi, utjecaj antilipemika na kliničke i laboratorijske parametre nije statistički obrađivan.

4.6 Učinak maslinovog ulja

4.6.1 Svi ispitanici koji su završili istraživanje

Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre analiziran je za ispitanike (N=35) koji su prošli cijeli protokol istraživanja. Početne vrijednosti, te vrijednosti nakon konzumacije ROO, odnosno EVOO za kliničke i laboratorijske parametre prikazuje Tablica 12.

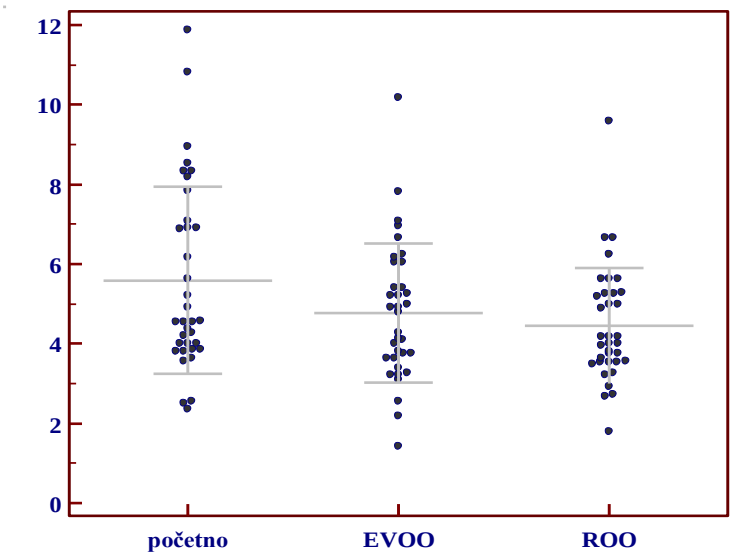
Tablica 12. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u svih ispitanika koji su završili istraživanje

MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=35)		EVOO (*N*=35)		ROO (*N*=35)		p (trend)	p[a] (početno/ EVOO)	p[a] (početno/ ROO)	p[a] (EVOO/ ROO)
Glukoza (mmol/L)*	5,6	(0,6)	5,5	(0,6)	5,5	(0,6)	0,494	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)*	6,0	(1,5)	6,2	(1,8)	6,1	(1,6)	0,565	0,653	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)*	14	(11)	13	(11)	13	(12)	0,505	1,000	1,000	1,000
CRP (mg/L)**	1,56	(1,00-2,26)	1,32	(0,73-2,89)	1,78	(1,00-4,32)	0,805	1,000	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)**	1,83	(1,22-2,50)	1,95	(1,13-2,90)	1,71	(0,98-2,74)	0,692	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)*	3,3	(0,7)	3,3	(0,8)	3,4	(0,9)	0,379	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)*	5,8	(1,3)	5,9	(1,2)	5,8	(1,3)	0,704	0,880	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)*	3,3	(1,0)	3,3	(0,9)	3,2	(0,8)	0,740	1,000	0,166	0,123
HDL-kolesterol (mmol/L)*	1,3	(0,2)	1,3	(0,2)	1,3	(0,2)	0,622	1,000	1,000	1,000
Triglyceridi (mmol/L)**	2,2	(1,6-3,3)	2,4	(1,6-3,4)	2,4	(1,3-3,3)	0,352	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (µmol/L)*	5,59	(2,35)	4,77	(1,74)	4,45	(1,46)	**0,001**	0,121	**0,003**	0,620
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)*	86,2	(28,6)	82,7	(25,6)	84,1	(25,0)	0,431	0,326	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)*	1920	(251)	1919	(235)	1967	(196)	0,246	1,000	0,739	0,351
Oksidirani LDL (mg/L)**	0,84	(0,51-3,18)	0,99	(0,51-3,09)	0,81	(0,50-2,85)	0,413	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)*	149	(66)	154	(76)	150	(67)	0,818	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)*	81	(10)	81	(10)	80	(9)	0,555	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)*	129	(17)	127	(17)	130	(19)	0,957	1,000	1,000	0,875

*aritmetička sredina (standar devijacija), ** medijan (interkvartilni raspon), [a] p vrijednosti su korigirane prema Bonferroni-u; EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Koncentracija MDA je jedini laboratorijski parametar koji se promijenio tijekom konzumacije maslinovog ulja (p=0,001). Vrijednosti aritmetičke sredine koncentracije MDA smanjile su se za 18% (p=0,003) nakon ROO u odnosu na početne vrijednosti koncentracije MDA (Slika 13). Konzumacija EVOO nije imala za posljedicu značajnu promjenu koncentracije MDA. Vrijednosti ostalih kliničkih i laboratorijskih parametara nisu se značajno razlikovale nakon

konzumacije ulja u odnosu na početne vrijednosti, niti su se razlikovale obzirom na vrstu konzumiranog ulja.



Slika 13. **Promjene koncentracija malondialdehida (MDA) u ispitanika liječenih antiretrovirusnim lijekovima nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte pokazuju vrijednosti aritmetičke sredine i standardne devijacije.**

Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre analiziran je i metodom linearnog miješanog modela (Tablica 13).

Tablica 13. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara nakon konzumacije maslinovog ulja u svih ispitanika koji su završili istraživanje prema metodi linearnog miješanog modela

MJERENI PARAMETRI	EVOO (*N*=35)		ROO (*N*=35)		Razlika aritmetičkih sredina najmanjih kvadrata	p (za vrstu ulja)	p (za razdoblje)	p (za slijed)
Glukoza (mmol/L)	5,5	(0,1)	5,5	(0,1)	-0,014	0,894	0,894	0,536
Broj leukocita ($x10^9$/L)	6,2	(0,3)	6,1	(0,3)	0,130	0,578	0,281	0,766
Sedimentacija (mm/h)	13	(2)	13	(2)	-0,279	0,885	0,359	0,690
log CRP (mg/L)*	0,23	(0,08)	0,33	(0,08)	-0,097	0,298	0,204	0,624
Interleukin-6 (ng/L)	2,93	(0,54)	2,01	(0,54)	0,914	0,231	0,591	0,619
Fibrinogen (g/L)	3,3	(0,1)	3,4	(0,1)	-0,083	0,569	0,868	0,402
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,9	(0,2)	5,8	(0,2)	0,082	0,471	0,566	0,588
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,3	(0,1)	3,2	(0,1)	0,133	**0,020**	0,006	0,660
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3	(0,0)	1,3	(0,0)	0,026	0,884	0,226	0,397
Trigliceridi (mmol/L)	2,8	(0,5)	3,0	(0,5)	-0,217	0,582	0,976	0,259
Malondialdehid (µmol/L)	4,73	(0,26)	4,40	(0,26)	0,328	0,185	0,138	0,052
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	83,0	(4,3)	84,5	(4,3)	-1,521	0,455	0,043	0,443
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1919	(37)	1965	(37)	-46,941	0,125	0,571	0,717
Oksidirani LDL (mg/L)	1,85	(0,39)	1,82	(0,39)	0,033	0,787	0,024	0,759
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	154	(12)	150	(12)	4,373	0,607	0,903	0,722
Puls (otkucaji/min)	81	(2)	80	(2)	1,393	0,464	0,249	0,945
Sistolički tlak (mmHg)	127	(3)	130	(3)	-2,860	0,208	0,971	0,565

Sve vrijednosti prikazane su kao aritmetička sredina najmanjih kvadrata (standardna pogreška); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Metoda linearnog miješanog modela pokazala je smanjenje koncentracije LDL-kolesterola nakon ROO u odnosu na rezultate nakon EVOO (p=0,020).

Rizične čimbenike za nastanak ateroskleroze dijelimo na upalu, dislipidemiju, oksidacijski stres i hiperkoagulabilnost. Pojedini laboratorijski parametri svrstani su prema vrsti rizičnog čimbenika kojeg opisuju. Broj ispitanika, čije su vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara odstupale od referentnog intervala ili preporučenih vrijednosti nakon konzumacije maslinovog ulja, prikazuje Tablica 14.

Tablica 14. Zastupljenost rizičnih čimbenika za aterosklerozu prije i nakon konzumacije maslinovog ulja

	UPALA				DISLIPIDEMIJA				OKSIDACIJSKI STRES				HIPERKOAGULA-BILNOST	
	Leukociti	**Sedimentacija**	**CRP**	**IL-6**	**Kolesterol**	**Trigliceridi**	**LDL-kolesterol**	**HDL-kolesterol**	**ox-LDL**	**MDA**	**GSH-Px**	**SOD**	**vWf**	**Fibrinogen**
REFERENTNI INTERVALI ILI PREPORUČENE VRIJEDNOSTI	(3,4-9,7x10^9/L)	(2-13[a], 2-23[b] mm/h)	(<3mg/L)	(<1pg/L)	(<5mmol/L)	(<1,7 mmol/L)	(<3 mmol/L)	(>1 mmol/L)	(0,11-0,24 mg/L)	(1,3-3,5µmol/L)	(27,5-73,6 U/gHb)	(1102-1601 U/gHb)	(58-172%)	(1,8-3,5 g/L)
početno*	0 (0)	13 (37)	6 (17)	28 (80)	26 (74)	25 (71)	22 (63)	2 (6)	30 (86)	32 (91)	24 (69)	33 (94)	10 (29)	10 (29)
EVOO*	3 (9)	11 (31)	9 (26)	29 (83)	29 (83)	23 (66)	20 (57)	1 (3)	30 (86)	27 (77)	21 (60)	31 (89)	10 (29)	11 (31)
ROO*	2 (6)	9 (26)	10 (29)	25 (71)	27 (77)	23 (66)	23 (66)	1 (3)	33 (94)	24 (69)	21 (60)	34 (97)	11 (31)	16 (46)
p	0,097	**0,050**	**0,039**	**0,039**	0,223	0,135	0,097	0,368	0,050	**0,002**	0,050	0,097	0,368	**0,022**
početno/EVOO	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
početno/ROO	1,000	**<0,05**	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	**<0,05**
EVOO/ROO	1,000	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

*vrijednosti su prikazane kao broj (%) ispitanika; [a] za dob do 50 godina, [b] za dob stariju od 50 godina; CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin-6; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće; ox-LDL, čestice oksidiranog LDL-kolesterola; MDA, malondialdehid; GSH-Px, glutation peroksidaza; SOD, superoksid dismutaza; vWf, von Willebrand-ov čimbenik; EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Svi ispitanici suradljivi prema konzumaciji oba ulja imali su broj leukocita unutar referentnog raspona. Manje od 50% ispitanika imalo je ubrzanu sedimentaciju eritrocita, povećanu koncentraciju CRP-a i fibrinogena, smanjenu koncentraciju HDL-kolesterola te povećanu aktivnost vWf. Više od 50% ispitanika imalo je povećanu koncentraciju IL-6, triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola, te povećanu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a. Povećanu koncentraciju MDA, povećan broj ox-LDL čestica i povećanu katalitičku koncentraciju SOD-a imalo je više od 90% suradljivih ispitanika.

Konzumacija maslinovog ulja imala je učinka na upalne biljege, oksidacijski stres i hiperkoagulabilnost.

Konzumacija ROO smanjila je broj ispitanika koji imaju povećanu brzinu sedimentacije eritrocita i broj ispitanika s povećanom koncentracijom MDA, te povećala broj ispitanika s povećanom koncentracijom CRP-a i povećanom koncentracijom fibrinogena.

Konzumacija EVOO nije imala učinka na promjenu zastupljenosti rizičnih čimbenika za aterosklerozu.

4.6.1.1 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u

Vrijednosti 10-godišnjeg rizika za CHD po Framingham-u za ispitanike koji su završili istraživanje (N=35) prikazuje Tablica 15.

Tablica 15. Rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u prije i nakon konzumacije ulja (N=35)

STUPANJ RIZIKA PO FRAMINGHAM-u	BROJ (%) ISPITANIKA		
	POČETNO	EVOO	ROO
NISKI RIZIK (<10%)	22 (63)	20 (57)	21 (60)
UMJERENI RIZIK (10-20%)	12 (34)	14 (40)	13 (37)
VISOKI RIZIK (>20%)	1 (3)	1 (3)	1 (3)

EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Konzumacija maslinovog ulja nije značajno promijenila broj ispitanika u pojedinoj kategoriji rizika za pojavu CHD prema Framingham-u.

4.6.2 Ispitanici liječeni inhibitorima proteaze

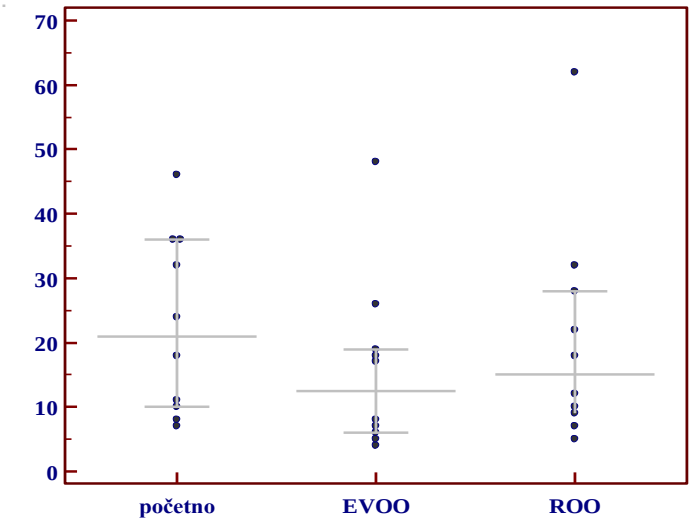
Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre u ispitanika liječenih kombinacijom antiretrovirusnih lijekova, koja je sadržavala inhibitore proteaze, prikazuje Tablica 16.

Tablica 16. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze

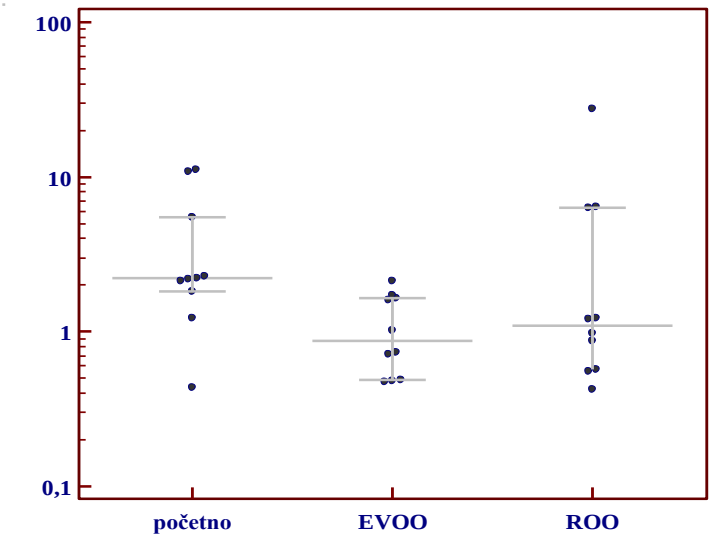
MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=10)		EVOO (*N*=10)		ROO (*N*=10)		p (trend)	p (početno/ EVOO)	p (početno/ ROO)	p (EVOO /ROO)
Glukoza (mmol/L)	5,2	(5,0-5,5)	5,0	(4,8-5,2)	5,2	(4,8-5,3)	0,329	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)	5,5	(5,3-6,8)	5,7	(4,8-6,9)	6,6	(5,6-7,1)	0,810	1,000	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)	21	(10-36)	13	(6-19)	15	(9-28)	**0,040**	**<0,05**	1,000	1,000
CRP (mg/L)	2,21	(1,82-5,47)	0,88	(0,49-1,66)	1,10	(0,57-6,32)	**0,035**	**<0,05**	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)	2,38	(1,59-3,41)	1,71	(1,10-1,95)	2,20	(0,98-3,10)	0,208	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)	3,9	(3,3-4,4)	3,6	(2,7-3,9)	3,9	(2,8-4,5)	0,520	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,9	(4,5-5,9)	5,6	(5,3-6,5)	5,3	(4,9-5,7)	0,408	1,000	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	2,9	(2,4-4,0)	3,3	(2,8-3,7)	3,4	(2,8-3,6)	0,256	1,000	1,000	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,1	(1,0-1,2)	1,3	(1,1-1,3)	1,1	(1,1-1,3)	0,103	1,000	1,000	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	2,7	(1,9-3,8)	2,4	(1,6-3,2)	2,3	(1,1-3,7)	0,286	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (µmol/L)	4,55	(4,02-7,84)	5,11	(3,82-6,18)	4,17	(3,82-5,29)	0,428	1,000	1,000	1,000
Glutation-peroksidaza (U/gHb)	79,6	(64,0-89,2)	73,3	(58,2-88,5)	74,7	(63,3-84,8)	0,150	1,000	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1868	(1704-2167)	1909	(1687-2076)	1939	(1880-2035)	0,520	1,000	1,000	1,000
Oksidirani LDL (mg/L)	0,83	(0,47-2,08)	0,89	(0,49-2,57)	0,63	(0,45-2,65)	0,905	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	156	(56-220)	123	(70-209)	151	(59-170)	0,760	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)	80	(78-88)	72	(72-74)	80	(72-88)	0,177	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)	120	(110-140)	110	(110-120)	115	(110-140)	0,213	1,000	1,000	1,000

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Brzina sedimentacije eritrocita (p=0,040) i koncentracija CRP-a (p=0,035) su jedini laboratorijski parametri, koji su se značajno promijenili tijekom konzumacije maslinovog ulja u ispitanika liječenih pomoću PI. Medijan brzine sedimentacije eritrocita je za 62% manji (p<0,05) (Slika 14), a medijan koncentracije CRP-a za 151% manji (p<0,05) (Slika 15) nakon konzumacije EVOO u odnosu na početne vrijednosti.



