

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Saška D. Đekić

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA AUTOANTITELA
IGG KLASA NA OKSIDOVANI LDL, LDL I
HDL SUBFRAKCIJA I PARAOKSONAZE 1
KOD BOLESNIKA SA AKUTNIM
INFARKTOM MIOKARDA SA
ELEVACIJOM ST SEGMENTA I
STABILNOM ANGINOM PEKTORIS**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Saška D. Đekić

**THE IMPORTANCE OF IGG CLASS
AUTOANTIBODIES TO OXIDIZED LDL,
LDL AND HDL SUBFRACTIONS AND
PARAOXONASE 1 DETERMINATION IN
PATIENTS WITH ST-SEGMENT
ELEVATION ACUTE MYOCARDIAL
INFARCTION AND STABLE ANGINA
PECTORIS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

dr Nataša Bogavac-Stanojević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

dr Aleksandar N. Nešković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Marija Zdravković, docent,
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Članovi komisije:

dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

dr Jelena Vekić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

dr Jerka Dumić, redovni profesor,
Sveučilište Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru istraživanja finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije kroz ugovor sa Univerzitetom u Beogradu - Farmaceutskim fakultetom broj: 451-03-47/2023-01/200161 na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Uzorci su sakupljeni u Kliničko-bolničkom centru "Bežanijska kosa" i Kliničko-bolničkom centru "Zemun" u Beogradu.

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Ovom prilikom želela bih da se zahvalim sledećim osobama:

Prvo i pre svih, mentoru prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević beskrajno sam zahvalna na uvođenju u naučnoistraživački rad, neprocenjivoj pomoći pri statističkoj obradi podataka i tumačenju rezultata, kao i na profesionalnom vođenju svih aspekata izrade doktorske disertacije s neuporedivim entuzijazmom, energijom i posvećenošću.

Mentoru prof. dr Aleksandru N. Neškoviću srdačno se zahvaljujem na ukazanom poverenju, stručnosti i korisnim savetima koje mi je pružao prilikom pisanja teze.

Mentoru doc. dr Mariji Zdravković dugujem zahvalnost za ukazano poverenje i dodatnu pomoć prilikom odabira pacijenata za istraživanje i sakupljanja uzoraka.

Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević posebno sam zahvalna na nesebičnoj pomoći tokom statističke obrade podataka i kritičkoj oceni teze.

Prof. dr Jeleni Vekić najiskrenije se zahvaljujem na bezrezervnoj podršci i pomoći tokom celokupnog toka istraživačkog procesa. Ne postoje reči hvale za nesebičnost i otvorenost koju je pokazala dok mi je prenosila svoju stručnost i mišljenja, naročito tokom formulisanja odgovora na mnogobrojna pitanja i zahteve recenzenata.

Prof. dr Jerki Dumić sa Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu srdačno sam zahvalna za stručnu pomoć i korisne primedbe tokom pisanja teze do njenog konačnog oblika.

Čitavom timu Katedre za Medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu veliko hvala na predivnoj saradnji, predusretljivosti i gostoprimstvu tokom eksperimentalne faze rada.

Kolektivu Opšte bolnice „Medigroup“ i Kliničko-bolničkih centara „Zemun“ i „Bežanijska Kosa“ u Beogradu dugujem zahvalnost za sakupljanje uzoraka i pomoć prilikom eksperimentalnog dela rada.

Mome suprugu Saši neizmerno sam zahvalna na izvanrednom instinktu, razumevanju i poštovanju mojih želja i dugogodišnjoj veri u mene i moje sposobnosti. Iskrene reči hvale upućujem mu i za veliku pomoć pri obradi slika i grafika tokom izrade teze.

Mojim sinovima Alekseju i Nikolaju iskazujem posebnu zahvalnost za strpljenje i podršku s jedne strane i neiscrpnu dovitljivost i upornost u odvlačenju moje pažnje prilikom pisanja teze s druge strane, što je sve zajedno za mene nepresušan izvor snage i inspiracije.

I na kraju, mojoj majci Milijani koja nažalost nije dočekala da ova teza ugleda svetlost dana, želim da iskažem najdublju zahvalnost za celoživotnu bezgraničnu ljubav i podršku na toliko mnogo različitih frontova. Rečima se ne može izraziti poštovanje koje osećam zbog svega što je učinila za mene i sestru u borbi da nas izvede na pravi put... Zato ovu disertaciju posvećujem njoj.

SKRAĆENICE U TEKSTU

ABCA1 transporter - ATP-vezujući kasetni transporter klase A1 (engl. *ATP binding cassette transporter A1*)

ACC - Američko udruženje kardiologa (engl. *American College of Cardiology*)

AHA - Američko udruženje za srce (engl. *American Heart Association*)

AIM - Akutni infarkt miokarda

AKS - Akutni koronarni sindrom

ANCOVA - Analiza kovarijanse

ANOVA - Analiza varijanse

AP - Angina pectoris

apoA-I- Apolipoprotein A-I

apoA-II - Apolipoprotein A-II

apoB-100 - Apolipoprotein B-100

apoE - Apolipoprotein E

APS - Amonijum-persulfat

BMI - Indeks telesne mase (engl. *body mass index*)

CETP- Holesterol-estar transferni protein (engl. *cholesteryl ester transfer protein*)

CRP - C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*)

CV - Koeficijent varijacije

DAMP - Molekularni obrasci povezani sa oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)

DM - *Diabetes mellitus*

EAS - Evropsko udruženje za aterosklerozu (engl. *European Atherosclerosis Society*)

EDTA - Etilendiaminotetrasirćetna kiselina

ELISA - Enzimski imunoesej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPIC-Norfolk studija - *European Prospective Investigation into Cancer Study*

ESC - Evropsko udruženje kardiologa (engl. *European Society of Cardiology*)

FHS studija - *Framingham Heart Study*

GMĆ - Glatke mišićne ćelije

GRACE skor - *Global Registry of Acute Coronary Events score*

GSP_x - Glutation-selenoperoksidaza

HDL- Lipoproteini visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein*)

HDL-h - Holesterol u lipoproteinima visoke gustine

HL - Hepatična lipaza

hsCRP - Visokoosetljivi C-reaktivni protein (engl. *high-sensitive C-reactive protein*)

HTA - Arterijska hipertenzija

IBS - Ishemijska bolest srca

IDL - Lipoproteini srednje gustine (engl. *intermediate-density lipoprotein*)

IgG anti-oxLDL antitela - autoantitela IgG klase na oxLDL

IL-1 - Interleukin-1

IL-1 β - Interleukin-1 beta

IL-6 - Interleukin-6

IL-18 - Interleukin-18

KAB - Koronarna arterijska bolest

KG - Kontrolna grupa

KVB - Kardiovaskularne bolesti

LCAT - Lecitin-holesterol aciltransferaza (engl. *lecithin-cholesterol acyl transferase*)

LDL - Lipoproteini niske gustine (engl. *low-density lipoprotein*)

LDL-h - Holesterol u lipoproteinima niske gustine
 LDL-R - Receptori za LDL
 MCP-1 - Monocitni hemoatraktantni protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)
 M-CSF - Faktor stimulacije kolonije monocita (engl. *monocyte-colony stimulating factor*)
 MDA – Malondialdehid
 Me - Medijana
 MMP - Matriks metaloproteinaze
 MPO - Mijeloperoksidaza
 NCEP ATP III - Nacionalni program za edukaciju o holesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*)
 NF-κB - Nuklearni faktor kapa B
 NSAP - Nestabilna angina pektoris
 NSTEMI - Infarkt miokarda bez elevacije ST segmenta (engl. *non-ST-elevation myocardial infarction*)
 OSE - Epitopi specifični za oksidaciju (engl. *oxidation-specific epitope*)
 oxLDL - Oksidovani lipoprotein niske gustine
 oxLDL-IC - Cirkulišući imunski kompleksi oxLDL i antitela
 PAF-AH - Acetilhidrolaza faktora aktivacije trombocita
 PAMP - Molekularni obrasci povezani sa patogenom (engl. *pathogen-associated molecular patterns*)
 PCI - Perkutana koronarna intervencija (engl. *percutaneous coronary intervention*)
 PI3K/Akt - Fosfatidil-inozitol-3-kinaza aktivacija (engl. *phosphatidyl-inositol-3-kinase*)
 PKC - Protein kinaza C
 PON1 - Paraoksonaza 1
 PRR - Receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*)
 PTX3 - Pentraksin 3 (engl. *pentraxin 3*)
 ROS – Reaktivna kiseonična jedinjenja (engl. *reactive oxygen species*)
 RTH - Reverzni transport holesterola
 SAA - Serumski amiloid A
 SAP - Stabilna angina pektoris
 SCORE 2 - *Systematic Coronary Risk Estimation 2*
 Sd - Standardna devijacija
 SYNTAX skor - *Synergy between Percutaneous Coronary Intervention with Taxus and Cardiac Surgery score*
 sdLDL- Male guste LDL čestice (engl. *small, dense low-density lipoprotein*)
 SR - Scavenger receptor
 SR-B1 - Scavenger receptor klase B1 (engl. *scavenger receptor class B type 1*)
 STEMI - infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta (engl. *ST-elevation myocardial infarction*)
 TBA - Tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)
 TEMED - Tetrametilen-diamin
 TF - Tkivni faktor (engl. *tissue factor*)
 TG - Trigliceridi
 TIMI skor - *Thrombolysis in myocardial infarction score*
 TLR4 - *Toll-like receptor 4*
 TXA2 - Tromboksan A2
 UH - Ukupni holesterol
 VCAM-1 - Vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*)
 VLDL - Lipoproteini veoma niske gustine (engl. *very-low-density lipoprotein*)

Značaj određivanja autoantitela IgG klase na oksidovani LDL, LDL i HDL subfrakcija i paraoksonaze 1 kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta i stabilnom anginom pectoris

Sažetak

Poznato je da u nastanku i progresiji ateroskleroze, koja predstavlja patofiziološku osnovu koronarne arterijske bolesti (KAB), važnu ulogu ima interakcija dislipidemije, oksidativnog stresa, imunskih i inflamatornih procesa, što dovodi do okluzije koronarnih arterija i razvoja akutnog koronarnog sindroma koji se najčešće manifestuje u vidu infarkta miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI). I dalje se traga za novim biomarkerima koji bi bili od pomoći u proceni obima ishemije miokarda, mogućih komplikacija i ishoda bolesti. Svrha ove studije bila je da se kod STEMI bolesnika (N=69) i bolesnika sa stabilnom anginom pectoris (SAP) (N=21) u odnosu na zdrave kontrolne osobe (N=67) izvrši: ispitivanje koncentracije autoantitela IgG klase na oksidovani LDL (IgG anti-oxLDL antitela), pentraksina 3 (PTX3) i malondialdehida (MDA); procena prognostičke sposobnosti IgG anti-oxLDL antitela i veličine HDL i LDL čestica u predviđanju ishoda bolesti kvantifikovane SYNTAX skorom; ispitivanje zastupljenosti rizičnih fenotipova HDL i LDL subfrakcija i njihov uticaj na koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, parametre inflamacije i lipidne peroksidacije; analiza aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1) u serumu, njene distribucije na HDL subfrakcijama i njihove povezanosti sa parametrima lipidnog statusa, lipidne peroksidacije i inflamacije. Rezultati trenutne studije su pokazali veću zastupljenost rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa kod SAP i STEMI bolesnika u poređenju sa zdravim osobama. Dokazan je i uticaj rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa na porast koncentracije PTX3 kod STEMI bolesnika, što ukazuje na sinergističko delovanje dislipidemije i inflamacije u progresiji KAB. Takođe, zapažen je i uticaj rizičnog fenotipa na nivoe IgG anti-oxLDL antitela kod zdravih osoba, čime je podržan koncept o dvojnoj ulozi ovih antitela: protektivnoj kod zdravih osoba i proaterogenoj kod bolesnika sa KAB. Uprkos nađenoj razlici u nivoima IgG anti-oxLDL antitela između STEMI bolesnika sa različitim SYNTAX skorom, logističkom regresionom analizom nije potvrđena prediktivna vrednost ovih antitela za težinu i ishod bolesti. U grupi STEMI bolesnika nađeni su manji udeo i smanjena arilesterazna aktivnost PON1 unutar malih HDL 3 subfrakcija izazvani uzajamnim dejstvom dislipidemije, inflamacije i oksidativnog stresa. Kao značajan nezavisni prediktor umerenog rizika u odnosu na SYNTAX skor identifikovan je dijametar LDL čestica. Konačno, rezultati studije su pokazali da je identifikacija STEMI bolesnika sa umerenim rizikom u odnosu na SYNTAX skor korisna u stratifikaciji rizika, terapijskom pristupu i praćenju pacijenata nakon bolničkog otpusta.

Ključne reči: akutni infarkta miokarda sa elevacijom ST segmenta, paraoksonaza 1, HDL i LDL subfrakcije, IgG anti-oxLDL antitela,

Naučna oblast: Medicinske nauke - Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

The importance of IgG class autoantibodies to oxidized LDL, LDL, and HDL subfractions and paraoxonase 1 determination in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction and stable angina pectoris

Abstract

It is known that the interaction of dyslipidemia, oxidative stress, immune and inflammatory processes plays an important role in the development and progression of atherosclerosis. Atherosclerosis is the pathophysiological basis of coronary artery disease (CAD), that leads to the occlusion of coronary arteries and the development of acute coronary syndrome, which is most often manifested in the form of ST-segment elevation acute myocardial infarction (STEMI). However, new biomarkers that would help assess the extent of myocardial ischemia, possible complications, and disease outcomes are still being sought. This study aimed to investigate the concentration of IgG class autoantibodies to oxidized LDL (IgG anti-oxLDL antibodies), pentraxin 3 (PTX3) and malondialdehyde (MDA) in STEMI patients (N=69) and patients with stable angina pectoris (SAP) (N=21) compared to healthy control subjects (N=67); to evaluate the predictive ability of IgG anti-oxLDL antibodies and the size of HDL and LDL particles for the disease outcome quantified by the SYNTAX score; to examine the presence of risk phenotypes of HDL and LDL subfractions and their influence on IgG anti-oxLDL antibody concentrations, parameters of inflammation and lipid peroxidation; to analyze paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, its distribution on HDL subfractions and their association with parameters of lipid status, lipid peroxidation and inflammation. The results of the current study showed a higher prevalence of risk HDL 3 and LDL B phenotypes in SAP and STEMI patients compared to healthy controls. The risk HDL and LDL phenotype influenced the increase in the concentration of pentraxin 3, confirming the synergistic action of dyslipidemia and inflammation in the progression of CAD. This phenotype, also, had an impact on the levels of IgG anti-oxLDL antibodies among healthy individuals, supporting the concept of a dual role of these antibodies: protective in healthy subjects and proatherogenic in patients with CAD. Despite the difference found in the levels of IgG anti-oxLDL antibodies between STEMI patients with different SYNTAX scores, logistic regression analysis did not confirm the predictive value of these antibodies, but a smaller diameter of LDL particles was identified as a significant independent predictor. In the STEMI group, a smaller proportion and reduced arylesterase activity of PON1 within small HDL 3 subfractions were found, suggesting the interaction of dyslipidemia, inflammation, and oxidative stress. Finally, the results of this study showed that the identification of STEMI patients with an intermediate to high SYNTAX score and a smaller LDL diameter is useful in risk stratification, therapeutic approach, and follow-up of patients after hospital discharge.

Keywords: ST-segment elevation acute myocardial infarction, paraoxonase 1, HDL and LDL subfractions, IgG anti-oxLDL antibodies

Scientific field: Medical sciences - Pharmacy

Scientific subfield: Medical biochemistry

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Etiopatogeneza ateroskleroze i faktori rizika	1
1.2.	Dislipidemija i ateroskleroza	3
1.2.1.	HDL čestice: heterogenost i antiaterogena svojstva	4
1.2.1.1.	HDL subfrakcije i ateroskleroza	6
1.2.2.	PON1: uloge i distribucija unutar HDL subfrakcija	7
1.2.3.	LDL čestice: heterogenost i struktura	8
1.2.3.1.	SdLDL čestice: nastanak i mehanizmi aterogenosti	8
1.2.3.2.	OxLDL: nastanak i mehanizmi aterogenosti	11
1.2.3.3.	OxLDL i imunski procesi	12
1.2.4.	Anti-oxLDL antitela i ateroskleroza	12
1.3.	Markeri inflamacija i ateroskleroza	14
2.	CILJEVI	15
3.	MATERIJAL I METODE	16
3.1.	Ispitanici	16
3.2.	Uzorci	17
3.3.	Metode	17
3.3.1.	Metode za određivanje koncentracije rutinskih biokemijskih parametara	17
3.3.2.	Metode za određivanje markera inflamacije	17
3.3.3.	Metoda za određivanje koncentracije MDA	18
3.3.4.	Metoda za određivanje koncentracije IgG anti-oxLDL antitela	18
3.3.4.1.	Princip metode	18
3.3.4.2.	Karakteristike testa	19
3.3.4.3.	Materijal i oprema	19
3.3.4.4.	Priprema odgovarajućeg razblaženja i izvođenje postupka	19
3.3.4.5.	Konstruisanje standardne krive	20
3.3.5.	Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija	20
3.3.5.1.	Izliivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova	21
3.3.5.2.	Izvođenje gradijent-gel elektroforeze	21
3.3.5.3.	Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija	22
3.3.6.	Metode za određivanje paraoksonazne aktivnosti PON1 i relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 u različitim HDL subfrakcijama	23
3.3.6.1.	Određivanje paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu	23
3.3.6.2.	Određivanje relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama	23
3.4.	Statistička analiza	24
4.	REZULTATI	25
4.1.	Analiza raspodele HDL i LDL subfrakcija, koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, PTX3, MDA i aktivnosti PON1 kod KG, SAP i STEMI ispitanika	25
4.1.1.	Demografske karakteristike i osnovni biokemijski parametri u tri ispitivane grupe	25

4.1.2.	Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije u tri ispitivane grupe	28
4.1.3.	Veličina i zastupljenost HDL i LDL subfrakcija i paraoksonazna aktivnost PON1 u tri ispitivane grupe	30
4.1.4.	Distribucija HDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika	33
4.1.5.	Distribucija HDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja	34
4.1.6.	Distribucija LDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja	35
4.2.	Ispitivanje uticaja rizičnih fenotipova HDL i LDL čestica na serumske koncentracije IgG anti-oxLDL antitela i na parametre inflamacije i lipidne peroksidacije	36
4.2.1.	Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod ispitanika KG u odnosu na HDL i LDL fenotipove	36
4.2.2.	Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG u odnosu na HDL i LDL fenotipove	37
4.2.3.	Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u odnosu na HDL i LDL fenotipove	38
4.2.4.	Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u odnosu na HDL i LDL fenotipove	39
4.3.	Procena prognostičke sposobnosti IgG anti-oxLDL antitela i veličine HDL i LDL čestica u predviđanju ishoda i težine bolesti kvantifikovane SYNTAX skorom	40
4.3.1.	Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor	41
4.3.2.	Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor	41
4.3.3.	Veličina i zastupljenost HDL i LDL subfrakcija kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor	42
4.3.4.	Analiza povezanosti LDL dijametara i koncentracije IgG anti-oxLDL antitela sa SYNTAX skorom	43
4.4.	Analiza aktivnosti PON1 u serumu, distribucije PON1 unutar HDL subfrakcija i njihove povezanosti sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije	44
4.4.1.	Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika	44
4.4.2.	Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja	45
4.4.3.	Ispitivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG	46
4.4.4.	Ispitivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika	47
4.4.5.	Analiza nezavisnog uticaja parametara lipidnog statusa, inflamacije i lipidne peroksidacije na distribuciju PON1 unutar HDL subfrakcija	49
4.4.6.	Ispitivanje povezanosti paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG	49

4.4.7.	Ispitivanje povezanosti paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika	51
4.5.	Udeo HDL subfrakcija i PON1 na HDL subfrakcijama u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL	52
4.5.1.	Udeo HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL	52
4.5.2.	Udeo PON1 na HDL subfrakcijama u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL	53
5.	DISKUSIJA	55
6.	ZAKLJUČCI	64
7.	LITERATURA	65

1. UVOD

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju veliku i heterogenu grupu oboljenja među kojima je najčešća ishemijska bolest srca (IBS) sa svoja četiri klinička oblika: anginom pektoris (AP), akutnim infarktom miokarda (AIM), iznenadnom srčanom smrtnosti i ishemijskom kardiomiopatijom (1). IBS nastaje kao posledica ateroskleroze u koronarnim arterijama, te se još označava i kao koronarna arterijska bolest (KAB). Svake godine u svetu od KVB umre preko 17 miliona stanovnika, dok samo od AIM oboli preko 6 miliona, od čega se smrtni ishod javlja kod približno 25% slučajeva. Prema tome, uočava se da KVB čine vodeći uzrok smrtnosti kako u svetu, tako i kod nas. Najteži oblik KAB je akutni koronarni sindrom (AKS) koji obuhvata spektar događaja u rasponu od nestabilne angine pektoris (NSAP) do AIM koji se može javiti sa elevacijom ST segmenta (engl. *ST-elevation myocardial infarction*, STEMI) ili bez elevacije ST segmenta (engl. *non-ST-elevation myocardial infarction*, NSTEMI). AKS predstavlja jedan od najčešćih uzroka hitnog prijema i iznenadne smrtnosti u razvijenim delovima sveta, a poslednjih decenija i u zemljama u razvoju (2). Zbog svega navedenog, potpuno je razumljivo što su brojne epidemiološke studije, među kojima je najpoznatija prospektivna Framingamska studija (engl. *Framingham Heart Study*, FHS), odigrale važnu ulogu u rasvetljavanju predisponirajućih faktora rizika za razvoj KVB i istakle značaj prevencije i ranog prepoznavanja ovih bolesti (3,4). S tim u vezi, brojni vodiči definišu načine implementacije preventivnih mera, pa tako evropski vodič za prevenciju KVB (engl. *European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice*) ističe da prevenciju treba sprovesti kako na nivou opšte populacije, promovisanjem zdravog načina života, tako i na individualnom nivou kod pacijenata sa umerenim do visokim rizikom od KVB, i/ili kod pacijenata sa dijagnostikovanom KVB, eliminacijom nezdravog načina života i optimizacijom faktora rizika (5). I pored definisanih preporuka, poražavajuća je činjenica da veliki broj osoba kod kojih se javi KVB nema nijedan, ili ima samo jedan od tradicionalnih faktora rizika, što neminovno iziskuje potrebu za dodatnim istraživanjima postojećih i uvođenjem novih, efikasnijih biohemijskih markera za predviđanje kardiovaskularnog rizika.

1.1. Etiopatogeneza ateroskleroze i faktori rizika

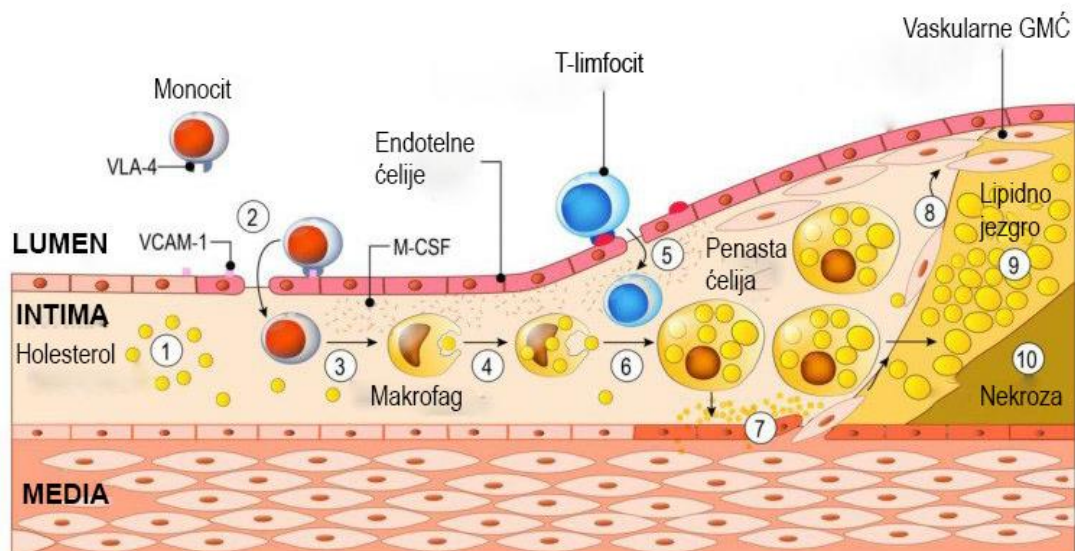
Patofiziološku osnovu IBS čini ateroskleroza, čiji razvoj počinje praktično od rođenja, ima dugu asimptomatsku fazu i napreduje do odraslog doba, a pod uticajem genetskih faktora i faktora okoline. Po pravilu, ateroskleroza ostaje neotkrivena sve do kliničkog ispoljavanja komplikacija poput hemodinamski značajne stenoze krvnih sudova, hemoragije, tromboze, embolije i dr., te joj se s pravom pridaje veliki značaj na svim nivoima medicinskih istraživanja, a prevencija njenog nastanka i usporavanje njene progresije predstavljaju jedan od osnovnih ciljeva savremene medicine (6).

Ateroskleroza se definiše kao multifaktorijalno, sistemsko, hronično, progresivno, inflamatorno oboljenje zidova velikih i srednjih arterija okarakterisano endotelnom disfunkcijom, vaskularnom inflamacijom i akumulacijom lipida i komponenti ekstracelularnog matriksa u intimi arterija, što rezultira formiranjem aterosklerotskog plaka, koji dovodi do postupnog suženja lumena arterija i otežanog protoka krvi do tkiva (7). Prema savremenom konceptu, ateroskleroza predstavlja inflamatorni odgovor na oštećenje endotela izazvano istovremenom interakcijom više faktora rizika, među kojima dislipidemija i oksidativni stres imaju glavnu ulogu (8). Dislipidemija i oksidativni stres deluju sinergistički u održavanju inflamacije tokom progresije ateroskleroze (9), a njihova interakcija se prvenstveno manifestuje promenama u strukturi i kvalitetu lipoproteinskih čestica, što dalje utiče na funkcionalne karakteristike, a samim tim i na ulogu lipoproteinskih čestica u aterogenezi (10). Pored tradicionalnih faktora rizika u koje spadaju:

1. promenljivi faktori kao što su: loše životne navike - pušenje, fizička neaktivnost, prekomerno konzumiranje alkohola, aterogena ishrana, prisustvo bolesti - *Diabetes mellitus* (DM), arterijska hipertenzija (HTA), gojaznost itd.
 2. nepromenljivi faktori: pol, starost, rasa, pozitivna porodična anamneza,
- sve je više dokaza da su i drugi tzv. pridruženi faktori rizika: lipoprotein (a), homocistein, protrombotski i proinflamatorni faktori značajni za razvoj i progresiju ateroskleroze (11-14). Karakteristično je da dugotrajna izloženost brojnim faktorima rizika izaziva ciklične promene oštećenja i reparacije, koje posle određenog vremena, kumulativnim efektom dovode do pojave tromboze, okluzije i rupture arterije.

Kao odgovor na oštećenje endotela, povećava se ekspresija različitih molekula odgovornih za hemotaksu i adheziju leukocita iz krvi na aktivirani endotel, pri čemu dolazi do migracije adheriranih leukocita ka intimi i njihove akumulacije u subendotelnom prostoru (15,16). Aktivacija endotela dovodi i do prodora monocita u subendotelni prostor i njihove diferencijacije u tkivne makrofage, koje kasnije vrše preuzimanje velikih količina lipidnih komponenti transformišući se u penaste ćelije. Ključni događaj u nastanku ranih aterosklerotskih lezija predstavlja stvaranje modifikovanih formi lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) i njihovo prepoznavanje i preuzimanje od strane makrofaga. Rana inflamatorna reakcija endotela, poznata i kao endotelna disfunkcija, najverovatnije se odvija uz pomoć klasičnih faktora rizika, pre svega povišenog holesterola u lipoproteinima niske gustine (LDL-h). Poznato je da u stanju endotelne disfunkcije postoje smanjen antioksidativni kapacitet subendotela i pojačana produkcija reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji dovode do oksidativne modifikacije LDL čestica. Slične modifikacije se ostvaruju i drugim mehanizmima kao što su: glikacija, acetilacija i agregacija. Oksidacija, koja se može odvijati preko enzimskih ili neenzimskih mehanizama, najčešća je i najviše istraživana modifikacija LDL čestica koja rezultira nastankom oksidovanog LDL (oxLDL). OxLDL se vezuju za receptore „hvatače“ (engl. *scavenger receptors*, SR) na površini makrofaga, pri čemu dolazi do nekontrolisanog preuzimanja prekomerne količine holesterola iz oxLDL i njegove akumulacije u makrofagama. SR receptori koji posreduju u preuzimanju modifikovanih LDL čestica ne funkcionišu po principu negativne povratne sprege, te i kada se akumulira velika količina lipidnih partikula u ćeliji, ona nastavlja da ih i dalje preuzima. Na ovakav način nastaju ćelije prekomerno opterećene lipidima, koje su zbog specifičnog izgleda nazvane penaste ćelije, a karakteristične su za ranu fazu nastanka aterosklerotskog plaka (13,17,18). Kako lezija dalje napreduje, dolazi do oslobađanja faktora rasta od strane monocita, trombocita i endotelne ćelije, zatim do migracije i proliferacije glatkih mišićnih ćelija (GMC) iz medije u intimu, kao i do pojačane sinteze komponenti ekstracelularnog matriksa: kolagena, elastina i proteoglikana. U ovom stadijumu proces ateroskleroze je još uvek reverzibilan (19).

Evoluciju aterosklerotskog plaka karakteriše njegovo postepeno povećanje tokom vremena usled akumulacije penastih ćelija. Plak koji se postepeno povećava može izazvati hroničnu stabilnu anginu pectoris (SAP), dok se AIM često javlja unutar krvnih sudova sa relativno neupadljivim suženjem, što sugerise da brzo rastući plakovi mogu prouzrokovati AIM. S druge strane, sporo rastući plakovi se odlikuju postepenom akumulacijom lipida unutar penastih ćelija i generalno nisu skloni iznenadnoj disrupciji sa pridruženom aktivacijom koagulacije. Za prognozu sudbine plaka, bitan je odnos veličine lipidnog jezgra i debljine fibrozne kape, pri čemu debljina fibrozne kape predstavlja indikator vulnerabilnosti plaka. Veliko lipidno jezgro, velika gustina makrofaga i tanka fibrozna kapa visoko su rizični za rupturu plaka, pri čemu je predilekciono mesto za rupturu rubni region plaka, gde je fibrozna kapa najtanja i infiltrirana makrofagama. Ruptura plaka praćena je adhezijom trombocita i formiranjem tromba, tako da se nakon dezintegracije fibrozne kape može javiti iznenadna tromboza zbog promena u funkciji trombocita, koagulaciji i fibrinolizi. Upravo proces tromboze predstavlja krajnju komplikaciju ateroskleroze, koja se klinički može manifestovati kao: koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest i periferna vaskularna bolest. Specifičnost arterijske tromboze ogleda se u tome što se ona uvek nadovezuje na oštećenje zida krvnog suda, a počinje adhezijom i agregacijom trombocita, na koje se nastavlja aktivacija sistema koagulacije (13,14,19-21). Na Slici 1. prikazana je patogeneza ateroskleroze.



Slika 1. Šema aterogeneze

OxLDL indukuje aktivaciju endotelne ćelije i ekspresiju različitih leukocitnih adhezionih molekula (kao što je VCAM-1) i posleđično adheziju monocita na endotel (1,2); Sledi naknadna transmigracija monocita u intimu gde se diferenciraju u makrofage (3,4); T-limfociti se pridružuju makrofagama u intimi tokom procesa evolucije plaka (5); Makrofage u koje se inkorporiraju modifikovani lipoproteini transformišu se u penaste ćelije bogate lipidima (6); Inflamatorni odgovor stimuliše migraciju i replikaciju vaskularnih GMĆ koje se akumuliraju u plaku i formiraju fibroproliferativnu leziju (7,8); Makrofage u plaku ispoljavaju abnormalni metabolizam lipida sa smanjenim efluksom holesterola (9) što dovodi do akumulacije apoptotičnih tela i nekrotičnih ostataka formirajući nekrotično jezgro (10);

Skraćenice: GMĆ - glatke mišićne ćelije; M-CSF - faktor stimulacije kolonije monocita (engl. monocyte-colony stimulating factor); VCAM-1 - vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (engl. vascular cell adhesion molecule-1)

(Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz: Minelli S, Minelli P, Montinari MR. Reflections on: Lesson from the past and future research directions. J Multidiscip Healthc 2020;13:621.)

1.2. Dislipidemija i ateroskleroza

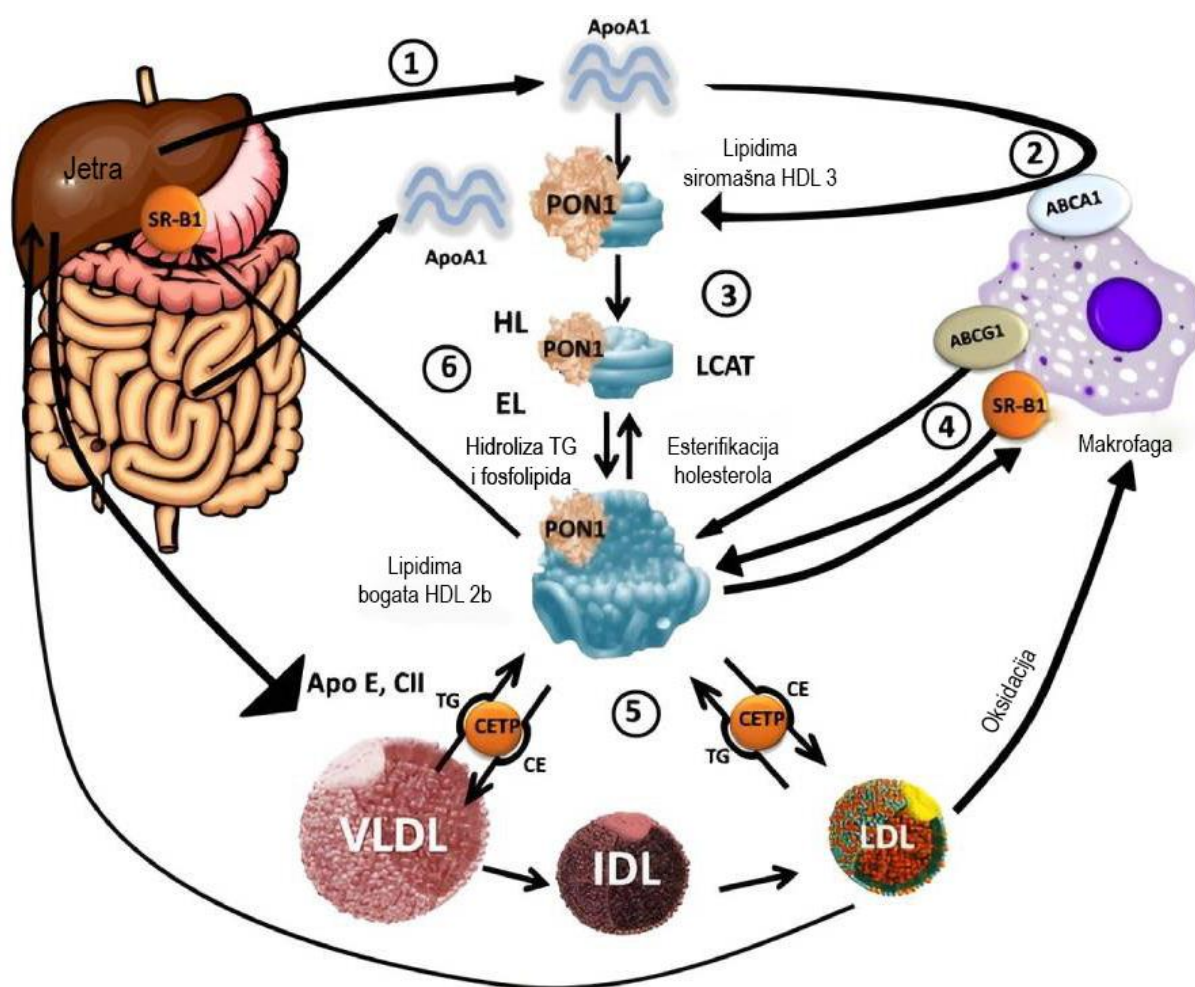
Uprkos činjenici da je ateroskleroza kompleksna bolest sa brojnim predisponirajućim faktorima, i dalje se centralna uloga pripisuje dislipidemijama, za koje je dokazano da predstavljaju najvažniji faktor rizika, jer se upravo holesterol deponuje u zidovima krvnih sudova (22). Za pacijente sa aterosklerozom karakteristično je postojanje tzv. „aterogene lipidne trijade“ ili „aterogenog lipoproteinskog fenotipa“ što obuhvata: povišenu koncentraciju triglicerida (TG), sniženu koncentraciju holesterola u lipoproteinima visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*, HDL-h) i prisustvo malih, gustih LDL čestica (engl. *small, dense low-density lipoprotein*, sdLDL). Kako je nedvosmisleno dokazano da su visoke plazmatske koncentracije TG, ukupnog holesterola (UH) i LDL-h, kao i niske koncentracije HDL-h ključni inicijalni faktori u nastanku i razvoju ateroskleroze, prve preporuke nacionalnog programa za edukaciju o holesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III –NCEP ATP III*) bile su zanovane na određivanju koncentracija upravo ovih parametara, kao osnovnih parametara neophodnih za predikciju, dijagnostikovanje i praćenje terapije IBS (12,23). Međutim, najnovije SCORE 2 smernice preporučuju upotrebu modela za predviđanje individualnog desetogodišnjeg rizika koji integriše informacije o nekoliko konvencionalnih faktora kardiovaskularnog rizika u cilju identifikacije osoba sa povećanim rizikom od KVB koje bi trebalo da imaju najviše koristi od preventivnih aktivnosti (24).

Uloga lipida u nastanku i progresiji ateroskleroze obavezno se povezuje sa poremećajima metabolizma lipoproteina, jer se sve lipidne komponente (holesterol, TG i fosfolipidi) nalaze u sklopu lipoproteinskih čestica zajedno sa apolipoproteinima. Stoga se pored osnovnih lipidnih parametara, preporučuje i određivanje koncentracije proteinskih komponenti lipoproteina: apolipoproteina B-100 (apoB-100), kao proaterogenog i apolipoproteina A-I (apoA-I), kao antiaterogenog apolipoproteina (2,23).

Rezultati dosadašnjih istraživanja sugerišu da se kardiovaskularni rizik ne može adekvatno proceniti samo na osnovu parametara standardnog lipidnog profila (UH, TG, HDL-h i LDL-h), te jasno ukazuju da pored kvantitativnih karakteristika, uvid u kvalitativne osobine lipoproteinskih čestica pruža dodatne prognostičke informacije (23). U tom smislu, nalaz proaterogenog lipoproteinskog profila udružen je sa visokim rizikom za razvoj KVB. Osnovne karakteristike ovog profila su: povećanje broja malih, gustih LDL čestica čiji je dijametar $\leq 25,5$ nm (LDL B fenotip), odnosno prisustvo malih, disfunkcionalnih lipoproteina visoke gustine (*engl. high-density lipoprotein*, HDL), dijametra $\leq 8,8$ nm (fenotip malih HDL čestica ili HDL 3 fenotip).

1.2.1. HDL čestice: heterogenost i antiaterogena svojstva

HDL je najmanja lipoproteinska čestica sa najvećom gustinom jer se odlikuje visokim sadržajem proteina. Najzastupljeniji apolipoprotein HDL čestice je apoA-I koji čini 70% sadržaja proteina, zatim sledi apoA-II koji čini 20% sadržaja proteina, dok preostalih 10% čine: apoE, apoA-IV, apoA-V, apoJ, apoC-I, apoC-II i apoC-III (25). Sadržaj lipida utiče na oblik HDL čestice, pa tako diskoidne HDL čestice, koje su manje, uglavnom sadrže slobodan holesterol i fosfolipide, dok veće, sferne HDL čestice sadrže esterifikovani holesterol i TG. Dijametar HDL čestica iznosi od 7 do 12 nm, pri čemu se u male čestice ubrajaju one sa dijametrom $\leq 8,8$ nm (26,27). HDL čestice se odlikuju velikom heterogenošću u pogledu fizičko-hemijskih svojstava, metabolizma i biološke aktivnosti (28-30) koja je izražena postojanjem ukupno 5 subfrakcija: velikih HDL 2 (HDL 2b i HDL 2a) i malih HDL 3 (HDL 3a, HDL 3b, HDL 3c), različitog oblika, veličine, gustine i naelektrisanja. Heterogenost HDL čestica proizilazi iz njihovog stalnog intravaskularnog remodelovanja tokom procesa reverznog transporta holesterola (RTH) prikazanog na Slici 2.



Slika 2. HDL sazrevanje i RTH

ApoA-I se sintetiše u jetri i crevima (1); ABCA1 transporter prenosi kolesterol i fosfolipide na apoA-I HDL 3 čestice siromašne lipidima formirajući preß HDL (2); LCAT stimuliše sazrevanje HDL čestica prevođenjem slobodnog holesterola u hidrofobne CE koji se izdvajaju u jezgru HDL čestice čime se ona uvećava i sazreva do HDL 2 (3); HDL 2 mobilise više holesterola iz makrofaga i drugih ćelija posredstvom receptora SR-B1 i ABCG1 transportera. SR-B1 vezuje veće HDL čestice i formira kompleks koji omogućava efluks holesterola u HDL. SR-B1 olakšava dvosmerni tok holesterola i dozvoljava HDL-h da uđe u ćelije. ABCG1 je intracelularni transporter koji preuređuje molekule holesterola u plazma membrani i time olakšava njegovu apsorpciju (4); Zrele HDL 2 čestice su supstrat za CETP, protein koji vrši prenošenje CE i TG između HDL, VLDL i LDL (5), Dve lipaze: EL i HL imaju važne uloge u metabolizmu HDL. EL ima izraženu aktivnost fosfolipaze A1 i učestvuje u remodelovanju HDL u male česticw, dok je HL efikasnija u hidrolizi TG (6)

Skraćenice: ABCA1 transporter - ATP binding cassette transporter A1; ABCG1 transporter - ATP binding cassette transporter G1; ApoA-I - apolipoprotein A-I; Apo C-II - apolipoprotein C-II; Apo E - apolipoprotein E; CE - holesterol-estar; CETP - holesterol-estar transferni protein (engl. cholesteryl ester transfer protein); EL - endotelna lipaza; HDL - lipoprotein visoke gustine (engl. high-density lipoprotein); HL - hepatična lipaza; IDL - lipoprotein srednje gustine (engl. intermediate-density lipoprotein); LCAT - lecitin-holesterol acil transferaze (engl. lecithin-cholesterol acyl transferase); LDL - lipoprotein niske gustine (engl. low-density lipoprotein); PON1 - paraoksonaza 1; SR-B1 - receptori „hvatači“ klase B tip 1 (engl. scavenger receptor class B type 1); TG - trigliceridi; VLDL - lipoprotein veoma niske gustine (engl. very-low-density lipoprotein)

(Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz: Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. Clin Chim Acta 2015;439:5-13.)

Upravo kroz RTH od perifernih tkiva do jetre gde se holesterol metaboliše u žučne kiseline i izlučuje putem žuči i fecesa, HDL čestice ostvaruju svoju najvažniju ulogu - ateroprotektivnu ulogu. Na početku ovog intravaskularnog metabolizma u jetri i intestinumu dolazi do sinteze i

sekrecije nascentnog, diskoidnog HDL koji sadrži apoA-I. ApoA-I migrira do perifernih tkiva gde se vezuje za ABCA1 transporter (*engl. ATP binding cassette transporter A1*) na membrani ćelija čime je omogućen transfer holesterola i fosfolipida na malu, nascentnu HDL česticu. Nakon preuzimanja na HDL, pod dejstvom enzima lecitin-holesterol acil transferaze (*engl. lecithin-cholesterol acyl transferase, LCAT*), dolazi do esterifikacije holesterola i nastanka holesterol-estara koji prelaze u jezgro HDL čestice pri čemu se najpre stvara HDL 3 forma, koja daljim sazrevanjem poprima sferni oblik uz nastanak velike, zrele HDL 2 forme sa lipidnim jezgrom. Dopremanje holesterol-estara u jetru vrši se direktnim preuzimanjem sa HDL čestice posredstvom receptora „hvatača“ klase B tip 1 (*engl. scavenger receptor class B type 1, SR-B1*). U remodelovanje HDL čestica uključen je i holesterol-estar transferni protein (*engl. cholesteryl ester transfer protein, CETP*) koji dovodi do prenosa holesterol-estara sa zrele HDL 2 čestice na hilomikrone, lipoproteine veoma niske gustine (*engl. very-low-density lipoprotein, VLDL*) i LDL u zamenu za TG, što rezultira smanjenjem sadržaja holesterola i stvaranjem TG bogatih malih, gustih HDL 3 čestica. Smatra se da ove strukturne promene HDL čestica u velikoj meri utiču na njihova ateroprotektivna svojstva (31-33).

Osim RTH, antiaterogenost HDL čestica ispoljava se i kroz antiinflamatorne efekte posredstvom nekoliko međusobno povezanih mehanizama:

- ✓ pokretanje efluksa holesterola iz penastih ćelija u aterosklerotskim lezijama u sklopu RTH (34,35) čime se sprečava njihovo dalje stvaranje i oslobađanje proinflamatornih medijatora
- ✓ inhibicija ekspresije adhezionih molekula na površini endotela (36), što usporava progresiju inflamacije u ranoj fazi razvoja ateroskleroze
- ✓ neutralizacija proinflamatornih molekula, pre svega serumskog amiloida A (SAA), proteina akutne faze, koji je vezan za HDL tokom transporta u cirkulaciji (37)
- ✓ antioksidativna aktivnost HDL čestica koja se ogleda u sprečavanju oksidativne modifikacije LDL čestica, čime se inhibira nastanak oxLDL (38).

1.2.1.1. HDL subfrakcije i ateroskleroza

Iako su sprovedene brojne studije čiji je cilj bio utvrđivanje veze između raspodele HDL subfrakcija i rizika za razvoj KVB, i dalje nedostaje odgovor na pitanje koja HDL subfrakcija pruža bolju kardiovaskularnu zaštitu. Rezultati nekih studija su sugerisali da je rizik za razvoj KVB povezan sa smanjenom količinom velikih HDL 2 subfrakcija (39-41), dok su druge studije zaključile da postoji inverzan odnos između rizika za razvoj KVB i količine malih, gustih HDL 3 subfrakcija (42,43). I pored toga što rezultati istraživanja nisu u potpunosti konzistentni, dominira mišljenje da su male, guste HDL 3 subfrakcije bolji akceptor holesterola iz perifernih tkiva i da pružaju moćniju zaštitu LDL čestica od oksidativnog oštećenja izazvanog slobodnim radikalima, što rezultira superiornijim antioksidativnim i ateroprotektivnim potencijalom malih HDL 3 u odnosu na velike HDL 2 subfrakcije (44). Međutim, nedvosmisleno je potvrđeno da funkcionalnost HDL čestica značajno zavisi od konstelacije ostalih faktora rizika, što znači da u uslovima dislipidemije, inflamacije i pojačanog oksidativnog stresa HDL čestice trpe promene proteinskog i lipidnog sastava zahvaljujući kojima postaju disfunkcionalne, odnosno imaju redukovani antiaterogeni potencijal (27,45,46).

U aterogenoj dislipidemiji jezgra HDL čestica su osiromašena estrima holesterola, a obogaćena TG, pri čemu su ove promene posredovane povišenom aktivnošću CETP i sniženom aktivnošću LCAT, što za posledicu ima smanjenje stabilnosti apoA-I, smanjeni efluks holesterola i smanjeno uklanjanje oksidovanih lipida sa LDL (47,48). Dalje, oksidativni stres može da izazove smanjenje aktivnosti LCAT *in vitro* (49), što rezultira redukovanim kapacitetom RTH. Osim toga, inflamacija je još jedan patološki proces koji utiče na strukturu i funkciju HDL čestica dovodeći do nastanka disfunkcionalnih čestica sa proaterogenim svojstvima (29). S jedne strane, inflamatorni citokini smanjuju aktivnost LCAT, a s druge strane inflamacija indukuje sintezu SAA koji istiskuje

apoA-I iz HDL, dovodeći do izostanka aktivacije LCAT i do pojačanog katabolizma HDL čestica (50).

Određene studije su pokazale da u poređenju sa većim i manje gustim HDL 2 subfrakcijama, male, guste HDL 3 čestice imaju i bolju prediktivnu sposobnost za buduće kardiovaskularne događaje, što bi se moglo objasniti njihovim snažnijim efektom na efluks holesterola, izraženijim antioksidativnim svojstvima, kao i njihovom uskom povezanošću sa enzimom paraoksonazom 1 (PON1) koji je sam po sebi ateroprotektivan (51,52).

Generalno, smatra se da je velika raznolikost metoda za određivanje HDL subfrakcija delimično odgovorna za dilemu koja HDL subfrakcija ima najjača antiaterogena svojstva (28,30,53-55).

1.2.2. PON1: uloge i distribucija unutar HDL subfrakcija

Na površini HDL čestica nalazi se više enzima sa antioksidativnom sposobnošću: glutation-selenoperoksidaza (GSPx), acetilhidrolaza faktora aktivacije trombocita (PAF-AH), kao i PON1. Među pomenutim enzimima, PON1 poseduje najsnažnija antioksidativna svojstva (56). Familija enzima PON sastoji se iz tri člana: PON1, PON2 i PON3 čiji su geni locirani na dugom kraku hromozoma 7 (7q21-22) (57). PON1 je najviše proučavani enzim familije PON koji ima sposobnost da hidrolizuje paraokson, metabolit organofosfatnog insekticida parationa, ali i druge supstrate (58). To je kalcijum zavisna hidrolaza koja se sintetiše u jetri, izlučuje u krv i transportuje u cirkulaciji uglavnom vezana za površinu HDL čestica (preko 80%), dok je mala količina enzima pronađena u VLDL (59) i hilomikronima (60). Pretpostavlja se da se PON1 transportuje na HDL verovatno putem VLDL koji može da moduliše metabolizam i aktivnost PON1 (59). Ključna fiziološka uloga ovog enzima ogleda se u njegovoj sposobnosti da hidrolizuje lipidne peroksidi na HDL i LDL česticama, čime štiti HDL od oksidacije i povećava kapacitet RTH, a takođe sprečava oksidaciju LDL čestica i formiranje oxLDL koji je usko povezan sa nastankom i razvojem ateroskleroze (61). Za potpunu aktivaciju PON1 potreban je apoA-I (62) na HDL česticama, pri čemu vezivanje za apoA-I dovodi do stabilizacije enzima i stimulacije njegove laktonazne aktivnosti (63).

Međutim, veoma malo se zna o mehanizmima kojima se PON1 integriše u HDL, kao i o sudbini ovog enzima tokom remodelovanja HDL čestica u intravaskularnom prostoru (64,65). Jedan od prvih pristupa za razumevanje sudbine PON1 tokom remodelovanja HDL bio je *ex vivo* inkubacija humanog seruma i praćenje laktonazne i arilesterazne aktivnosti PON1, kao i analiza distribucije PON1 unutar različitih HDL subfrakcija i utvrđivanje povezanosti sa apolipoproteinima (62). Ovim eksperimentom je dokazana značajna aktivacija laktonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 već tokom 3 h *ex vivo* inkubacije seruma na 37°C, kao i nastanak okruženja za optimalnu aktivnost PON1 relativno brzo nakon interakcije HDL sa lipoproteinskim česticama koje sadrže apoB. Zajedno sa aktivacijom PON1 *ex vivo*, dokazana je istovremeno i brza preraspodela aktivnosti ili količine enzima na male HDL 3c i velike HDL 2b subfrakcije, što je praćeno razmenom lipida tokom sazrevanja HDL čestica. Porast aktivnosti PON1 na velikim HDL 2 subfrakcijama mogao bi se pripisati sazrevanju manjih HDL 2 čestica, dok bi se povećanje aktivnosti PON1 na malim HDL 3c subfrakcijama moglo objasniti sazrevanjem diskoidalnog, malog preß HDL u HDL 3c. Naime, Gugliucci je pokazao da se PON1 brzo pomera između HDL čestica tokom njihovog sazrevanja i aktivira se, a tom prilikom dolazi i do pomeranja odgovarajućih apolipoproteina (apoE, apoA-I i apoA-II). Dakle, sazrevanje HDL čestica optimizuje aktivnost PON1, pri čemu je aktivacija PON1 uslovljena remodelovanjem HDL putem razmene lipida između HDL čestica i lipoproteina koji sadrže apoB (66).

Interakcija HDL subfrakcija i PON1 je predmet istraživanja brojnih studija, s obzirom na to da promene u strukturi HDL čestica mogu izmeniti njihovu funkcionalnost, a samim tim kompromitovati aktivnost PON1. Različiti patološki uslovi mogu uticati na sazrevanje HDL čestica i posledično na distribuciju PON1 između HDL 2 i HDL 3 subfrakcija što su dokazali i rezultati nedavne studije Miljkovic i saradnika (67). Takođe, brojne studije su pokazale da postoji specifična

interakcija mijeloperoksidaze (MPO), apoA-I i PON1 na površini HDL čestica koja bi mogla biti relevantna za aterogenezu. MPO selektivno indukuje oksidaciju HDL čestica transformišući ih u potencijalno aterogene oblike (68-71). Drugim rečima, MPO je izvor ROS tokom inflamacije i oksiduje apoA-I na HDL česticama, što kompromituje njihovu ateroprotektivnu ulogu. Štaviše, MPO, PON1 i HDL se vezuju jedni za druge stvarajući kompleks u kome PON1 umereno ometa aktivnost MPO, dok MPO inaktivira PON1. U tom smislu, bolje razumevanje interakcije PON1 sa HDL, kao i kinetike i sudbine PON1, može pružiti nove uvide u dalje istraživanje ateroskleroze.

Afinitet PON1 za različite HDL subfrakcije i dalje predstavlja nerešeno pitanje. Smatra se da je enzim PON1 distribuiran u svim HDL subfrakcijama, ali ipak ima najveći afinitet za male HDL 3 subfrakcije (28,30,55,62,67,72). Neke studije su dokazale povezanost povećanog udela malih HDL 3 subfrakcija sa sniženom aktivnošću PON1 u nekoliko kategorija visoko rizičnih pacijenata (72-76), na osnovu čega bi se moglo pretpostaviti da HDL 3 subfrakcije pokazuju snažan antioksidativni potencijal kod zdravih ispitanika, ali ne i kod pacijenata sa visokim kardiovaskularnim rizikom. Međutim, postoje i studije koje su demantovale uočenu vezu (77,78). Nedoslednost u dobijenim rezultatima mogla bi se pripisati:

- ✓ različitim metodološkim pristupima za izolovanje HDL subfrakcija i različitoj osetljivosti i karakteristikama metoda za određivanje aktivnosti PON1,
- ✓ raznovrsnosti supstrata koji se koriste za određivanje aktivnosti PON1 (npr. određivanje laktonazne i arilesterazne aktivnosti PON1),
- ✓ razlikama u karakteristikama učesnika studija.

Uzimajući sve ovo u obzir, ostaje i dalje pretpostavka da je izmenjena distribucija PON1 u različitim HDL subfrakcijama povezana sa promenama funkcionalnosti HDL čestica, ali su potrebne dodatne studije za procenu potencijalnog doprinosa određivanja distribucije i aktivnosti PON1 u različitim HDL subfrakcijama sa ciljem procene ukupnog rizika od KVB.

1.2.3. LDL čestice: heterogenost i struktura

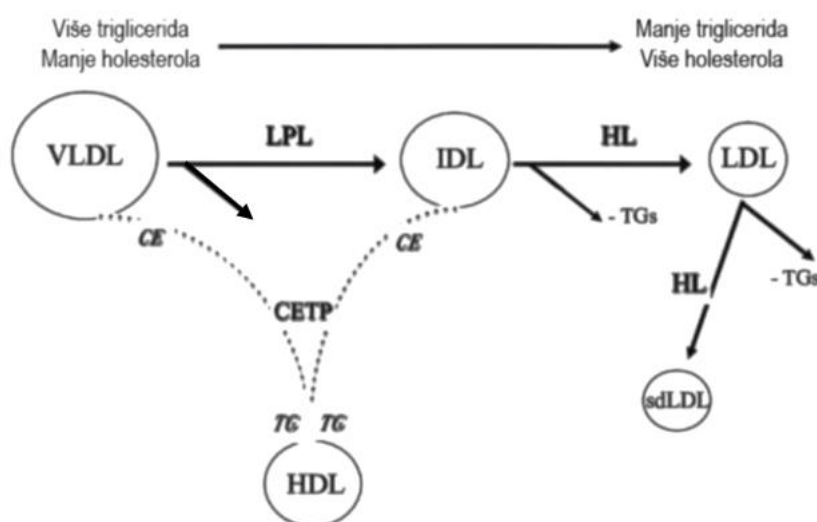
LDL čestice nastaju tokom procesa delipidacione kaskade VLDL čestica i predstavljaju glavne nosioce ukupnog holesterola u plazmi. U zavisnosti od odnosa lipida i proteina, gustina LDL čestica se kreće od 1,019 do 1,063 g/mL, a veličina od 18 do 28 nm, mada su identifikovane i čestice veće od 30 nm (79,80). U strukturi LDL čestica uočava se hidrofobno jezgro, sastavljeno od holesterol-estara i TG koje je obavijeno površinskim omotačem, sastavljenim od slobodnog holesterola, fosfolipida i apoB-100 (81). ApoB-100 sadrži domen za vezivanje za LDL receptore (LDL-R) i igra centralnu ulogu u stabilizaciji i održavanju strukture LDL čestica (82).

Slično HDL česticama i LDL čestice se odlikuju heterogenošću koja je rezultat promena aktivnosti enzima u metabolizmu lipoproteina, kao i višestrukih metaboličkih puteva, uključujući katabolizam prekursora VLDL i lipoproteina srednje gustine (engl. *intermediate-density lipoprotein*, IDL) (83). Primenom gradijent gel elektroforeze, identifikovano je čak sedam različitih LDL subfrakcija grupisanih, na osnovu gustine, u četiri glavne subklase, od najvećih i najmanje gustih do najmanjih i najgušćih, označenih kao: LDL I, LDL IIa, LDL IIb, LDL IIIa, LDL IIIb, LDL IVa i LDL IVb (84). Kod svakog pojedinca, istovremeno je prisutno više LDL subfrakcija, a njihov međusobni odnos varira u zavisnosti od genetskih i brojnih faktora sredine (85,86). Na osnovu izmerenog dijametra LDL čestica, definisana su dva različita fenotipa: fenotip A u kome su dominantne velike, plutajuće LDL čestice čiji je dijametar > 25,5 nm i fenotip B u kome dominiraju male, guste LDL čestice dijametra ≤ 25,5 nm (85).