Slika 14. **Promjene brzine sedimentacije eritrocita u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte prikazuju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**



Slika 15. **Promjene koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) određenog metodom visoke osjetljivosti (hsCRP) u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte prikazuju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**

4.6.3 Ispitanici koji nisu liječeni inhibitorima proteaze

Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre u ispitanika liječenih kombinacijom antiretrovirusnih lijekova, koja nije sadržavala inhibitore proteaze, prikazuje Tablica 17.

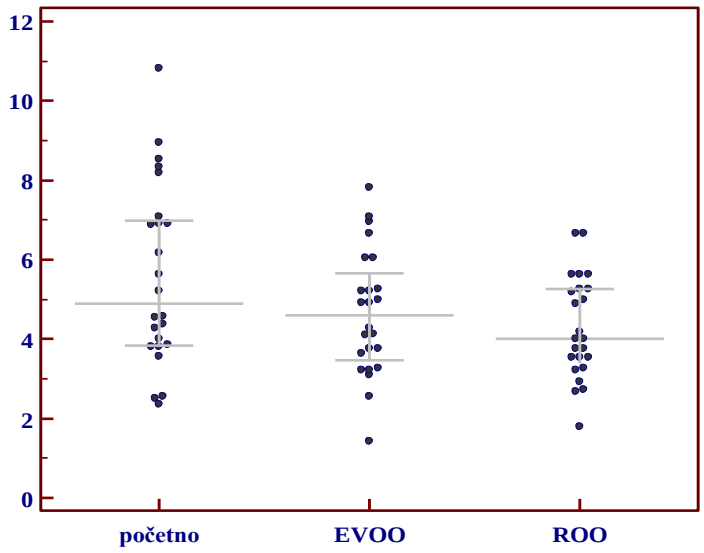
Tablica 17. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u ispitanika koji nisu liječeni inhibitorima proteaze

MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=24)		EVOO (*N*=24)		ROO (*N*=24)		p (trend)	p (početno/ EVOO)	p (početno/ ROO)	p (EVOO /ROO)
Glukoza (mmol/L)	5,9	(5,2-6,1)	5,7	(5,2-6,1)	5,6	(5,3-6,2)	0,670	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)	5,4	(4,9-6,6)	5,9	(5,3-6,9)	5,7	(5,1-6,3)	0,514	1,000	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)	8	(6-14)	9	(5-13)	9	(3-13)	0,616	1,000	1,000	1,000
CRP (mg/L)	1,38	(0,94-2,20)	1,35	(0,95-4,50)	1,91	(1,24-4,21)	0,235	1,000	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)	1,53	(0,86-1,95)	1,95	(1,21-3,22)	1,43	(0,95-2,50)	0,210	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)	3,0	(2,8-3,4)	3,1	(2,7-3,7)	2,9	(2,7-3,7)	0,932	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,6	(5,1-7,1)	6,0	(5,2-6,5)	5,8	(5,1-6,5)	0,931	1,000	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,3	(2,9-4,0)	3,2	(2,8-3,9)	3,1	(2,6-3,9)	0,062	1,000	1,000	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3	(1,1-1,4)	1,3	(1,1-1,4)	1,3	(1,1-1,4)	0,381	1,000	1,000	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	2,2	(1,5-3,2)	2,4	(1,6-3,5)	2,5	(1,3-3,3)	0,696	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (µmol/L)	4,90	(3,84-7,00)	4,60	(3,46-5,66)	4,00	(3,40-5,27)	**0,004**	**<0,05**	**<0,05**	1,000
Glutation-peroksidaza (U/gHb)	85,1	(60,9-113,0)	84,5	(66,0-107,7)	90,4	(60,9-105,2)	0,331	1,000	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/gHb)	1936	(1786-2134)	1934	(1772-2056)	1989	(1878-2103)	0,462	1,000	1,000	1,000
Oksidirani LDL (mg/L)	0,93	(0,54-3,45)	1,01	(0,50-2,90)	0,86	(0,60-2,63)	0,406	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	142	(114-172)	133	(110-169)	144	(109-179)	0,280	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)	80	(74-88)	84	(77-88)	80	(72-88)	0,435	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)	130	(120-140)	130	(120-140)	130	(118-150)	0,365	1,000	1,000	1,000

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Koncentracija MDA je jedini biokemijski parametar, koji se promijenio tijekom konzumacije maslinovog ulja (p=0,004) u ispitanika koji nisu liječeni pomoću PI.

Vrijednosti medijana koncentracije MDA smanjile su se za 23% (p<0,05) nakon konzumacije ROO u odnosu na početne vrijednosti i samo 7% (p<0,05) nakon konzumacije EVOO u odnosu na početne vrijednosti koncentracije MDA (Slika 16).



Slika 16. **Promjene koncentracija malondialdehida (MDA) u ispitanika koji nisu liječeni inhibitorima proteaze nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte pokazuju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**

4.6.4 Ispitanici liječeni abakavirom

Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre u ispitanika liječenih kombinacijom antiretrovirusnih lijekova, koja je sadržavala abakavir, prikazuje Tablica 18.

Tablica 18. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u ispitanika liječenih abakavirom

MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=10)		EVOO (*N*=10)		ROO (*N*=10)		p (trend)	p (početno/ EVOO)	p (početno/ ROO)	p (EVOO /ROO)
Glukoza (mmol/L)	5,4	(5,1-6,0)	5,4	(5,1-6,0)	5,3	(5,1-6,2)	0,904	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)	5,5	(4,7-7,7)	5,9	(4,6-7,0)	5,5	(4,7-7,7)	0,914	1,000	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)	14	(8-32)	8	(5-17)	11	(7-28)	0,114	1,000	1,000	1,000
CRP (mg/L)	2,01	(0,74-5,79)	1,06	(0,67-1,73)	1,58	(0,57-6,44)	0,286	1,000	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)	2,23	(1,38-3,66)	1,55	(0,85-1,95)	2,25	(1,22-3,66)	0,150	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)	3,3	(2,9-4,4)	2,8	(2,7-4,0)	3,6	(2,9-4,4)	0,428	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,8	(5,0-6,6)	6,3	(5,6-6,5)	5,5	(4,9-6,6)	0,520	1,000	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,4	(2,7-4,1)	3,4	(2,8-4,4)	3,1	(2,7-3,6)	0,073	1,000	1,000	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,2	(1,1-1,3)	1,3	(1,2-1,3)	1,2	(1,1-1,3)	0,210	1,000	1,000	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	2,4	(1,6-3,8)	2,2	(1,8-2,7)	2,1	(1,2-3,5)	0,520	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (μmol/L)	4,57	(4,00-5,21)	4,85	(3,82-5,42)	4,17	(3,96-5,18)	0,520	1,000	1,000	1,000
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	60,5	(54,6-75,2)	63,2	(58,0-72,4)	66,2	(59,9-80,5)	0,286	1,000	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1840	(1743-1914)	1775	(1659-1908)	1901	(1735-2009)	0,208	1,000	1,000	1,000
Oksidirani LDL (mg/L)	1,66	(0,84-3,38)	1,55	(0,62-3,30)	1,53	(0,76-2,99)	0,760	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	137	(97-203)	160	(81-223)	134	(73-191)	0,150	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)	80	(78-88)	72	(71-82)	82	(72-88)	0,225	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)	120	(110-140)	115	(110-140)	135	(120-140)	0,308	1,000	1,000	1,000

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

U ispitanika liječenih abakavirom, vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara nisu se značajno razlikovale nakon konzumacije ulja u odnosu na početne vrijednosti, niti su se razlikovale prema vrsti maslinovog ulja.

4.6.5 Ispitanici koji nisu liječeni abakavirom

Učinak konzumacije maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre u ispitanika liječenih kombinacijom antiretrovirusnih lijekova, koja nije sadržavala abakavir, prikazuje Tablica 19.

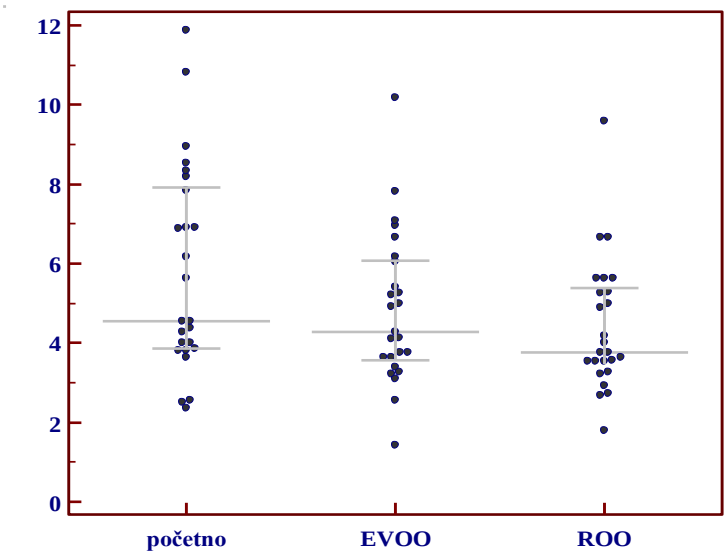
Tablica 19. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u ispitanika koji nisu liječeni abakavirom

MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=25)		EVOO (*N*=25)		ROO (*N*=25)		p (trend)	p (početno/ EVOO)	p (početno/ ROO)	p (EVOO /ROO)
Glukoza (mmol/L)	5,7	(5,1-6,0)	5,4	(5,1-6,0)	5,4	(5,3-5,9)	0,335	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)	5,5	(4,9-6,5)	5,8	(5,2-6,5)	5,7	(5,0-6,5)	0,606	1,000	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)	10	(7-14)	10	(5-18)	10	(4-16)	0,825	1,000	1,000	1,000
CRP (mg/L)	1,40	(1,00-2,23)	1,32	(0,95-4,17)	1,78	(1,06-4,06)	0,487	1,000	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)	1,71	(1,06-2,19)	1,95	(1,43-3,08)	1,59	(0,97-2,45)	0,081	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)	3,2	(2,8-3,5)	3,3	(2,7-3,7)	2,9	(2,7-3,8)	0,934	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,5	(4,9-6,6)	5,4	(5,2-6,4)	5,7	(5,1-6,2)	0,847	1,000	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,1	(2,8-3,6)	3,2	(2,7-3,6)	3,1	(2,6-3,6)	0,375	1,000	1,000	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3	(1,1-1,4)	1,2	(1,1-1,4)	1,3	(1,1-1,4)	0,475	1,000	1,000	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	2,2	(1,6-3,2)	2,6	(1,5-3,4)	2,5	(1,3-3,3)	0,628	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (µmol/L)	4,56	(3,85-7,92)	4,29	(3,58-6,08)	3,75	(3,47-5,38)	**0,003**	**<0,05**	**<0,05**	1,000
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	89,8	(76,1-113,6)	85,8	(71,4-106,8)	91,6	(66,5-107,7)	0,333	1,000	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1941	(1790-2181)	1943	(1831-2051)	2031	(1897-2102)	0,604	1,000	1,000	1,000
Oksidirani LDL (mg/L)	0,74	(0,43-3,05)	0,79	(0,34-2,90)	0,68	(0,40-2,14)	0,386	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	145	(116-177)	132	(104-168)	153	(117-177)	0,147	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)	80	(72-88)	84	(72-88)	80	(72-88)	0,194	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)	130	(119-140)	130	(110-140)	130	(110-140)	0,336	1,000	1,000	1,000

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Koncentracija MDA je jedini biokemijski parametar koji se promijenio tijekom konzumacije maslinovog ulja (p=0,003) u ispitanika koji nisu liječeni abakavirom.

Vrijednosti medijana koncentracije MDA smanjile su se za 22% (p<0,05) nakon konzumacije ROO u odnosu na početne vrijednosti, te samo 6% (p<0,05) nakon konzumacije EVOO u odnosu na početne vrijednosti medijana koncentracije MDA (Slika 17).



Slika 17. **Promjene koncentracija malondialdehida (MDA) u ispitanika koji nisu liječeni abakavirom nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte pokazuju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**

4.7 Suradljivost ispitanika

4.7.1 Ispitanici suradljivi prema konzumaciji oba ulja

Jedina potvrda da su ispitanici konzumirali maslinovo ulje tijekom istraživanja bila je anketa o suradljivosti prema uzimanju maslinovog ulja. Ispitanici koji su izjavili suradljivost veću od 90% (N=23) zasebno su analizirani (Tablica 20).

Tablica 20. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara na početku istraživanja i nakon konzumacije ulja u ispitanika koji su izrazili suradljivost prema konzumaciji oba ulja

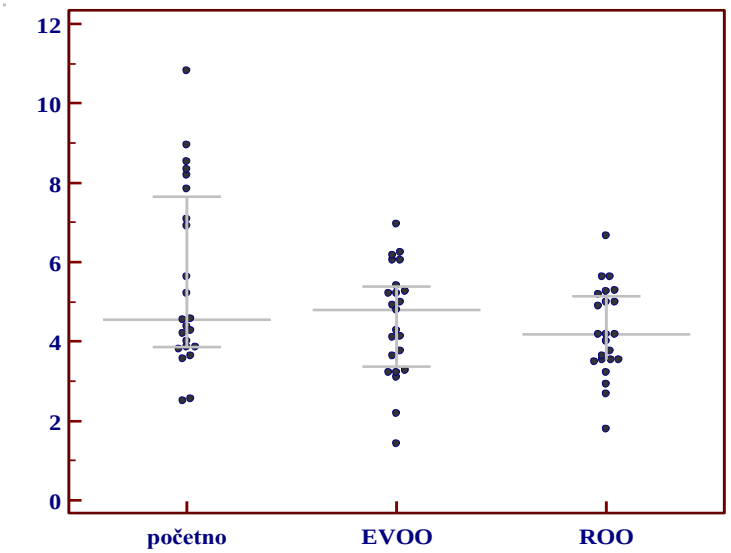
MJERENI PARAMETRI	POČETNE VRIJEDNOSTI (*N*=23)		EVOO (*N*=23)		ROO (*N*=23)		p (trend)	p (početno/ EVOO)	p (početno/ ROO)	p (EVOO /ROO)
Glukoza (mmol/L)	5,7	(5,1-6,1)	5,6	(5,1-6,0)	5,5	(5,2-6,0)	0,736	1,000	1,000	1,000
Broj leukocita ($x10^9$/L)	5,3	(4,7-6,7)	6,4	(4,9-6,9)	5,7	(4,9-6,8)	0,344	1,000	1,000	1,000
Sedimentacija (mm/h)	8	(6-15)	10	(4-17)	10	(4-20)	0,333	1,000	1,000	1,000
CRP (mg/L)	1,39	(0,94-2,24)	1,38	(0,78-2,89)	2,30	(1,44-6,41)	0,063	1,000	1,000	1,000
Interleukin-6 (ng/L)	1,83	(1,13-2,74)	1,95	(1,10-2,93)	2,32	(1,22-3,52)	0,368	1,000	1,000	1,000
Fibrinogen (g/L)	3,3	(2,8-3,8)	3,3	(2,8-3,9)	3,7	(2,9-4,2)	0,302	1,000	1,000	1,000
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,6	(4,9-6,3)	5,8	(5,3-6,5)	5,6	(5,1-6,3)	0,660	1,000	1,000	1,000
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,2	(2,8-4,1)	3,2	(2,8-4,0)	3,1	(2,5-3,6)	**0,048**	1,000	**<0,05**	1,000
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,2	(1,1-1,5)	1,2	(1,1-1,4)	1,3	(1,1-1,4)	0,604	1,000	1,000	1,000
Trigliceridi (mmol/L)	2,1	(1,5-3,7)	2,3	(1,5-3,4)	1,8	(1,2-3,3)	0,059	1,000	1,000	1,000
Malondialdehid (µmol/L)	4,56	(3,86-7,65)	4,79	(3,36-5,38)	4,17	(3,53-5,13)	**0,013**	1,000	**<0,05**	1,000
Glutation-peroksidaza(U/g Hb)	81,6	(56,2-105,4)	76,0	(59,4-101,9)	81,7	(60,0-96,9)	0,265	1,000	1,000	1,000
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1931	(1769-2172)	1913	(1756-2072)	2009	(1839-2099)	0,410	1,000	1,000	1,000
Oksidirani LDL (mg/L)	0,83	(0,53-2,06)	0,89	(0,52-2,41)	0,70	(0,53-1,83)	0,955	1,000	1,000	1,000
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	164	(112-223)	141	(108-226)	168	(114-200)	0,265	1,000	1,000	1,000
Puls (otkucaji/min)	80	(72-88)	84	(72-88)	80	(72-88)	0,424	1,000	1,000	1,000
Sistolički tlak (mmHg)	125	(115-140)	130	(110-140)	130	(111-148)	0,698	1,000	1,000	1,000

Sve vrijednosti prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Koncentracija MDA je jedini biokemijski parametar koji se promijenio tijekom konzumacije maslinovog ulja (p=0,003) u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema oba ulja.