1.2.3.1. SdLDL čestice: nastanak i mehanizmi aterogenosti

Ključni faktor u nastanku sdLDL čestica je povišena koncentracija TG. Naime, hipertrigliceridemija je povezana sa pojačanom aktivnošću CETP koji omogućava razmenu TG

unutar VLDL i hilomikronskih ostataka sa holesterol-estrima unutar LDL i HDL čestica, pri čemu nastaju TG obogaćene LDL čestice koje predstavljaju supstrat za hepatičnu lipazu (HL). HL dalje razlaže TG čime se smanjuje veličina LDL čestica i nastaju sdLDL čestice sa izrazito aterogenim svojstvima (87). Formiranje sdLDL čestica prikazano je na Slici 3.

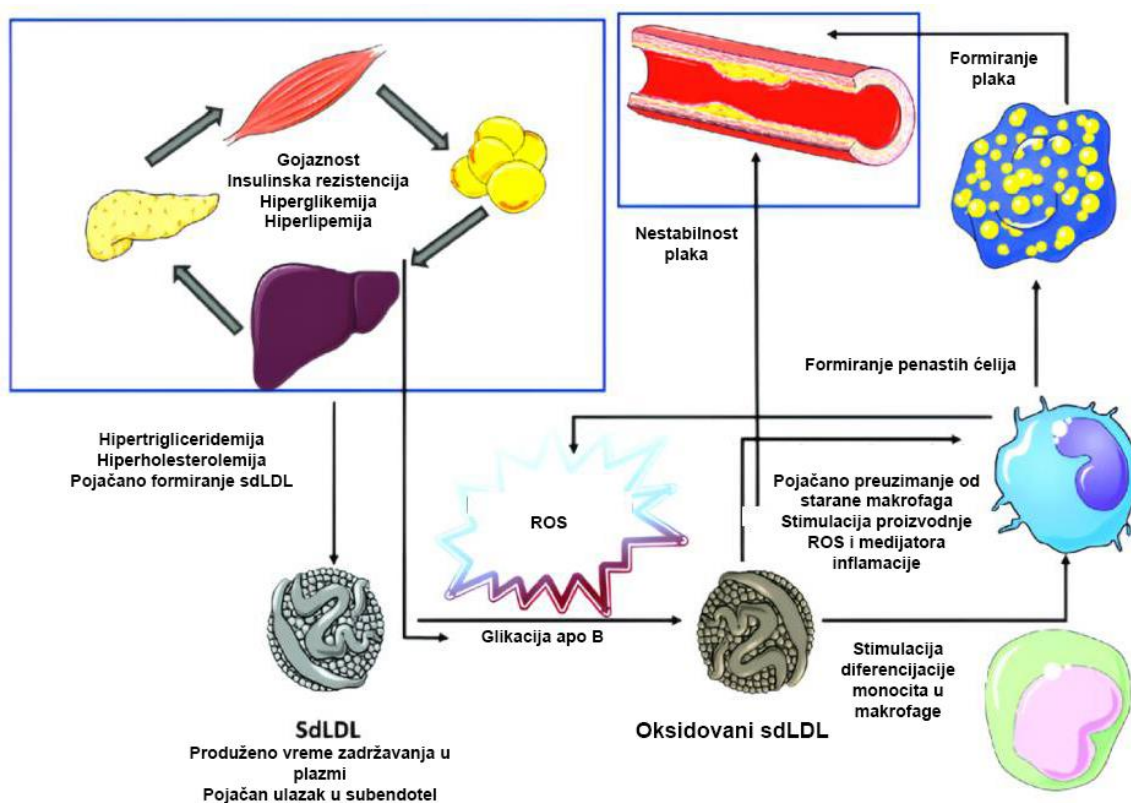


Slika 3. Formiranje sdLDL

Skraćenice: CE - holesterol-estar; CETP - holesterol-estar transferni protein (engl. cholesteryl ester transfer protein); HDL - lipoprotein visoke gustine (engl. high-density lipoprotein); HL - hepatična lipaza; IDL - lipoprotein srednje gustine (engl. intermediate-density lipoprotein); LDL - lipoprotein niske gustine (engl. low-density lipoprotein); LPL - lipoproteinska lipaza; sdLDL - male guste LDL čestice (engl. small, dense low-density lipoprotein); TG - trigliceridi; VLDL - lipoprotein veoma niske gustine (engl. very-low-density lipoprotein)

(Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz: Vekic J, Zeljkovic A, Cicero AFG, Janez A, Stoian AP, Sonmez A, Rizzo M. Atherosclerosis development and progression: The role of atherogenic small, dense LDL. Medicina 2022; 58(2):299.)

Iako je aterogenost karakteristika svih LDL čestica, stepen aterogenosti pojedinih LDL subfrakcija je različit, a rezultati skorašnjih studija konzistentno pokazuju da je sdLDL najaterogenija frakcija (88). Predloženo je nekoliko mehanizama za objašnjenje povećanog aterogenog potencijala sdLDL prikazanih na Slici 4.



Slika 4. Patofiziološki mehanizmi koji objašnjavaju povećani aterogeni potencijal sdLDL

Skraćenice: Apo B - apolipoprotein B; ROS - reaktivna kiseonična jedinjenja (engl. reactive oxygen species); sdLDL - male guste LDL čestice (engl. small, dense low-density lipoprotein)

(Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz: Vekic J, Zeljkovic A, Cicero AFG, Janez A, Stoian AP, Sonmez A, Rizzo M. Atherosclerosis development and progression: The role of atherogenic small, dense LDL. Medicina 2022; 58(2):299.)

Prvo, zbog promena u strukturi apoB-100 (89), sdLDL imaju snižen afinitet za LDL-R (90) što doprinosi njihovom dužem zadržavanju u cirkulaciji, a samim tim i većem aterogenom potencijalu; takođe, sdLDL imaju povećan afinitet za SR receptore na površini makrofaga (91) pri čemu dolazi do njihovog nekontrolisanog preuzimanja, što predstavlja ključni korak u nastanku penastih ćelija i kasnije aterosklerotskog plaka; dalje, zbog manje veličine, sdLDL lakše prodiru u subendotelni prostor (92) i konačno, kao posledica smanjene količine antioksidanasa na njihovoj površini, sdLDL su podložnije oksidativnoj modifikaciji, uz nastanak oxLDL (93,94).

Velike prospektivne studije koje su se bavile distribucijom LDL čestica, dokazale su veću prevalencu sdLDL kod pacijenata sa KVB i potvrdile njihov nezavisni doprinos razvoju KVB (95-97). Nedavna meta-analiza pokazala je da se sdLDL čestice mogu smatrati biomarkerom povećanog kardiovaskularnog rizika (98). S druge strane, kliničke smernice o holesterolu i primarnoj prevenciji KVB derfinisane od strane: Američkog udruženja kardiologa (engl. *American College of Cardiology*, ACC) i Američkog udruženja za srce (engl. *American Heart Association*, AHA), kao i Evropskog udruženja kardiologa (engl. *European Society of Cardiology*, ESC) i Evropskog udruženja za aterosklerozu (engl. *European Atherosclerosis Society*, EAS) ne preporučuju određivanje sdLDL čestica, niti ih posebno označavaju kao terapijski cilj (99,100). Stoga, pitanje moguće koristi dobijene rutinskim određivanjem pomenutih čestica, ostaje i dalje otvoreno.

1.2.3.2. OxLDL: nastanak i mehanizmi aterogenosti

Poznato je da oxLDL ima ključnu ulogu u indukciji aterogeneze, tj. predstavlja molekularnu osnovu ateroskleroze. Zapravo, termin oxLDL označava širok spektar oksidativnih promena na LDL čestici (101). Iako precizni mehanizmi LDL oksidacije nisu u potpunosti rasvetljeni, Parthasarathy i saradnici (102) su rezimirali da se formiranje oxLDL odvija kroz dve faze:

1. Blaga oksidacija, u kojoj dolazi do minimalnih promena LDL čestica, uglavnom bez uticaja na molekularnu strukturu apoB-100, pri čemu se ovako izmenjene LDL čestice još uvek mogu vezivati za LDL-R
2. Progresivna oksidacija, koja podrazumeva i promene u strukturi apoB-100, usled čega ovako modifikovane čestice gube sposobnost vezivanja za LDL-R i vezuju se za SR receptore koji imaju svojstvo akumulacije holesterola u neograničenim količinama (102,103).

Uloga oxLDL u indukciji aterogeneze ostvaruje se posredstvom većeg broja mehanizama budući da jednom formirani oxLDL poseduje snažan proinflammatory, protrombotički i imunogeni potencijal (104).

Već u ranoj fazi aterogeneze, oxLDL aktivira endotelne ćelije i stimuliše oslobađanje hemoatraktantnih proteina, koji dodatno privlače imunske ćelije iz cirkulacije u subendotelni prostor (105). Naime, OxLDL povećava sintezu vaskularnog ćelijskog adhezionog molekula-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) koji stimuliše regrutovanje monocita i T-limfocita na mestu oštećenja endotela. Dalje, oxLDL stimuliše ekspresiju monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) koji privlači monocite iz cirkulacije u subendotelni prostor i time pojačava inflamatornu kaskadu. Osim toga, oxLDL potpomaže diferencijaciju monocita u makrofage, pojačanu lokalnim oslobađanjem faktora stimulacije kolonije monocita (engl. *monocyte-colony stimulating factor*, M-CSF) koji pospešuje dalju konverziju makrofaga u penaste ćelije. Makrofage i penaste ćelije oslobađaju faktore rasta koji dovode do ćelijske proliferacije i stvaranja ROS, što doprinosi egzacerbaciji oksidativnog stresa i daljoj progresiji ateroskleroze (104). Osim toga, makrofage stimulišu sintezu komponenti ekstracelularnog matriksa i aktivnost matriks metaloproteinaza (MMP) koje razgradnjom kolagena doprinose destabilizaciji aterosklerotskog plaka (106). Sve u svemu, oxLDL pokreće čitav niz uzastopnih reakcija, formirajući brojne začarane krugove koji dovode do progresije aterosklerotske lezije. Upravo zato se smatra da bi sdLDL, koji predstavlja prekursor oxLDL, mogao biti glavni pokretač inicijacije i progresije ateroskleroze. Proces oksidativne modifikacije LDL čestica su potencirani u uslovima inflamacije, što bi moglo sugerisati da je fokalna inflamacija u zidu krvnog suda na mestu inicijalne povrede odgovorna za početak oksidacije LDL čestica u ranim stadijumima formiranja plaka.

Proaterogeni efekti oxLDL ne zavise samo od njegovog proinflammatory potencijala, već i od njegove sposobnosti da utiče na protrombotičke odgovore, modulacijom stanja aktivacije endotelne ćelije. Pokazano je da izlaganje endotelne ćelije dejstvu oxLDL dovodi do smanjenja funkcije endotelne barijere i do modulacije komponenti koagulacione kaskade kao što su: ushodna regulacija ekspresije i aktivnosti tkivnog faktora (engl. *tissue factor*, TF), nishodna regulacija trombomodulina i inaktivacija inhibitora TF, što rezultira ukupnim povećanjem trombogenog stanja endotelne ćelije (107,108). Inače, TF je transmembranski glikoprotein koji deluje kao primarni aktivator koagulacione kaskade. Ekspimiran je na ćelijama koje okružuju zid krvnog suda uključujući pericite i fibroblaste adventicije, ali nije ekspimiran na endotelnim ćelijama. Međutim, tokom hiperlipidemije, ekspresija TF je indukovana i u makrofagama unutar aterosklerotskih plakova i monocitima. Potvrđeno je da oxLDL indukuje ekspresiju TF u monocitima, makrofagama, endotelnim i vaskularnim GČ (109-111), dovodeći do hiperkoaguabilnog stanja udruženog sa hiperlipidemijom. Takođe, dokazano je da aterosklerotski plak predstavlja važan izvor TF (108) pri čemu tokom iznenadne rupture plaka, izlaganje TF cirkulaciji indukuje koagulacionu kaskadu, što dovodi do formiranja tromba i okluzije krvnog suda.

1.2.3.3. OxLDL i imunski procesi

Ekstenzivna istraživanja tokom poslednje dve decenije otkrila su da i urođeni i adaptivni imunitet imaju važnu ulogu u nastanku i progresiji aterosklerotskih lezija, pri čemu je posebno istaknut značaj epitopa specifičnih za oksidaciju (engl. *oxidation-specific epitopes*, OSE) koji poseduju imunogena, proinflamatorna i proaterogena svojstva. OSE predstavljaju klasu „molekularnih obrazaca povezanih sa oštećenjem“ (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) protiv kojih je usmeren urođeni imunski odgovor i koji mogu da promovišu oštećenje tkiva i smrt ćelije. OSE su u izobilju prisutni na površini oxLDL i dovode do njegovog pojačanog preuzimanja od strane makrofaga i nastanka penastih ćelija, kao i do promena u ekspresiji gena u ćelijama atrijskog zida uslovljavajući regrutovanje i diferencijaciju monocita u makrofage i regrutovanje limfocita, što sve zajedno rezultira progresijom i destabilizacijom naprednih lezija. Osim na oxLDL, OSE se nalaze i na apoptotskim ćelijama i ćelijskim ostacima, a bivaju prepoznati od strane urođenih „receptora za prepoznavanje obrazaca“ (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) eksprimiranih na tkivnim makrofagama. PRR često prepoznaju i „molekularne obrasce povezane sa patogenom“ (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) na mikrobnim antigenima, tako da mnogi DAMP i PAMP dele molekularni ili imunološki identitet. Prema tome, urođeni imunski sistem, razvojem inflamacije, pruža moćnu prvu liniju odbrane od DAMP specifičnih za aterosklerozu i pokreće adaptivne imunске odgovore koje obezbeđuju T- i B- ćelije (112,113). Ovako koordinisan imunski odgovor veoma je efikasan u zaštiti organizma od infektivnih patogena, ali ne i u uslovima hronične stimulacije antigenima koja postoji kod trajne hiperholesterolemije u aterosklerozi. U takvim uslovima dolazi do oštećenja ćelije, pa se aterogeneza može posmatrati kao hroničan i neprilagođen inflamatorni odgovor na OSE i srodne antigene, usled uporne hiperholesterolemije (112). Smatra se da bi razumevanje ovih imunskih odgovora moglo pružiti uvid u mehanizme koji pokreću progresiju ranih aterosklerotskih lezija u napredne lezije.

1.2.4. Anti-oxLDL antitela i ateroskleroza

Pokazano je da oxLDL delimično podstiče razvoj ateroskleroze zahvaljujući sposobnosti da aktivira komponente stečenog imunskog sistema (103). Naime, oxLDL stimuliše B-ćelije da proizvode autoantitela, uglavnom G klase, koja dodatno doprinose arterijskoj inflamaciji (114,115). Stvorena antitela prepoznaju OSE na oxLDL i vezuju se za njih formirajući cirkulišuće imunске komplekse (oxLDL-IC) koji se internalizuju posredstvom Fcγ receptora na makrofagama i dovode do aktivacije Fcγ receptor-posredovanih signalnih puteva i do sekrecije proinflamatornih citokina: interleukina-1 (IL-1) i interleukina-6 (IL-6) (116,117). Osim toga, oxLDL-IC u ateromatoznoj leziji dovode i do aktivacije komplementa klasičnim putem (116) ispoljavajući snažnija imunomodulatorna svojstva i jači proinflamatorni potencijal u odnosu na slobodno cirkulišući oxLDL, te su znatno efikasniji u indukciji stvaranja penastih ćelija (118). Anti-oxLDL antitela, kao i oxLDL-IC detektovani su u serumu životinja i pacijenata sa aterosklerozom i uočena je njihova povezanost sa ovom bolešću (119). Osim toga, dokazano je da u ishemičnom miokardu nastaju velike količine ROS koje vrše lipidnu peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina pri čemu kao krajnji proizvod nastaje malondialdehid (MDA). Inače, MDA nastaje razgradnjom arahidonske kiseline i polinezasićenih masnih kiselina prisutnih u membranskim fosfolipidima kroz enzimske ili neenzimske procese. Proizvodnja MDA enzimskim procesom je dobro poznata i podrazumeva njegovo *in vivo* generisanje kao sporednog proizvoda tokom biosinteze tromboksana A2 (TXA2), biološki aktivnog metabolita arahidonske kiseline. S druge strane, produkcija MDA neenzimskim procesom je posredovana slobodnim radikalima i vrši se pomoću bicikličnih endoperoksida nastalih tokom procesa lipidne peroksidacije. Jednom formirani MDA može biti enzimski metabolisan ili lako stupiti u interakciju sa funkcionalnim grupama ćelijskih i tkivnih proteina i DNK gradeći adukte koji su biološki važni jer mogu učestvovati u sekundarnim štetnim reakcijama izazivajući

duboke promene u biohemijskim svojstvima biomolekula (120). MDA adukti mogu stimulisati vezivanje C3a komponente komplementa za oxLDL i doprineti inflamatornim procesima koji uključuju aktivaciju sistema komplementa i aktivaciju protein kinaze C (PKC) u ćelijama prisutnim u aterosklerotskom plaku. Aktivirana PKC ima važnu ulogu u intracelularnoj transdukciji signala u procesima proliferacije, diferencijacije, migracije i inflamacije. Drugim rečima, PKC omogućava oslobađanje i aktivaciju nuklearnog faktora kapa B (NF-κB) kroz proces fosforilacije njegovog inhibitora. Aktivirani NF-κB se vezuje za DNK ciljnih ćelija - monocita, makrofaga, GMC i endotelne ćelije delujući kao transkripcioni faktor gena koji kodiraju sintezu proteina značajnih za razvoj inflamacije.

Zahvaljujući svojoj hemijskoj prirodi, slobodni MDA može da stvara epitope na glavnim ćelijskim makromolekulima u različitim tkivima. MDA epitopi doprinose održavanju homeostatskih funkcija delujući kao markeri povišenog oksidativnog stresa i oštećenja tkiva, a opisana je i njihova sposobnost da pokreću inflamatorne procese u aterosklerozi, te stoga predstavljaju važnu metu urođenog i adaptivnog imunskog odgovora (121). Identifikovani su na proteinima i lipoproteinima plazme, pre svega na oxLDL. Palinski i saradnici (122) su prvi otkrili anti-oxLDL antitela specifična za MDA, što je predstavljalo dokaz da oxLDL postoji *in vivo*. Prema tome, detektovana anti-oxLDL antitela smatraju se markerima prisustva oxLDL (123). Ovako opisana proaterogena delovanja anti-oxLDL antitela, potkrepljena su rezultatima studija na životinjskim modelima koji su pokazali korelaciju koncentracije autoantitela IgG klase na oxLDL (IgG anti-oxLDL antitela) sa stepenom ateroskleroze (124,125), dok su istraživanja na ljudima dala veoma kontroverzne rezultate uslovljene, uglavnom, individualnim varijacijama imunskog odgovora (126,127).

Većina anti-oxLDL antitela, pronađenih u bolestima povezanim sa aterosklerozom, pripada G klasi (potklase G₁ i G₃), značajno manje ih pripada M klasi, dok su antitela A klase prisutna u tragovima (128). Međutim, koncept anti-oxLDL antitela nije sveobuhvatan, već odražava stavove nekih istraživača po kojima se ovaj pojam odnosi na kompletan humani monoklonalni imunoglobulin G₁ protiv oksidovanog apoB-100, koji može da inhibira aktivaciju inflamatorne kaskade u ćeliji, a zatim stabilizuje aterosklerotske plakove (129). Stabilni plakovi nisu lako podložni rupturi, što smanjuje stvaranje krvnih ugrušaka i mogućnost nastanka AIM. *In vitro* i *in vivo* studije su otkrile da anti-oxLDL antitela mogu inhibirati hemotaksu i proinflamatorna svojstva makrofaga čime se smanjuje stvaranje aterosklerotskih plakova (105,130-132). Ovaj mehanizam ide u prilog antiaterogenim svojstvima anti-oxLDL antitela, a neki autori sugerišu da bi se pomenuta antitela mogla koristiti za sekundarnu prevenciju potencijalnih kardiovaskularnih događaja (129). Smatra se da IgM anti-oxLDL antitela prepoznaju OSE prisutne na oxLDL, vezuju se za njih i ograničavaju aktivaciju endotela, formiranje penastih ćelija i inflamatorne odgovore makrofaga, dok IgG anti-oxLDL antitela grade oxLDL-IC i promovišu inflamatorne odgovore makrofaga.

Iako je poslednjih godina postignut veliki napredak u dizajniranju studija koje se bave istraživanjem anti-oxLDL antitela, njihova uloga u aterosklerozi i sa njom povezanim bolestima, ostaje i dalje kontroverzna. Nedavni nalazi o ulozi anti-oxLDL antitela u aterosklerozi i sa njom povezanim bolestima mogu se svrstati u tri kategorije:

- ✓ Anti-oxLDL antitela su patogeni faktor u aterosklerozi i relevantnim bolestima (122-125)
- ✓ Anti-oxLDL antitela su protektivni faktor u aterosklerozi i relevantnim bolestima (129-132)
- ✓ Anti-oxLDL antitela nisu povezana sa aterosklerozom i relevantnim bolestima (126)

Nedosljednost u rezultatima dobijenim izvođenjem mnogobrojnih studija, može se pripisati sledećim faktorima uticaja:

- ✓ Različiti kriterijumi odabira pacijenata koji učestvuje u ispitivanju i posledična heterogenost grupa
- ✓ Ispitivanja nisu sveobuhvatna: u nekim studijama su određivana IgG, a u drugim IgM antitela, tako da su ove studije objasnile samo aktivnost antitela određenog tipa, a nisu mogle da razjasne delovanje svih antitela
- ✓ Nejasna klasifikacija i nepreciznost istraživača: različiti istraživači su ispitivali anti-oxLDL antitela pri čemu nisu opisali vrstu korišćenih antitela, niti ciljani epitop

- ✓ Razlike u protokolima koji se koriste za prečišćavanje antitela, kao i nedostatak standardizacije imunohemijskih testova za određivanje antitela.

1.3. Markeri inflamacije i ateroskleroza

Ateroskleroza se više ne smatra samo poremećajem nastalim usled abnormalnosti u metabolizmu lipida, već je široko prihvaćeno da je inicijalni događaj u aterogenezi inflamacija koja se javlja decenijama pre nego što bolest postane klinički očigledna, kao i da je najranija faza razvoja aterotromboze većim delom posredovana inflamatornom kaskadom (133). Otuda je apsolutno opravdana potraga za novim biomarkerima inflamacije koji bi omogućili procenu rizika za razvoj KVB, kao i predviđanje budućih kardiovaskularnih događaja (134). Identifikovani su brojni markeri inflamacije potencijalno povezani sa aterogenezaom poput reaktanata akutne faze, proinflamatornih citokina, adhezionih molekula itd., a među njima, intenzivno su proučavani biomarkeri iz familije pentraksina. Familija pentraksina obuhvata kratkolančane i dugolančane pentraksine koji imaju važnu ulogu u urođenom imunitetu, a razlikuju se po veličini molekula, kao i po tome što njihovu sintezu kodiraju različiti geni, te se stvaraju u različitim tipovima ćelija kao odgovor na različite stimuluse i deluju na različite ciljne molekule (135). Među kratkolančanim pentraksinima već duže vremena u rutinskoj upotrebi je C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*, CRP), koji se sintetiše u hepatocitima i drugim ćelijama tokom inflamacije, a čije je oslobađanje indukovano proinflamatornim citokinima, uglavnom IL-6. Pošto su koncentracije CRP veoma niske, razvijene su visoko osetljive metode za procenu malih promena u koncentracijama ovog parametra. Pokazalo se da je tzv. visoko osetljivi C-reaktivni protein (engl. *high sensitive C-reactive protein*, hsCRP) povezan sa rizikom od rupture plaka i vaskularne tromboze (136), ali je u studijama sekundarne prevencije dokazana njegova slaba prognostička vrednost za buduće kardiovaskularne događaje (137). Takođe, još jedna slabost ovog biomarkera je njegova sistemska inflamatorna uloga, te stoga nije koristan za predviđanje stepena stenozе, ni za diferencijalnu dijagnozu KVB (138,139).

Kao novi marker inflamacije proučava se pentraksin 3 (engl. *pentraxin 3*, PTX3) koji pripada dugolančanim pentraksinima, a smatra se superiornijim u odnosu na CRP (140). PTX3 ima ulogu ranog markera primarne lokalne aktivacije urođenog imuniteta i inflamacije čija je ekspresija indukovana citokinima u endotelnim ćelijama, u mononuklearnim fagocitima i u miokardu (141). PTX3 je uključen u različite molekularne mehanizme kojima se objašnjava njegov uticaj na kardiovaskularni sistem. Deban i saradnici (142) su objavili da PTX3 interakcijom sa ćelijskim adhezionim molekulom P-selektinom, smanjuje regrutovanje leukocita na mestu inflamacije, što ukazuje na njegovu zaštitnu ulogu u aterosklerozi. Nasuprot tome, dokazani su i štetni efekti PTX3 u patogenezi aterotromboze (143). S tim u vezi, pokazano je da PTX3 povećava ekspresiju TF u endotelnim ćelijama, što izaziva pokretanje koagulacione kaskade i stvaranje tromba (144). Dalje, Norata i saradnici (145) su pokazali da HDL čestice, naročito HDL 3 subfrakcije, indukuju ekspresiju PTX3 *in vivo* i *in vitro* uglavnom preko fosfatidil-inozitol-3 kinaza - PI3K/Akt (engl. *phosphatidyl-inositol-3-kinase*) puta, što sugeriše da bi se ateroprotektivni efekat HDL 3 subfrakcija delimično mogao objasniti upravo modulacijom ključne komponente humoralnog kraka urođenog imuniteta. Pokazano je i da prekomerna ekspresija PTX3 ne samo da stimuliše preuzimanje oxLDL, već i značajno smanjuje efluks holesterola, a takođe inhibira i ekspresiju ABCA1 transportera holesterola dovodeći do akumulacije lipida u makrofagama, što doprinosi progresiji ateroskleroze (146).

Kada su u pitanju studije koje su se bavile ispitivanjem PTX3 kod STEMI bolesnika, postoje suprotstavljeni stavovi u vezi sa ulogama ovog biomarkera budući da neka istraživanja ukazuju na njegove protektivne efekte, dok druga spekulišu da povećani nivoi PTX3 koreliraju sa težinom bolesti i nepovoljnom prognozom (147-149). Zbog lokalne produkcije i brze promene koncentracije, PTX3 bi se mogao smatrati novim potencijalnim biomarkerom AIM.

2. CILJEVI

Iako je ateroskleroza dugo smatrana degenerativnom bolešću uglavnom uslovljenom pasivnom akumulacijom lipida, u novije vreme težište je pomerenom ka rasvetljavanju veze između dislipidemije, inflamacije niskog stepena, oksidativnog stresa i imunskih procesa, imajući u vidu multifaktorijalnu osnovu aterogeneze (150-152).

Kako bi se detaljnije utvrdio imunski odgovor organizma na dislipidemiju i posledično razvoj inflamacije i oksidativnog stresa, ispitivanja se usmeravaju ka proučavanju lokalnih aktivatora urođenog imuniteta koji su u vezi sa aterosklerozom, kao i ROS koja vrše lipidnu peroksidaciju. Međutim, još uvek nije poznato da li male guste HDL i LDL subfrakcije uslovljavaju veću koncentraciju IgG anti-oxLDL antitela, kao ni da li su male HDL čestice nosioci povećane aktivnosti enzima PON1. Takođe, ne zna se da li inflamacija i oksidativni stres, utiču na pomenute procese isti način i u istom stepenu kod zdravih osoba i osoba obolelih od KVB, odnosno da li se dodatno menjaju u akutnom stanju, kao što je STEMI. Konačno, do danas nema dovoljno studija koje su proučavale vezu IgG anti-oxLDL antitela i veličine HDL i LDL čestica sa težinom KAB procenjenom pomoću SYNTAX skora (engl. *Synergy between Percutaneous Coronary Intervention with Taxus and Cardiac Surgery score*) (153).

Na osnovu svega navedenog, formulisani su sledeći ciljevi istraživanja:

- Analiza raspodele HDL i LDL subfrakcija i određivanje koncentracija IgG anti-oxLDL antitela, PTX3 i MDA, kao i aktivnosti PON1 u serumu kod bolesnika sa SAP, STEMI i zdravih kontrolnih ispitanika, uz utvrđivanje razlika između grupa;
- Ispitivanje uticaja rizičnih fenotipova HDL i LDL čestica na serumske koncentracije IgG anti-oxLDL antitela i na parametre inflamacije i lipidne peroksidacije;
- Analiza veze između aktivnosti PON1 u serumu i njene distribucije unutar HDL subfrakcija sa parametrima lipidnog statusa, lipidne peroksidacije i inflamacije;
- Procena prognostičke sposobnosti IgG anti-oxLDL antitela i veličine HDL i LDL čestica u predviđanju ishoda i težine bolesti kvantifikovane SYNTAX skorom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Studija je dizajnirana kao opservaciona i uključivala je ukupno 157 ispitanika. Grupu pacijenata obolelih od KAB činilo je 90 osoba i to: 21 osoba sa dijagnozom SAP (15 muškaraca i 6 žena, prosečne starosti 60 ± 10 godina) i 69 osoba sa dijagnozom STEMI (58 muškaraca i 11 žena, prosečne starosti 60 ± 12 godina) koji su bili hospitalizovani u Kliničko-bolničkim centrima „Bežanijska Kosa“ i „Zemun“. Svi pacijenti su u toku hospitalizacije bili podvrgnuti koronarnoj angiografiji na osnovu koje je procenjena težina koronarnog oboljenja. Za procenu težine KAB korišćen je i SYNTAX skor koji objedinjuje informacije o opsegu, anatomiji i karakteristikama lezije (153). Demografski podaci, kao i podaci o zdravstvenom stanju i terapiji ispitivanih bolesnika, dobijeni su iz medicinske dokumentacije, kao i popunjavanjem standardizovanog upitnika, čime su prikupljene informacije o porodičnoj anamnezi KVB i životnim navikama: načinu ishrane, stepenu fizičke aktivnosti i statusu pušenja. Takođe, svim bolesnicima je izmerena telesna težina i visina, obim struka i kukova, kao i sistolni i dijastolni krvni pritisak. Iz podataka za visinu i težinu, izračunat je indeks telesne mase (engl. *body mass index*, BMI) po formuli: $BMI = \text{telesna masa (kg)} / \text{kvadrat telesne visine (m}^2\text{)}$. HTA je definisana ako je sistolni pritisak ≥ 140 mm Hg i/ili dijastolni pritisak ≥ 90 mm Hg ili ako postoji upotreba antihipertenzivnih lekova (154).