Vrijednosti medijana koncentracije MDA smanjile su se za 9% (p<0,05) nakon konzumacije ROO u odnosu na početne vrijednosti (Slika 18). Konzumacija EVOO nije značajno promijenila koncentracije MDA.

Smanjenje medijana koncentracije LDL-kolesterola nakon konzumacije ROO u odnosu na početne vrijednosti bilo je na granici statističke značajnosti (p=0,048).



Slika 18. **Promjene koncentracije malondialdehida (MDA) u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja, nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive crte pokazuju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**

Ispitanici koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja analizirani su prema pojedinim rizičnim čimbenicima za nastanak ateroskleroze.

Broj ispitanika čije su vrijednosti laboratorijskih parametara odstupale od referentnog intervala ili preporučenih vrijednosti nakon konzumacije maslinovog ulja prikazuje Tablica 21.

Tablica 21. Zastupljenost rizičnih čimbenika za aterosklerozu prije i nakon konzumacije maslinovog ulja u ispitanika suradljivih prema konzumaciji oba ulja

	UPALA				DISLIPIDEMIJA				OKSIDACIJSKI STRES				HIPERKOAGULA-BILNOST	
	Leukociti	**Sedimentacija**	**CRP**	**IL-6**	**Kolesterol**	**Trigliceridi**	**LDL-kolesterol**	**HDL-kolesterol**	**ox-LDL**	**MDA**	**GSH-Px**	**SOD**	**vWf**	**Fibrinogen**
REFERENTNI INTERVALI ILI PREPORUČENE VRIJEDNOSTI	(3,4-9,7x10^9/L)	(2-13[a], 2-23[b] mm/h)	(<3mg/L)	(<1pg/L)	(<5mmol/L)	(<1,7 mmol/L)	(<3 mmol/L)	(>1 mmol/L)	(0,11-0,24 mg/L)	(1,3-3,5µmol/L)	(27,5-73,6 U/gHb)	(1102-1601 U/gHb)	(58-172%)	(1,8-3,5 g/L)
početno*	0 (0)	8 (35)	3 (13)	18 (78)	15 (65)	15 (65)	14 (61)	1 (4)	22 (96)	21 (91)	15 (65)	22 (96)	9 (39)	7 (30)
EVOO*	2 (9)	6 (26)	6 (26)	19 (83)	20 (87)	16 (70)	11 (48)	1 (4)	21 (91)	17 (74)	11 (48)	21 (91)	7 (30)	10 (43)
ROO*	2 (9)	8 (35)	10 (43)	18 (78)	18 (78)	12 (52)	13 (57)	1 (4)	21 (91)	14 (61)	14 (61)	22 (96)	10 (43)	13 (57)
p	0,135	0,135	**0,005**	0,368	**0,022**	**0,039**	0,097	1,000	0,368	**0,005**	**0,039**	0,368	0,097	**0,011**
početno/EVOO	1,000	1,000	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000
početno/ROO	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	**<0,05**
EVOO/ROO	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	**<0,05**	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

*vrijednosti su prikazane kao broj (%) ispitanika; [a] za dob do 50 godina, [b] za dob stariju od 50 godina; CRP, C-reaktivni protein; IL-6, interleukin-6; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće; ox-LDL, čestice oksidiranog LDL-kolesterola; MDA, malondialdehid; GSH-Px, glutation peroksidaza; SOD, superoksid dismutaza; vWf, von Willebrand-ov čimbenik; EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Svi ispitanici suradljivi prema konzumaciji oba ulja imali su broj leukocita unutar referentnog raspona. Manje od 50% ispitanika imalo je ubrzanu sedimentaciju eritrocita, povećanu koncentraciju CRP-a i fibrinogena, smanjenu koncentraciju HDL-kolesterola, te povećanu aktivnost vWf. Više od 50% ispitanika imalo je povećanu koncentraciju IL-6, triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola te povećanu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a. Povećanu koncentraciju MDA, povećan broj ox-LDL čestica i povećanu katalitičku koncentraciju SOD-a imalo je više od 90% suradljivih ispitanika.

Konzumacija maslinovog ulja imala je učinka na sve rizične čimbenike. Konzumacija ROO smanjila je broj ispitanika koji imaju povećanu koncentraciju MDA s 91% na 61% ispitanika, te povećala broj ispitanika s povećanim vrijednostima koncentracije fibrinogena s 30% na 57% ispitanika.

Konzumacija EVOO smanjila je broj ispitanika s povećanom katalitičkom koncentracijom GSH-Px-a sa 65% na 48% suradljivih ispitanika.

4.7.1.1 10-godišnji rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u

Vrijednosti 10-godišnjeg rizika za CHD po Framingham-u u 23 ispitanika koji su izrazili suradljivost prema konzumaciji oba ulja veću od 90% prikazuje Tablica 22.

Tablica 22. Rizik za pojavu koronarne bolesti srca prema Framingham-u prije i nakon konzumacije ulja u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja (N=23)

STUPANJ RIZIKA PO FRAMINGHAM-u	BROJ (%) ISPITANIKA		
	POČETNO	EVOO	ROO
NISKI RIZIK (<10%)	15 (65)	13 (57)	13 (57)
UMJERENI RIZIK (10-20%)	7 (31)	9 (39)	9 (39)
VISOKI RIZIK (>20%)	1 (4)	1 (4)	1 (4)

EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje

Konzumacija maslinovog ulja nije značajno promijenila broj ispitanika u pojedinoj kategoriji rizika za pojavu CHD prema Framingham-u.

4.7.2 Ispitanici suradljivi prema najmanje jednom ulju

Učinak maslinovog ulja na kliničke i laboratorijske parametre, u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema najmanje jednoj vrsti maslinovog ulja, analiziran je metodom linearnog miješanog modela. Rezultate prikazuje Tablica 23.

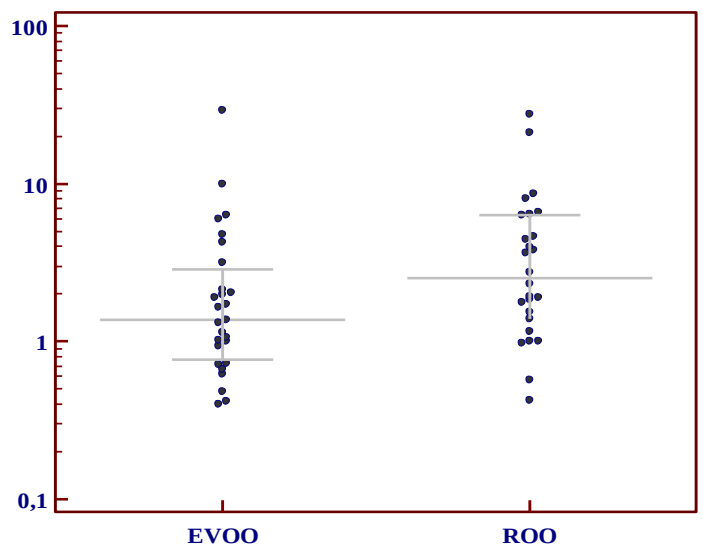
Tablica 23. Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara nakon konzumacije maslinovog ulja u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema najmanje jednoj vrsti ulja.

MJERENI PARAMETRI	EVOO (*N*=27)		ROO (*N*=26)		Razlika aritmetičkih sredina najmanjih kvadrata	p (za vrstu ulja)	p (za razdoblje)	p (za slijed)
Glukoza (mmol/L)	5,6	(0,1)	5,6	(0,1)	0,024	0,847	0,700	0,509
Broj leukocita ($x10^9$/L)	6,2	(0,3)	6,1	(0,3)	0,118	0,674	0,313	0,798
Sedimentacija (mm/h)	12	(2)	14	(2)	-2,163	0,359	0,310	0,679
log CRP (mg/L)*	0,23	(0,09)	0,47	(0,87)	-0,234	**0,035**	0,118	0,306
Interleukin-6 (ng/L)	2,42	(0,32)	2,29	(0,32)	0,135	0,741	0,647	0,293
Fibrinogen (g/L)	3,3	(0,2)	3,6	(0,2)	-0,230	0,190	0,831	0,318
Ukupni kolesterol (mmol/L)	6,0	(0,2)	5,9	(0,2)	0,083	0,606	0,917	0,623
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,4	(0,2)	3,2	(0,2)	0,185	**0,003**	0,041	0,640
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3	(0,0)	1,3	(0,0)	-0,028	0,344	0,315	0,251
Trigliceridi (mmol/L)	2,8	(0,7)	3,0	(0,7)	-0,206	0,720	0,768	0,245
Malondialdehid (µmol/L)	4,69	(0,25)	4,37	(0,25)	0,316	0,248	0,382	0,031
Glutation-peroksidaza (U/g Hb)	81,0	(4,2)	81,9	(4,2)	-0,891	0,715	0,161	0,237
Superoksid-dismutaza (U/g Hb)	1927	(44)	1964	(44)	-37,486	0,343	0,722	0,880
Oksidirani LDL (mg/L)	1,61	(0,37)	1,56	(0,37)	0,054	0,643	0,105	0,855
vonWillebrand-ov čimbenik (% akt.)	151	(14)	156	(14)	-5,801	0,526	0,208	0,887
Puls (otkucaji/min)	82	(2)	80	(2)	1,944	0,419	0,469	0,921
Sistolički tlak (mmHg)	128	(4)	131	(4)	-2,564	0,360	0,743	0,803

Vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara prikazane su kao aritmetička sredina najmanjih kvadrata (standardna pogreška); EVOO, ekstra djevičansko maslinovo ulje; ROO, rafinirano maslinovo ulje; CRP, C-reaktivni protein; LDL, lipoproteini niske gustoće; HDL, lipoproteini visoke gustoće

Tablica 23 prikazuje statistički značajno manje koncentracije log CRP-a nakon EVOO u odnosu na ROO (p=0,035) (Slika 19).

Rezultati linearnog miješanog modela za CRP, izraženi kao geometrijska sredina za ulje 1, iznose: 1,70 mg/L (95% IP: 1,15-2,52), a za ulje 2: 2,92 mg/L (95% IP: 1,95-4,37). Koncentracije LDL-kolesterola statistički su značajno manje nakon ROO u odnosu na koncentracije nakon EVOO (p=0,003).



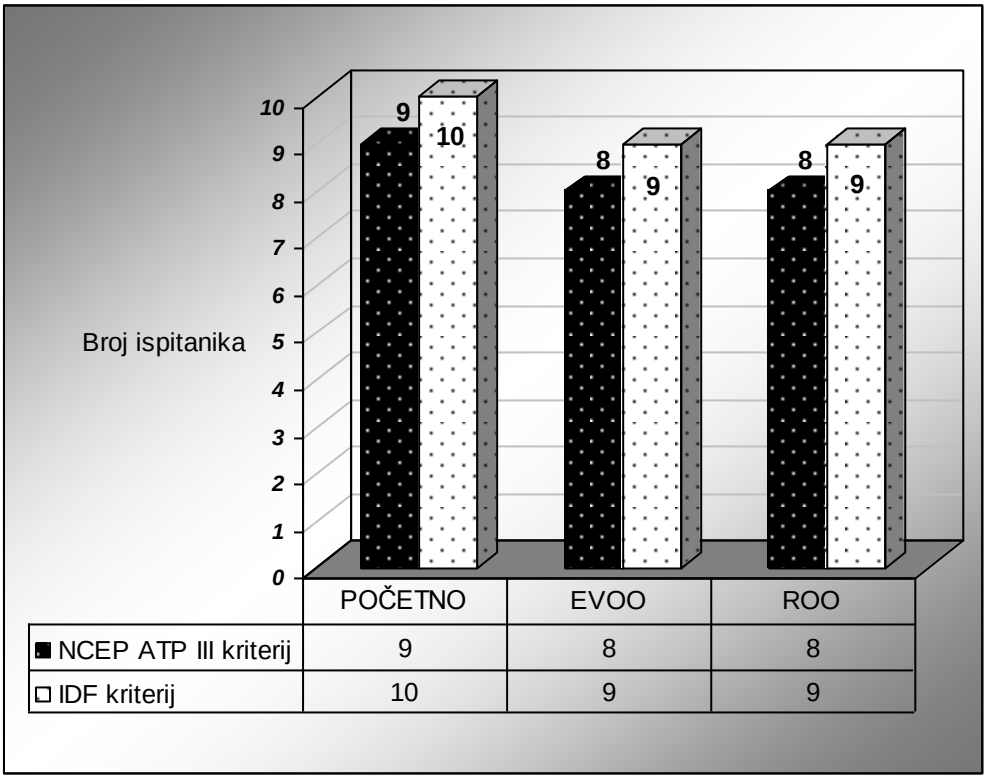
Slika 19. **Razlike u koncentracijama C-reaktivnog proteina (CRP) određenog metodom visoke osjetljivosti (hsCRP) u ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema najmanje jednom ulju, nakon konzumacije ekstra djevičanskog (EVOO) i rafiniranog (ROO) maslinovog ulja. Sive vodoravne crte označavaju vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona.**

4.8 Metabolički sindrom

Prema NCEP ATP III kriteriju metabolički sindrom je utvrđen na početku istraživanja u devet od ukupno 35 (26%) ispitanika, koji su završili istraživanje.

Prema IDF kriteriju, metabolički sindrom je utvrđen u 10 od ukupno 35 (29%) ispitanika, koji su završili istraživanje.

Prisutnost metaboličkog sindroma u svih ispitanika, koji su završili istraživanje prema NCEP ATP III i IDF kriterijima, na početku istraživanja, te nakon konzumacije maslinovog ulja prikazuje Slika 20.

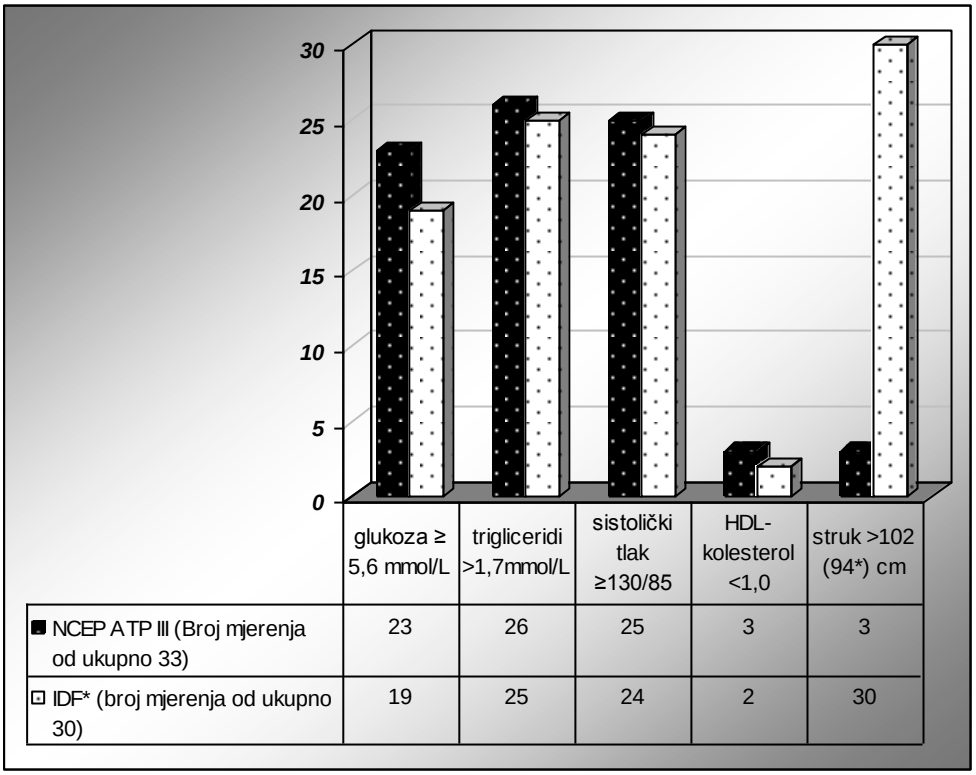


Slika 20. **Broj ispitanika s metaboličkim sindromom prema kriterijima Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu - Panel liječenja odraslih III (NCEP ATP III) i prema kriterijima Međunarodne dijabetičke federacije (IDF)**

NCEP ATP III kriterij i IDF kriterij podjednako dobro otkrivaju osobe s metaboličkim sindromom. Konzumacija maslinovog ulja nije značajno promijenila broj ispitanika koji zadovoljavaju pojedine kriterije za dijagnozu metaboličkog sindroma.

Čimbenike koji najviše pridonose dijagnozi metaboličkog sindroma prikazuje Slika 21.

Dijagnoza metaboličkog sindroma prema NCEP ATP III kriteriju najčešće se temeljila na rezultatima povećane koncentracije triglicerida u serumu te povećanim vrijednostima sistoličkog tlaka. Dijagnoza metaboličkog sindroma prema IDF kriteriju, osim opsega struka većeg od 94 cm, kao obaveznog kriterija, također se najčešće temeljila na povećanim koncentracijama triglicerida i povećanim vrijednostima sistoličkog tlaka.



Slika 21. **Čimbenici koji utječu na dijagnozu metaboličkog sindroma prema kriterijima Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu - Panel liječenja odraslih III (NCEP ATP III) i prema kriterijima Međunarodne dijabetičke federacije (IDF).**

5 RASPRAVA

Obzirom na veću učestalost kardiovaskularnih bolesti u osoba zaraženih HIV-om, kojoj uz upalnu komponentu koju nosi sam virus, pridonosi antiretrovirusna terapija, te neovisni rizični čimbenici, s oprezom se prepisuju lijekovi s već poznatim rizičnim djelovanjem na kardiovaskularni sustav, istražuju se novi lijekovi koji bi predstavljali manji rizik, ali se uz to nastoji i podići svjesnost o zdravoj prehrani, koja je važna za očuvanje funkcije kardiovaskularnog sustava.

Zbog epidemijskih razmjera koje su CVD počele poprimati sredinom prošlog stoljeća u razvijenim zemljama, bilo je potrebno ustanoviti rizične čimbenike i osigurati preventivne mjere kojima bi se smanjila učestalost nepovoljnih kardiovaskularnih događaja. Prva važna studija koja se bavila rizičnim čimbenicima za nastanak CVD je Framingham Heart Study iz 1948 godine (96). Ipak, kad se došlo do zaključka koliko je prehrana važna kao rizični čimbenik za CVD, najutjecajniji je bio rad "Seven Countries Study" Keys-a i suradnika (75), gdje je pokazano da unos zasićenih masnoća povisuje koncentracije kolesterola, koji je jedan od čimbenika zaslužnih za pojavu CVD, a dokazana su i kardioprotektivna svojstva mediteranske prehrane u kojoj je maslinovo ulje glavni izvor masti. Studije koje su uslijedile zadnjih desetak godina, potvrdile su kardioprotektivni učinak maslinovog ulja. Zahvaljujući tim studijama, doznalo se da kardioprotektivni učinak maslinovog ulja nije samo posljedica njegova povoljnog učinka na koncentraciju lipoproteina, već i na niz drugih mehanizama, uključujući osjetljivost na inzulin, krvni tlak, upalne biljege, funkciju arterijskih stijenki itd (30).

Ideja za naše istraživanje temeljila se na rezultatima brojnih i različitih studija. Neke od njih su obrađivale utjecaj EVOO na biljege ateroskleroze, neke su se bavile analizom istih ili sličnih biljega u svrhu ranog otkrivanja povećanog rizika od CVD u osoba zaraženih HIV-om. Naše istraživanje imalo je za cilj povezati dosadašnja saznanja o aterosklerozi u osoba zaraženih HIV-om, utjecaju EVOO na aterosklerozu i mogućnosti "usporavanja" procesa ateroskleroze pomoću EVOO.

Početne vrijednosti za 39 randomiziranih ispitanika pokazuju značajna odstupanja od referentnih intervala ili preporučenih vrijednosti za dio kliničkih i laboratorijskih parametara. Od svih upalnih parametara najveći udio ispitanika (77%) pokazao je odstupanje u

koncentraciji IL-6. Koncentracije svih mjerenih lipoproteina, osim HDL-kolesterola, također pokazuju značajna odstupanja od referentnih intervala. Koncentracija ukupnog kolesterola bila je povećana u 77%, LDL-kolesterola u 64%, a triglicerida u 69% ispitanika. Koncentracija MDA bila je povećana u 90%, ox-LDL-a u 87% ispitanika, katalitička koncentracija GSH-Px-a u 67% ispitanika i SOD-a u 95% ispitanika. Iako su ispitanici odabrani u našem istraživanju, u relativno zadovoljavajućem zdravstvenom stanju obzirom na dijagnozu, navedeni podaci pokazuju da ti bolesnici imaju brojne rizične čimbenike za aterosklerozu.

Ispitanici su prije istraživanja randomizirani s ciljem dobivanja dviju skupina ispitanika od kojih jedna uzima maslinovo ulje redoslijedom 1→2 (skupina A), a druga redoslijedom 2→1 (skupina B). Vrijednosti početnih kliničkih i laboratorijskih parametara u skupini A i skupini B nisu se statistički značajno razlikovale, što znači da su ispitanici dobro randomizirani.

Opći rizični čimbenici vezani uz pojavu CVD analizirani u našem istraživanju su pušenje, dob i 10-godišnji rizik za pojavu CHD prema Framingham-u.

U pušača su dokazane značajno veće vrijednosti broja leukocita (p=0,037) i veće koncentracije ukupnog kolesterola (p=0,047) u odnosu na nepušače. Povećan broj leukocita u pušača već je ranije opisan, pronađen je i povećan broj leukocita u bivših pušača u odnosu na nepušače, te korelacija između broja popušenih cigareta u danu i povećanog broja leukocita u perifernoj krvi (97). Povećane koncentracije ukupnog kolesterola u pušača već su ranije opisane (98 - 100). Blankenberg sa suradnicima dokazao je značajno smanjenu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a u pušača u odnosu na nepušače, kao i smanjenu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a u bivših pušača u odnosu na nepušače, ali posljednja razlika nije bila značajna (35). Navedeni rezultati ukazuju na smanjene "rezerve" zaštitnih antioksidacijskih mehanizama i povećan oksidacijski stres u pušača. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je katalitička koncentracija GSH-Px-a u pušača 18% manja u odnosu na katalitičku koncentraciju GSH-Px-a u nepušača, no razlika nije bila značajna. U istraživanju koje je provela Kotur-Stevuljević sa suradnicima na bolesnicima oboljelim od CVD, pronađena je smanjena katalitička koncentracija SOD-a u pušača u odnosu na nepušače (101). U našem istraživanju nije zamijećena razlika u katalitičkoj koncentraciji SOD-a između pušača i nepušača.

Ispitanici mlađi od 40 godina nisu se značajno razlikovali u početnim vrijednostima kliničkih i laboratorijskih parametara od ispitanika starijih od 40 godina. Taj podatak je značajan

obzirom na relativno velik dobni raspon naših ispitanika (18 do 60 godina), kod kojih bi se mogle očekivati razlike biljega upale i ateroskleroze obzirom na dob.

Prema Framingham-u 59% naših ispitanika imalo je niski rizik, 38% umjereni rizik, a samo jedan ispitanik imao je visoki rizik za razvoj CHD u sljedećih 10 godina. Rezultati istraživača iz Njemačke napravljeni na preko 800 HIV-om zaraženih bolesnika, dijelom su slični našim rezultatima: 60% bolesnika imalo je niski, 22% srednji rizik i 18% visoki rizik (102).

S obzirom da su samo dva naša ispitanika bila liječena antilipemicima, taj podatak nije statistički obrađen.

Suradljivost naših ispitanika prema mediteranskoj prehrani na početku istraživanja iznosila je 6 (2) (vrijednost prikazana kao aritmetička sredina (SD)). Prema PREDIMED istraživanju, iz kojeg smo preuzeli anketu o suradljivosti prema mediteranskoj prehrani, rezultati suradljivosti su podijeljeni u tri kategorije: manji od 7; 7 - 10 i veći od 10. Kad je napravljena analiza upalnih biljega za pojedine kategorije, rezultati su pokazali najveće koncentracije upalnih biljega u najnižoj kategoriji rezultata suradljivosti prema mediteranskoj prehrani i obrnuto, iako ti rezultati nisu bili statistički značajni (103). PREDIMED istraživanje obuhvatilo je stariju populaciju, a u muških ispitanika, bio je podjednak broj ispitanika u sve tri kategorije (104).

Ispitanici su zatim podijeljeni na temelju kombinacije antiretrovirusnih lijekova koja je korištena u njihovom liječenju. Broj ispitanika liječenih pomoću PI bio je samo 10, zbog čega dobivene rezultate treba interpretirati s oprezom. Početna mjerenja u ispitanika, koji su u liječeni pomoću PI, pokazala su statistički značajno manje koncentracije glukoze i HDL-kolesterola, a statistički značajno veće vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita, te koncentracije fibrinogena i IL-6 u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni pomoću PI. Koncentracije CRP-a i triglicerida također su bile veće u ispitanika liječenih pomoću PI u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni pomoću PI, ali te razlike nisu bile statistički značajne. Djelovanje PI na koncentracije lipoproteina već je ranije opisano (105 - 107), a najčešće podrazumijeva povećane koncentracije ukupnog kolesterola, triglicerida i smanjene koncentracije HDL-kolesterola. Takvi nalazi rezultat su produženog djelovanja SREBP proteina i aktivacije protein kinaze C pomoću PI. Aktivirana protein kinaza C pojačava ekspresiju CD36 receptora, koji tako postaju put za unos modificiranih lipoproteina u makrofage, koji formiraju pjenaste stanice. Thomas i Smart opisuju da niske doze PI mogu uzrokovati aterosklerozu, iako dislipidemija ne mora biti prisutna (108). Rezultati istraživanja

D.A.D. grupe iz 2005. godine na 23437 HIV-om zaraženih ispitanika, s ciljem praćenja pojavnosti infarkta miokarda (IM) i njegove povezanosti s uzimanjem PI, pokazali su povećanu pojavnost IM u bolesnika, koji su u liječenje imale uključene PI, u odnosu na bolesnike liječene pomoću NNRTI. Autori u svom članku navode da se ta pojava može samo djelomično objasniti poremećajem na razini lipida, tj. smatraju da PI djeluju na neke još uvijek nepoznate čimbenike, koji također pridonose povećanoj pojavnosti IM (109). Znači da dislipidemija potpuno ne objašnjava povećanu pojavnost IM u bolesnika koji u liječenju koriste PI, ali rijetki su istraživači u ovih bolesnika analizirali i neke druge čimbenike, npr. upalu. Tako je Madden sa suradnicima u ispitanika liječenih pomoću PI određivao koncentraciju fibrinogena i pokazao 11% veće vrijednosti u odnosu na ispitanike koji u svoje liječenje nisu imali uključene PI (110).

Povećane koncentracije fibrinogena i IL-6 te povećane vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita, u naših ispitanika koji su liječeni pomoću PI, u odnosu na one koji su liječeni pomoću NNRTI, mogle bi ukazivati na veći stupanj upale u bolesnika liječenih pomoću PI.

Grupa istraživača iz Kine djelomično je razjasnila povezanost liječenja pomoću PI i upale. Predloženi mehanizmi su: intracelularna akumulacija slobodnog kolesterola, smanjenje koncentracije kalcija u endoplazmatskom retikulumu, povećanje stabilnosti mRNA proupalnih citokina TNF-α i IL-6. U studijama *in vitro* ista grupa analizirala je utjecaj biljaka *berberis aquifolium* i *berberis vulgaris*, koje se koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini kao lijekovi protiv različitih infekcija, na ekspresiju TNF-α i IL-6. Rezultat je bio značajno smanjenje ekspresije mRNA navedenih upalnih proteina, do čega je došlo pod utjecajem PI (111).

U ovom je istraživanju koncentracija glukoze bila značajno manja u ispitanika liječenih pomoću PI. To se ne slaže s rezultatima ostalih istraživača, koji su mjerili koncentraciju glukoze u bolesnika liječenih pomoću PI, jer su isti bolesnici često imali hiperglikemiju, koja je u nekih čak bila znak pojave šećerne bolesti tipa II. Hiperglikemija takvih bolesnika povezana je s inzulinskom rezistencijom i hipertrigliceridemijom, te je vjerojatno uzrokovana inhibicijom GLUT4 prijenosnika za glukozu, do koje dolazi pod utjecajem PI (112). Ipak, u ispitanika ovog istraživanja nije se mogla niti očekivati hiperglikemija, jer je jedan od kriterija uključenja u istraživanje bio da se koncentracija glukoze nalazi unutar granica referentnog intervala.

Medijan koncentracije HDL-kolesterola u ispitanika koji su liječeni pomoću PI, bio je 18%

manji u odnosu na medijan koncentracije HDL-kolesterola u ispitanika liječenih pomoću NNRTI (p=0,017). Koncentracije HDL-kolesterola su često smanjene u osoba zaraženih HIV-om, s tim da se najmanje koncentracije HDL-kolesterola pronalaze u neliječenih bolesnika, nešto su veće koncentracije u bolesnika liječenih pomoću PI, dok su najveće koncentracije HDL-kolesterola pronađene u bolesnika koji nisu liječeni pomoću PI. Mehanizam kojim HIV utječe na smanjenje koncentracije HDL-kolesterola, tumači se prvenstveno utjecajem *tat* virusnog proteina na hepatocite, koji nakon infekcije HIV-om proizvode manje HDL-kolesterola. PI tek dodatno utječu na smanjenje koncentracije HDL-kolesterola (113). Također su opisane veće koncentracije HDL-kolesterola u bolesnika koji imaju uključen nevirapin (NNRTI) u svoje liječenje, u odnosu na vrijednosti HDL-a u osoba, čije liječenje ne uključuje nevirapin. Smatra se da je razlog toj pojavi usporena razgradnja HDL-čestica pod utjecajem nevirapina (114). HDL-čestice mogu utjecati na smanjenje rizika od CVD na više načina. Najznačajniji je reverzni transport kolesterola, ali HDL-čestice sprečavaju i oksidaciju LDL-čestica, smanjuju ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama, stimuliraju NO sintazu, stimuliraju sintezu prostaciklina u endotelnim stanicama, pojačavaju vazodilataciju ovisnu o endotelu, te smanjuju ekspresiju tkivnog čimbenika (115). Kako poremećene koncentracije lipoproteina povećavaju rizik od CVD, smatra se da bi trebalo uvesti individualni pristup prema svakoj osobi zaraženoj HIV-om, te prije uvođenja HAART-a procijeniti kardiovaskularni rizik, što podrazumijeva i određivanje koncentracija lipoproteina, a tri do šest mjeseci nakon početka liječenja napraviti kontrolno određivanje koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida. U osoba s povećanim rizikom od CVD trebalo bi se primijeniti antiretrovirusno liječenje, koje ne uzrokuje značajne poremećaje metabolizma lipoproteina (116). SMART studija je pokazala da privremeno ukidanje antiretrovirusne terapije dovodi do normalizacije koncentracija lipoproteina, ali je istovremeno došlo do povećanja koncentracija upalnih biljega (IL-6, D-dimeri, Amiloid-A), te porasta broja HIV-RNA virusnih čestica u plazmi. Pojačanje upale povećava rizik pojave AIDS-a, ali i drugih kroničnih bolesti kojima su skloni HIV-om zaraženi bolesnici (117).

Novija izvješća D.A.D. grupe posebnu pažnju posvećuju lijeku abakaviru, kao novootkrivenom rizičnom lijeku koji može dovesti do nastanka CVD. Vezu između abakavira i CVD istraživalo je još nekoliko grupa u svojim kohortnim studijama. Četiri od sedam istraživačkih grupa potvrdile su takvu vezu, dok ostale tri nisu. Još uvijek se ne zna koji bi bio

mehanizam abakavira u stvaranju povećanog rizika od CVD. Pretpostavlja se da bi to mogla biti neka od pojava, kao što je sklonost rupturi plaka, aktivacija trombocita ili aktivacija proupalnih citokina, ali dok se rezultati istraživanja konačno ne potvrde, abakavir bi se trebao s oprezom prepisivati osobama zaraženim HIV-om s povećanim rizikom od CVD (118).

U našem istraživanju 11 ispitanika je u svoje liječenje imalo uključen abakavir. Njihove katalitičke koncentracije GSH-Px-a bile su statistički značajno manje u odnosu na katalitičke koncentracije GSH-Px-a u ispitanika koji u svoje liječenje nisu imali uključen abakavir. Abakavir vjerojatno djeluje na neke mehanizme koji pojačavaju oksidacijski stres čime se "troše" antioksidacijski mehanizmi. Iako razlike nisu statistički značajne, početne vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita, koncentracije CRP-a, IL-6, fibrinogena, ukupnog i LDL-kolesterola, te broj ox-LDL čestica veći su u ispitanika, koji su u svoje liječenje imali uključen abakavir, u odnosu na ispitanike koji nisu bili liječeni abakavirom. Navedeni rezultati mogli bi značiti veći stupanj upale i oksidacijskog stresa te dislipidemiju, što povećava vjerojatnost pojave CVD. Hammond sa suradnicima pratila je koncentracije CRP-a i IL-6 u liječenih i neliječenih osoba zaraženih HIV-om, te promjene istih biljega nakon uvođenja abakavira. U neliječenih osoba medijan za IL-6 je bio 1,99 ng/L, u liječenih pomoću kombinacije timidin-NRTI 0,78 ng/L, a u liječenih pomoću timidin-NRTI u kombinaciji s abakavirom 1,80 ng/L. Nakon uvođenja abakavira u neliječenih bolesnika koncentracija IL-6 povećala se za 31%, ali promjena nije bila značajna (119).