Kontrolnu grupu (KG) činilo je ukupno 67 zdravih dobrovoljaca (49 muškaraca i 18 žena prosečne starosti 55 ± 9 godina) zaposlenih na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i osoba koje su u Opštu bolnicu „Medigroup“ dolazile na redovan sistematski pregled. Demografski podaci zdravih ispitanika prikupljeni su anketiranjem. Kriterijumi za isključivanje prilikom formiranja KG bili su: prisustvo KVB, potvrda pozitivne porodične anamneze za KVB, HTA, kao i prisustvo bilo koje druge sistemske inflamatorne, metaboličke, maligne bolesti, bolesti jetre i bubrega i u skorije vreme preležane infekcije.

Veličina uzorka je određena u odnosu na nivo značajnosti od 0,05 i snagu studije od 80%, uz dodatnu korekciju u odnosu na upotrebu neparametarskih statističkih testova za obradu podataka (uzorak je uvećan za 15%). Takođe, veličina KG je uvećana i u odnosu na broj dostupnih bolesnika sa SAP i STEMI kako bi očekivana snaga studije ostala 80% (155). Dobijena potrebna veličina uzorka za STEMI bolesnike je minimalno 65, za SAP je minimalno 20 i za KG je minimalno 65 ispitanika. Studija je odobrena od strane etičkih komiteta Kliničko-bolničkih centara „Zemun“ (Odluka br. 325/1) i „Bežanijska kosa“ (Odluka br. 4705/4), Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 2262/2) i Opšte bolnice „Medigroup“ (Odluka br. 1050/1/15 i Odluka 1464-2/15). Istraživanje je planirano i sprovedeno u skladu sa etičkim principima definisanim Helsinškom deklaracijom (156). Pre uključivanja u studiju, svi ispitanici su upoznati sa ciljevima istraživanja i potpisali su dobrovoljni pristanak za učešće.

Da bi se stekao bolji uvid u povezanost dislipidemije, inflamacije, lipidne peroksidacije i imunskih procesa, definisani su dodatni kriterijumi podele ispitanika:

- ✓ za ispitivanje uticaja rizičnih fenotipova HDL i LDL čestica na markere inflamacije, lipidne peroksidacije i imunskih procesa, STEMI bolesnici i kontrolni ispitanici su podeljeni u dve grupe: grupu bez i grupu sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom
- ✓ u cilju procene sposobnosti ispitivanih biomarkera za predviđanje ishoda bolesti, samo STEMI bolesnici su prema SYNTAX skoru podeljeni u dve grupe: grupu sa niskim rizikom ($\text{SYNTAX} \leq 22$), kao indikatorom manje komplikovanih lezija i nižom verovatnoćom za sve uzroke smrtnosti i grupu sa umerenim do visokim rizikom ($\text{SYNTAX} > 22$), kao pokazateljem veće verovatnoće za kasniju pojavu komplikacija (153)
- ✓ za ispitivanje uticaja udela sdLDL na distribuciju HDL subfrakcija i PON1 unutar različitih HDL subfrakcija, izvršena je podela STEMI bolesnika i kontrolnih ispitanika

u dve grupe: grupu sa nižim udelom sdLDL ($\text{sdLDL} \leq 50\%$) i grupu sa povećanim udelom sdLDL ($\text{sdLDL} > 50\%$).

3.2. Uzorci

Ispitanicima KG krv je uzeta venepunkcijom prednje kubitalne vene u ranim jutarnjim satima nakon dvanaestočasovnog noćnog gladovanja, dok je STEMI bolesnicima krv uzeta odmah nakon prijema u jedinice hitne službe. Krv je prikupljana u dve vrste epruveta: u epruvete sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom za dobijanje plazme i u epruvete bez aditiva za dobijanje seruma. U toku jednog sata od vađenja krvi, izvršeno je izdvajanje seruma i plazme od ćelija, a zatim su uzorci alikvotirani i čuvani u zamrzivaču na temperaturi -80°C do izvođenja analiza. EDTA plazma je korišćena za razdvajanje lipoproteinskih subfrakcija i određivanje koncentracije MDA, dok su ostali parametri određivani u serumu.

3.3. Metode

3.3.1. Metode za određivanje koncentracija rutinskih biohemijskih parametara

Za analizu rutinskih biohemijskih parametara korišćeni su reagensi firme Siemens (Siemens, Munich, Germany). Određivanje koncentracije glukoze i parametara lipidnog statusa (UH, TG, HDL-h i LDL-h) izvršeno je na biohemijskom analizatoru Dimension® Xpand Plus korišćenjem odgovarajućih komercijalnih reagenasa proizvođača Siemens.

- Koncentracija glukoze određena je enzimskom metodom sa heksokinazom (HK)
- Koncentracija UH određena je enzimskom metodom sa holesterol esterazom, holesterol oksidazom i peroksidazom (CHOD-PAP)
- Koncentracija TG određena je enzimskom metodom sa lipazom, glicerol kinazom, glicerol-3-fosfat oksidazom i peroksidazom (GPO-PAP)
- Koncentracija HDL-h je određena direktnom enzimskom metodom
- Koncentracija LDL-h u uzorcima u kojima je koncentracija TG bila $\leq 4,0$ mmol/L izračunata je pomoću Friedewald formule (157) na sledeći način: $\text{LDL-h (mmol/L)} = \text{UH} - \text{HDL-h} - \text{TG}/2,2$, dok je u uzorcima sa koncentracijom TG $> 4,0$ mmol/L, koncentracija LDL-h određena direktnom metodom uz upotrebu komercijalnih testova proizvođača Siemens.

3.3.2. Metode za određivanje markera inflamacije

- Koncentracija hsCRP određena je imunoturbidimetrijskom metodom koja koristi lateks tehnologiju, uz upotrebu reagenasa proizvođača Roche (Tina-quant® CRP Roche, Indianapolis USA)
- Određivanje koncentracije PTX3 izvršeno je pomoću ELISA „sendvič“ imunoeseja (Human Pentraxin3 DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) čiji princip se zasniva na stvaranju tzv. „sendviča“ sačinjenog od: primarnog monoklonskog antitela specifičnog za određeni domen PTX3 i imobilisanog za mikroploču, samog PTX3 i sekundarnog antitela koje je specifično za drugi epitop PTX3.

3.3.3. Metoda za određivanje koncentracije MDA

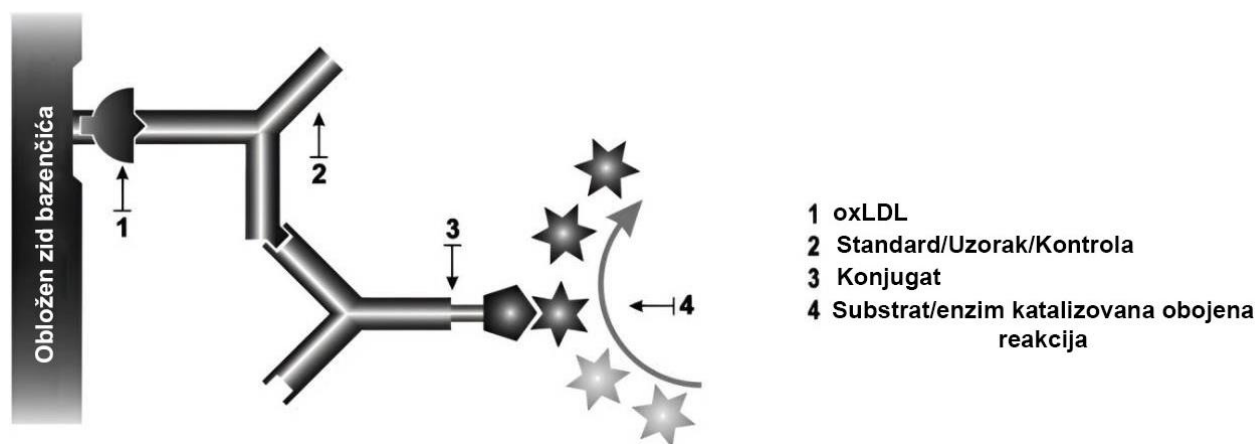
- Koncentracija MDA određena je Girroti metodom (158) koja se zasniva na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid*, TBA) uz stvaranje ružičastog kompleksa MDA-TBA čija se apsorbancija meri spektrofotometrijski na 535 nm. Intenzitet boje nastalog kompleksa proporcionalan je koncentraciji MDA u uzorku.

3.3.4. Metoda za određivanje koncentracije IgG anti-oxLDL antitela

- IgG anti-oxLDL antitela određena su u uzorcima seruma korišćenjem komercijalno dostupnog ELISA testa (OLAB IgG Anti Oxidized Low Density Lipoprotein, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Austria) prema specifikaciji proizvođača.

3.3.4.1. Princip metode

Princip određivanja koncentracije IgG anti-oxLDL antitela prikazan je na Slici 5. Mikrotitarska ploča priložena u kompletu je prethodno obložena oxLDL koji ima ulogu antigena. Standardi, uzorci i kontrole su pipetirani u bazenčiće sa konjugovanim oxLDL. Antitela prisutna u uzorcima ispitanika su se vezala za oxLDL, a po dodavanju sekundarnog antitela obeleženog enzimom - peroksidazom i substrata došlo je do razvijanja boje usled formiranja antigen-antitelo kompleksa. Intenzitet boje kompleksa bio je proporcionalan koncentraciji antitela u uzorku.



Slika 5. Princip određivanja koncentracije IgG anti-oxLDL antitela

(Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz uputstva proizvođača testa: OLAB IgG Anti oxidised low density lipoprotein. Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of human IgG autoantibodies against oxidised low density lipoprotein in serum. Cat. No. BI-20032; 12 x 8 tests)

3.3.4.2. Karakteristike testa

- Referentni opseg: medijana 263 mU/mL (n = 50)
- Standardni opseg: 37 – 1200 mU/mL
- Zapremina uzorka: 50 µL seruma
- Limit detekcije: 48 mU/mL (37 mU/mL + 3x SD)
- Vreme inkubacije: 90 min./30 min./15 min.

Podaci vezani za preciznost testa prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Preciznost ELISA kita za određivanje IgG anti-oxLDL antitela

Unutar testa (n=8)	Uzorak 1	Uzorak 2	Između testova (n=5)	Uzorak 1	Uzorak 2
Srednja vrednost (mU/mL)	119	324	Srednja vrednost (mU/mL)	139	544
SD (mU/mL)	4	14	SD (mU/mL)	11	22
CV %	4	4,3	CV %	8	4

3.3.4.3. Materijal i oprema

U Tabeli 2 prikazan je sadržaj ELISA kita.

Tabela 2. Komponente ELISA kita

Skraćenica	Komponenta kita
PLATE	oxLDL obložena mikrotitarske trake
ASYBUF	Pufer za ispitivanje
WASHBUF	Koncentrat pufera za pranje, 20x
STD	Standardi (37, 75, 150, 300, 600, 1200 mU/mL oLAB IgG)
CTRL	Kontrole (300, 1000 mU/mL),
CONJ	Konjugat - peroksidaza rena (monoklonalni anti humani IgG HRPO)
SUB	Substrat (TMB rastvor)
STOP	Stop rastvor H ₂ SO ₄

3.3.4.4. Priprema odgovarajućeg razblaženja i izvođenje postupka

Uzorci su dobro promešani pre izvođenja analize. Lipemični i hemolizovani uzorci nisu korišćeni.

Pufer za pranje (WASHBUF) je bio u obliku koncentrata, a tokom izvođenja testa se koristio u razblaženom obliku, pa je razblaženje napravljeno u odnosu 1:20 (50 mL pufera i 950 mL destilovane vode).

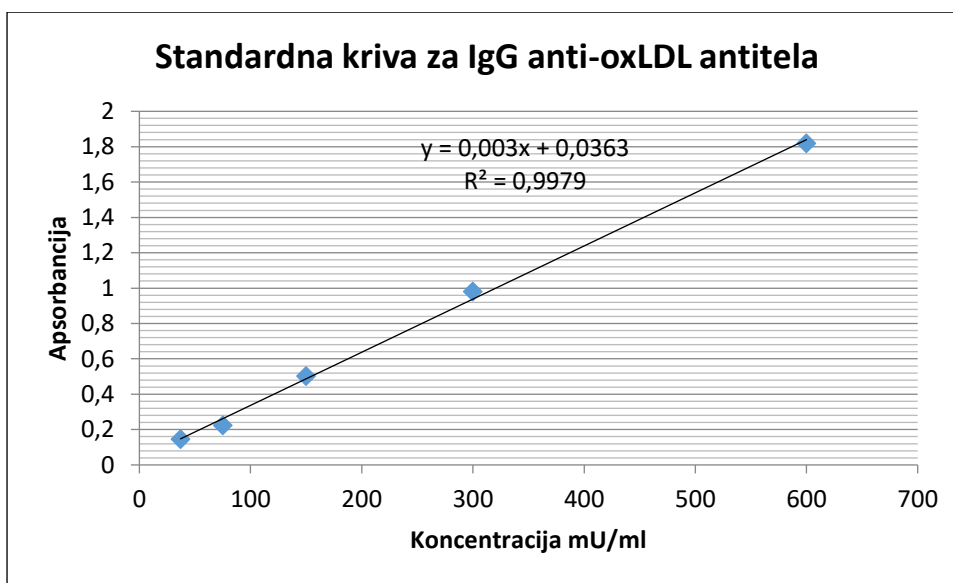
Predilucija: svi standardi, uzorci i kontrole su korišćeni u konačnom razblaženju 1:55, tako da je najpre napravljeno prethodno razblaženje u odnosu 1:5, a zatim i razblaženje testa u odnosu 1:11. Pravljenje prethodnog razblaženja (1:5) je izvršeno dodavanjem 200 µL pufera za ispitivanje (ASYBUF) i 50 µL standarda/uzorka/kontrole u odgovarajuće bazenčiće neobložene mikrotitarske ploče, a zatim je sve dobro promešano. Ovako razblaženi materijal je upotrebljen dalje u testu u roku od 15 minuta.

Izvođenje testa: svi reagensi i uzorci su pre početka izvođenja testana temperirani na 18-24°C. Na listi protokola označene su pozicije za slepu probu/ standard/ uzorak/ kontrolu. U

odgovarajuće bazenčice obloženih mikrotitarskih traka pomoću multikanalne pipete i odgovarajućih nastavaka za jednokratnu upotrebu dodato je po 200 μL pufera za ispitivanje uključujući i bazenčić za slepu probu. Zatim je u roku od 15 minuta na isti način dodato po 20 μL prethodnog razblaženja (1:5) u svaki bazenčić osim praznog za slepu probu i lagano promešano. Ovako pripremljena ploča je pokrivena i inkubirana 90 minuta na 37°C. Potom je sadržaj bazenčića aspiriran i bazenčići su isprani četiri puta sa po 300 μL razblaženog pufera za pranje, pri čemu je nakon poslednjeg pranja preostali pufer za pranje uklonjen udaranjem ploče o papirni ubrus. Posle toga dodato je 100 μL konjugata (CONJ) u svaki bazenčić osim praznog za slepu probu, sve je dobro pokriveno i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi (18-24°C). Ponovo je na isti način izvršeno prethodno opisano ispiranje bazenčića, a zatim je dodato po 100 μL substrata (SUB) u svaki bazenčić i izvršena inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Na kraju je dodato po 50 μL stop rastvora (STOP) u svaki bazenčić i odmah izmerena apsorbancija na 450 nm.

3.3.4.5. Konstruisanje standardne krive

Apsorbancija za slepu probu je oduzeta od svih ostalih vrednosti, a zatim je konstruisana standardna kriva na osnovu vrednosti izmerenih apsorbancija za standarde poznatih koncentracija (Slika 6). Koncentracije IgG anti-oxLDL antitela u uzorcima dobijene su iz standardne krive, pri čemu su uzeti u obzir faktori razblaženja. Uzorci u kojima je koncentracija bila veća od 1100 mU/mL su dalje razblaživani i podvrgnuti ponovnom merenju.



Slika 6. Standardna kriva za IgG anti-oxLDL antitela

3.3.5. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija

Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija izvršeno je metodom vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gradijentu (3-31%) gelu. Upotrebom kompozitnog gradijenta gela, omogućeno je istovremeno razdvajanje LDL i HDL subfrakcija. Primenjena elektroforetska tehnika predstavlja modifikovanu metodu Rainwatera i saradnika (159) koja je optimizovana na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Pod uticajem jednosmerne električne struje, pri konstantnom naponu, lipoproteinske čestice se kreću duž gela pri čemu dolazi do njihovog razdvajanja na osnovu razlika u veličini tako da LDL čestice ostaju bliže katodi, dok HDL čestice putuju duže i pojavljuju se u blizini anode.

3.3.5.1. Izlivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova

Za pripremu kompozitnih gradijent (3-31%) gelova korišćen je sistem za izlivanje *Hoefler SE 675* (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria). Komponente ovog sistema bile su:

- Staklene ploče dimenzija 16 x 18 cm
- Plastični spaceri debljine 1,5 mm
- Češljici pomoću kojih su na gelu pravljena mesta za nanošenje uzoraka

Odgovarajući koncentracioni gradijent poliakrilamida dobijen je mešanjem 3% i 31% rastvora monomera akrilamida u Tris puferu, pH 8,3 pripremljenom od tri komponente: 90 mmol/L tris, 80 mmol/L borne kiseline i 2,5 mmol/L Na₂EDTA (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, USA). Za pripremanje poliakrilamidnog gela korišćeni su još i: tetrametilen-diamin (TEMED) i amonijum-persulfat (APS) (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) zahvaljujući kojima je izvršena polimerizacija gela. Za postizanje dodatne gustine 31% rastvora akrilamida i ravnomernije slaganje slojeva gela, upotrebljen je 70% rastvor glicerola (Macron, Center Valley, PA, USA) (160).

U komoru za izlivanje gelova postavljena su 4 kalupa. Mešanje monomera je izvršeno pomoću dve peristaltičke pumpe *Masterflex L/S* (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills, IL, USA) čiji rad je kontrolisan softverom *Masterflex Linkable Instrument Control Software* (WinLIN). Kontrolisanim mešanjem monomera formiran je gradijent koncentracije gela od 12 segmenata. 13. segment je sastavljen samo od 31% poliakrilamida i dodat je da bi se sprečilo skraćivanje gela prilikom polimerizacije. Na kraju, na dno komore za izlivanje, izvršeno je lagano upumpavanje 70% rastvora glicerola kako bi se postiglo podizanje gradijenta do ivice staklenih ploča. Nakon izlivanja gelova, na površinu svakog kalupa, naneto je 300 µL Tris pufera, da bi se sprečio kontakt sa vazduhom tokom polimerizacije koja se vrši preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku polimerizacije, gelovi su isprani destilovanom vodom, konzervisani i čuvani do upotrebe u hermetički zatvorenim kesama u Tris puferu kome je dodat Na-azid (20 mg/L).

3.3.5.2. Izvođenje gradijent-gel elektroforeze

Elektroforetsko razdvajanje LDL i HDL subfrakcija je izvedeno u vertikalnoj kadi *Hoefler SE 600 Ruby* (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria) u Tris puferu, pH 8,3 na temperaturi od 8°C. Pre nanošenja uzoraka, izvršena je aktivacija gelova na 290 V tokom 50 minuta, kao i mešanje uzoraka plazme (30 µL) sa 10 µL 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze kako bi se postigla bolja vidljivost uzoraka tokom nanošenja i njihovog kretanja kroz gel. Dobijena smeša (25 µL) je potom nanescena na gel, a paralelno su u posebne trake na gelu postavljeni i standardi. Sam proces elektroforeze je izveden pri konstantnom naponu na sledeći način:

- 13 minuta na 60 V
- 20 minuta na 170 V
- 20 h na 300 V

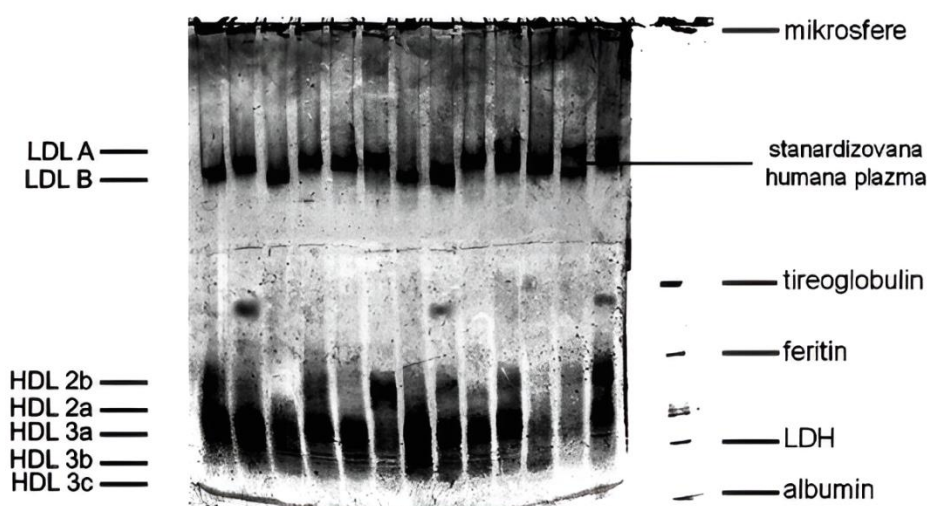
Kalibracija gelova je izvršena korišćenjem sledećih standarda:

- Proteinski standardi velike molekulske mase (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria) su upotrebljeni za kalibraciju HDL subfrakcija, jer su sastavljeni od proteina poznatog dijametara: tireoglobulina (17,0 nm), feritina (12,2 nm), laktat-dehidrogenaze (8,4 nm) i albumina (7,1 nm). Priprema proteinskog standarda je izvršena dodavanjem 100 µL Tris pufera, pH 8,3 u jednu bočicu standarda, nakon čega je 20 µL rastvorenog standarda pomešano sa 10 µL 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. U zadnju traku svakog gela naneto je po 10 µL na ovaj način pripremljenog standarda.
- Standardizovana humana plazma sadrži dve LDL subfrakcije čija standardizacija je izvršena u Laboratoriji za genetiku lipoproteina (Southwest Foundation for Biomedical Research,

San Antonio, TX, USA). Po 30 μ L standardne humane plazme je pomešano sa 10 μ L 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. U posebnu traku svakog gela naneto je 25 μ L ove smeše.

- Karboksilovane polistirenske čestice (mikrosfere) dijametra 40 nm (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA) su korišćene za konstruisanje kalibracione krive za veličinu LDL čestica, pored standardizovane humane plazme i tireoglobulina. 10 μ L mikrosfera pomešano je sa 40 μ L Tris pufera, pH 8,3 i 50 μ L boje Sudan Black B (Merck, Darmstadt, Germany), a potom zagrevano 6 h na 40°C. Smeši je nakon hlađenja dodato 100 μ L 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. 10 μ L smeše mikrosfera naneto je u traku sa prethodno nanesenim proteinskim standardima.

Po završetku elektroforetskog razdvajanja, gelovi su skinuti sa nosača i odsećene su trake sa proteinskim standardima, nakon čega su gelovi fiksirani 1 h u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline (Acros Organic, Geel, Belgium), a zatim su sat vremena ispirani u 45% rastvoru etanola (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, USA). Posle ispiranja, izvršeno je bojenje gelova preko noći u rastvoru Sudan Black B u 45% etanolu, a zatim i odbojavanje u 45% etanolu, takođe preko noći. Traka sa proteinskim standardima je nakon fiksiranja u 10% trihlorsirćetnoj kiselini, ispirana sat vremena destilovanom vodom i bojena 5 h sa 0,75% rastvorom boje Comassie brilliant blue G-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Višak boje je uklonjen pomoću smeše etanola, sirćetne kiseline i vode (3:1:8). Po završetku odbojavanja, gelovi i proteinski standardi su preko noći ostavljeni u Tris puferu, pH 8,3 radi uspostavljanja prvobitnog oblika i veličine, a zatim su podvrgnuti skeniranju. Na Slici 7. prikazan je izgled gela nakon elektroforetskog razdvajanja.



Slika 7. Izgled gela sa razdvojenim LDL i HDL subfrakcijama i proteinskim standardima (Uz izmene na srpski jezik preuzeto iz: Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-316.)

3.3.5.3. Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija

Denzitometrijsko skeniranje gelova izvršeno je na skeneru *Image Scanner III* (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Austria) uz korišćenje softvera *Magic Scan software* (version 4,6;1999; UMAX Data Systems, Inc). Za analiziranje gelova upotrebljen je *Image Quant software* (version 5.2;1999; Molecular Dynamics).

Evaluacija razdvojenih LDL i HDL subfrakcija podrazumevala je:

- Određivanje dominantnog LDL i HDL dijametra na osnovu najvišeg pika u odgovarajućem regionu

- Utvrđivanje LDL i HDL fenotipa na osnovu dominantnog dijametra ovih čestica, pri čemu su LDL B fenotip činile čestice čiji je LDL dijametar $\leq 25,5$ nm, dok su HDL 3 fenotipu pripadale HDL čestice dijametra $\leq 8,8$ nm
- Određivanje relativnog udela (%) svake pojedinačne LDL i HDL subfrakcije na osnovu površine ispod pika denzitometrijskog skeniranja. Povećani udeo sdLDL definisan je ako je više od 50% celokupnih LDL čestica detektovano u oblasti $\leq 25,5$ nm. Shodno tome, povećani udeo malih, gustih HDL čestica razmatran je ako je više od 50% ukupnih HDL čestica detektovano u oblasti $\leq 8,8$ nm.

3.3.6. Metode za određivanje paraoksonazne aktivnosti PON1 i relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 u različitim HDL subfrakcijama

3.3.6.1. Određivanje paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu

Određivanje paraoksonazne aktivnosti enzima PON1 izvršeno je primenom Richter-Furlong metode (161) koja je zasnovana na delovanju PON1 na supstrat paraokson pri čemu nastaje p-nitrofenol koji se u alkalnoj sredini javlja u obliku p-nitrofenoksidnog anjona. Kinetički je praćena brzina stvaranja p-nitrofenoksidnog anjona i izračunata promena apsorbancije po minuti. Aktivnost PON1 je izražena u U/L.

3.3.6.2. Određivanje relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama

Nakon elektroforetskog razdvajanja HDL čestica, za procenu distribucije aktivnosti PON1 unutar različitih HDL subfrakcija korišćena je zimogram metoda predložena od strane Gugliucci i saradnika (162). Ova metoda kombinuje gradijent gel elektroforezu i merenje aktivnosti PON1 u istom gelu, čime je omogućena istovremena analiza raspodele HDL subfrakcija i serumske aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama. Osnovni princip metode zasniva se na hidrolizi fenilacetata arilesteraznom aktivnošću enzima PON1. Fenol, koji nastaje kao proizvod arilesterazne aktivnosti PON1, reaguje sa 4-aminoantipirinom u prisustvu $K_3[Fe(CN)_6]$ gradeći obojen kompleks koji se pojavljuje u gelu u vidu ružičastih frakcija. Intenzitet boje kompleksa odgovara aktivnosti PON1 na HDL 2 odnosno HDL 3 subfrakcijama. Relativni udeo aktivnosti PON1 unutar pojedinačnih HDL subfrakcija (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) određen je denzitometrijski i procenjen utvrđivanjem površine ispod vrhova denzitometrijski skeniranih pikova.

Opis postupka: pre početka izvođenja postupka, izvršena je aktivacija gelova pomoću sveže napravljenog TRIS-HCl pufera (0,1 mol/L TRIS-HCl; 2 mmol/L $CaCl_2$; pH 8,3) koja je podrazumevala stajanje gelova 2 puta po 15 minuta u svežem puferu, na 25°C, uz blago mešanje. Po završetku aktivacije, gelovi su prebaćeni u posudu sa 200 mL rastvora 20 mmol/L 4-aminoantipirina i 2 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ i inkubirani uz blago mešanje 15 minuta na 25°C, na tamnom mestu. Nakon toga, dodato je 80 mL rastvora 4-aminoantipirina i $K_3[Fe(CN)_6]$ i 54,4 μ L fenilacetata direktno na gel i izvršena inkubacija u trajanju od 20 minuta na 25°C, uz blago mešanje, zaštićeno od dejstva svetlosti. Posle pojave ružičaste boje na gelu, rastvor za razvijanje boje je prosut, a gel ispran i ostavljen da stoji na tamnom mestu u hladnom rastvoru 5 mmol/L EDTA, 5 minuta, uz blago mešanje.

3.4. Statistička analiza

Provera tipa raspodele podataka izvršena je *Kolmogorov-Smirnov* ili *Shapiro-Wilk* testom u zavisnosti od veličine grupa koje se porede. Kontinuirani podaci koji su sledili normalnu raspodelu predstavljeni su kao aritmetičke srednje vrednosti sa standardnim devijacijama ($\bar{x} \pm Sd$), dok su kontinuirani podaci koji nisu pratili normalnu raspodelu prikazani su kao medijane (Me) sa interkvartilnim rasponima. Kategorički podaci su predstavljeni kao apsolutne ili relativne frekvence.