U našem istraživanju za konzumaciju ispitanika planirana je jedna vrsta EVOO i jedna vrsta ROO kao placebo, s tim da su se njihove koncentracije polifenola morale značajno razlikovati. Odabrano je nekoliko različitih ulja s ciljem da se izmjeri njihova koncentracija polifenola i nakon toga donese odluka o izboru ulja. U današnje vrijeme za analizu ukupnih polifenola u uljima, vinu, sokovima, voću i sl. mogu se koristiti vrlo sofisticirane metode kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography, HPLC), plinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa (engl. Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), kapilarna elektroforeza i druge, ali ipak se zbog dobre usporedivosti s navedenim metodama još uvijek najviše koristi spektrofotometrijska metoda po Folin-Ciocalteau, jednostavna za izvedbu i jeftina. Koncentracije polifenola u uljima za ovo istraživanje analizirane su navedenom metodom. Domaća ulja su nakon analize pokazala vrlo visoke koncentracije polifenola, ali njih bi bilo teže nabaviti u većoj količini i postojala je mogućnost različitog sastava u pojedinim serijama.

Zbog toga je odlučeno u istraživanju koristiti kontrolirana ulja koja se mogu naći u slobodnoj prodaji i koja se mogu kupiti u većim serijama s manjom vjerojatnošću razlike u sastavu. Čisto rafinirano maslinovo ulje bilo je gotovo nemoguće pronaći na hrvatskom tržištu, pa je kupljena mješavina u kojoj uz glavninu rafiniranog postoji i manji udio djevičanskih maslinovih ulja.

Vrsta istraživanja koje se provodilo je randomizirani kontrolirani križni klinički pokus. Križni klinički pokusi se koriste kada se iz njih mogu dobiti objektivni podaci koje je moguće interpretirati, kada se radi o kroničnoj (relativno stabilnoj) bolesti, kada se koristi lijek (pripravak) s relativno kratkim vremenom poluživota, kada su periodi uzimanja lijeka relativno kratki, te kada postoji dovoljno velik broj ispitanika koji dozvoljava i eventualno isključenje nekog od njih (dropouts). Prednosti križnih kliničkih pokusa su: 1) mogućnost intra-individualne usporedbe dvaju lijekova, jer je svaki ispitanik sam sebi kontrola, 2) manja inter-individualna varijabilnost (prisutna kad je grupa ispitanika koristi lijek A, a druga lijek B), 3) pravilna randomizacija ispitanika za pojedine slijedove lijekova smanjuje pogrešku uzrokovanu razlikama između dva lijeka. Kod križnih kliničkih pokusa važno je definirati duljinu wash-out perioda. Wash-out period se definira kao vrijeme između dvaju intervencijskih perioda koje mora biti dovoljno dugo da lijek iz prvog intervencijskog perioda nema nikakvog utjecaja na lijek iz drugog intervencijskog perioda. Wash-out period ovisi o vrsti lijeka, odnosno pripravka (120).

Duljina wash-out perioda u ovom istraživanju preuzeta je iz literature u kojoj su opisani slični pokusi (121).

U našem istraživanju 35 od 39 randomiziranih ispitanika završilo je istraživanje do kraja. ANOVA analizom napravljena je usporedba kliničkih i laboratorijskih parametara između početnih vrijednosti i vrijednosti nakon konzumacije EVOO i ROO. Jedini statistički značajan rezultat u svih 35 ispitanika, koji su završili istraživanje, je smanjenje koncentracije MDA nakon ROO u odnosu na početne vrijednosti za 18% (p=0,003). Konzumacija EVOO također je smanjila koncentracije MDA, ali promjena nije bila značajna. Kako je stupanj lipidne peroksidacije proporcionalan broju dvostrukih veza, manju vjerojatnost lipidne peroksidacije imaju masne kiseline s jednom dvostrukom vezom, kao što je oleinska kiselina. U našem je istraživanju vjerojatno dva tjedna konzumacije EVOO, odnosno ROO bogatih oleinskom kiselinom bilo dovoljno za smanjenje koncentracije MDA, glavnog produkta lipidne peroksidacije, u odnosu na bazične vrijednosti MDA. Iako danas postoje vrlo osjetljive

metode za detekciju slobodnog MDA, poput HPLC-a, zbog niske cijene i jednostavne izvedbe, još uvijek je najzastupljenija spektrofotometrijska metoda po Yagi-u (90). Tom metodom se određuje koncentracija MDA zajedno s drugim produktima lipidne peroksidacije koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom, zbog čega ova metoda nije specifična za MDA.

Analiza linearnim miješanim modelom, koja se uobičajeno koristi kod križnih kliničkih pokusa, pokazala je u skupini od 35 ispitanika koji su završili istraživanje smanjene koncentracije LDL-kolesterola nakon konzumacije ROO u odnosu na koncentraciju LDL-kolesterola nakon konzumacije EVOO (p=0,020). Takav rezultat bi se mogao protumačiti prisutnošću oleinske kiseline koja je zastupljena i u ROO i u EVOO. Drugi razlog su možda premale razlike u koncentracijama polifenola koji su bili prisutni i u EVOO i u ROO koje smo koristili u ovom istraživanju. Prema Perez-Jimenez F i suradnicima, smanjenje koncentracije LDL-kolesterola nakon konzumacije maslinovog ulja pripisuje se samo oleinskoj kiselini, a ne i polifenolima. Oleinskoj kiselini se pripisuju i: zaštita LDL kolesterola od oksidacije, smanjenje prooksidacijskih efekata na stanicama i očuvanje endotela (30).

U našem istraživanju pojedine pretrage su svrstane u određene rizične čimbenike za nastanak ateroskleroze da bi se procijenilo koji je rizični čimbenik najizraženiji i mijenja li se nakon konzumacije EVOO i ROO. Upala je definirana povećanim brojem leukocita, povećanom brzinom sedimentacije eritrocita te povećanim koncentracijama CRP-a i IL-6, dislipidemija je definirana povećanim koncentracijama ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida, te smanjenom koncentracijom HDL-kolesterola, oksidacijski stres je definiran povećanim koncentracijama ox-LDL-a i MDA, te smanjenim katalitičkim koncentracijama GSH-Px-a i SOD-a, a hiperkoagulabilnost povećanom koncentracijom fibrinogena i povećanom aktivnošću vWf. Neki od navedenih biokemijskih parametara mogli bi definirati i druge rizične čimbenike što bi imalo za posljedicu i drugačije rezultate. Povećana koncentracija fibrinogena i povećana aktivnost vWf osim hiperkoagulabilnosti mogu još definirati upalu i endotelnu disfunkciju, a ox-LDL bi mogao definirati dislipidemiju i endotelnu disfunkciju. U našem istraživanju endotelna disfunkcija nije definirana kao rizični čimbenik samo radi jednostavnosti.

U našem istraživanju svi biokemijski parametri koji definiraju oksidacijski stres pokazuju odstupanja od referentnih intervala. Katalitička koncentracija GSH-Px-a je bila povećana premda se u literaturi navodi da je u stanjima oksidacijskog stresa katalitička koncentracija GSH-Px-a smanjena. Povećanje nije bilo značajno, aritmetička sredina (85,5 U/g Hb) bila je

16% veća od gornje granice referentnog intervala, ali je povećanu katalitičku koncentraciju GSH-Px-a imalo 67% naših ispitanika. Katalitička koncentracija SOD-a je povećana u 95% ispitanika, što je već opisano kod HIV-om zaraženih osoba. Prema istraživanju Gil-a i suradnika, u neliječenih HIV-om zaraženih osoba katalitičke koncentracije GSH-Px-a su smanjene, a SOD-a povećane, što dovodi do nakupljanja vodikovog peroksida (122). Prateći rezultate studija, u kojima su se mjerile katalitičke koncentracije SOD-a u bolesnika oboljelih od CVD, zapažaju se bitne razlike u njihovim rezultatima. Analizirajući bolesnike oboljele od CVD, Kotur-Stevuljević sa suradnicima izmjerila je povećane koncentracije $O_2^{\cdot -}$ i povećane koncentracije MDA, te smanjene katalitičke koncentracije SOD-a (101). Grupa istraživača iz Australije pokazala je pozitivnu korelaciju između povećanih koncentracija homocisteina i katalitičkih koncentracija SOD-a u osoba oboljelih od CVD. Liječenje koje je dovelo do smanjenja koncentracija homocisteina, slično je djelovalo i na SOD (123, 124). Povećana katalitička koncentracija SOD-a mogla bi značiti adaptaciju na povećanu koncentraciju superoksidnog aniona koji se uklanja pomoću SOD-a (125). Grupa istraživača iz Indije ispitivala je biljege oksidacijskog stresa, mikronutrijente i antioksidanse, pri čemu su dokazali značajno veće koncentracije MDA-TBARS metodom u osoba zaraženih HIV-om (6,51±0,90 μmol/L), te bolesnika oboljelih od AIDS-a (9,14±1,84 μmol/L) u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike (2,76±0,35 μmol/L). Katalitičke koncentracije GSH-Px-a i SOD-a u tom istraživanju također su bile značajno manje u osoba zaraženih HIV-om, kao i vrijednosti mikronutrijenata, što bi se moglo protumačiti povećanom potrošnjom uslijed jačeg oksidacijskog stresa, kojem su izložene osobe zaražene HIV-om. Ipak, autori nisu spominjali jesu li bolesnici, obuhvaćeni u tom istraživanju, liječeni antiretrovirusim lijekovima (126). Druga grupa istraživača izmjerila je povećane koncentracije MDA-TBARS u liječenih osoba zaraženih HIV-om (6,28±1,3 μmol/L) u odnosu na neliječene bolesnike (4,20±0,77 μmol/L) i kontrolnu grupu (1,30±0,12 μmol/L). Autori su takve nalaze pokušali obrazložiti pojačanom peroksidacijom, smanjenom količinom antioksidansa i nemogućnosti popravka oštećenja izazvanih peroksidacijom kod liječenih bolesnika. Također bi se pojačana lipidna peroksidacija, prisutna u liječenih bolesnika, mogla povezati s njihovom relativno čestom dislipidemijom i lipodistrofijom (127).

Početna koncentracija MDA u naših liječenih ispitanika (5,4±2,3 μmol/L), nije se razlikovala od literaturnih.

Fito i suradnici dokazali su značajno povećanu katalitičku aktivnost GSH-Px nakon dvadeset i

prvog dana konzumacije EVOO u odnosu na konzumaciju ROO u jednakom vremenskom periodu (128). Ista grupa autora dokazala je i povećanu aktivnost drugih enzima vezanih uz metabolizam glutationa nakon samo tjedan dana konzumacije EVOO u dozama od po 20 mL dnevno (129). Takvi nalazi podupiru teoriju o povezanosti povećanog unosa polifenola i većeg kapaciteta endogenog antioksidacijskog sustava. Polifenoli smanjenjem količine slobodnih radikala u organizmu povećavaju bioraspoloživost GSH-Px-a što se očituje kao povećana aktivnost enzima. Konzumiranjem maslinovog ulja s visokim sadržajem polifenola, pojačava se ekspresija GSH-Px mRNA i aktivnost samog enzima (130).

U našem istraživanju konzumacija EVOO i ROO nije utjecala na promjenu katalitičke aktivnosti GSH-Px-a.

ox-LDL ima važnu ulogu u procesu ateroskleroze i njegove su koncentracije povećane u osoba s CVD, iako prediktivnu vrijednost ox-LDL-a kao biljega za pojavu CVD u odnosu na dosadašnje biljege tek treba ispitati. ox-LDL je vrlo složena čestica, pa afinitet protutijela, koja se nalaze u test reagencijama, nije jednak prema pojedinim oksidiranim epitopima, što otežava usporedbu rezultata (131, 132), a s obzirom da ox-LDL nije niti standardizirana pretraga, referentni intervali ovise o proizvođaču. ox-LDL karakteriziraju relativno visoke intraindividualne varijacije (21%) tijekom tri mjerenja unutar jednog tjedna (133).

U našem istraživanju početne koncentracije ox-LDL-a su povećane (medijan: 0,83 mg/L) u odnosu na raspon zdrave kontrolne skupine (0,11-0,24 mg/L) koji je određen metodom istog proizvođača (134). Duong sa suradnicima određivao je koncentraciju ox-LDL-a (metodom koja detektira različite epitope u odnosu na našu metodu) u liječenih osoba zaraženih HIV-om i također pokazao značajno veće koncentracije (8±3 mg/L) u odnosu na kontrolnu skupinu (6±1 mg/L) (135).

U skupini naših ispitanika koji su završili istraživanje (N=35), nakon konzumacije EVOO i ROO biokemijski parametri, koji karakteriziraju oksidacijski stres kao rizični čimbenik, odstupaju u najvećem broju slučajeva u odnosu na druge rizične čimbenike. Test proporcija je pokazao statistički značajne promjene kod tri upalna parametra nakon konzumacije ulja: veći broj ispitanika s povećanim koncentracijama CRP-a nakon ROO u odnosu na početni broj ispitanika s povećanim koncentracijama CRP-a ($p<0,05$), značajno manji broj ispitanika s povećanim koncentracijama IL-6 nakon ROO u odnosu na broj ispitanika s povećanim koncentracijama IL-6 nakon EVOO ($p<0,05$) i značajno manji broj ispitanika s povećanim vrijednostima brzine sedimentacije eritrocita nakon ROO u odnosu na početne vrijednosti

($p<0,05$). Navedeni rezultati upućuju na značajniji učinak ROO u odnosu na EVOO, iako je za vrijednost brzine sedimentacije eritrocita i koncentraciju IL-6 taj učinak povoljan, dok je za koncentraciju CRP-a taj učinak nepovoljan.

Učinak konzumacije ulja na pojavu 10-godišnjeg rizika od pojave CHD po Framingham-u u 35 ispitanika koji su završili istraživanje pokazuje da su nakon konzumacije EVOO dva ispitanika iz grupe niskog rizika prešla grupi umjerenog rizika, kao i da je nakon konzumacije ROO jedan ispitanik iz grupe niskog rizika prešao grupi umjerenog rizika. Pretvaranjem kvantitativnih obilježja u kvalitativna, što se napravilo u testu proporcija i izračunavanjem rizika od CHD po Framingham-u, rezultati se ne slažu s rezultatima statističkih analiza koje su napravljene na kvantitativnim rezultatima mjerenja. Rezultati kvalitativnih analiza pokazuju znatno veći utjecaj konzumacije ulja na kliničke i laboratorijske parametre, nego rezultati kvantitativnih analiza, iako je u oba slučaja izraženiji utjecaj ROO koji bi trebao imati placebo efekt.

Učinak konzumacije maslinovih ulja u ispitanika liječenih pomoću PI bila je statistički značajno smanjena brzina sedimentacije eritrocita i koncentracije CRP u odnosu na početne vrijednosti. Iako nije bilo statistički značajno, nakon konzumacije EVOO došlo je i do smanjenja koncentracija IL-6 (39%), fibrinogena (8%), triglicerida (13%), aktivnosti vWf (27%), te do povećanja koncentracija HDL-kolesterola (18%) u odnosu na početne vrijednosti. Navedeni rezultati mogli bi ukazivati na povoljan utjecaj EVOO, ali to bi trebalo dokazati na većem broju ispitanika uz možda duži period konzumacije ulja.

Ispitanici liječeni abakavirom (N=10) nisu imali značajnih promjena nakon konzumacije EVOO i ROO, iako je nakon EVOO došlo do smanjenja brzine sedimentacije eritrocita za 75%, smanjenja koncentracija CRP-a za 89%, IL-6 za 44%, fibrinogena za 18% i triglicerida za 9% u odnosu na početne vrijednosti, ali bez statističke značajnosti. Takvi rezultati bi se mogli protumačiti slično kao i djelovanje EVOO kod ispitanika liječenih pomoću PI.

Ispitanici koji nisu liječeni pomoću PI (N=24), kao i ispitanici, koji nisu liječeni abakavirom (N=25), nakon konzumacije i EVOO i ROO imali su smanjene koncentracije MDA u odnosu na početne vrijednosti, što bi se moglo pripisati smanjenoj peroksidaciji mononezasićenih masnih kiselina, kao što je oleinska kiselina.