Za poređenje normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli korišćeni su *Student's t-test* ili analiza varijanse (ANOVA) sa *Tukey's post hoc* testom, u zavisnosti od broja grupa koje se porede. S druge strane, prema broju grupa koje se porede, kontinuirane varijable koje nisu sledile normalnu raspodelu analizirane su *Mann-Whitney U* testom ili *Kruskal-Wallis* testom sa *Mann-Whitney U* testom kao *post hoc* testom uz *Bonferroni* korekciju. Analiza malog broja podataka izvršena je korišćenjem *Mann-Whitney U exact* testa. Za ispitivanje razlike između kategoričkih varijabli upotrebljen je *Chi-kvadrat* (χ^2) test. Razlika između grupa nakon korekcije za starost, HTA i status pušenja ispitana je analizom kovarijanse (ANCOVA). Uticaj statusa bolesti i povećanog udela sdLDL na distribuciju HDL subfrakcija i PON1 unutar različitih HDL subfrakcija, procenjen je upotrebom dvofaktorske ANOVE.

Za utvrđivanje povezanosti LDL dijametra i koncentracije IgG anti-oxLDL antitela sa umerenim rizikom definisanim SYNTAX skorom, primenjena je logistička regresiona analiza sa korekcijom u odnosu na ometajuće varijable kao što su: starost, glukoza, hsCRP, PTX3 i HDL dijametar.

Korelacija između različitih parametara proverena je primenom Spearmanove neparametarske korelacione analize.

Za ispitivanje nezavisnog uticaja parametara inflamacije i lipidne peroksidacije na udeo PON1 unutar HDL, korišćena je multipla linearna regresiona analiza sa „forward“ selekcijom, pri čemu je za obezbeđivanje linearne veze između zavisnih i nezavisnih varijabli izvršena log-transformacija vrednosti sledećih parametara: sdLDL, LDL-h, HDL-h, TG, MDA i hsCRP. Da bi se izbegla multikolinearnost, VIF skor je bio < 10 , a tolerance skor $> 0,2$.

Kao minimalni uslov za postojanje statističke značajnosti, uzeta je verovatnoća $p < 0,05$. Za statističku obradu rezultata, korišćen je program SPSS, verzija 27 (PASW® Statistic for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. REZULTATI

4.1. Analiza raspodele HDL i LDL subfrakcija, koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, PTX3, MDA i aktivnosti PON1 kod KG, SAP i STEMI ispitanika

Na početku istraživanja analizirani su udeli HDL i LDL subfrakcija, koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, PTX3, MDA i aktivnosti PON1 kod KG, SAP i STEMI ispitanika. Posmatrano je da li su grupe homogene u odnosu na demografske karakteristike i osnovne biohemijske parametre. Raspodela podataka testirana je *Kolmogorov-Smirnov* testom u KG i STEMI grupi, odnosno *Shapiro-Wilk* testom u SAP grupi. Starost, UH, LDL-h i udeli HDL subfrakcija imali su normalnu raspodelu, dok BMI, glukoza, TG, HDL-h, hsCRP, PTX3, MDA, IgG anti-oxLDL antitela, PON1, HDL dijametar, LDL dijametar i udeli LDL subfrakcija nisu bili normalno distribuirani.

4.1.1. Demografske karakteristike i osnovni biohemijski parametri u tri ispitivane grupe

U Tabeli 3. prikazane su demografske karakteristike i koncentracije osnovnih biohemijskih parametara kod 67 ispitanika KG, 21 SAP i 69 STEMI bolesnika.

Tabela 3. Demografske karakteristike i osnovni biohemijski parametri kod KG, SAP i STEMI ispitanika

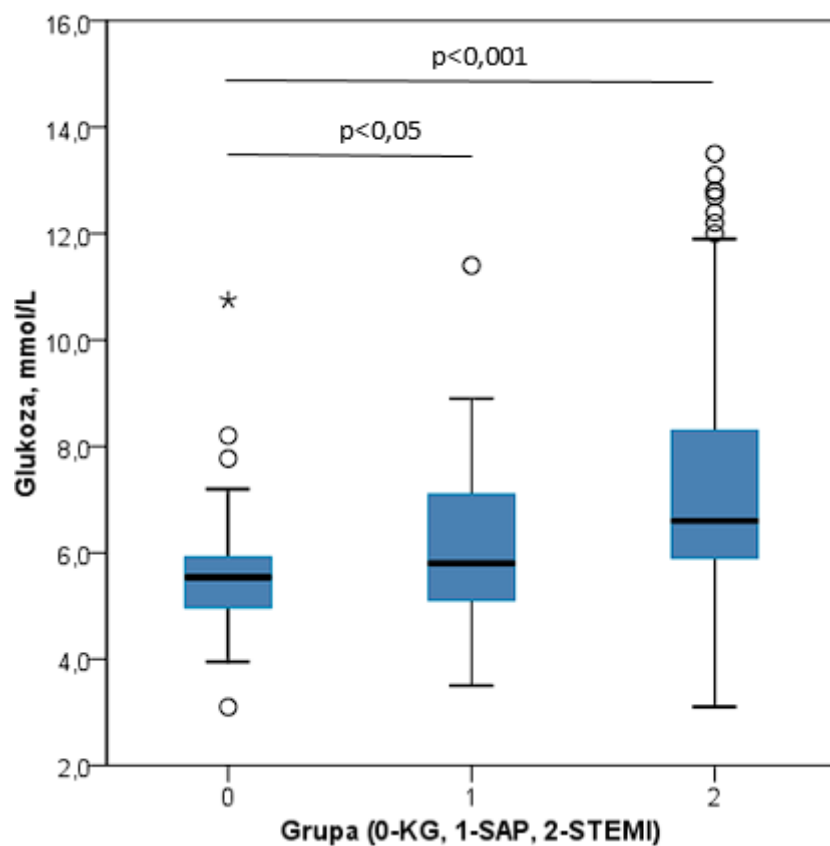
Varijabla	KG	SAP	STEMI	p vrednost
N	67	21	69	/
Starost, godine	55±9	60±10*	60±12*	0,010 ^a
Pol, muškarci %	73	71	80	0,591 ^c
BMI, kg/m ²	26,4 (24,4-29,5)	28,1 (25,6-31,4) [#]	25,4 (23,4-27,8)	0,009 ^b
Pušači, %	19,4	23,8	58**	<0,001 ^c
HTA, %	38,8	66,7*	61,8*	0,011 ^c
Terapija statinima,%	/	38,1 [#]	1,4	0,002 ^c
Glukoza, mmol/L	5,5 (4,9-5,9)	5,8 (4,8-7,4) [#]	6,7 (5,9-8,7)**	<0,001 ^b
UH, mmol/L	5,70±1,09	4,56±1,14* [#]	5,53±1,30	0,001 ^a
TG, mmol/L	1,37 (0,97-1,72)	0,94 (0,71-1,93) [#]	1,68 (1,20-2,32)*	0,003 ^b
HDL-h, mmol/L	1,26 (0,96-1,54)	1,01 (0,77-1,15)*	0,96 (0,80-1,18)**	<0,001 ^b
LDL-h, mmol/L	3,65±1,06	2,92±1,07* [#]	3,67±1,12	0,019 ^a

* $p < 0,05$ ili $p < 0,017$ za Bonferroni korekciju vs kontrolna grupa; ** $p < 0,001$ vs kontrolna grupa; [#] $p < 0,05$ ili $p < 0,017$ za Bonferroni korekciju vs STEMI; Normalno distribuirane kontinuirane varijable predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ Sd, kontinuirane varijable čija distribucija nije bila normalna prikazane su kao medijana i interkvartilni raspon, kategoričke varijable su predstavljene kao apsolutne i relativne frekvence; Poređenja: ^aANOVA sa Tuckey post hoc testom, ^bKruskal Wallis test sa Mann Whitney post hoc testom uz Bonferroni korekciju, ^c χ^2 test homogenosti; (Skraćenice: BMI- indeks telesne mase; HTA- arterijska hipertenzija; UH- ukupni holesterol; TG- trigliceridi; HDL-h- HDL-holesterol; LDL-h- LDL-holesterol).

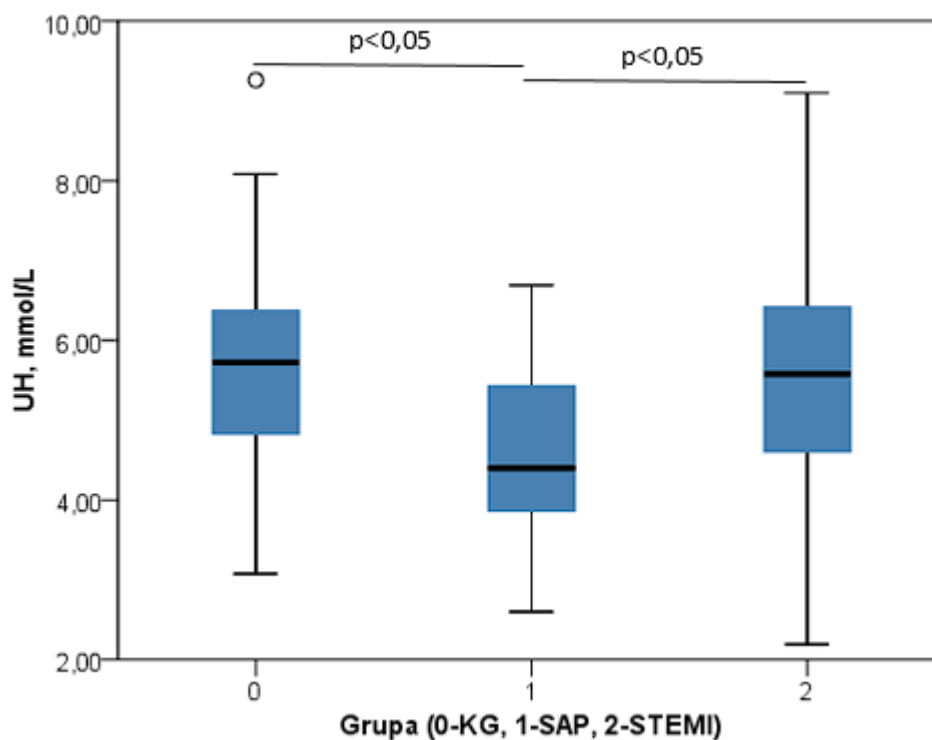
Sve tri ispitivane grupe bile su ujednačene po polu, ali je uočena statistički značajna razlika između grupa kada se posmatraju nelipidni tradicionalni faktori rizika: starost, BMI, status pušenja, HTA i hiperglikemija. Naime, bolesnici sa SAP i STEMI su bili stariji u odnosu na ispitanike KG. Očekivano, veća učestalost HTA zapažena je u obe grupe bolesnika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, dok su prevalencija pušača i koncentracija glukoze bile najviše kod STEMI bolesnika. Dalje, pokazana je statistički značajno niža koncentraciji tri parametra lipidnog statusa: UH, TG i

LDL-h kod SAP bolesnika u poređenju sa STEMI bolesnicima. Konačno, koncentracija HDL-h bila je niža u obe grupe bolesnika u odnosu na ispitanike KG.

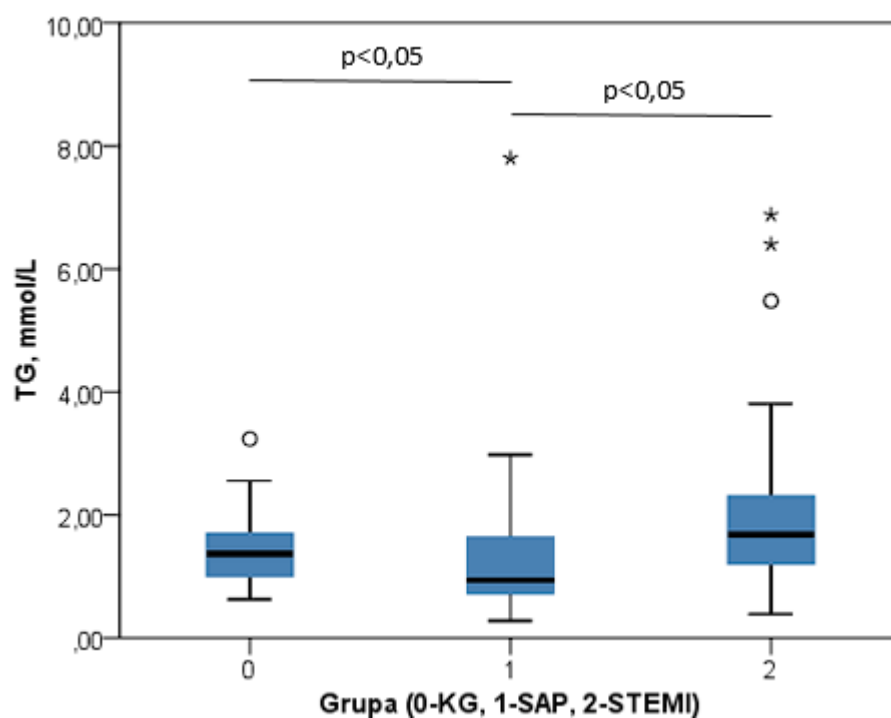
Na Slikama 8-12 prikazani su parametri čije su se koncentracije razlikovale između ispitivanih grupa.



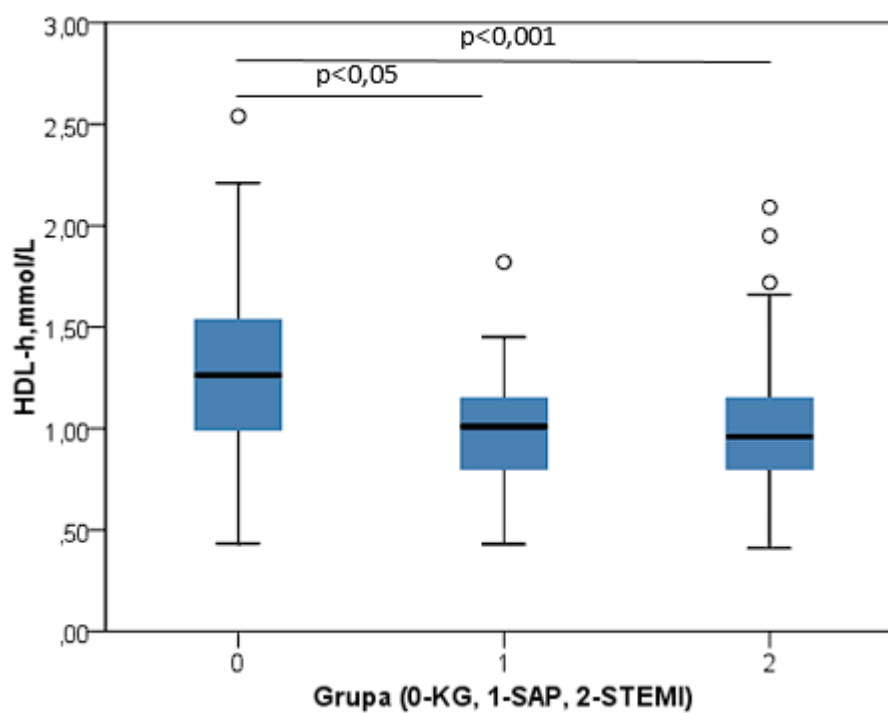
Slika 8. Koncentracija glukoze u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



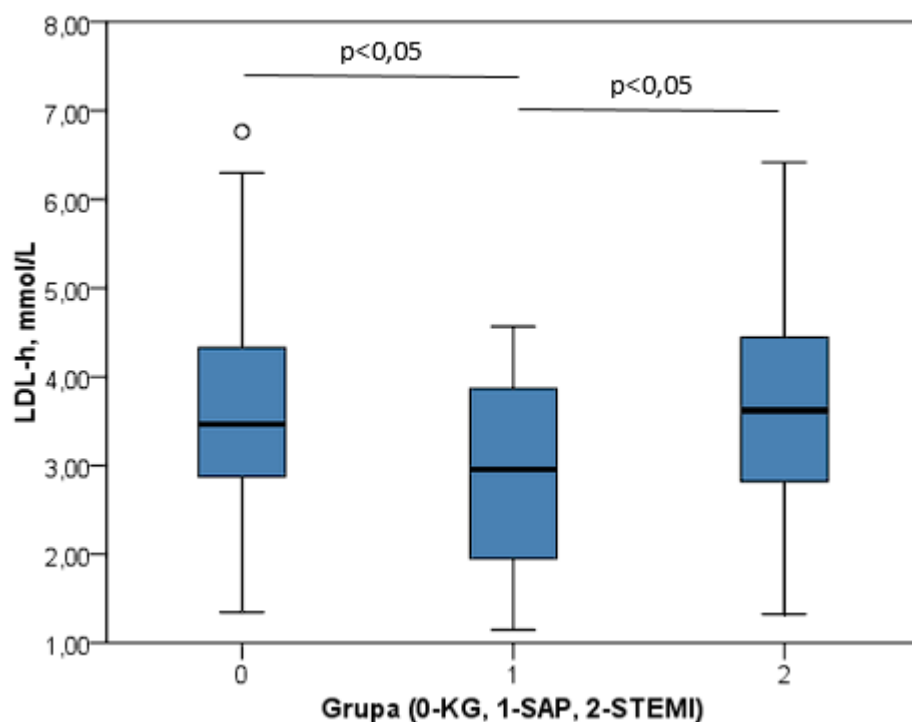
Slika 9. Koncentracija UH u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 10. Koncentracija TG u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 11. Koncentracija HDL-h u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 12. Koncentracija LDL-h u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI

4.1.2. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije u tri ispitivane grupe

U Tabeli 4. predstavljeni su parametri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije u sve tri ispitivane grupe.

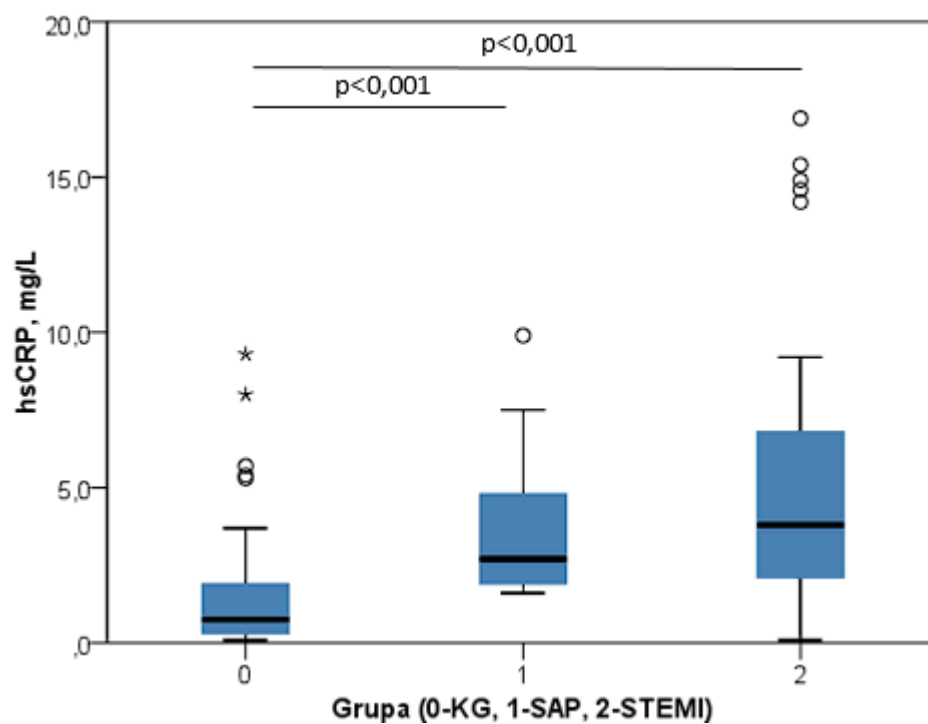
Tabela 4. Koncentracije markera inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod KG, SAP i STEMI ispitanika

Varijabla	KG	SAP	STEMI	p vrednost
N	67	21	69	/
hsCRP, mg/L	0,7 (0,3-1,9)	2,7 (1,9-4,9)**	3,7 (2,1-7,2)**	<0,001
PTX3, ng/mL	1,0 (0,7-1,2)	1,8 (1,6-2,2)**	2,4 (1,5-5,4)**	<0,001
IgG anti-oxLDL, mU/mL	90,5 (50,3-275,7)	69,0 (23,5-268,2)	103,0 (53,6-230,6)	0,427
MDA, μ mol/L	3,74 (3,26-4,28)	6,37 (5,63-7,59)**	3,26 (2,44-6,22)	<0,001

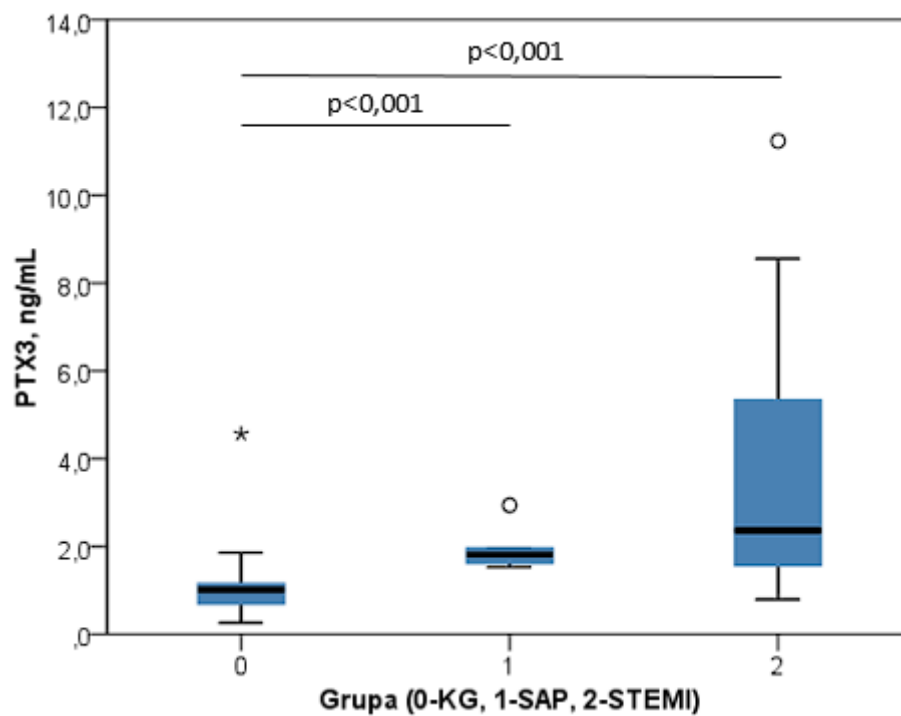
** $p < 0,001$ vs kontrolna grupa; Vrednosti svih parametara prikazane su kao medijana i interkvartilni raspon; Poređenje grupa izvršeno je Kruskal Wallis testom sa Mann Whitney post hoc testom uz Bonferroni korekciju;

(Skraćenice: hsCRP- visokoosetljivi C-reaktivni protein, PTX3- pentraksin 3, IgG anti-oxLDL- antitela IgG klase na oksidovani LDL, MDA- malondialdehid)

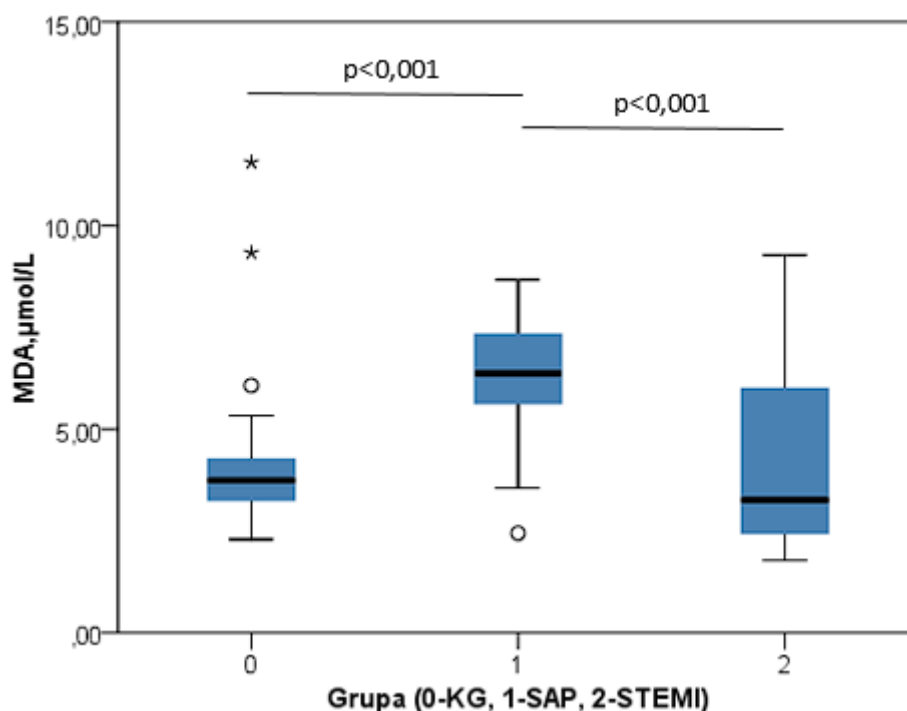
Identifikovane su značajno više koncentracije inflamatornih markera hsCRP i PTX3 u obe grupe bolesnika u poređenju sa ispitanicima KG (Slike 13 i 14), dok nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji IgG anti-oxLDL antitela između ispitivanih grupa. Takođe, utvrđena je statistički značajno viša koncentracija MDA kod bolesnika sa SAP u odnosu na kontrolne ispitanike i STEMI bolesnike (Slika 15).



Slika 13. Koncentracija hsCRP u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 14. Koncentracija PTX3 u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 15. Koncentracija MDA u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI

4.1.3. Veličina i zastupljenost HDL i LDL subfrakcija i paraoksonazna aktivnost PON1 u tri ispitivane grupe

Pored osnovnih parametara lipidnog statusa, u okviru ove studije izvršeno je i određivanje paraoksonazne aktivnosti PON1, dijametara HDL i LDL čestica, kao i ispitivanje distribucije lipoproteinskih subfrakcija kod KG, SAP i STEMI ispitanika. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.