Nedostatak ovog istraživanja je nepostojanje objektivnih, mjerljivih parametara suradljivosti ispitanika. U literaturi se najčešće navode određivanja koncentracija T i OH-T u urinu

ispitanika koji su konzumirali maslinovo ulje. S obzirom da su neke grupe istraživača mjerile samo slobodne forme T, HT i O-MHT, a druge su radile ili enzimsku ili kiselu hidrolizu kako bi mjerile ukupne T, HT i O-MHT, literaturni podaci o tim komponentama vrlo su različiti. Miro-Casas i suradnici radili su usporednu analizu mjerenja koncentracija T i HT u urinu nakon konzumacije jedne doze od 50 mL, te nakon tjedan dana konzumacije po 25 mL dnevno. Autori nisu opisali kada se počeo skupljati urin, da li odmah nakon konzumacije ulja ili tek sljedeće jutro, ali T se izlučio u većoj količini nakon jednokratne doze, nego nakon tjedan dana uzimanja maslinovog ulja, dok se HT izlučio u podjednakim količinama nakon jednokratne doze, kao i nakon tjedan dana uzimanja maslinovog ulja. U procesu sinteze noradrenalina i dopamina u mozgu stvara se određena količina endogenog HT koji se izlučuje na isti način kao HT podrijetlom iz maslinovog ulja. Zbog toga uvijek postoji manja količina bazičnog HT u tjelesnim tekućinama i upitno je koliko je izmjerenog HT endogenog porijekla, a koliko ga je akumulirano tijekom dugotrajnog uzimanja putem maslinovog ulja (137).

Zbog nemogućnosti mjerenja koncentracija T i OH-T u uvjetima našeg istraživanja, suradljivost ispitanika se evidentirala u postocima prema njihovim vlastitim izjavama o suradljivosti. Ispitanici koji su izjavili da su u zadanom razdoblju potrošili više od 90% ulja na propisan način, smatrani su suradljivim. Suradljivi ispitanici podijeljeni su u dvije grupe: ispitanici koji su bili suradljivi prema oba ulja (N=23) i ispitanici koji su bili suradljivi prema najmanje jednoj vrsti ulja.

U ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja, nakon konzumacije ROO, koncentracija MDA značajno je smanjena u odnosu na početne vrijednosti. Koncentracija MDA je imala slične promjene i u grupi svih ispitanika koji su završili istraživanje (N=35). Promjena koncentracije LDL-kolesterola bila je na granici statističke značajnosti.

U 23 ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji obje vrste ulja, parametri koji karakteriziraju oksidacijski stres, imali su najveći broj odstupanja od referentnih intervala, početno i nakon konzumacije obje vrste ulja. Značajne promjene u odnosu na početni broj odstupanja utvrđene su kod MDA (veći broj odstupanja nakon ROO u odnosu na početna odstupanja) i GSH-Px-a (veći broj odstupanja nakon EVOO u odnosu na početna odstupanja) kao laboratorijskih parametara za rizični čimbenik oksidacijski stres.

Izračun 10-godišnjeg rizika za pojavu CHD po Framingham-u u 23 ispitanika, koji su izrazili

suradljivost prema konzumaciji obe vrste ulja veću od 90%, daje slične rezultate kao i u svih 35 ispitanika koji su završili istraživanje. Nakon konzumacije obje vrste ulja, po dva ispitanika su iz grupe niskog rizika prešla su u grupu umjerenog rizika, dok u grupi visokog rizika nije bilo promjene.

Rezultati ispitanika koji su izrazili suradljivost u uzimanju ulja veću od 90% prema najmanje jednom ulju, obrađeni su metodom linearnog miješanog modela, koji dozvoljava izostanak pojedinih rezultata. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje koncentracije CRP-a nakon uzimanja EVOO u odnosu na ROO, što bi moglo značiti smirenje upale pod utjecajem EVOO. Fito i suradnici nakon jednakih doza ulja i jednako dugih intervencijskih i wash-out perioda također su dobili značajno smanjenje koncentracija CRP-a i IL-6 nakon EVOO u odnosu na ROO u CHD bolesnika u stabilnoj fazi bolesti (121). Esposito i suradnici našli su kod ispitanika nakon dvije godine mediteranske dijete značajno smanjene koncentracije CRP-a i IL-18 (136). Slične rezultate dobila je grupa koju je predvodio Estruch sa suradnicima, iako se istraživanje provodilo u kraćem vremenskom periodu (137). De la Torre-Carbot sa suradnicima provodila je križni klinički pokus s dva intervencijska perioda po tri tjedna i wash-out periodom od dva tjedna u kojem je određivana koncentracija triglicerida, kolesterola, apo B, te nekih biokemijskih parametara u izolatima ox-LDL čestica. Vrijednosti ispitivanih parametara nisu se promijenile nakon konzumacije niti jednog od maslinovih ulja, ali broj ox-LDL-čestica u plazmi značajno se smanjio nakon konzumacije EVOO (139).

Grupa istraživača koja je godinu dana provodila mediteransku dijetu kod HIV-om zaraženih bolesnika iz Hrvatske, također nije našla značajne promjene u koncentracijama lipoproteina. S obzirom na vrstu liječenja, koncentracije lipoproteina u navedenih bolesnika bile su slične već ranije opisanim istraživanjima (ispitanici liječeni kombinacijom koja je sadržavala PI imali su povećane koncentracije ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i smanjene koncentracije HDL- kolesterola) (140).

Određivanje koncentracije CRP-a našlo je svoju praktičnu primjenu kao rani biljeg budućih kardiovaskularnih događaja. Naime, prije nekoliko godina provedeno je kliničko ispitivanje kojim se trebala ispitati uloga povećane koncentracije CRP-a u pronalaženju visoko rizičnih kandidata za pojavu CVD, a kod kojih je istovremeno koncentracija LDL-kolesterola u granicama referentnog intervala. Studija je bila poznata kao JUPITER (engl. Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). U studiju je bilo uključeno više od 16 000 ispitanika i završena je dvije godine ranije nego što je

planirano, jer je već u tom periodu nedvojbeno pokazala značajne rezultate. U ispitanika s prethodno povećanom koncentracijom CRP-a koji su uzimali terapiju rosuvastatinom, došlo je do smanjene učestalosti CVD za 44% (141). U istraživanju, koje je predvodila Jong sa suradnicima, u 33% liječenih HIV-om zaraženih osoba koncentracije CRP-a bile su veće od 3 mg/L, što u normalnoj populaciji predstavlja povećan rizik za buduće kardiovaskularne događaje. Svi bolesnici s povećanim koncentracijama CRP-a istovremeno su imali i povećane koncentracije D-dimera, fibrinogena, protrombinskog fragmenta 1+2 (F1+2) i povećan endogeni trombin potencijal (ETP) (142). Prema istraživanju Muthu-a i suradnika, koncentracija CRP-a je bila povećana u osoba zaraženih HIV-om koje su imale manje od 350 CD4+ T limfocita/μL u odnosu na osobe koje su imale više od 350 CD4+ T limfocita/μL, što govori o povezanosti povećane koncentracije CRP-a i supresije imunološkog sustava u tih bolesnika (143).

Ispitanici na početku našeg istraživanja imali su zadovoljavajući broj CD4+ T-limfocita (medijan: 486 CD4+ T-limfocita/μL), što su prihvatljive vrijednosti u HIV-om zaraženoj populaciji, iako je 62% ispitanika odstupalo od referentnih intervala.

Usporedba rezultata između svih 35 ispitanika, koji su završili istraživanje, i rezultata suradljivih ispitanika pokazuje razliku u djelovanju EVOO na koncentraciju CRP-a samo u suradljivih ispitanika, i to onih koji su izrazili suradljivost prema najmanje jednom ulju (četiri ispitanika više u odnosu na ispitanike suradljive prema obje vrste ulja). Djelovanje ROO na koncentracije MDA i LDL-kolesterola je pronađeno i u grupi svih ispitanika koji su završili istraživanje i u grupi suradljivih ispitanika.

Metabolički sindrom kao pojam zaokuplja pažnju posljednjih godina, jer objedinjuje pojedinačne rizične čimbenike, koji mogu dovesti do kardiovaskularnih bolesti. Sve više se opisuje i u literaturi, koja se bavi dugoročnim posljedicama liječenja HIV-a antiretrovirusnim lijekovima (144).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je metabolički sindrom prisutan u devet (26%) ispitanika po NCEP ATP III kriteriju i u 10 (29%) ispitanika po IDF kriteriju na početku istraživanja. Etnički heterogeno stanovništvo u području Baranje prema NCEP ATP III kriteriju ima prevalenciju metaboličkog sindroma 35% za muškarce i 42% za žene (144). Mondy i suradnici su u svom istraživanju na američkoj HIV-om zaraženoj populaciji dobili rezultat od 25,6% osoba s metaboličkim sindromom prema NCEP ATP III kriteriju. Naveden je i podatak da je prevalencija metaboličkog sindroma u općoj američkoj populaciji slična.

Najučestaliji čimbenici koji su utjecali na dijagnozu metaboličkog sindroma u njihovom istraživanju su: hipertenzija, snižena koncentracija HDL-kolesterola i opseg struka. To se razlikuje od učestalosti čimbenika koji su utjecali na dijagnozu metaboličkog sindroma u našem istraživanju: hipertrigliceridemija, hipertenzija, hiperglikemija, visceralna debljina i snižena koncentracija HDL-kolesterola. Razlike učestalosti takvih parametara možda bi se mogle pripisati različitoj prehrani, stilu života ili kombinaciji antiretrovirusnih lijekova (146). Važno je naglasiti da su svi ispitanici u ovom istraživanju imali koncentracije glukoze unutar referentnih intervala, čime se smanjio broj osoba s koncentracijama glukoze iznad 5,6 mmol/L što je jedan od kriterija za proglašenje metaboličkog sindroma. Palella sa suradnicima dobio je rezultat udjela metaboličkog sindroma 20-33%, koji je potvrdio povezanost metaboličkog sindroma s korištenjem antiretrovirusnog liječenja, a naročito PI (147). Znatno manju učestalost metaboličkog sindroma pokazala je grupa istraživača iz Francuske: 11% u HIV-om zaraženoj populaciji i 5% u općoj populaciji (148), dok je prema istraživanju grupe iz Australije, prevalencija metaboličkog sindroma u HIV-om zaraženoj populaciji prema NCEP ATP III kriteriju 18%, a prema IDF kriteriju 14%. Podudarnost između NCEP ATP III i IDF kriterija iznosila je 85%. Neslaganje među zadovoljenim kriterijima kod ostatka bolesnika (što je bio slučaj i u našem istraživanju) posljedica je razlike u ključnom parametru za zadovoljenje IDF kriterija, opsegu struka (144). Literaturni podaci navode povezanost liječenja pomoću PI s većom prevalencijom metaboličkog sindroma (144).

Naše istraživanje nije rezultiralo očekivanim brojem povoljnih ishoda. Razlozi za to mogu biti u činjenici da su ispitanici, koji su odabrani za ovo istraživanje, imali nemjerljiv broj kopija HIV-a i relativno normalan broj CD4+ T-limfocita, što znači da su u jednom stabilnom stanju, gdje je upala dobro kontrolirana s HAART-om. Razlozi za odabir ispitanika s takvim osobinama bili su u svrhu postizanja što homogenije skupine, jer su osobe zaražene HIV-om s različitim brojem virusnih čestica u krvi vrlo heterogena populacija, čemu može biti uzrok nesuradljivost bolesnika u uzimanju lijekova, rezistencija na lijekove, druge kronične bolesti i sl. Drugi razlog zbog kojeg nismo dobili očekivane rezultate su možda nedovoljno dugi intervencijski periodi, no onda se postavlja pitanje o etičnosti dužih intervencijskih perioda, jer je dnevna količina od 50 mL ulja kroz 20 dana prilično velika doza. Treći razlog izostanka očekivanih rezultata bi mogao biti nedovoljna razlika u sadržaju polifenola između EVOO i ROO koje smo koristili u istraživanju. Kako bi se s većom osjetljivošću procijenila suradljivost bolesnika, suradljivost je potrebno procjenjivati objektivnim metodama. Rizične

čimbenike za aterosklerozu potrebno je odrediti prije te ih pratiti tijekom antiretrovirusne terapije.

Wash-out periodi preuzeti su iz literature autora koji su proveli slična istraživanja s objašnjenjem da su wash-out periodi dovoljno dugi da bi se organizam "očistio" od utjecaja prethodno korištenog pripravka, pa je temeljem toga napravljeno samo jedno početno mjerenje. Svakako bi bilo pouzdanije da je i prije drugog intervencijskog perioda napravljeno još jedno početno mjerenje, no to bi značilo ukupno četiri vađenja krvi po ispitaniku, čime bi vjerojatno doveli u pitanje suradljivost ispitanika. Iako su prije istraživanja napravljene "power analize" kojima se utvrdilo da je broj ispitanika koji su pristupili istraživanju dovoljan, tijekom istraživanja broj ispitanika se smanjio zbog odustajanja četvero ispitanika, a zbog nedovoljne suradljivosti svih ispitanika potpune podatke smo imali samo za 23 ispitanika. Iz tog razloga, za statističku obradu dijela rezultata, korišteni su neparametrijski testovi, čija je osjetljivost manja u odnosu na parametrijske testove. Uzevši u obzir činjenicu da u odnosu na ostale Europske zemlje Hrvatska ima još uvijek nisku prevalenciju HIV-a, u populaciji registriranih i liječenih bolesnika nije bilo jednostavno pronaći ispitanike koji zadovoljavaju naše kriterije i sami pristaju na uvjete istraživanja.

Jedine izraženije nuspojave, koje su zabilježene u anketama istraživanja, su umor i proljev, ali niti navedene niti ostale nuspojave nisu postale češće tijekom istraživanja, što znači da se navedene nuspojave mogu pripisati samoj HIV infekciji i nuspojavama antiretrovirusnog liječenja. Pojava proljeva smanjila se tijekom konzumacije obje vrste ulja gdje se udio ispitanika s proljevom smanjio s 34% na 17%.

Ipak, tijekom istraživanja zapaženi su rezultati kao što je povoljan utjecaj EVOO na biokemijske biljege, iako razlike nisu uvijek bile statistički značajne, u ispitanika liječenih pomoću PI i liječenih pomoću abakavira, no te su podskupine imale mali broj ispitanika. Proširenje istraživanja na veću skupinu ispitanika dalo bi pouzdanije rezultate.

S obzirom na produljeni životni vijek osoba koje se liječe HAART-om, bilo bi preporučljivo pratiti koncentracije CRP-a, kao biljega budućih kardiovaskularnih događaja.

Još jedan segment ovog istraživanja koji nudi mogućnost proširenja je detekcija i praćenje metaboličkog sindroma u HIV-om zaraženih bolesnika. Metabolički sindrom je zbog sjedilačkog načina života u stalnom porastu. Procjena prevalencije metaboličkog sindroma u HIV-om zaraženoj populaciji s većim stupnjem viremije koja nije tako dobro kontrolirana kao

skupina koja je obrađena u ovom istraživanju, vjerojatno bi dala zanimljive rezultate i skrenula pažnju na važnost zdravog načina života.

Rizične čimbenike za kardiovaskularne bolesti potrebno je definirati u svih bolesnika s HIV infekcijom prije početka antiretrovirusnog liječenja te ih pratiti tijekom liječenja. Redovita konzumacija EVOO mogla bi umanjiti vjerojatnost razvoja kardiovaskularnih bolesti u bolesnika s HIV-om što bi trebalo dodatno potvrditi na većem broju ispitanika tijekom duljeg perioda konzumacije maslinovog ulja.

6 ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju, rizični čimbenici za aterosklerozu prisutni su u više od 50% ispitanika liječenih antiretrovirusnim lijekovima, a povećana koncentracija MDA i povećana katalitička koncentracija SOD-a prisutne su u više od 90% ispitanika.

2. Na početku istraživanja, prema Framingham-u, 59% ispitanika imalo je niski rizik, 38% ispitanika umjereni rizik, a samo jedan ispitanik visoki rizik za pojavu CHD u sljedećih 10 godina.

3. Ispitanici liječeni pomoću PI početno su imali značajno veće vrijednosti sedimentacije (p=0,008), značajno veće koncentracije IL-6 (p=0,030), značajno veće koncentracije fibrinogena (0,004) i značajno manje koncentracije HDL-kolesterola (p=0,017) u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni pomoću PI.

4. Ispitanici liječeni abakavirom početno su imali značajno manje katalitičke koncentracije GSH-Px-a u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni abakavirom (p=0,002) te veće vrijednosti sedimentacije, veće koncentracije CRP-a, IL-6, fibrinogena i ox-LDL čestica u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni abakavirom, ali bez statističke značajnosti.

5. Konzumacija ROO smanjila je medijan koncentracije MDA s početnih 5,59 μmol/L na 4,45 μmol/L, što iznosi 18% (p=0,003) i smanjila udio ispitanika s povećanom koncentracijom MDA u odnosu na referentni interval s 91% na 69% u svih 35 ispitanika koji su završili istraživanje.

6. Analizom podataka metodom linearnog miješanog modela u svih ispitanika koji su završili istraživanje utvrđena je značajno manja koncentracija LDL-kolesterola (3,2 mmol/L) nakon konzumacije ROO u odnosu na koncentraciju nakon konzumacije EVOO (3,3 mmol/L) (p=0,020).