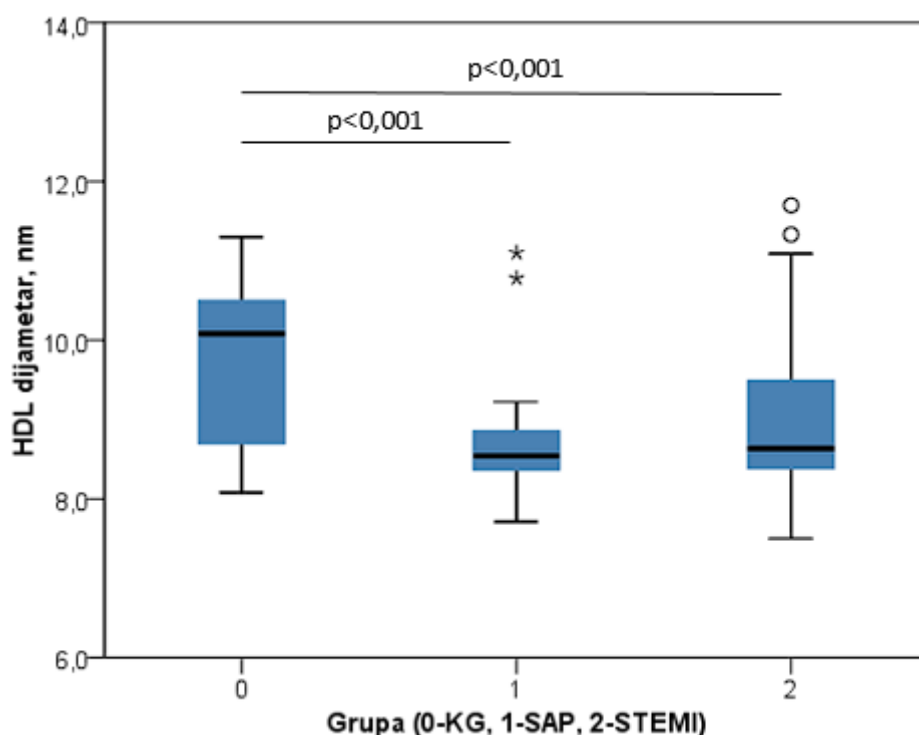
Tabela 5. Dijametri HDL i LDL čestica i raspodela HDL i LDL subfrakcija kod KG, SAP i STEMI ispitanika

Varijabla	KG	SAP	STEMI	p vrednost
N	67	21	69	/
HDL dijametar, nm	10,1 (8,7-10,5)	8,5 (8,3-8,9)**	8,6 (8,4-9,5)**	<0,001 ^b
HDL 2, %	60,4±9,1	58,0±5,5	58,5±7,5	0,285 ^a
HDL 3, %	39,5±9,0	41,9±5,5	41,3±7,3	0,288 ^a
HDL 3 fenotip, %	26,9	75**	62,1**	<0,001 ^c
PON1, U/L	295,0 (216,0-544,0)	484,0 (188,5-693,0)	353,5 (180,0-614,0)	0,659
LDL dijametar, nm	26,8 (25,6-27,3)	25,9 (24,3-26,8)*	24,8 (23,6-26,0)**	<0,001 ^b
LDL I, %	19,7 (17,0-25,5)	20,7 (17,6-25,5)	19,3 (17,4-23,3)	0,547 ^b
LDL II, %	26,4 (22,9-28,8)	28,5 (25,1-31,7) [#]	25,2 (22,6-27,9)	0,030 ^b
LDL III, %	22,2 (18,8-24,6)	22,8 (18,2-24,9)	21,6 (20,0-24,3)	0,957 ^b
LDL IV, %	29,2 (23,7-33,3)	27,4 (20,3-32,6) [#]	30,8 (26,8-35,3)	0,035 ^b
LDL B fenotip, %	22,4	40**	62,1**	<0,001 ^c
SdLDL, %	53,3 (43,0-58,5)	47,7 (44,7-55,9)	54,5 (48,1-58,7)	0,082 ^b

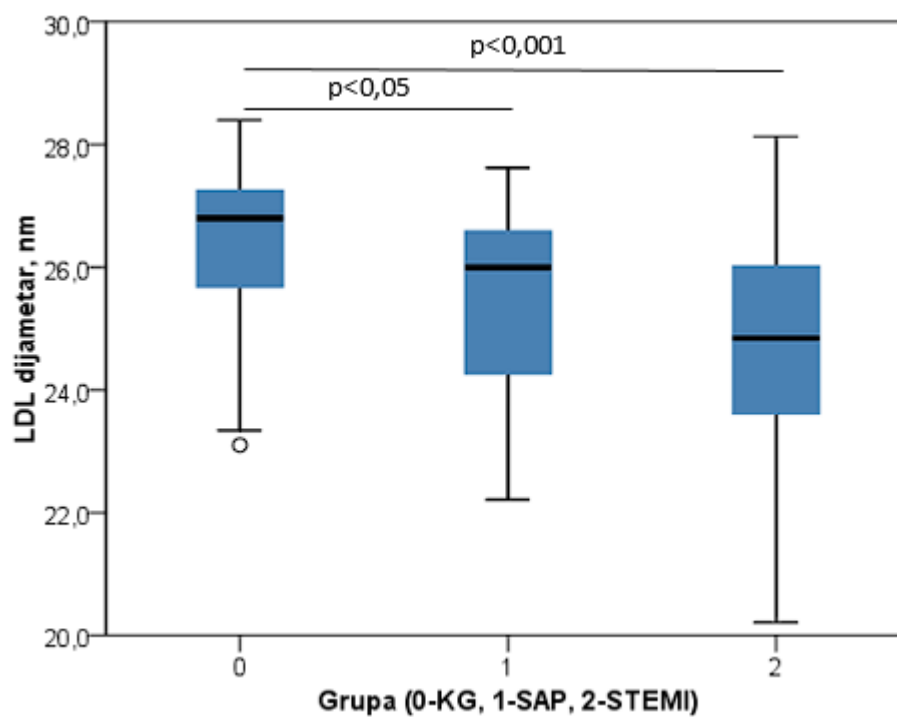
* $p < 0,05$ ili $p < 0,017$ za Bonferroni korekciju vs kontrolna grupa; ** $p < 0,001$ vs kontrolna grupa; [#] $p < 0,05$ ili $p < 0,017$ za Bonferroni korekciju vs STEMI; Normalno distribuirane kontinuirane varijable predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ Sd, a kontinuirane varijable čija distribucija nije bila normalna prikazane su kao

medijana i interkvartilni raspon; Poređenje grupa izvršeno je korišćenjem: ^aANOVA sa Tuckey post hoc testom za normalno distribuirane varijable, ^bKruskal Wallis testom sa Mann Whitney post hoc testom uz Bonferroni korekciju za varijable koje nisu sledile normalnu raspodelu i ^c χ^2 testom;

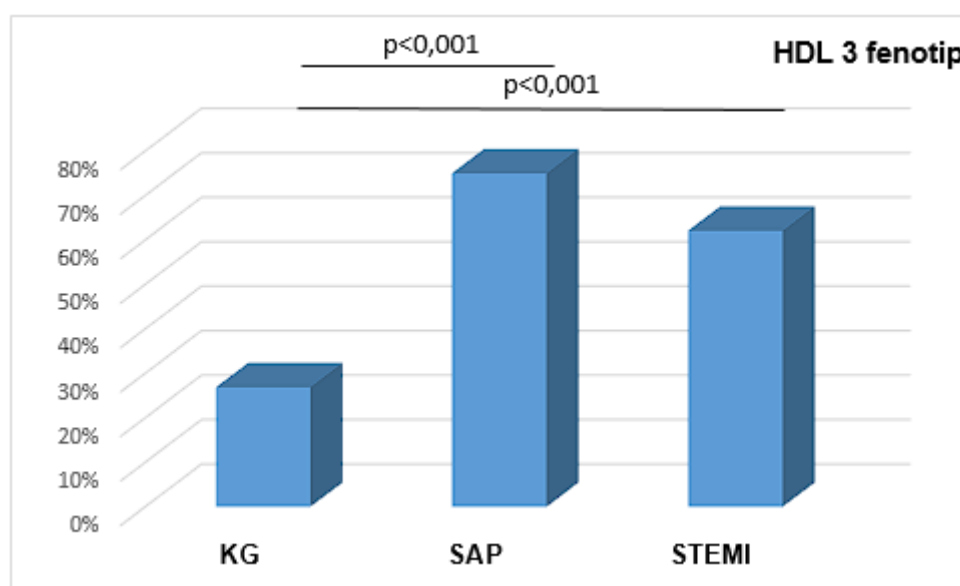
Kod bolesnika obe grupe nađeni su značajno manji dijametri HDL i LDL čestica u odnosu na kontrolne ispitanike (Slike 16 i 17). Kao što je i očekivano, zastupljenost rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa, bila je značajno veća kod pacijenata sa SAP i STEMI u poređenju sa ispitanicima KG (Slike 18 i 19). Što se tiče raspodele LDL subfrakcija, uočen je veći relativni udeo LDL II subfrakcije i manji relativni udeo LDL IV subfrakcije kod bolesnika sa SAP u odnosu na STEMI bolesnike (Slika 20). Nasuprot tome, nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa kada su upoređivani relativni udeli HDL 2 i HDL 3 subfrakcija. Nije utvrđena značajna razlika između tri ispitivane grupe ni u aktivnosti PON1 u serumu, kao ni u zastupljenosti sdLDL.



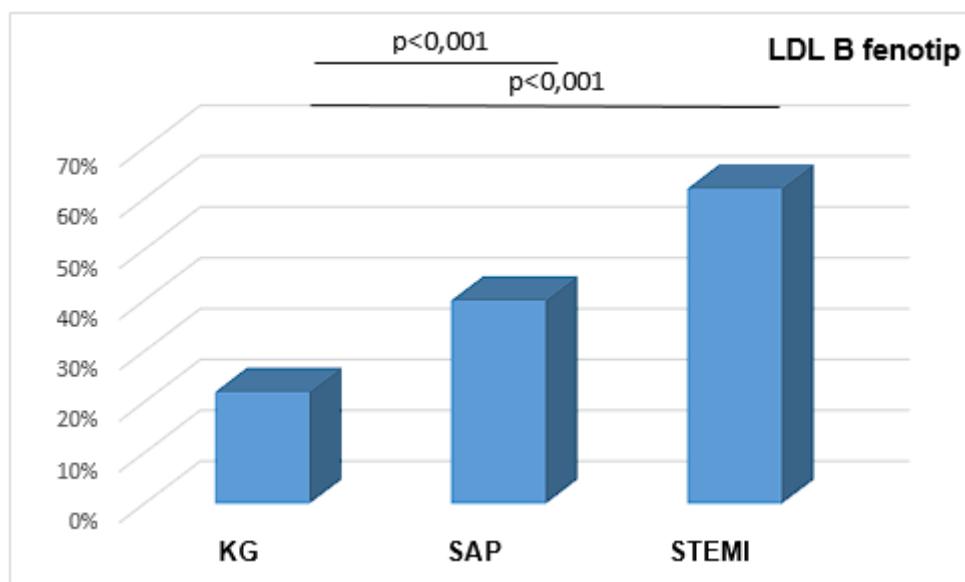
Slika 16. Dijametar HDL čestica u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



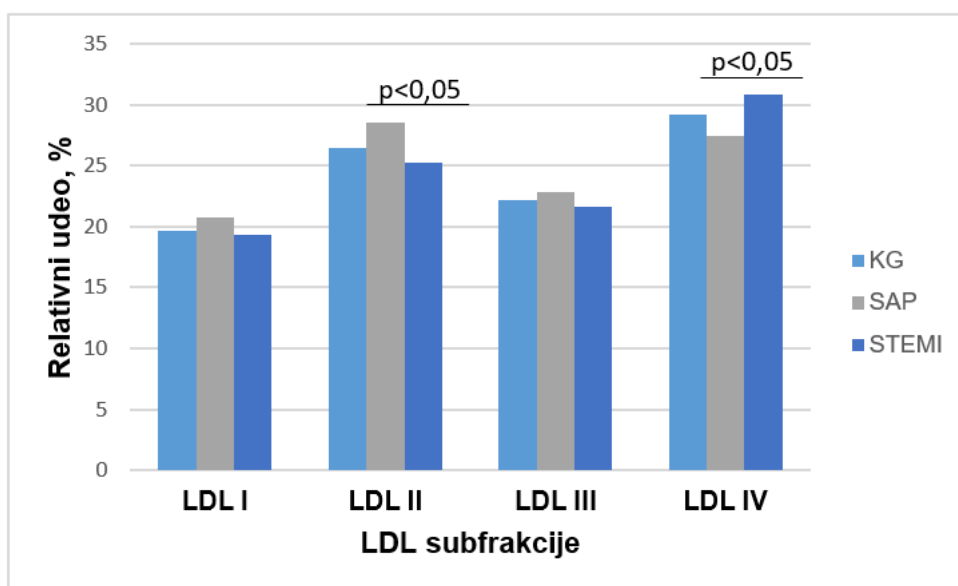
Slika 17. Dijametar LDL čestica u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 18. Zastupljenost HDL 3 fenotipa u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 19. Zastupljenost LDL B fenotipa u KG i kod bolesnika sa SAP i STEMI



Slika 20. Poređenje relativnih udela LDL subfrakcija kod ispitanika KG i bolesnika sa SAP i STEMI

4.1.4. Distribucija HDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika

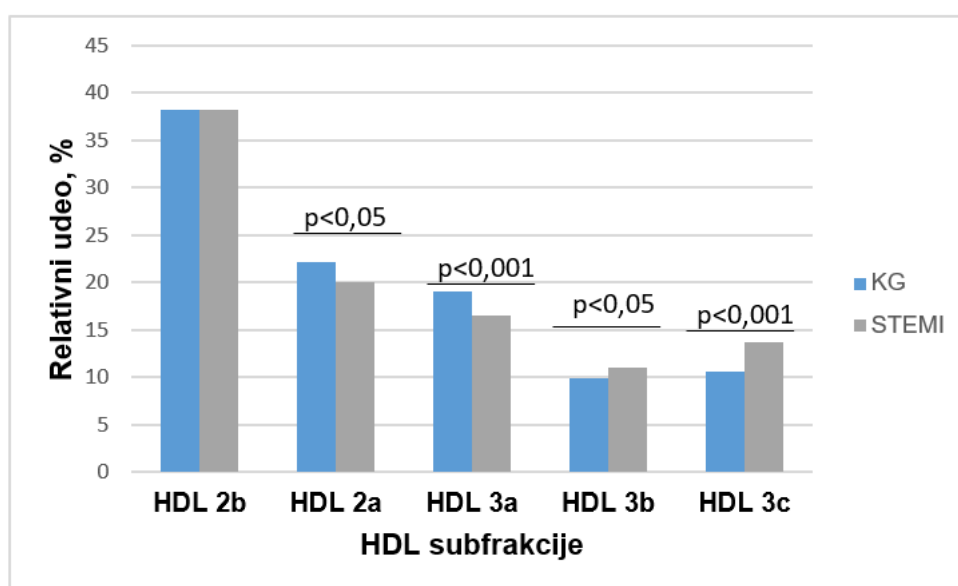
Uzimajući u obzir da između ispitivanih grupa nije pokazana razlika u glavnim HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama, izvršena je dodatna analiza raspodele pojedinačnih HDL subfrakcija. Poređenje je izvršeno samo između KG i STEMI bolesnika, jer su relativni udeli glavnih HDL subfrakcija (Tabela 5) u STEMI i SAP grupama bili slični. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 6.

Tabela 6. Raspodela HDL subfrakcija kod kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika

Varijabla	KG N=67	STEMI N=69	p vrednost
HDL 2b, %	38,2±8,3	38,3±6,8	0,928
HDL 2a, %	22,2±3,6	20,1±3,7*	0,001
HDL 3a, %	19,0±3,9	16,5±2,9**	<0,001
HDL 3b, %	9,9±3,0	11,1±2,4*	0,013
HDL 3c, %	10,6±5,1	13,7±4,8**	<0,001

Rezultati su bili normalno distribuirani pa su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ Sd; Studentov t-test je korišćen za poređenje; Statistički značajne razlike između KG i STEMI: * $p<0,05$; ** $p<0,001$

Relativni udeli HDL 2a i HDL 3a subfrakcija bili su značajno niži, dok su udeli HDL 3b i HDL 3c subfrakcija bili viši kod STEMI bolesnika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Slika 21). Relativni udeo HDL 2b subfrakcije nije se statistički značajno razlikovao između ispitivanih grupa.

**Slika 21.** Poređenje relativnih udela HDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika

4.1.5. Distribucija HDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

Budući da su se ispitanici KG i STEMI bolesnici međusobno razlikovali prema starosti, HTA i statusu pušenja, izvršena je dodatna statistička analiza kako bi se isključio nezavisni uticaj pomenutih faktora na promene u distribuciji HDL subfrakcija. Rezultati su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Raspodela HDL subfrakcija kod KG i STEMI ispitanika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

Varijabla	KG N=67	STEMI N=69	p vrednost
HDL 2, %	62,1 (60,1-64,2)	56,6 (54,5-58,7)**	<0,001
HDL 2b, %	39,4 (37,5-41,3)	37,0 (35,0-38,9)	0,10
HDL 2a, %	22,7 (21,7-23,7)	19,6 (18,7-20,6)**	<0,001
HDL 3, %	37,9 (35,8-39,9)	43,1 (41,1-45,1)**	<0,001
HDL 3a, %	18,6 (17,7-19,5)	17,0 (16,1-17,9)*	<0,03

HDL 3b, %	9,5 (8,9-10,2)	11,6 (10,8-12,3)*	0,001
HDL 3c, %	9,8 (9,5-11,0)	14,6 (13,3-15,8)**	<0,001

*Rezultati su prikazani kao prilagođene srednje vrednosti i 95 % intervali pouzdanosti i upoređivani primenom ANCOVE; Statistički značajne razlike između KG i STEMI: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$*

Primenom ANCOVE ispitano je postojanje razlike između grupa nakon korekcije za uticaj starosti, HTA i statusa pušenja, pri čemu je osim značajno manje zastupljenosti HDL 2a i HDL 3a subfrakcija, nađena i manja zastupljenost ukupne HDL 2 subfrakcije kod STEMI bolesnika. Takođe, STEMI bolesnici su u poređenju sa ispitanicima KG imali značajno veću zastupljenost HDL 3b i HDL 3c subfrakcija, kao i ukupne HDL 3 subfrakcije.

4.1.6. Distribucija LDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

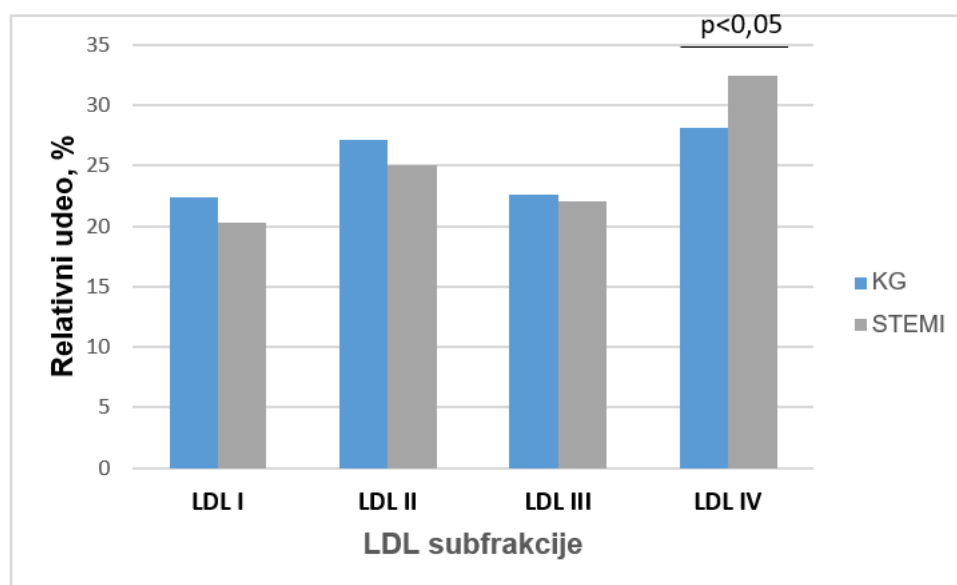
Uzimajući u obzir da nije dokazana razlika u raspodeli LDL subfrakcija između STEMI bolesnika i ispitanika KG (Tabela 5) dodatno je izvršeno poređenje ove dve grupe uz korekciju za pomenute tradicionalne faktore rizika. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 8.

Tabela 8. Raspodela LDL subfrakcija kod KG i STEMI ispitanika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

Varijabla	KG N=67	STEMI N=69	p vrednost
LDL I, %	22,4 (20,3-24,5)	20,3 (18,2-22,4)	0,215
LDL II, %	27,1 (25,5-28,7)	25,1 (23,5-26,7)	0,114
LDL III, %	22,6 (21,1-24,0)	22,1 (20,6-23,6)	0,716
LDL IV, %	28,2 (26,0-30,4)	32,5 (30,3-34,8)*	0,013

*Rezultati su prikazani kao prilagođene srednje vrednosti i 95 % intervali pouzdanosti i upoređivani primenom ANCOVE; Statistički značajne razlike između KG i STEMI: * $p < 0,05$*

ANCOVA je pokazala postojanje statistički značajne razlike u raspodeli LDL subfrakcija između ispitivanih grupa, pri čemu je udeo LDL IV subfrakcije bio veći kod STEMI bolesnika u poređenju sa ispitanicima KG (Slika 22).



Slika 22. Poređenje relativnih udela LDL subfrakcija kod ispitanika KG i STEMI bolesnika nakon korekcije za tradicionalne faktore rizika

4.2. Ispitivanje uticaja rizičnih fenotipova HDL i LDL čestica na serumske koncentracije IgG anti-oxLDL antitela i na parametre inflamacije i lipidne peroksidacije

Nakon istraživanja relativnih udela HDL i LDL subfrakcija, prema dominantnom HDL i LDL fenotipu, izvršena je podela kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika u dve grupe: grupu bez rizičnog HDL i LDL fenotipa kod koje dominiraju HDL čestice čiji je dijametar $> 8,8$ nm (fenotip velikih HDL 2 čestica) i LDL čestice dijametra $> 25,5$ nm (LDL A fenotip) i grupu sa rizičnim lipoproteinskim fenotipom gde dominiraju HDL čestice čiji je dijametar $\leq 8,8$ nm (fenotip malih HDL 3 čestica) i LDL čestice sa dijametrom $\leq 25,5$ nm (LDL B fenotip). Slična podela nije izvršena u SAP grupi zbog malog broja ispitanika.

4.2.1. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod ispitanika KG u odnosu na HDL i LDL fenotipove

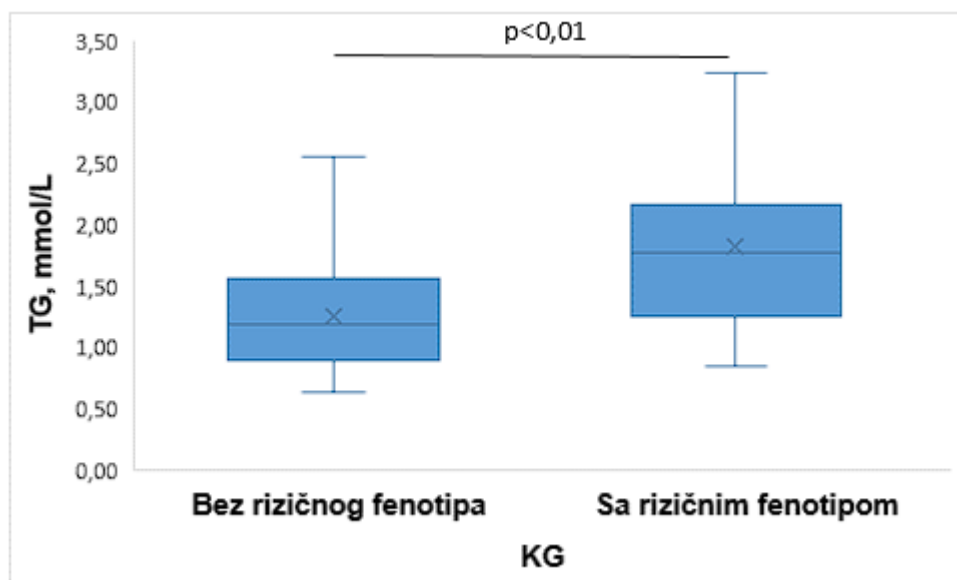
Od ukupno 67 ispitanika KG, 25 je imalo rizičan HDL 3 i LDL B fenotip, dok 42 nije imalo ovaj fenotip. Rezultati su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 9. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod ispitanika KG u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

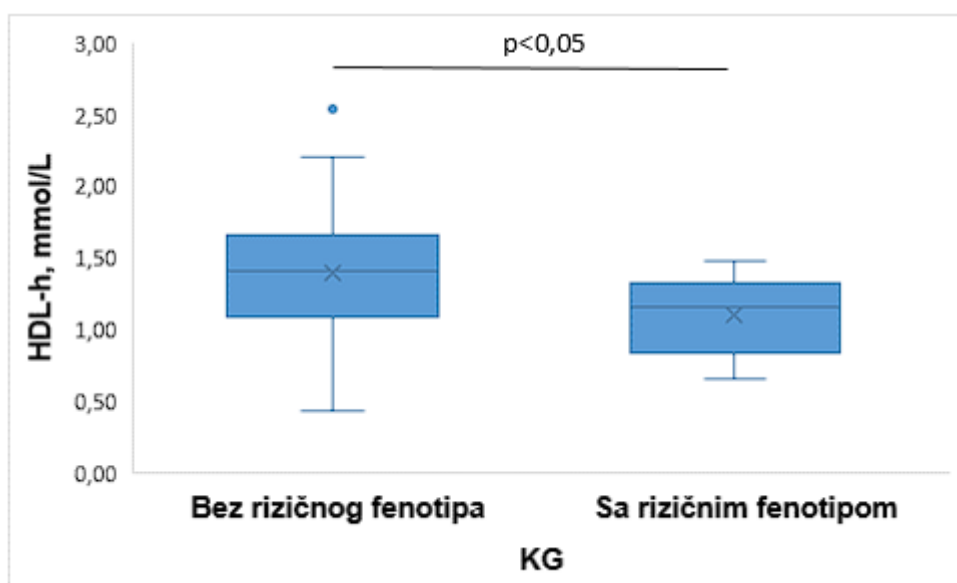
Varijabla	Rizični HDL 3 i LDL B fenotip		p vrednost
	Bez	Sa	
N	42	25	/
Starost, godine	58 $\pm$ 8	51 $\pm$ 11**	0,006 ^a
BMI, kg/m ²	25,8 (23,9-29,6)	27,2 (24,9-29,3)	0,269 ^b
Glukoza, mmol/L	5,5 (5,0-6,0)	5,5 (4,9-6,0)	0,662 ^b
UH, mmol/L	5,65 $\pm$ 1,10	5,80 $\pm$ 1,09	0,601 ^a
TG, mmol/L	1,20 (0,89-1,56)	1,61 (1,28-2,22)**	0,001 ^b
HDL-h, mmol/L	1,41 (1,09-1,66)	1,15 (0,90-1,36)*	0,014 ^b
LDL-h, mmol/L	3,65 $\pm$ 1,09	3,66 $\pm$ 1,04	0,972 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ Sd za kontinuirane varijable sa normalnom raspodelom i kao medijana i interkvartilni raspon za varijable koje nisu bile normalno distribuirane; Grupe su poređene ^aStudentovim t-testom i ^bMan Whitney exact testom u zavisnosti od tipa raspodele; Statistički značajne razlike između kontrolne grupe bez i sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Skracénice: BMI- indeks telesne mase; UH- ukupni holesterol; TG- trigliceridi; HDL-h- HDL-holesterol; LDL-h- LDL-holesterol)

Pokazano je da su ispitanici KG sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom bili značajno mlađi od osoba bez rizičnog fenotipa, dok su prema BMI ove dve grupe bile ujednačene. Dalje, nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji glukoze između ispitanika KG sa različitim lipoproteinskim fenotipovima. Analizom lipidnog statusa, utvrđeno je da su ispitanici KG sa HDL 3 i LDL B fenotipom imali višu koncentraciju TG (Slika 23) i nižu koncentraciju HDL-h (Slika 24) u poređenju sa osobama bez ovog fenotipa, dok su u ispitivanim grupama koncentracije UH i LDL-h bile slične.



Slika 23. Koncentracija TG kod ispitanika KG u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa



Slika 24. Koncentracija HDL-h kod ispitanika KG u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

4.2.2. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG u odnosu na HDL i LDL fenotipove

Osim demografskih karakteristika i osnovnih biohemijskih parametara, kod ispitanika KG istraživani su i markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije u zavisnosti od prisustva/odsustva rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 10.

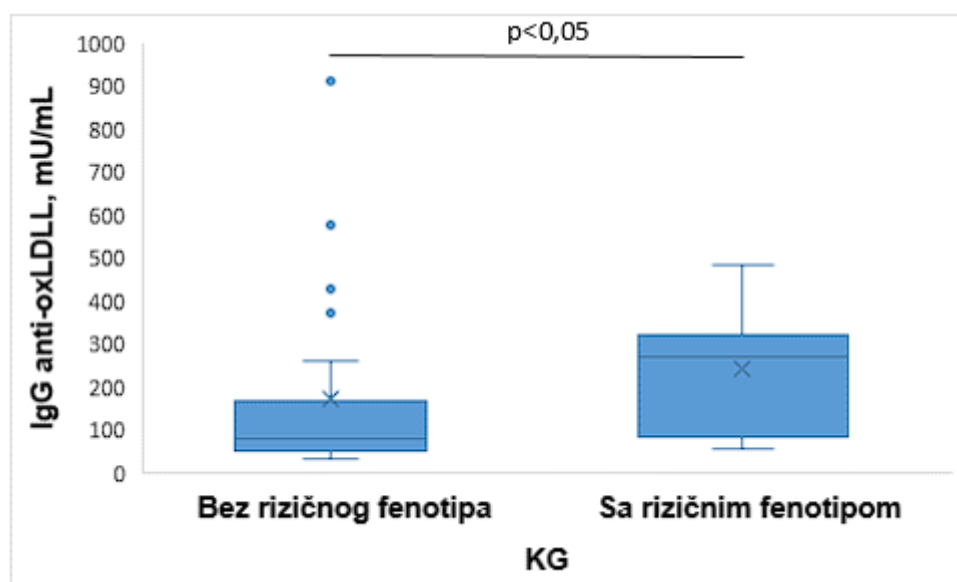
Tabela 10. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

Varijabla	Rizični HDL 3 i LDL B fenotip		p vrednost
	Bez	Sa	
N	42	25	/
hsCRP, mg/L	0,5 (0,2-1,7)	1,0 (0,4-3,2)	0,065
PTX3, ng/mL	1,0 (0,7-1,2)	1,0 (0,8-1,1)	0,850
IgG anti-oxLDL, mU/mL	74,7 (47,7-157,7)	269,3 (57,7-380,7)*	0,015
MDA, μ mol/L	3,85 (3,04-4,22)	3,70 (3,41-4,37)	0,426

Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; Grupe su poređene Man Whitney exact testom; Statistički značajna razlika između kontrolne grupe bez i sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom: * $p < 0,05$;

(Skraćenice: hsCRP- visoko osetljivi C-reaktivni protein; PTX3- pentraksin 3; IgG anti-oxLDL – antitela IgG klase na oksidovani LDL; MDA- malondialdehid)

Statističkom obradom rezultata, između ispitivanih grupa, nije uočena značajna razlika u koncentracijama hsCRP, PTX3 i MDA. Međutim, pronađena je značajno veća koncentracija IgG anti-oxLDL antitela kod kontrolnih ispitanika sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom u odnosu na kontrolne ispitanike bez rizičnog fenotipa (Slika 25).



Slika 25. Koncentracija IgG anti-oxLDL antitela kod ispitanika KG u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

4.2.3. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u odnosu na HDL i LDL fenotipove

Kada se posmatraju STEMI bolesnici, od ukupno 69 bolesnika 54 je imalo istovremeno prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa, dok njih 15 nije imalo ovaj fenotip. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 11.

U pogledu starosti i BMI, STEMI bolesnici sa i bez rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa, bili su ujednačeni. Takođe, koncentracije glukoze, i osnovnih parametara lipidnog statusa u ispitivanim grupama nisu se statistički značajno razlikovale bez obzira na prisustvo/odsustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa.

Tabela 11. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

Varijabla	Rizični HDL 3 i LDL B fenotip		p vrednost
	Bez	Sa	
N	15	54	/
Starost, godine	62±12	61±12	0,688 ^a
BMI, kg/m ²	25,1 (22,0-28,7)	25,4 (23,4-27,7)	0,742 ^b
Glukoza, mmol/L	6,4 (5,0-9,0)	6,8 (6,0-8,4)	0,274 ^b
UH, mmol/L	5,72±0,92	5,52±1,39	0,637 ^a
TG, mmol/L	1,60 (1,21-2,32)	1,69 (1,21-2,31)	0,940 ^b
HDL-h, mmol/L	1,09 (0,78-1,43)	0,93 (0,80-1,14)	0,266 ^b
LDL-h, mmol/L	3,76±0,72	3,68±1,20	0,810 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± Sd za kontinuirane varijable koje su sledile normalnu raspodelu i kao medijana i interkvartilni raspon za varijable koje nisu bile normalno distribuirane;

^aStudentov t-test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih sa normalnom raspodelom, dok je

^bMann Whitney exact test korišćen za poređenje podataka koji nisu bili normalno distribuirani;

(Skracenicice: BMI- indeks telesne mase; UH- ukupni holesterol; TG- trigliceridi; HDL-h- HDL-holesterol; LDL-h - LDL-holesterol)

4.2.4. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u odnosu na HDL i LDL fenotipove

Pored osnovnih biohemijskih parametara, kod STEMI bolesnika su određivani i markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa. Rezultati su prikazani u Tabeli 12.