7. U ispitanika liječenih pomoću PI, konzumacija EVOO značajno je smanjila koncentraciju CRP-a s 2,21 mg/L na 0,88 mg/L, što iznosi 151% i brzinu sedimentacije eritrocita s 21 mm/h na 13 mm/h, što iznosi 62%.

8. Konzumacija maslinovog ulja nije značajno promijenila vrijednosti kliničkih i laboratorijskih parametara u ispitanika liječenih abakavirom.

9. Na početku istraživanja metabolički sindrom je utvrđen u devet ispitanika prema NCEP ATP III kriteriju i u 10 ispitanika prema IDF kriteriju. Konzumacija maslinovog ulja nije značajno utjecala na promjenu broja ispitanika kojima je utvrđen metabolički sindrom.

10. Konzumacija maslinovog ulja nije značajno promijenila broj ispitanika u pojedinoj kategoriji rizika za CHD prema Framingham-u u odnosu na početne vrijednosti.

11. U ispitanika koji su izrazili suradljivost veću od 90% prema konzumaciji oba ulja, konzumacija ulja je najviše promijenila parametre oksidacijskog stresa (konzumacija ROO je smanjila broj ispitanika s koncentracijama MDA izvan referentnog intervala, dok je konzumacija EVOO smanjila broj ispitanika s katalitičkim koncentracijama GSH-Px izvan referentnog intervala) i parametre dislipidemije (konzumacija EVOO je povećala broj ispitanika s koncentracijama kolesterola izvan referentnog intervala, dok je konzumacija ROO smanjila broj ispitanika s koncentracijama triglicerida izvan referentnog intervala).

12. U ispitanika koji su izrazili suradljivost u konzumaciji maslinovih ulja veću od 90% prema najmanje jednom ulju, nakon konzumacije EVOO koncentracije CRP-a su se značajno smanjile u odnosu na koncentracije CRP-a nakon konzumacije ROO ($p=0,035$).

7 LITERATURA

1. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med 2008;358(15):1590-602.
2. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Ann Ist Super Sanita 2010;46(1):5-14.
3. Begovac J. Infekcija virusom humane imunodeficijencije. U: Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Schönwald S. Infektologija. 1. izdanje, Zagreb, Hrvatska, Profil International 2006. str. 338-47.
4. Weiss, R.A. Gulliver's travels in HIVland. Nature 2001;410:963–7.
5. Bartlett JG, Hirsch MS, McGovern BH. The stages and natural history of HIV infection. www.uptodate.com; Datum pristupa: 23.09.2010.
6. Begovac J. Smjernice za antiretrovirusno liječenje odraslih bolesnika u Hrvatskoj u 2009. godini. Infektološki glasnik 2008;28:Suppl.1,3-20.
7. Glass TR, Ungsenhapand C, Wolbers M, Weber R, Vernazza PL, Rickenbach M, et al and the Swiss Cohort Study. Prevalence of risk factors for cardiovacular disease in HIV-infected patients over time: the Swiss HIV Cohort Study. HIV Medicine 2006;7:404-10.
8. den Boer MA, Berbée JF, Reiss P, van der Valk M, Voshol PJ, Kuipers F, et al. Ritonavir impairs lipoprotein lipase-mediated lipolysis and decreases uptake of fatty acids in adipose tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26(1):124-9.
9. Rasheed S, Yan JS, Lau A, Chan AS. HIV replication enhances production of free fatty acids, low density lipoproteins and many key proteins involved in lipid metabolism: a proteomics study. PLoS One 2008;3(8):e3003.
10. da Silva EF, Bárbaro G. New options in the treatment of lipid disorders in HIV-infected patients. Open AIDS J 2009;3:31-7.

11. Aberg JA. Lipid management in patients who have HIV and are receiving HIV therapy. Endocrinol Metab Clin North Am 2009;38(1):207-22.

12. Mehta N and Reilly M. Atherosclerotic cardiovascular disease risk in the HAART-treated HIV-1 population. HIV Clin Trials 2005;6(1):5-24.

13. Sertić J. Molekularna genetika i dijagnostika nasljednih bolesti. U: Sertić J i suradnici. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Medicinska naklada, Zagreb 2008.

14. Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, et al. Apolipoprotein CIII gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. J Lipid Res 2002;43:1450-7.

15. Bottorff MB. Statin safety and drug interactions: clinical implications. Am J Cardiol. 2006;97(8A):27C-31C.

16. World health organization. WHO and HIV/AIDS. http://www.who.int/hiv/en/. WHO 2011. Datum pristupa: ožujak 2011.

17. Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Epidemiologija HIV infekcije i AIDS-a u Hrvatskoj. http://www.hzjz.hr/epidemiologija/hiv.htm. Datum pristupa: 31. ožujka 2010.

18. Kardiovaskularne bolesti, poglavlje 4. U: Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Medicinska naklada, Zagreb, 2004.

19. Mohler ER. Endothelial disfunction. www.uptodate.com; Datum pristupa: siječanj 2011.

20. Kovač Z. Kisikovi i drugi slobodni radikali, poglavlje 11.9. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. Patofiziologija, šesto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 2005.

21. Shema lipidne peroksidacije.Preuzeto s: http://www.thefullwiki.org/Lipid_peroxidation. Datum pristupa: 02.03.2011.

22. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipi peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina 2007;43:84-93.

23. 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. Review.

24. VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(24):14247-52.

25. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. J Biol Chem 2003;278:31426-33.

26. Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of -protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. Mutat Res 1999;424:97-106.

27. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 2000;28:1685-96.

28. Hillestrøm PR, Covas MI, Poulsen HE. Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno– adducts. Free Rad Biol & Med 2006;41:1133–8.

29. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur J Biochem 2000;267(16):4904-11.

30. Perez-Jimenez F, et al. Consensus report, Jaen (Spain). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. Eur J Clin Invest 2005;35:421-4.

31. Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi, poglavlje 30 u: Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija, Medicinska naklada, Zagreb 2009.

32. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Int 2006;160:1-40.

33. Fattman CL, Cshaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Rad Biol & Med 2003;35:236-56.

34. Harrison D, Griendling K, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. Am J Cardiol 2003;91:7A–11A.

35. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 2003;349:1605-13.

36. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, et al. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1131-8.

37. Williams JL. Thrombophilia: Thrombus formation (chapter 33). In McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

38. Reiner Ž, Gamulin S. Poremećaji odlaganja lipida, poglavlje 6.2.2. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. Patofiziologija, šesto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 2005.

39. Schecter AD, Berman AB, Yi L, Mosoian A, McManus CM, Berman JW, et al. HIV envelope gp120 activates human arterial smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Aug 28;98(18):10142-7.

40. Israel N, Gougerot-Pocidalo MA. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. CMLS 1997;53:864-70.

41. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. J Clin Invest 1992;90(3):1138-44.

42. Nie Q, Fan J, Haraoka S, Shimokama T, Watanabe T. Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis. Lab Invest 1997;77(5):469-82.

43. Hannson G. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med 2005;352:1685-95.

44. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. Thromb Haemost 2009;102(2):215-22. Review.

45. Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. Circulation 2008;117(25):3168-70. Review.

46. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: Transition from theory to practice. Circ J 2010;2:213-20.

47. Burns C, Ehsan A.Hematology Procedures: Erythrocyte sedimentation rate (Poglavlje 34). U: McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

48. Laudicina RJ, Simonian Y. The Leukocyte: Leukocyte concentration in the peripheral blood (Poglavlje 7). U: McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

49. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. Clin Chem 2009;55(2):229-38. Review.

50. Calabró P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. Circulation 2003;108(16):1930-2.

51. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. Am J Pathol 2001;158(3):1039-51.

52. Dong Q, Wright JR. Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. J Immunol 1996;156(12):4815-20.

53. Young I and Rifai N. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease. Clin Chem 2009;55(2):201-2.

54. Carpenter S, Kirby B. Disorders of secondary hemostasis: Hereditary disorders of secondary hemostasis (Poglavlje 29). U: McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

55. Horvath B, Hegedus D, Szapary L, et al. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. Exp Clin Cardiol 2004;9(1):31-4.

56. Massberg S, Brand K,Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. J Exp Med 2002; 196: 887–96.

57. Methia N, Andre P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. Blood 2001;98:1424–8.

58. Blann AD, McCollum CN. von Willebrand factor, endothelial cell damage and atherosclerosis. Eur J Vasc Surg 1994;8:10-5.

59. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary flow modulation in humans: Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. J Clin Invest 1993;92:652-62.

60. Vischer UM, Herrmann FR, Peyrard T, Nzietchueng R, Benetos A. Plasma von Willebrand factor and arterial ageing. J Thromb Haemost 2005;3:794-5.

61. Musunuru K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. Lipids. 2010;45(10):907-14.

62. Williams JL. Secondary hemostasis and fibrinolysis: Coagulation cascade (Poglavlje 33). U: McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

63. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 2003;10(2):63-71. Review.

64. Curtiss LJ. Reversing atherosclerosis? N Engl J Med 2009;360(11):1144-6.

65. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. J Clin Invest 2009;119(1):136-45.

66. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 1994;94:2493-503.

67. Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2000;269:808-15.

68. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. Mayo Clin Proc 2006;81(1):59-68.

69. Williams JL. Secondary hemostasis and fibrinolysis: Coagulation cascade (Poglavlje 30). U: McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology, Second edition. Pearson Education 2010.

70. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation 2004 Jan 27;109(3):433-8. Review

71. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. Lancet 2005;366(9491):1059-62.

72. Wubben DP, Adams AK. Metabolic syndrome: what's in a name? WMJ 2006;105(5):17-20.

73. Domac R. Flora Hrvatske. Priručnik za određivanje bilja. II izdanje, Školska knjiga Zagreb, 2002. p. 312.

74. Koprivnjak O. Upoznajmo ekstra djevičansko maslinovo ulje, Poreč 2003.

75. Keys A, Aravanis C, van Buchem FSP, et al. The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study. Lancet 1981;2(8237):58-61.

76. Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. Pharmacol Res 2007;55(3):175-86.

77. Vissers, MN, Zock, PL, Katan, MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil in humans: a review. Eur J Clin Nutr 2004;58:955–65.

78. Sakr SW, Haourigui M, Paul JL, Soni T, Vachter D, Girard-Globa A. Fatty acid composition of an oral fat load affects chylomicron size in human subjects. Br J Nutr 1997;77:19-31.

79. Van Greevenbroek MMJ, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW, de Bruin JWA. Lipoprotein secretion by intestinal Caco-2 cells is affected differently by trans and cis unsaturated fatty acids: effect of carbon chain length and position of the double bond. Am J Clin Nutr. 1998;68:561-7.

80. Sarkkinen ES, Agren JJ, Ahola I, Ovaskainen ML, Uusitupa MI. Fatty acid composition of serum cholesterol esters, and erythrocyte and platelet membranes as indicators of long-term adherence to fat-modified diets. Am J Clin Nutr 1994;59:364-70.

81. Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. FEBS Lett 2000;468(2-3):159-60.

82. Miró-Casas E, Farré Albaladejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, et al. Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. Anal Biochem 2001;294(1):63-72.

83. Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, et al. EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. Ann Intern Med 2006;145(5):333-41.

84. Pacheco YM, Bermudez B, Lopez S, Abia R, Muriana FJG. Blood transport and genomic effects of olive oil components. Grasas y Aceites 2004;55(1):11-23.

85. Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol Med 1996;20:933–56.

86. Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbiers JA, Van Putte KP, Wiseman SA, et al. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. J Agric Food Chem 2002;50:1290–7.

87. Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. J Nutr Biochem 2006;17:429-45.

88. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije. Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Medicinska naklada Zagreb, 2004.

89. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin&Ciocalteau reagent. Methods in Enzymology 1999;299:152-78.

90. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med 1976;15(2):212-6.

91. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. Acta Haematol 1957;17: 237–46.

92. Tablica za izračun CVD rizika po Framingham-u dostupna na mrežnoj stranici: http://hp2010.nhlbihin.net/atpiii/calculator.asp?usertype=prof; Datum pristupa: 30. svibnja 2010.

93. Smjernice za dijagnostiku i liječenje arterijske hipertenzije 2007. god. Hrvatsko kardiološko društvo, Hrvatsko društvo za hipertenziju. Dostupno na mrežnoj stranici: http://www.hdh.hr/hrvatski/desno/2007-smjernice-lijecenja-arterij-hipertenz/smjernice%202007.pdf. Datum pristupa: 12. prosinca 2011.

94. Pulse. Dostupno na mrežnoj stranici:

http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003399.htm. Datum pristupa: 12. prosinca 2011.

95. Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ros E, Covas MI, Fiol M, et al. Cohort Profile: design and methods of the PREDIMED study. Int J Epidemiol 2010;1-9.

96. About Framingham heart study. Dostupno na mrežnoj stranici:

http://www.framinghamheartstudy.org/about/index.html. Datum pristupa: 02. ožujka 2011.

97. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M. Association between cigarette smoking, white blood cell count, and metabolic syndrome as defined by the Japanese criteria. Intern Med 2007;46(15):1167-70.

98. Gossett LK, Johnson HM, Piper ME, Fiore MC, Baker TB, Stein JH. Smoking intensity and lipoprotein abnormalities in active smokers. J Clin Lipidol 2009;3(6):372-8.

99. Hozawa A, Okamura T, Kadowaki T, Murakami Y, Nakamura K, Hayakawa T, et al. Hirotsugu Ueshima for NIPPON DATA80 Research group. Is weak association between cigarette smoking and cardiovascular disease mortality observed in Japan explained by low total cholesterol? NIPPON DATA80. Int J Epidemiol 2007;36(5):1060-7.

100. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. J Am Coll Cardiol 2004;43(10):1731-7. Review.

101. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. Clin Biochem 2007;40:181–7.

102. Reinsch N, Neuhaus K, Esser S, Potthoff A, Hower M, Mostardt S, et al. Are HIV patients undertreated? Cardiovascular risk factors in HIV: results of the HIV-HEART study. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2011 Feb 28. [Epub ahead of print].

103. Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. Eur J Clin Nutr 2008;62(5):651-9.

104. Zazpe I, Estruch R, Toledo E, Sánchez-Taínta A, Corella D, Bulló M, et al. Predictors of adherence to a Mediterranean-type diet in the PREDIMED trial. Eur J Nutr 2010;49(2):91-9.

105. D:A:D Study Group. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. Lancet 2008;371:1417–26.

106. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. Lancet 1999;353:2093-9.

107. Fontas E, van Leth F, Sabin CA, et al. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? J Infect Dis 2004;189:1056–74.

108. Thomas CM, Smart EJ. How HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation. Curr Opin Lipidol 2007;18(5):561-5. Review.

109. The DAD Study Group. Class of Antiretroviral Drugs and the Risk of Myocardial Infarction. N Engl J Med 2007;356:1723-35.

110. Madden E, Lee G, Kotler DP, Wanke C, Lewis CE, Tracy R, et al. Association of antiretroviral therapy with fibrinogen levels in HIV-infection. AIDS 2008;22:707–15.

111. Zha W, Liang G, Xiao J, Studer EJ, Hylemon PB, Pandak WM Jr et al. Berberine inhibits HIV protease inhibitor-induced inflammatory response by modulating ER stress signaling pathways in murine macrophages. PLoS One 2010;5(2):e9069.

112. Kramer AS, Lazzarotto AR, Sprinz E, Manfroi WC. Metabolic abnormalities, antiretroviral therapy and cardiovascular disease in elderly patients with HIV. Arq Bras Cardiol 2009;93:561-8. Review.

113. Rose H, Woolley I, Hoy J, Dart A, Bryant B, Mijch A, et al. HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of the disease vs the effect of treatment. Metabolism 2006;55:90-5.

114. Petit JM, Duong M, Masson D, Buisson M, Duvillard L, Bour JB, et al. Serum adiponectin and metabolic parameters in HIV-1-infected patients after substitution of nevirapine for protease inhibitors. Eur J Clin Invest 2004;34:569-75.

115. Baker J, Ayenew W, Quick H, Hullsiek KH, Tracy R, Henry K, et al. High-density lipoprotein particles and markers of inflammation and thrombotic activity in patients with untreated HIV infection. J Infect Dis 2010;201:285-92.

116. Currier JS, Wadhwa SG. Management of dyslipidemia and cardiovascular risk in the HIV-infected patient. www.uptodate.com; Zadnja izmjena: listopad, 2010.

117. Lampe FC, Duprez DA, Kuller LH, Tracy R, Otvos J, Stroes E, et al. SMART Study Group. Changes in lipids and lipoprotein particle concentrations after interruption of antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2010;54(3):275-84.

118. Das S. Risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients. J Antimicrob Chemoter 2010;65:386-9.

119. Hammond E, McKinnon E, Mallal S, Nolan D. Longitudinal evaluation of cardiovascular disease-associated biomarkers in relation to abacavir therapy. AIDS 2008;22(18):2540-3.

120. Chow SC, Liu JP. Design and analysis of clinical trials: concepts and methodologies, Wiley-IEEE 2004.

121. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, et al. SOLOS Investigators. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. Eur J Clin Nutr 2008;62(4):570-4.