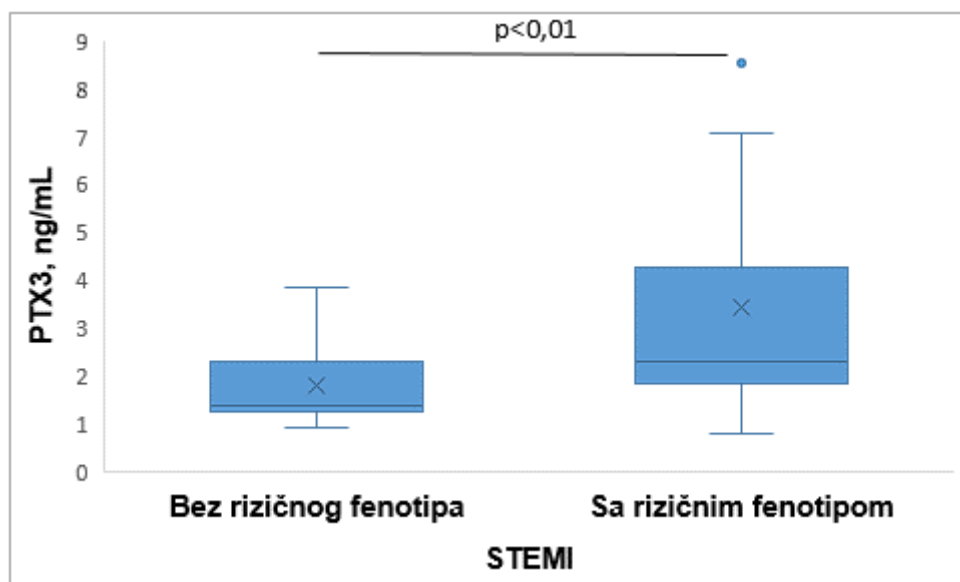
Tabela 12. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

Varijabla	Rizični HDL 3 i LDL B fenotip		p vrednost
	Bez	Sa	
N	15	54	/
hsCRP, mg/L	5,5 (1,7-8,1)	3,2 (1,9-4,4)	0,191
PTX3, ng/mL	1,4 (1,3-2,3)	2,4 (1,7-5,7)*	0,004
IgG anti-oxLDL, mU/mL	161,0 (65,7-233,2)	88,7 (43,7-179,5)	0,366
MDA, μmol/L	6,22 (5,32-7,26)	2,96 (2,44-5,18)*	0,007

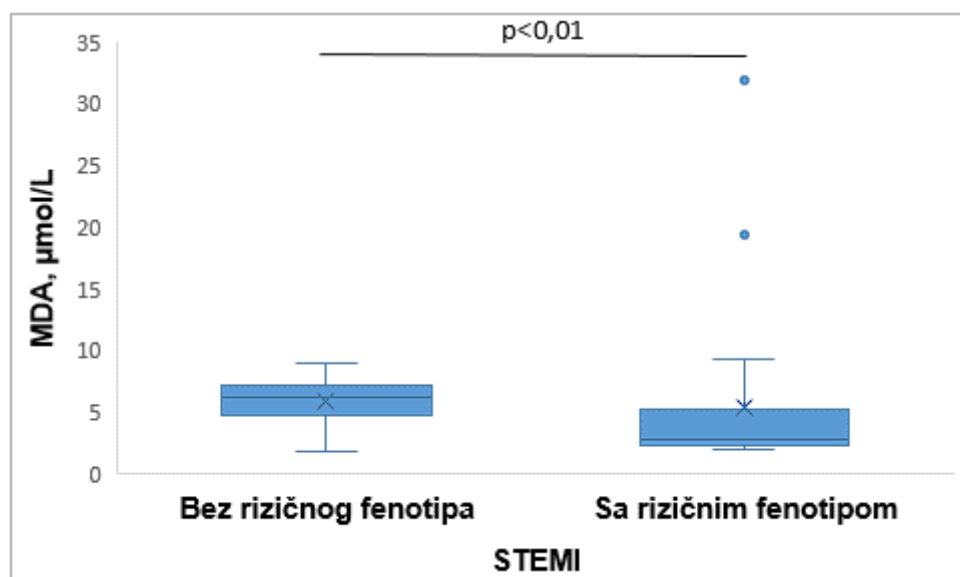
Podaci nisu sledili normalnu raspodelu pa su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; Mann Whitney exact test korišćen za poređenje grupa; Statistički značajna razlika između STEMI grupe bez i sa rizičnim HDL 3 i LDL B fenotipom: *p<0,01

(Skracenicice: hsCRP- visoko osetljivi C-reaktivni protein; PTX3- pentraksin 3; IgG anti-oxLDL– antitela IgG klase na oksidovani LDL; MDA- malondialdehid)

Evidentirana je statistički značajna razlika u koncentracijama PTX3 i MDA između STEMI bolesnika sa i bez rizičnog lipoproteinskog fenotipa. STEMI bolesnici sa rizičnim fenotipom imali su višu koncentraciju PTX3 (Slika 26) i nižu koncentraciju MDA (Slika 27) u odnosu na bolesnike bez rizičnog fenotipa.



Slika 26. Koncentracija PTX3 kod STEMI bolesnika u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa



Slika 27. Koncentracija MDA kod STEMI bolesnika u odnosu na prisustvo rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa

4.3. Procena prognostičke sposobnosti IgG anti-oxLDL antitela i veličine HDL i LDL čestica u predviđanju ishoda i težine bolesti kvantifikovane SYNTAX skorom

U sledećem koraku ispitivana je prediktivna sposobnost pojedinačnih biomarkera koja se odnosi na ishod i težinu bolesti. Prema težini oboljenja procenjenoj pomoću SYNTAX skora, STEMI bolesnici su klasifikovani u grupu sa niskim ($\text{SYNTAX} \leq 22$) i grupu sa umerenim rizikom ($\text{SYNTAX} > 22$).

4.3.1. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor

Od ukupno 69 STEMI bolesnika 58 je imalo nizak rizik, dok je 11 imalo umeren rizik prema vrednostima SYNTAX skora. U Tabeli 13. prikazane su osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u zavisnosti od SYNTAX skora.

Tabela 13. Osnovne demografske karakteristike i biohemijski parametri kod STEMI bolesnika u zavisnosti od SYNTAX skora

Varijabla	Nizak rizik (SYNTAX ≤ 22)	Umeren rizik (SYNTAX > 22)	p vrednost
N	58	11	/
Starost, godine	60±12	63±10	0,626 ^a
BMI, kg/m ²	25,1 (23,4-28,5)	25,4 (23,8-26,8)	0,886 ^b
Glukoza, mmol/L	6,6 (5,9-8,6)	7,2 (5,6-9,5)	0,652 ^b
UH, mmol/L	5,62±1,33	4,90±0,97	0,094 ^a
TG, mmol/L	1,65 (1,17-2,19)	1,69 (1,11-2,33)	0,763 ^b
HDL-h, mmol/L	0,98 (0,81-1,21)	0,90 (0,78-1,04)	0,392 ^b
LDL-h, mmol/L	3,76±1,14	3,05±0,89	0,055 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± Sd za kontinuirane varijable koje su sledile normalnu raspodelu i kao medijana i interkvartilni raspon za varijable koje nisu bile normalno distribuirane;

^aStudentov t-test je korišćen za poređenje kontinuiranih promenljivih sa normalnom raspodelom, dok je

^bMann Whitney exact test korišćen za poređenje podataka koji nisu bili normalno distribuirani;

(Skraćenice: BMI- indeks telesne mase; UH- ukupni holesterol; TG- trigliceridi; HDL-h – HDL-holesterol; LDL-h – LDL-holesterol)

Rezultati statističke analize su pokazali postojanje ujednačenosti po starosti i BMI među STEMI bolesnicima sa niskim i umerenim rizikom. Takođe, među ispitivanim grupama nije bilo razlike u koncentraciji glukoze, kao ni u koncentracijama osnovnih parametara lipidnog statusa.

4.3.2. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor

U Tabeli 14. predstavljeni su rezultati koji se odnose na markere inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u zavisnosti od SYNTAX skora.

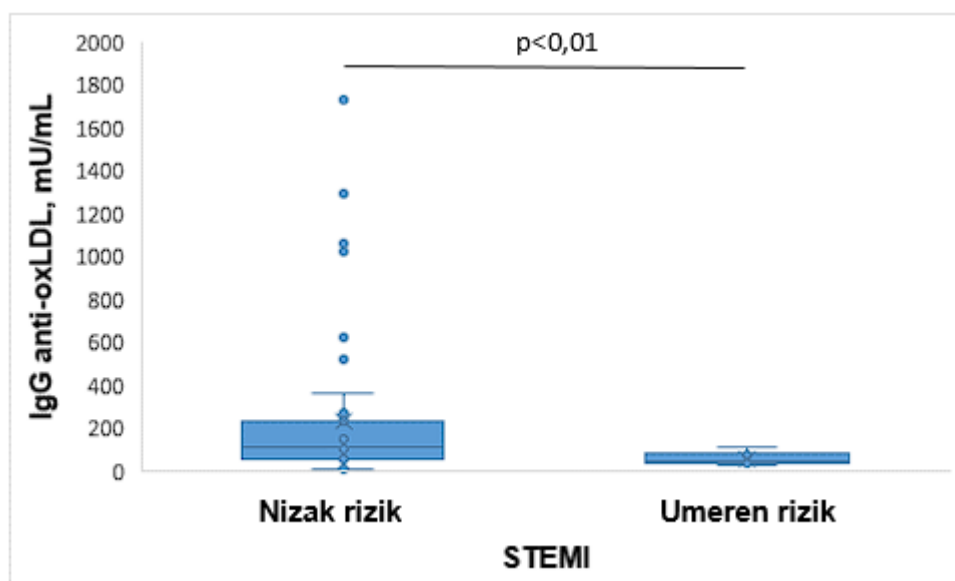
Tabela 14. Markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika u zavisnosti od SYNTAX skora

Varijabla	Nizak rizik (SYNTAX ≤ 22)	Umeren rizik (SYNTAX > 22)	p vrednost
N	58	11	/
hsCRP, mg/L	3,5 (1,8-5,1)	2,9 (2,0-4,0)	0,572
PTX3, ng/mL	2,4 (1,5-6,2)	1,8 (1,4-3,4)	0,284
IgG anti-oxLDL, mU/mL	123,3 (60,7-262,1)	41,3 (25,5-92,5)*	0,008
MDA, μmol/L	3,26 (2,45-6,22)	4,30 (2,56-6,18)	0,978

Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon s obzirom da podaci nisu bili normalno distribuirani; ^bMann Whitney exact test korišćen za poređenje; Statistički značajna razlika između STEMI grupa sa niskim i umerenim rizikom u odnosu na SYNTAX skor: *p<0,01;

(Skraćenice: hsCRP- visoko osetljivi C-reaktivni protein; PTX3- pentraksin 3; IgG anti-oxLDL – antitela IgG klase na oksidovani LDL; MDA- malondialdehid)

Statističkom obradom podataka dokazana je značajno niža koncentracija IgG anti-oxLDL antitela kod STEMI bolesnika sa umerenim rizikom u odnosu na bolesnike sa niskim rizikom (Slika 28), dok između ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u koncentracijama markera inflamacije i lipidne peroksidacije.



Slika 28. Koncentracija IgG anti-oxLDL antitela kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor

4.3.3. Veličina i zastupljenost HDL i LDL subfrakcija kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor

U daljem toku studije ispitivana je veličina HDL i LDL čestica i distribucija HDL i LDL subfrakcija među STEMI bolesnicima u zavisnosti od SYNTAX skora. Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

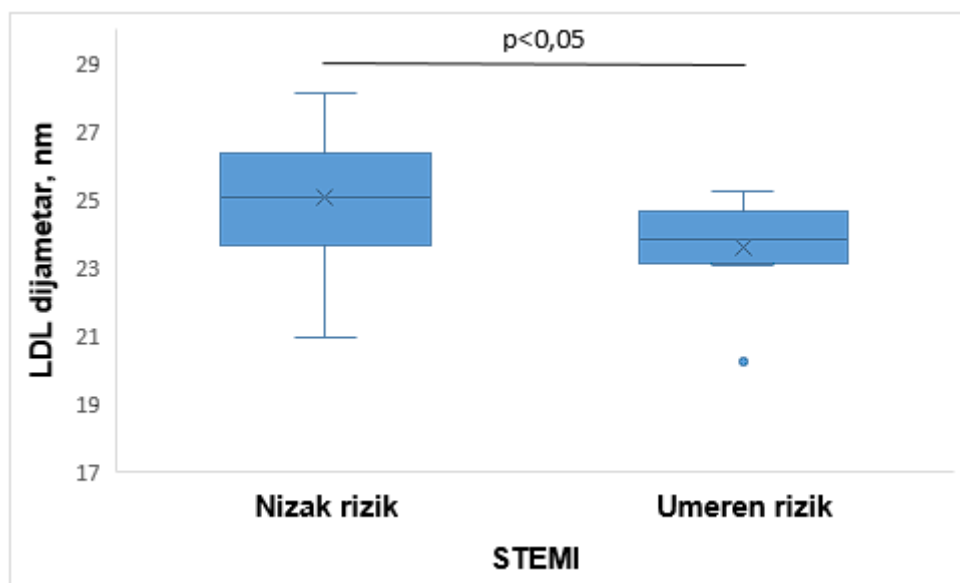
Tabela 15. Dijametri HDL i LDL čestica i raspodela HDL i LDL subfrakcija kod STEMI bolesnika u zavisnosti od SYNTAX skora

Varijabla	Nizak rizik (SYNTAX ≤ 22)	Umeren rizik (SYNTAX > 22)	p vrednost
N	58	11	/
HDL dijametar, nm	8,6 (8,4-9,6)	8,6 (8,4-8,7)	0,304
HDL 2, %	57,2 (53,0-62,4)	59,5 (50,2-64,2)	0,992
HDL 3, %	42,8 (37,6-47,0)	40,0 (35,8-43,9)	0,576
LDL dijametar, nm	25,1 (23,6-26,4)	23,9 (23,1-24,9)*	0,038
LDL I, %	19,2 (17,2-23,8)	20,1 (17,5-21,7)	0,865
LDL II, %	25,3 (22,6-27,9)	24,6 (21,8-28,1)	0,670
LDL III, %	21,5 (20,1-24,2)	22,2 (19,1-25,2)	0,886
LDL IV, %	30,8 (26,7-34,5)	34,1 (28,4-37,3)	0,497

*Rezultati su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon budući da podaci nisu bili normalno distribuirani; Mann Whitney exact test je korišćen za poređenje podataka; Statistički značajna razlika između STEMI grupa sa niskim i umerenim rizikom u odnosu na SYNTAX skor: *p<0,05;*

Rezultati statističke analize nisu pokazali postojanje značajne razlike u veličini HDL čestica, kao ni u zastupljenosti HDL i LDL subfrakcija među STEMI bolesnicima sa različitim rizikom.

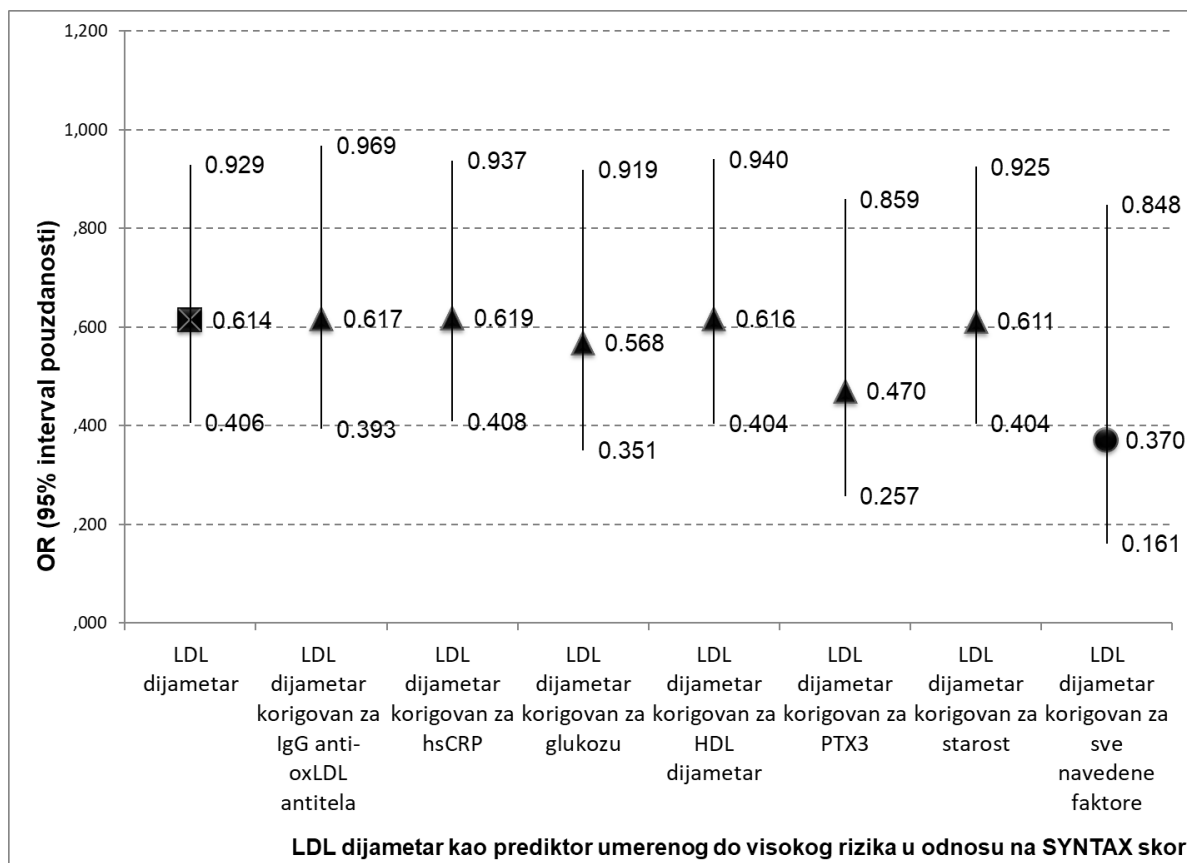
Utvrđen je jedino značajno manji LDL dijametar kod STEMI bolesnika sa umerenim rizikom u odnosu na bolesnike sa niskim rizikom (Slika 29).



Slika 29. Dijametar LDL čestica kod STEMI bolesnika u odnosu na SYNTAX skor

4.3.4. Analiza povezanosti LDL dijametra i koncentracije IgG anti-oxLDL antitela sa SYNTAX skorom

Uzimajući u obzir da su prema vrednostima SYNTAX skora pronađene značajno niže koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, kao i značajno manji LDL dijametar kod STEMI bolesnika sa umerenim rizikom, u odnosu na STEMI bolesnike sa niskim rizikom, za dalje ispitivanje povezanosti ovih parametara sa SYNTAX skorom primenjena je logistička regresiona analiza. Da bi se eliminisao interferirajući efekat drugih varijabli, izvršena je korekcija modela za starost, HDL dijametar i koncentracije hsCRP, PTX3 i glukoze. Nađeno je da je manji LDL dijametar bio udružen sa umerenim rizikom nezavisno od drugih faktora, tj. jedino je manji LDL dijametar bio nezavisni prediktor umerenog rizika što je predstavljeno slikom 30.



Slika 30. LDL dijametar kao značajan prediktor umerenog do visokog rizika procenjenog pomoću SYNTAX skora

4.4. Analiza aktivnosti PON1 u serumu, distribucije PON1 unutar HDL subfrakcija i njihove povezanosti sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije

U daljem toku studije, analizirana je povezanost aktivnosti PON1 u serumu, kao i njene distribucije na HDL subfrakcijama, sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG i STEMI bolesnika.

4.4.1. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika

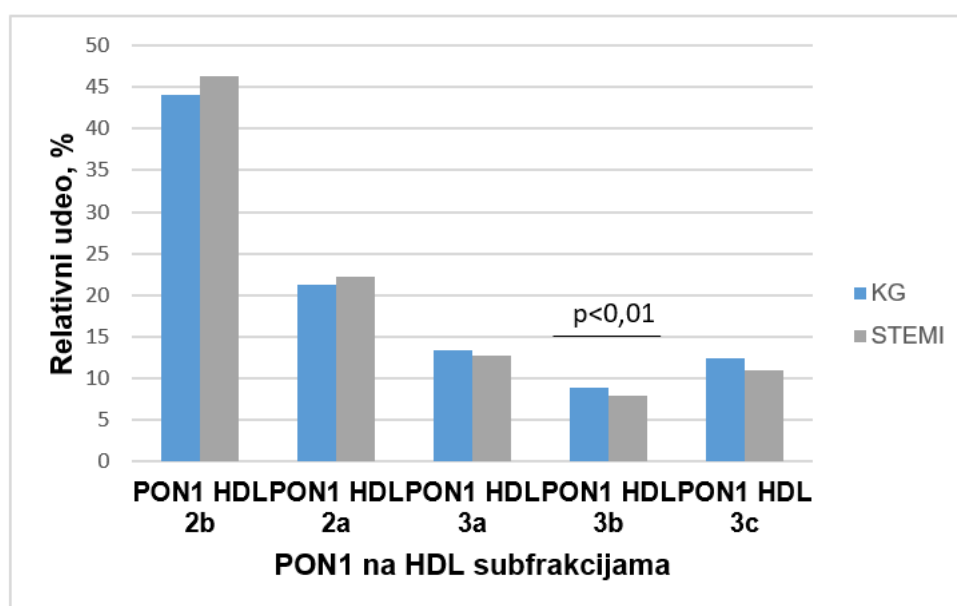
Osim relativnih udela pojedinačnih HDL subfrakcija, u okviru ove studije, ispitivani su i relativni udeli arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 16.

Tabela 16. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika

Varijabla	KG N=67	STEMI N=69	p vrednost
PON1 HDL 2, %	65,3±7,4	68,5±6,1*	0,018
PON1 HDL 2b, %	44,0±7,3	46,3±5,9	0,081
PON1 HDL 2a, %	21,3±4,3	22,2±4,5	0,300
PON1 HDL 3, %	34,7±7,4	31,5±6,1*	0,018
PON1 HDL 3a, %	13,3±2,1	12,8±2,1	0,180
PON1 HDL 3b, %	8,9±1,8	7,9±2,1**	0,006
PON1 HDL 3c, %	12,4±5,9	10,9±3,7	0,116

Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ Sd i poređeni Studentovim t-testom; Statistički značajna razlika između KG i STEMI: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Relativni udeo aktivnosti PON1 na HDL 3 subfrakciji bio je značajno manji kod STEMI bolesnika u poređenju sa ispitanicima KG. Kada se posmatra raspodela aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL 2 subfrakcijama, između ispitivanih grupa, nije uočena značajna razlika u distribuciji aktivnosti PON1 na HDL 2a i HDL 2b subfrakciji. S druge strane, analizom pojedinačnih HDL 3 subfrakcija, pokazana je značajno manja zastupljenost relativnog udela aktivnosti PON1 na HDL 3b subfrakciji kod STEMI bolesnika u odnosu na ispitanike KG, dok nije zapažena statistički značajna razlika u distribuciji aktivnosti PON1 na HDL 3a i HDL 3c subfrakcijama.



Slika 31. Poređenje relativnih udela arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod ispitanika KG i STEMI bolesnika

4.4.2. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

Zbog mogućeg uticaja demografskih varijabli koje su se razlikovale između KG i STEMI ispitanika na raspodelu aktivnosti PON1 unutar HDL subfrakcija, za procenu distribucije PON1

primenjena je ANCOVA, pri čemu je potvrđen značajno manji udeo PON1 na HDL 3b subfrakciji kod STEMI bolesnika u odnosu na ispitanike KG. Dobijeni rezultati su predstavljeni u Tabeli 17.

Tabela 17. Distribucija arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama kod KG i STEMI ispitanika nakon standardizacije grupa prema starosti, HTA i statusu pušenja

Varijabla	KG N=67	STEMI N=69	p vrednost
PON1 HDL 2, %	65,4 (63,4-67,3)	67,5 (64,5-69,3)	0,086
PON1 HDL 2b, %	43,6 (41,7-44,4)	46,4 (44,4-48,4)	0,059
PON1 HDL 2a, %	21,8 (20,5-23,1)	21,7 (20,3-23,0)	0,865
PON1 HDL 3, %	34,6 (32,7-36,6)	31,8 (29,9-34,1)	0,087
PON1 HDL 3a, %	13,6 (13,0-14,1)	12,7 (12,1-13,3)	0,069
PON1 HDL 3b, %	9,0 (8,4-9,5)	8,0 (7,4-8,6)*	0,036
PON1 HDL 3c, %	11,9 (10,4-13,4)	11,5 (9,9-13,2)	0,786

*Rezultati su prikazani kao prilagođene srednje vrednosti i 95 % intervali pouzdanosti i upoređivani primenom ANCOVE; Statistički značajna razlika između KG i STEMI: * $p < 0,05$*

4.4.3. Ispitivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG

Primenom Spearmanove korelacione analize istraživana je povezanost distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije među ispitanicima KG.

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa distribucijom HDL subfrakcija

U Tabeli 18 predstavljeni su rezultati Spearmanove korelacione analize između relativnih udela arilesterazne aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama i relativnih udela pojedinačnih HDL subfrakcija kod kontrolnih ispitanika.

Tabela 18. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa distribucijom HDL subfrakcija kod ispitanika KG

Varijabla	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
PON1 HDL 2b, %	-0,418**	-0,039	0,459**	0,244	0,174
PON1 HDL 2a, %	0,211	0,134	-0,207	-0,213	-0,298*
PON1 HDL 3a, %	0,162	0,181	-0,331*	-0,125	0,027
PON1 HDL 3b, %	0,242	0,100	-0,350**	-0,134	0,013
PON1 HDL 3c, %	0,312*	-0,046	-0,272*	-0,133	-0,071

*Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$*

Relativni udeo aktivnosti PON1 na HDL 2b subfrakciji bio je u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2b subfrakcije, a s druge strane, u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 3a subfrakcije. Kada se posmatra relativni udeo arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2a subfrakciji, utvrđena je negativna korelacija sa relativnim udelom HDL 3c subfrakcije. Uočena je i negativna korelacija relativnog udela PON1 na HDL 3b sa HDL 3a subfrakcijom, dok je relativni udeo PON1 na HDL 3c bio u pozitivnoj korelaciji sa HDL 2b i u negativnoj korelaciji sa HDL 3a subfrakcijom.

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa

Kada je reč o vezi distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa kod kontrolnih ispitanika, Spearmanovom korelacionom analizom dokazana je negativna korelacija između relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2a subfrakciji i zastupljenosti sdLDL čestica. Rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa kod ispitanika KG

Varijabla	TG, mmol/L	UH, mmol/L	LDL-h, mmol/L	HDL-h, mmol/L	sdLDL, %
PON1 HDL 2b, %	-0,050	-0,094	-0,002	0,044	0,171
PON1 HDL 2a, %	-0,191	-0,073	-0,191	0,134	-0,365*
PON1 HDL 3a, %	0,057	0,101	0,118	-0,153	-0,092
PON1 HDL 3b, %	0,131	0,226	0,221	-0,082	-0,046
PON1 HDL 3c, %	0,091	0,202	0,172	-0,093	0,023

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,01$;

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije

Ispitivana je i zavisnost distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama od parametara inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod kontrolnih ispitanika. Statističkom obradom podataka, nije utvrđena značajna korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG

Varijabla	hsCRP, mg/L	PTX3, ng/mL	IgG anti-oxLDL, mU/mL	MDA, μ mol/L
PON1 HDL 2b, %	0,180	-0,049	-0,080	0,053
PON1 HDL 2a, %	-0,159	0,231	0,266	-0,059
PON1 HDL 3a, %	-0,086	0,230	-0,007	0,154
PON1 HDL 3b, %	-0,098	0,090	0,098	0,100
PON1 HDL 3c, %	-0,105	-0,010	-0,035	0,009

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

4.4.4. Ispitivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika

Spearmanova korelaciona analiza obuhvatila je i utvrđivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije među STEMI bolesnicima.

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa distribucijom HDL subfrakcija

Kao i kod ispitanika KG, Spearmanovom korelacionom analizom istraživana je zavisnost između relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama i relativnog udela HDL subfrakcija među STEMI bolesnicima. Uočena je pozitivna korelacija između relativnog udela PON1 na HDL 2a subfrakciji i relativnog udela HDL 2a subfrakcije, kao i između relativnog udela PON1 na HDL 3a subfrakciji i HDL 3b subfrakcije. Rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa distribucijom HDL subfrakcija kod STEMI bolesnika

Varijabla	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
PON1 HDL 2b, %	0,116	0,056	-0,056	-0,173	-0,123
PON1 HDL 2a, %	0,011	0,329*	-0,077	-0,074	-0,124
PON1 HDL 3a, %	-0,206	-0,140	0,199	0,321*	0,136
PON1 HDL 3b, %	-0,228	-0,189	0,209	0,193	0,232
PON1 HDL 3c, %	-0,030	-0,135	0,129	0,093	0,087

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$;

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa

Spearmanova korelaciona analiza korišćena je i za utvrđivanje povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa kod STEMI bolesnika, pri čemu je dokazana značajna pozitivna korelacija između relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 3a subfrakciji i zastupljenosti sdLDL. Rezultati su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima lipidnog statusa kod STEMI bolesnika

Varijabla	TG, mmol/L	UH, mmol/L	LDL-h, mmol/L	HDL-h, mmol/L	sdLDL, %
PON1 HDL 2b, %	0,059	-0,045	-0,143	0,016	-0,066
PON1 HDL 2a, %	-0,189	0,090	0,079	0,146	-0,200
PON1 HDL 3a, %	0,096	-0,167	-0,266	-0,028	0,366*
PON1 HDL 3b, %	0,046	-0,026	0,036	-0,121	0,040
PON1 HDL 3c, %	0,067	0,064	0,068	0,020	0,139

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$;

Korelacija distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije

U Tabeli 23 su prikazani rezultati Spearmanove korelacione analize između distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na različitim HDL subfrakcijama i parametara inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika.