122. Gil L, Martinez G, Gonzalez I, Tarinas A, Alvarez A, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. Pharm Res 2003;47:217-24.

123. Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, et al. Relationship between total plasma, homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors, and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. Atherosclerosis 1999;146:133–40.

124. Wilcken DE, Wang XL, Adachi T Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 2000;20:1199–202.

125. Nozik-Grayck E, Hagir B. Suliman, Piantadosi CA. Molecules in focus. Extracellular superoxide dismutase. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005;37:2466–71.

126. Pasupathi P, Ramchandran T, Sindhu P, Saranavan G, Bakthavathsalam G. Enhanced Oxidative Stress Markers and Antioxidant Imbalance in HIV Infection and AIDS Patients. J Sci Res 2009;1(2):370-80.

127. Ngondi JL, Oben J, Forkah DM, Etame LH, Mbanya D. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. AIDS Res Ther 2006;3:19.

128. Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti J, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: A randomised, crossover, controlled, clinical trial. Atherosclerosis 2005;181:149 –58.

129. Fito M, Gimeno E, Covas MI, et al. Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. Lipids 2002;37:245–51.

130. Massela R, Vari R, D`Archivio M, et al. Extra virgin olive oil phenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutatathione-related enzymes. J Nutr 2004;134:785-91.

131. Verhoye E, Langlois MR; Asklepios Investigators. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? Clin Chem Lab Med 2009;47(2):128-37. Review.

132. Lindstedt P, Bates HM, Hedlof E. All oxidized LDL tests are not created equal in what they measure. Research and Development Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A, S-754 50 Uppsala, Sweden.

133. Van Hoydonck PG, Schouten EG, Temme EH. Reproducibility of blood markers of oxidative status and endothelial function in healthy individuals. Clin Chem 2003;49:963-5.

134. Kimak E, Hałabiś M, Baranowicz-Gąszczyk I, Solski J, Książek A. Association between moderately oxidized low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclass distribution in hemodialyzed and post-renal transplant patients. J Zhejiang Univ Sci B 2011;12(5):365-71.

135. Duong M, Petit JM, Martha B, Galland F, Piroth L, Walldner A, et al. Concentration of circulating oxidized LDL in HIV-infected patients treated with antiretroviral agents: relation to HIV-related lipodystrophy. HIV Clin Trials 2006;7(2):41-7.

136. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. JAMA 2004;292(12):1440-6.

137. Miró-Casas E, Covas MI, Fitó M, Farré-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. Eur J Clin Nutr 2003;57(1):186-90.

138. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. Ann Intern Med 2006;145(1):1-11.

139. de la Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, et al. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. J Nutr 2010;140(3):501-8.

140. Turcinov D, Stanley C, Canchola JA, Rutherford GW, Novotny TE, Begovac J. Dyslipidemia and adherence to the Mediterranean diet in Croatian HIV-infected patients during the first year of highly active antiretroviral therapy. Coll Antropol 2009;33(2):423-30.

141. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. N Engl J Med 2008;359:2195-207.

142. Jong E, Meijers JC, Van Gorp EC, Spek AC, Mulder JW. Markers of inflammation and coagulation indicate a prothrombotic state in HIV-infected patients with long-term use of antiretroviral therapy with or without abacavir. AIDS Res Ther 2010 Apr 16;7(1):9.

143. Muthu S, Cecelia AJ, Pulimi S, Ameedha L, Srinivas CN, Solomon SS, et al. C-reactive protein in HIV-infected patients - could it be a marker of immunosuppression? Clin Chim Acta 2007;376(1-2):246-7.

144. Samaras K, Wand H, Law M, Emery S, Cooper D, Carr A. Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy using International Diabetes Foundation and Adult Treatment Panel III criteria: associations with insulin resistance, disturbed body fat compartmentalization, elevated C-reactive protein, and hypoadiponectinemia. Diabetes Care 2007;30(1):113-9.

145. Tucak-Zorić S, Curcić IB, Mihalj H, Dumancić I, Zelić Z, Cetina NM, et al. Prevalence of metabolic syndrome in the interior of Croatia: the Baranja region. Coll Antropol 2008;32(3):659-65.

146. Mondy K, Powderly WG, Claxton SA, Yarasheski KE, Stoneman JS, Hoffmann ME, et al. Metabolic syndrome in HIV within a representative US patient population. 13. conference on retroviruses and opportunistic infection 2006. Abstract 748.

147. Palella F, Wang Z, Chu H, Riddler S, Brown T, Dobs A, et al. Correlates of the metabolic syndrome among HIV seropositive and seronegative men in the multicenter AIDS cohort study. 13. Conference on retroviruses and opportunistic infection 2006. Abstract 747.

148. de Saint Martin L, Pasquier E, Roudaut N, Vandhuick O, Vallet S, Bellein V, et al. Metabolic syndrome: A major risk factor for atherosclerosis in HIV-infected patients (SHIVA study). Presse Med 2008;37:579-84.

8 PRILOZI

Kvantitativni izračun suradljivosti ispitanika prema mediteranskoj prehrani prije početka istraživanja. Preuzeto iz (95).

		Kriteriji za jedan bod
1	Koristite li maslinovo ulje kao glavni izvor masnoća u Vašem domaćinstvu?	Da
2	Koliko maslinovog ulja dnevno trošite? (uključujući i ono koje koristite za prženje, salate, te obroke koje konzumirate van kuće)	4 žlice dnevno ili više
3	Koliko obroka povrća konzumirate dnevno? (1 obrok podrazumijeva oko 200 g, a prilog uz glavno jelo se računa kao pola obroka)	ukupno više od 2 obroka povrća, odnosno više od jednog obroka svježeg povrća
4	Koliko komada voća (uključujući i prirodne voćne sokove) konzumirate dnevno?	3 komada ili više
5	Koliko obroka crvenog mesa, odnosno mesnih prerađevina (kobasice, šunka itd.) konzumirate dnevno? (1 obrok podrazumijeva 100-150 g)	manje od jednog obroka
6	Koliko obroka maslaca, margarina ili vrhnja konzumirate dnevno? (1 obrok podrazumijeva 12 g)	manje od jednog obroka
7	Koliko zaslađenih ili gaziranih napitaka konzumirate dnevno?	manje od jednog napitka
8	Koliko vina pijete tjedno?	3 čaše ili više
9	Koliko obroka mahunarki konzumirate tjedno ? (1 obrok podrazumijeva 150 g)	3 obroka ili više
10	Koliko obroka ribe ili plodova mora konzumirate tjedno? (1 obrok podrazumijeva 150 g ribe, te 4-5 komada, odnosno 200 g plodova mora)	3 obroka ili više
11	Koliko puta tjedno konzumirate slatkiše iz trgovine (torte, kolače, kekse)?	manje od 3 puta
12	Koliko obroka orašastih plodova (uključujući kikiriki) konzumirate tjedno? (1 obrok podrazumijeva 30 g)	jednom tjedno ili više
13	Da li radije konzumirate a) piletinu, puretinu i zečje meso, ili b) teletinu, svinjetinu, hamburger i kobasice?	Odgovori pod točkom "a"
14	Koliko puta tjedno konzumirate povrće, tjesteninu, rižu ili druga jela prelivena "sofrito" umakom? (rajčica s lukom, porilukom ili češnjakom koji se dinstaju na maslinovom ulju)	2 ili više puta
	UKUPAN BROJ BODOVA	

Zadovoljen kriterij nosi jedan bod, a nezadovoljen kriterij nosi nula bodova.

9 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28.03.1973. u Gospiću. Osnovnu i srednju školu završila sam u Zadru. 1991/92. godine upisala sam Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija i diplomirala 1996. godine. Tijekom studija dobila sam Rektorovu nagradu za rad: "Kvalitativno i kvantitativno određivanje *bcr-abl* translokacije kod kronične mijeloične leukemije", izrađen pod vodstvom mentorice dr. sc. Blaženke Grahovac.

Pripravnički staž provela sam u Zavodu za kliničku kemiju, Kliničke bolnice "Merkur" u Zagrebu od 1997-98. god, a od 1998-99 sudjelovala sam na znanstvenom projektu "Non-Hodgkin limfomi" koji je proveden u suradnji KB "Merkur" i Laboratorija za molekularnu imunogenetiku, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu. Od 1999.-2000. godine radila sam u Hematološko-biokemijskom laboratoriju Poliklinike za dijagnostiku, Nemetova, Zagreb, a nakon toga prelazim u Laboratorij za molekularnu dijagnostiku infektivnih bolesti, Klinike za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević".

2002. godine pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, obranila sam magistarski rad pod naslovom "Dokazivanje ekspresije NPM-ALK kimeričnog gena u malignim limfomima" pod vodstvom dr. sc. Blaženke Grahovac.

Od 2002.-2005. godine sudjelovala sam u projektu Ministarstva znanosti: "Molekularna dijagnostika Epstein-Barr i citomegalovirusne infekcije".

Tijekom 2003. i 2004. godine bila sam uključena u Austrijsko-Hrvatski projekt vezan uz molekularnu dijagnostiku infektivnih bolesti (grant 7/2004), što mi je omogućilo nekoliko edukacija pri "Institute of Hygiene", Medical University of Graz.

Od 2007.-2010. godine pohađala sam specijalistički staž iz medicinske biokemije u Kliničkoj bolnici "Sestre Milosrdnice" i krajem 2010. godine položila specijalistički ispit. Tijekom specijalizacije prešla sam u Laboratorij za hematologiju, citologiju i patohistologiju s Odsjekom za koagulaciju Klinike za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević".

Član sam Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i Hrvatske komore medicinskih biokemičara. U Upisniku znanstvenika Ministarstva obrazovanja i športa upisana sam pod matičnim brojem 260183.

OBJAVLJENI RADOVI:

a) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u CC:

1. **Kozić S**, Vince A, Iščić Beš J, Đaković Rode O, Židovec Lepej S, Poljak M, Bozic M, Kessler H.H. "Evaluation of a commercial real-time PCR assay for quantitation of Epstein-Barr virus in different groups of patients". J Virol Methods 2006;135:263-8.

2. Vince A, Zidovec Lepej S, Kurelac I, Barsic B, **Kozic S**, Klinar I, Zarkovic K. Virological and immunological characteristics of fatal EBV-mononucleosis in a 17-year old Caucasian male presenting with meningoencephalitis and hemophagocytic syndrome. J Neurovirol 2007;13(4):389-96.

b) Ostali objavljeni radovi:

1. Kozić M, Gregov I, **Kozić S**. Primary Sclerosing Cholangitis-Idiopathic form Case Report, Croat J Gastroenterol Hepatol 1998;7: No 3-4.

2. Iščić-Beš J, Vince A, Škerk V, **Kozić S**, Kutela N, Židovec-Lepej S, Lukas D. Detekcija klamidije trahomatis u različitim biološkim uzorcima metodom solubilne hibridizacije, Hybrid Capture II Test-Digene. Infektološki glasnik 2004;24:1,15-20.

3. Perić Lj, Židovec-Lepej S, Jeren T, Vince A, **Kozić S**, Perić N. Multifaktorijalno istraživanje nemalignih limfadenopatija. Infektološki glasnik 2005;25:3, 105-10.

c) Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima indeksiranim u CC:

1. Grahovac B, **Kozić S**, Kušec R, Ostojić S, Vrhovac R, Dominis M, Jakšić B. Detection of the NPM/ALK fusion transcript in reactive lymphoid tissue. Blood 1999;94:82a.

2. Ostojić S, Kušec R, **Kozić S**, Grahovac B, Dominis M, Vrhovac R, Jakšić B. Can ALK expression discriminate anaplastic large cell lymphoma from variants of Hodgkin`s lymphoma?. Blood 2000; 96:4715a.

3. **Kozić S**, Vince A, Iščić Beš J, Đaković Rode O, Židovec-Lepej S, Baća Vrakela I, Poljak M, Bozic M, Kessler HH. Quantitation of Epstein-Barr virus in different groups of patients based on real-time PCR. Clin Chem Lab Med 2006;44(4):A13.

4. Vince A, Židovec-Lepej S, **Kozić S**, Baća-Vrakela I, Serventi-Seiwerth R, Grković L, Labar B. Molecular detection of Epstein-Barr virus in patients with bone marrow transplantation. Leukemia Research 2007;31:(2) S104-S105.

Aktivno sam sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa i simpozija

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

EKSTRA DJEVIČANSKO MASLINOVO ULJE I BIOKEMIJSKI BILJEZI ATEROSKLEROZE U BOLESNIKA NA ANTIRETROVIRUSNOJ TERAPIJI

Sanja Kozić Dokmanović

Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb

S a ž e t a k

Bolesnici zaraženi HIV-om skloni su ranoj pojavi ateroskleroze zbog upale uzrokovane samim virusom, kao i zbog nuspojava antiretrovirusnog liječenja. Antiaterogeno djelovanje ekstra djevičanskog maslinovog ulja (EVOO) moglo bi umanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti u osoba zaraženih HIV-om. 39 HIV-om zaraženih muških ispitanika uključeno je u križni klinički pokus. Ispitanici su konzumirali EVOO i rafinirano maslinovo ulje (ROO) - placebo. Više od 50% ispitanika imalo je izražene čimbenike za aterosklerozu, a više od 90% ispitanika imalo je povećanu koncentraciju malondialdehida i povećanu katalitičku koncentraciju superoksid dismutaze. Udio rizičnih čimbenika znatno je veći u ispitanika koji se liječe inhibitorima proteaze ili abakavirom. Konzumacija ROO smanjila je koncentraciju malondialdehida za 18% u svih ispitanika, dok je konzumacija EVOO smanjila koncentracije hsCRP za 151% i brzinu sedimentacije eritrocita za 62% u ispitanika liječenih inhibitorima proteaze. Koncentracije hsCRP-a značajno su smanjene nakon konzumacije EVOO samo u ispitanika čija je suradljivost bila veća od 90%. Konzumacija maslinovih ulja nije smanjila rizik za koronarnu bolest srca i metabolički sindrom. Rizične čimbenike za kardiovaskularne bolesti potrebno je definirati i pratiti tijekom antiretrovirusnog liječenja. Učinkovitost EVOO trebalo bi potvrditi na većem broju ispitanika.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.
(120 stranica, 21 slika, 23 tablice, 148 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)
Ključne riječi: Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Virus humane imunodeficijencije, Upala, Biljezi ateroskleroze, Antiretrovirusno liječenje

Voditelji: Dr. sc. Josip Begovac, red. prof
Dr. sc. Nada Vrkić, docent
Ocjenjivači: Dr. sc. Jozsef Petrik, izv. prof.
Dr. sc. Renata Zrinski Topić, zn. sur.
Dr. sc. Željan Maleš, red. prof.
Dr. sc. Josip Begovac, red. prof
Dr. sc. Nada Vrkić, docent

Datum prihvaćanja rada: 25. siječnja 2012.

[Type text]

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Doctoral Thesis**

EXTRA VIRGIN OLIVE OIL AND ATHEROSCLEROSIS BIOMARKERS IN PATIENTS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY

Sanja Kozić Dokmanović

University hospital for infectious diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb

Summary

Premature atherosclerosis in HIV infected patients is associated with chronic infection by itself and side effects of antiretroviral therapy. Beneficial effect of extra virgin olive oil (EVOO) could decrease the risk for cardiovascular disease in HIV-infected patients. 39 HIV positive male participants were included in randomized crossover controlled trial. They consumed EVOO and refined olive oil (ROO) - placebo. The atherosclerosis risk factors were affected in more than 50% of participants receiving antiretroviral therapy. In more than 90% of participants malondialdehyde concentrations and superoxide dismutase cathalitic concentrations were increased. Risk factors were more affected in participants using protease inhibitors and abacavir containing antiretroviral therapy. After ROO administration, MDA concentration was 18% higher when compared to basic values. After EVOO administration, in participants using protease inhibitors containing antiretroviral therapy, erythrocyte sedimentation rate and hsCRP concentrations were 62% and 151% lower when compared to basic values, respectively. hsCRP concentrations showed a significant decrease after EVOO administration only in participants with >90% compliance. Olive oil consumption did not affect the risk for coronary heart disease and the metabolic syndrome diagnosis. Cardiovascular disease risk factors should be recognized and followed in all HIV patients receiving antiretroviral therapy. EVOO effects should be confirmed on a larger sample size.

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and University Library
(120 pages, 21 figures, 23 tables, 148 references, original in Croatian language)
Key words: Extra virgin olive oil, Human immunodeficiency virus, Inflammation, Atherosclerosis biomarkers, Antiretroviral therapy

Supervisor: Josip Begovac, Ph. D. Professor
Nada Vrkić, Ph. D. Assistant Professor
Reviewers: Jozsef Petrik, Ph. D. Associate Professor
Renata Zrinski Topić, Ph. D. Research Associate
Željan Maleš, Ph. D. Professor
Josip Begovac, Ph. D. Professor
Nada Vrkić, Ph. D. Assistant Professor

Thesis accepted: January 25. 2012.