Tabela 23. Spearmanova korelaciona analiza distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika

Varijabla	hsCRP, mg/L	PTX3, ng/mL	IgG anti-oxLDL, mU/mL	MDA, μ mol/L
PON1 HDL 2b, %	-0,072	-0,130	0,156	0,352*
PON1 HDL 2a, %	0,230	-0,419*	0,035	0,053
PON1 HDL 3a, %	0,145	0,156	0,018	-0,113

PON1 HDL 3b, %	0,049	0,216	0,139	-0,148
PON1 HDL 3c, %	0,037	0,237	-0,093	-0,230

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$

Relativni udeo arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2b subfrakciji bio je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom MDA, dok je s druge strane utvrđena negativna korelacija između relativnog udela arilesterazne aktivnosti PON1 na HDL 2a subfrakciji i koncentracije PTX3.

4.4.5. Analiza nezavisnog uticaja parametara lipidnog statusa, inflamacije i lipidne peroksidacije na distribuciju PON1 unutar HDL subfrakcija

Nezavisni uticaj lipidnih parametara, kao i markera inflamacije i lipidne peroksidacije na udeo PON1 unutar HDL ispitan je primenom multiple linearne regresione analize sa „forward“ selekcijom. Ispitivanje linearne veze između zavisnih i nezavisnih promenljivih omogućeno je logaritamskom transformacijom vrednosti parametara: sdLDL, LDL-h, HDL-h, TG, MDA i hsCRP. Ova analiza je pokazala da su udeli PON1 unutar HDL 3a kod STEMI bolesnika i PON1 unutar HDL 2a kod ispitanika KG bili statistički značajno povezani sa distribucijom log sdLDL čestica nezavisno od drugih ispitivanih parametara. Distribucija log sdLDL čestica bila je obrnuto povezana sa udelom PON1 unutar HDL 2a subfrakcije kod ispitanika KG ($\beta = -10,89$; $p = 0,007$) i direktno povezana sa udelom PON1 unutar HDL 3a subfrakcije kod STEMI bolesnika ($\beta = 10,30$; $p = 0,044$). Osim toga, uočena je i direktna povezanost koncentracije log MDA sa udelom PON1 unutar HDL 2b subfrakcije ($\beta = 9,65$; $p = 0,019$). Multikolinearnost nije otkrivena, a vrednosti tolerancije za sve domene bile su manje od 1. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 24.

Tabela 24. Nezavisni prediktori relativnog udela PON1 unutar HDL subfrakcija

Nezavisni prediktor	PON1 HDL 2a, %	PON1 HDL 3a, %	PON1 HDL 2b, %
U KG* log sdLDL	-10,89 (-18,68 –3,09) $p = 0,007$	/	/
U STEMI grupi* log sdLDL	/	10,30 (0,34-20,29) $p = 0,044$	/
log MDA	/	/	9,65 (1,64-17,66) $p = 0,019$

*Prediktori uključeni u modele su logaritmovane vrednosti udela sdLDL, kao i koncentracija: MDA, TG, hsCRP i HDL-c (forward selekcija)

4.4.6. Ispitivanje povezanosti paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG

Primenom Spearmanove korelacione analize istraživana je povezanost i jačina veze paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije među ispitanicima KG.

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama

Kod kontrolnih ispitanika istraživana je povezanost paraoksonazne aktivnosti PON1 sa HDL subfrakcijama, pri čemu nije nađena statistički značajna korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Tabela 25. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 i HDL subfrakcija kod ispitanika KG

Varijabla	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
PON1, U/L	-0,021	-0,033	-0,038	-0,002	0,122

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa parametrima lipidnog statusa

U KG je ispitivana povezanost paraoksonazne aktivnosti PON1 sa parametrima lipidnog statusa i nije uočena značajna korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 26.

Tabela 26. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i parametara lipidnog statusa kod ispitanika KG

Varijabla	TG, mmol/L	UH, mmol/L	LDL-h, mmol/L	HDL-h, mmol/L	sdLDL, %
PON1, U/L	-0,109	0,005	-0,055	-0,002	0,080

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije

U KG je istraživana veza paraoksonazne aktivnosti PON1 sa markerima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije i tom prilikom nije utvrđena korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 27.

Tabela 27. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i parametara inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod ispitanika KG

Varijabla	hsCRP, mg/L	PTX3, ng/mL	IgG anti-oxLDL, mU/mL	MDA, μ mol/L
PON1, U/L	-0,027	0,135	0,163	0,140

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa distribucijom PON1 na HDL subfrakcijama

Kod kontrolnih ispitanika istraživana je veza paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa distribucijom PON1 na HDL subfrakcijama, pri čemu nije uočena značajna korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 28.

Tabela 28. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i distribucije PON1 na HDL subfrakcijama kod ispitanika KG

Varijabla	PON1 HDL 2b, %	PON1 HDL 2a, %	PON1 HDL 3a, %	PON1 HDL 3b, %	PON1 HDL 3c, %
PON1, U/L	-0,052	0,085	0,054	-0,082	0,021

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

4.4.7. Ispitivanje povezanosti paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika

Primenom Spearmanove korelacione analize istraživana je povezanost i jačina veze paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama, parametrima lipidnog statusa, inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije među STEMI bolesnicima.

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa HDL subfrakcijama

Kako u KG, tako je i u STEMI grupi ispitivana povezanost paraoksonazne aktivnosti PON1 sa HDL subfrakcijama, pri čemu nije uočena značajna korelacija između ispitivanih parametara. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 29.

Tabela 29. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 i HDL subfrakcija kod STEMI bolesnika

Varijabla	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
PON1, U/L	0,156	-0,179	-0,036	-0,084	-0,027

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa parametrima lipidnog statusa

Rezultati Spearmanove korelacione analize koji se odnose na zavisnost paraoksonazne aktivnosti PON1 od parametara lipidnog statusa u STEMI grupi pokazali su da nije bilo značajne korelacije između ispitivanih parametara i prikazani su u Tabeli 30.

Tabela 30. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i parametara lipidnog statusa kod STEMI bolesnika

Varijabla	TG, mmol/L	UH, mmol/L	LDL-h, mmol/L	HDL-h, mmol/L	sdLDL, %
PON1, U/L	0,161	0,074	0,057	0,048	-0,202

Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ)

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije

Zavisnost paraoksonazne aktivnosti PON1 od markera inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije ispitivana je i u STEMI grupi, pri čemu je zapažena značajna negativna korelacija između PON1 aktivnosti i inflamatornog markera, PTX3. Rezultati su prikazani u Tabeli 31.

Tabela 31. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i parametara inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod STEMI bolesnika

Varijabla	hsCRP, mg/L	PTX3, ng/mL	IgG anti-oxLDL, mU/mL	MDA, μ mol/L
PON1, U/L	0,015	-0,338*	-0,146	0,181

*Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$*

Korelacija paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa distribucijom PON1 na HDL subfrakcijama

U STEMI grupi ispitivana je povezanost paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu sa distribucijom PON1 na HDL subfrakcijama. Spearmanova korelaciona analiza pokazala je postojanje značajne negativne korelacije između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i PON1 na HDL 3b, kao i PON1 na HDL 3c. Rezultati su prikazani u Tabeli 32.

Tabela 32. Spearmanova korelaciona analiza između paraoksonazne aktivnosti PON1 u serumu i distribucije PON1 na HDL subfrakcijama kod STEMI bolesnika

Varijabla	PON1 HDL 2b, %	PON1 HDL 2a, %	PON1 HDL 3a, %	PON1 HDL 3b, %	PON1 HDL 3c, %
PON1, U/L	0,270	0,203	-0,184	-0,294*	-0,287*

*Prikazane su vrednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ); * $p < 0,05$*

4.5. Udeo HDL subfrakcija i PON1 na HDL subfrakcijama u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL

Na kraju je u našoj studiji upotrebljena dvofaktorska ANOVA za ispitivanje udela HDL subfrakcija i udela PON1 unutar HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo STEMI i povećanog udela sdLDL. U ovu svrhu, STEMI i kontrolni ispitanici su podeljeni u dve grupe: grupu sa nižim udelom sdLDL ($\text{sdLDL} \leq 50\%$) i grupu sa povećanim udelom sdLDL ($\text{sdLDL} > 50\%$). 27 kontrolnih ispitanika je imalo niži, a 40 njih je imalo povećan udeo sdLDL, dok je među STEMI bolesnicima, 20 imalo niži, a 49 povećani udeo sdLDL.

4.5.1. Udeo HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL

Udeo HDL subfrakcija u zavisnosti od prisustva STEMI i udela sdLDL predstavljen je rezultatima u tabeli 33.

Tabela 33. Distribucija HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL

Varijabla	Udeo sdLDL	KG	STEMI	p (sdLDL grupna)	p (STEMI prema KG)	p (interakcija)
HDL 2, %	sdLDL $\leq$ 50%	63,4 $\pm$ 7,4	59,4 $\pm$ 9,0	0,039	0,149	0,242
	sdLDL $>$ 50%	58,5 $\pm$ 9,7	58,0 $\pm$ 6,8			
HDL 2b, %	sdLDL $\leq$ 50%	40,6 $\pm$ 5,9	38,3 $\pm$ 8,7	0,150	0,847	0,153
	sdLDL $>$ 50%	36,6 $\pm$ 9,3	38,3 $\pm$ 5,8			
HDL 2a, %	sdLDL $\leq$ 50%	22,8 $\pm$ 3,9	21,1 $\pm$ 3,0	0,084	0,004	0,756
	sdLDL $>$ 50%	31,8 $\pm$ 3,4	19,7 $\pm$ 3,9			
HDL 3, %	sdLDL $\leq$ 50%	36,4 $\pm$ 6,9	40,6 $\pm$ 9,0	0,038	0,146	0,143
	sdLDL $>$ 50%	41,5 $\pm$ 9,7	41,6 $\pm$ 6,5			
HDL 3a, %	sdLDL $\leq$ 50%	17,8 $\pm$ 3,3	16,0 $\pm$ 2,8	0,034	<0,001	0,303
	sdLDL $>$ 50%	19,8 $\pm$ 4,1	16,7 $\pm$ 2,9			
HDL 3b, %	sdLDL $\leq$ 50%	9,0 $\pm$ 2,6	10,8 $\pm$ 2,8	0,056	0,012	0,359
	sdLDL $>$ 50%	10,5 $\pm$ 3,2	11,3 $\pm$ 2,2			

HDL 3c, %	sdLDL≤50%	9,5±5,9	13,8±5,3	0,374	<0,001	0,293
	sdLDL>50%	11,3±4,4	13,6±4,5			

Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ Sd i poređeni korišćenjem dvofaktorske ANOVE

Napomena: broj kontrolnih ispitanika sa sdLDL $\leq$ 50% bio je N=27 i sa sdLDL > 50% N=40; broj STEMI bolesnika sa sdLDL $\leq$ 50% bio je N=20 i sa sdLDL > 50% N= 49

Rezultati statističke analize unutar grupa pokazali su veću zastupljenost HDL 3a subfrakcije i kod ispitanika KG i kod STEMI bolesnika sa povećanim udelom sdLDL u odnosu na odgovarajuće učesnike sa nižim udelom sdLDL. S druge strane, poređenjem ispitanika sa povećanim udelom sdLDL između grupa, uočena je značajno manja zastupljenost HDL 3a i HDL 2a subfrakcije, kao i veća zastupljenost HDL 3b i HDL 3c subfrakcije kod STEMI bolesnika u odnosu na kontrolne ispitanike. Iako između kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika, nije uočena značajna razlika u udelu HDL 3 subfrakcije, povećan udeo sdLDL bio je povezan sa većom zastupljenošću HDL 3 subfrakcije unutar obe grupe ispitanika.

4.5.2. Udeo PON1 na HDL subfrakcijama u odnosu na prisustvo STEMI i sdLDL

U Tabeli 34 prikazani su rezultati koji opisuju relativni udeo PON1 unutar HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo STEMI i udela sdLDL.

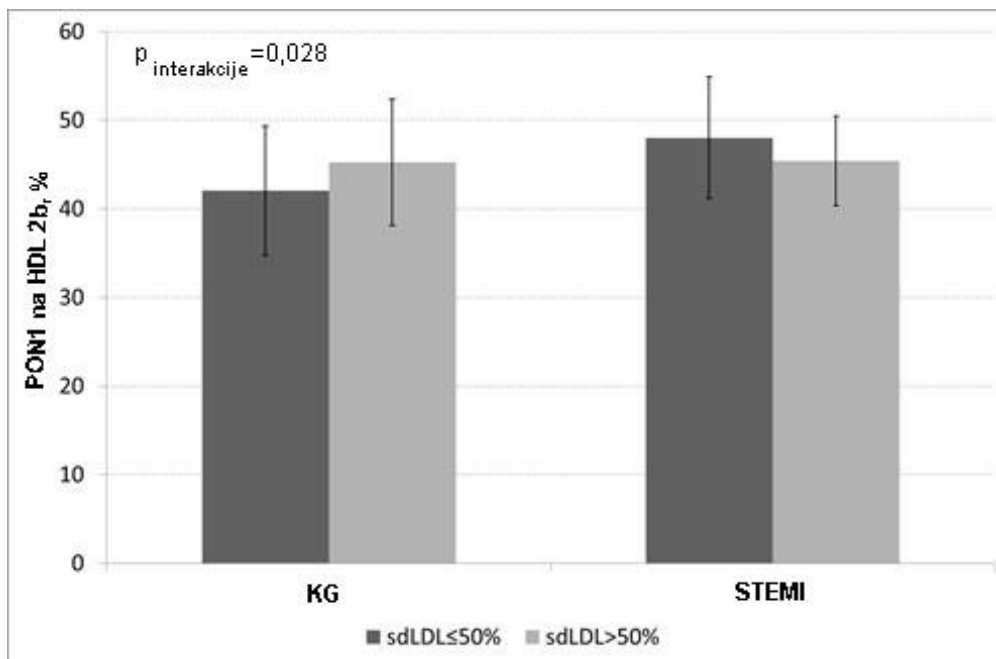
Tabela 34. Distribucija PON1 na HDL subfrakcijama u zavisnosti od udela sdLDL

Varijabla	Udeo sdLDL	KG	STEMI	P (sdLDL grupna)	P (STEMI prema KG)	p (interakcija)
PON1 HDL 2b, %	sdLDL≤50%	42,0±7,3	48,0±6,8	0,817	0,086	0,028
	sdLDL>50%	45,3±7,1	45,4±5,0			
PON1 HDL 2a, %	sdLDL≤50%	22,9±5,5	22,7±3,9	0,043	0,445	0,302
	sdLDL>50%	20,2±3,1	21,8±4,9			
PON1 HDL 3, %	sdLDL≤50%	35,1±7,0	29,3±6,7	0,284	0,018	0,142
	sdLDL>50%	34,5±7,8	32,8±5,5			
PON1 HDL 3a, %	sdLDL≤50%	13,6±1,7	11,9±2,1	0,270	0,064	0,046
	sdLDL>50%	13,2±2,3	13,2±1,9			
PON1 HDL 3b, %	sdLDL≤50%	9,3±1,9	7,6±1,9	0,888	0,003	0,146
	sdLDL>50%	8,7±1,8	8,1±2,1			
PON1 HDL 3c, %	sdLDL≤50%	12,2±4,3	9,8±3,4	0,287	0,082	0,534
	sdLDL>50%	12,6±6,7	11,5±3,8			

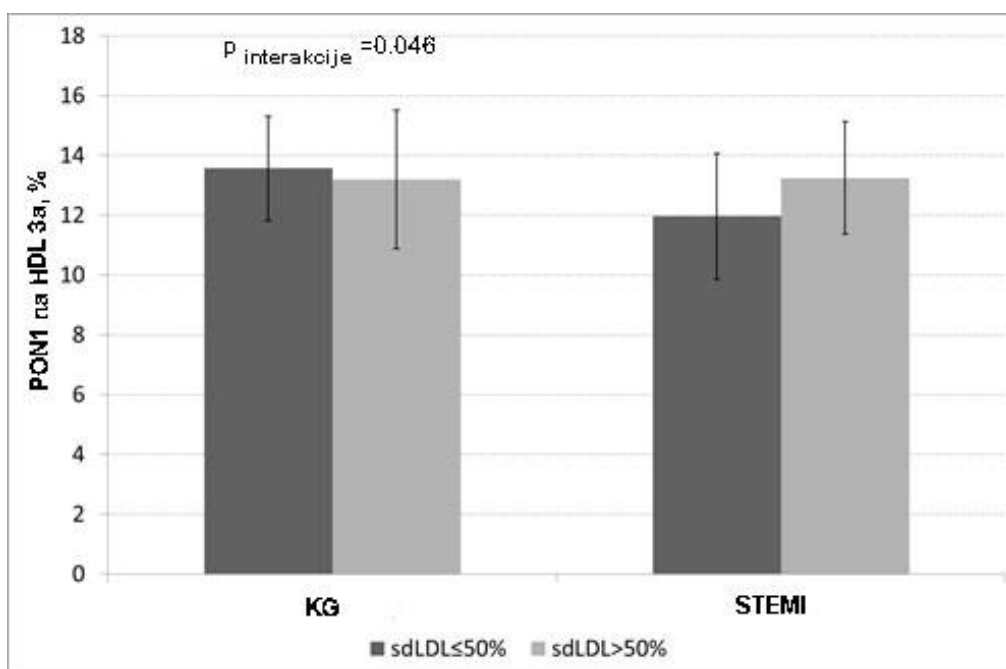
Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ Sd i poređeni korišćenjem dvofaktorske ANOVE

Napomena: broj kontrolnih ispitanika sa sdLDL $\leq$ 50% bio je N=27 i sa sdLDL > 50% N=40; broj STEMI bolesnika sa sdLDL $\leq$ 50% bio je N=20 i sa sdLDL > 50% N= 49

Statistička obrada podataka pokazala je da je relativni udeo PON1 na HDL 2a subfrakciji bio značajno niži u obe grupe ispitanika sa povećanim udelom sdLDL u odnosu na odgovarajuće ispitanike sa nižim udelom sdLDL. Međutim, iako povećani udeo sdLDL i prisustvo STEMI nisu značajno uticali na relativni udeo PON1 unutar HDL 2b i HDL 3a subfrakcija, dokazano je postojanje interakcije između ova dva faktora. Relativni udeo PON1 unutar HDL 2b bio je veći kod kontrolnih ispitanika, a manji kod STEMI bolesnika sa povećanim udelom sdLDL u odnosu na odgovarajuće ispitanike sa nižim udelom sdLDL (Slika 32, panel a), dok je relativni udeo PON1 unutar HDL 3a bio manji kod kontrolnih, a veći kod STEMI ispitanika sa povećanim udelom sdLDL (Slika 32, panel b).



Panel a



Panel b

Slika 32. Relativni udeo PON1 unutar HDL 2b i HDL 3a subfrakcija u zavisnosti od udela sdLDL kod kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika

Panel a: relativni udeo PON1 unutar HDL 2b subfrakcije kod kontrolnih i STEMI ispitanika sa udelom sdLDL $\leq$ ili $>$ 50%

Panel b: relativni udeo PON1 unutar HDL 3a subfrakcije kod kontrolnih i STEMI ispitanika sa udelom sdLDL $\leq$ ili $>$ 50%

5. DISKUSIJA

Uprkos činjenici da su tokom poslednje dve decenije načinjeni značajni pomaci u razumevanju patogeneze ateroskleroze, i dalje ostaju nerazjašnjeni kompleksni odnosi koji povezuju dislipidemiju, inflamaciju, oksidativni stres i imunske procese u jedinstvenu celinu u kojoj svaki od pomenutih procesa utiče na ostale. Upravo iz tih razloga, savremene studije su usmerene ka proučavanju interakcija imunskih mehanizama sa brojnim metaboličkim faktorima rizika koji dovode do aktiviranja i širenja lezija u arterijskom stablu. Takođe, aktuelna su i ispitivanja povezanosti biomarkera inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije sa težinom, prognozom, mogućim komplikacijama i ishodom KAB. Svrha ove studije bila je da uporedi raspodele HDL i LDL subfrakcija, koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, PTX3 i MDA i aktivnosti enzima PON1 u serumu između SAP i STEMI bolesnika, kao i u odnosu na zdrave ispitanike, kako bi se procenio uticaj ishemije miokarda i različitih promena koje nastaju tokom AIM na njihove vrednosti. Dodatno je analizirana povezanost ispitivanih markera sa istovremenim prisustvom rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa kod STEMI bolesnika i ispitanika KG i procenjivana je sposobnost pomenutih markera u predviđanju ishoda bolesti čija je težina kvantifikovana SYNTAX skorom. Konačno, istraživana je i distribucija aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL subfrakcijama i njena povezanost sa markerima inflamacije i lipidne peroksidacije. Prema trenutnim saznanjima, ovo je prva studija koja se bavila ispitivanjem povezanosti rizičnog HDL 3 i LDL B fenotipa sa koncentracijom IgG anti-oxLDL antitela kako bi se ustanovilo da li ova autoantitela mogu imati različite uloge kod STEMI bolesnika sa jedne i zdravih osoba sa druge strane. Za razliku od većine drugih studija u kojima su upoređivane velike HDL 2 subfrakcije sa malim HDL 3 subfrakcijama, ovo je prva studija koja je detaljnije istraživala sve HDL subfrakcije (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) kako bi pružila više preciznih podataka o promenama različitih HDL subfrakcija i aktivnosti PON1 kod STEMI bolesnika i ispitanika KG.

Kada su u pitanju demografske karakteristike i osnovni biohemijski parametri, rezultati naše studije su pokazali da je prevalenca HTA i starijih osoba bila značajno veća u obe grupe bolesnika u odnosu na ispitanike KG (Tabela 3), čime je još jednom potvrđeno da su starije osobe sa visokim krvnim pritiskom podložnije razvoju KVB (163). Očekivano, zastupljenost pušača, kao i koncentracije glukoze značajno su bile veće kod STEMI bolesnika (Tabela 3), budući da pušenje i hiperglikemija predstavljaju faktore rizika za razvoj AKS (164). Činjenica da su SAP bolesnici u našoj studiji imali veći BMI u poređenju sa STEMI bolesnicima (Tabela 3) sugerise da BMI kao najčešće korišćeni antropometrijski indikator za definisanje gojaznosti pruža samo grubu meru opšte gojaznosti ne uspevajući da u potpunosti obuhvati heterogenu raspodelu telesne masti, te kao takav nije dovoljan za procenu individualnog nivoa metaboličkog rizika (165). U poređenju sa BMI, odnos obima struka i kukova koji je direktno povezan sa nakupljanjem masti u predelu abdomena, predstavlja bolji indeks za procenu abdominalne gojaznosti. To znači da osobe sa normalnom ili niskom vrednošću BMI i abdominalnom gojaznošću imaju veći rizik za razvoj KVB od osoba sa povišenim vrednostima BMI i bez abdominalne gojaznosti, što je i dokazano studijama novijeg datuma (166,167). Dalje, koncentracija HDL-h bila je značajno niža kod bolesnika obe grupe u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 3), što je očekivano i u saglasnosti sa rezultatima ranijih studija u kojima je potvrđeno da je niska koncentracija HDL-h snažan prediktor povećanog kardiovaskularnog rizika (168,169). U ovoj studiji pronađene su i značajno niže koncentracije UH, TG i LDL-h kod SAP bolesnika u poređenju sa STEMI bolesnicima, što bi se moglo pripisati činjenici da su SAP bolesnici bili na terapiji hipolipemijskim lekovima, statinima (Tabela 3). Naime, klinička korist upotrebe statina dobro je dokumentovana studijama koje su pokazale da upravo primena statina doprinosi smanjenju rizika od kardiovaskularnih događaja, poboljšanju ishoda bolesti i smanjenju učestalosti komplikacija i to višestrukim mehanizmima: sniženjem koncentracije LDL-h, redukcijom trombogenosti, smanjenjem inflamacije i stabilizacijom fibrozne kape aterosklerotskog plaka (170,171). Međutim, očekivana razlika u koncentracijama UH i LDL-h

između STEMI bolesnika i ispitanika KG nije dokazana (Tabela 3), a potencijalno objašnjenje za ovaj fenomen obuhvata heterogenost unutar populacije STEMI bolesnika i odgovor akutne faze povezan sa povećanom aktivnošću LDL-R (172), što uslovljava privremeno smanjenje koncentracije ovih parametara kod STEMI bolesnika. Pa ipak, generalno posmatrano, iz opisanih rezultata naše studije uočava se da se STEMI bolesnici, koji su inače bili starije osobe, uglavnom pušači sa HTA, hiperglikemijom i lošijom regulacijom parametara lipidnog statusa, zaista uklapaju u profil visoko rizičnih pacijenata, budući da je prema savremenim preporukama fokus na postojanju većeg broja faktora rizika za razvoj KVB (24).

Pošto se zna da inflamatorni procesi zajedno sa imunskim procesima učestvuju u složenoj kaskadi nastanka aterosklerotskog plaka koji dovodi do opstrukcije koronarne arterije i samim tim do ishemije miokarda, u našoj studiji su ispitivane koncentracije inflamatornih markera hsCRP i PTX3. Tom prilikom dokazano je prisustvo povišenih koncentracija ovih markera u serumu obe grupe bolesnika u poređenju sa ispitanicima KG, ali nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama pomenutih markera između SAP i STEMI bolesnika (Tabela 4). Odsustvo razlike u vrednostima inflamatornih parametara između dve grupe bolesnika moglo bi se pripisati kratkom vremenu koje protekne nakon AIM do određivanja koncentracije ovih parametara (5). Osim toga, jasno je istaknuto da je vaskularna inflamacija niskog stepena uključena u sve faze aterosklerotskog procesa, od endotelne disfunkcije, preko formiranja aterosklerotskog plaka, do erozije i/ili rupture plaka, što na kraju može dovesti do ishemijskog sindroma. Poznato je da se hronična izloženost koronarnih krvnih sudova inflamaciji niskog stepena reflektuje kroz povišenu koncentraciju sistemskog inflamatornog markera CRP (173). U tom kontekstu, u našoj studiji nađene vrednosti hsCRP < 1 mg/L kod zdravih ispitanika sugerišu da ove osobe imaju nizak rizik za razvoj AKS, za razliku od SAP bolesnika sa vrednostima hsCRP između 1 i 3 mg/L koji imaju umeren rizik i STEMI bolesnika sa vrednostima hsCRP > 3 mg/L koji imaju visok rizik za razvoj AKS. Uočena povišena koncentracija hsCRP kod STEMI bolesnika u skladu je sa rezultatima studije Nijmeijer i saradnika (174) koji su podržali ideju da CRP funkcioniše kao proinflamatorni medijator tokom AIM tako što aktivira komplement i dovodi do lokalne akumulacije kompleksa CRP i komplementa u infarktom zahvaćenom miokardu. Takođe, postoji i saglasnost naših rezultata sa studijom Badimon i saradnika (175) u kojoj je pokazano da CRP doprinosi progresiji ateroskleroze ispoljavanjem proinflamatornih efekata, modulacijom urođenog imunskog odgovora, aktiviranjem sistema komplementa i promovisanjem aktivacije trombocita i formiranja tromba, kao i vaskularnim remodelovanjem i angiogenezom. Međutim, CRP se sintetiše u jetri kao odgovor na inflamatorne signale, naročito IL-6 i predstavlja, ne samo marker sistemske inflamacije, već i marker infekcije, pa se sve više proučava novi inflamatorni marker, PTX3. PTX3 se stvara u različitim ćelijama aterosklerotskih lezija uključujući monocite, makrofage, endotelne ćelije, vaskularne GMC i kardiomiocite, što sugerise da se kroz koncentraciju PTX3 u krvi reflektuje stepen lokalne inflamacije u samoj leziji (176).

Nađene povišene vrednosti PTX3 kod naših STEMI bolesnika u odnosu na ispitanike KG u skladu su sa rezultatima studije Peri i saradnika (141) koji su pokazali da se koncentracija PTX3 povećava u krvi pacijenata sa AIM već nakon 6 h od pojave bola u grudima, te su PTX3 predložili kao rani potencijalni indikator ireverzibilnog oštećenja miocita. Takođe, postoji i saglasnost sa studijom Nebuloni i saradnika (177) u kojoj je PTX3 opisan kao rani marker oštećenja miokarda sa dostignutom maksimalnom vrednošću oko 7 h nakon nastanka AIM. Povišene vrednosti PTX3 kod naših SAP bolesnika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima u skladu su sa rezultatima studije Soeki i saradnika (176) koji su pokazali da je u odnosu na hsCRP, PTX3 osetljiviji marker vulnerabilnosti koronarnog plaka.

S obzirom da su povišene vrednosti PTX3 zapažene i kod SAP i kod STEMI bolesnika, studije koje su se bavile ispitivanjem mehanizama delovanja PTX3 u ovim bolestima, kao i kliničkim značajem njegovog određivanja, pokazale su da PTX3 ima i proinflamatorne i antiinflamatorne efekte u zavisnosti od situacije i anatomske lokalizacije lezija. Dokazano je da tokom AKS dolazi do sekrecije PTX3 iz granula aktiviranih neutrofila, pri čemu se u zahvaćenoj koronarnoj arteriji lokalno izlučeni PTX3 vezuje za trombocite i inhibira njihovu agregaciju

ispoljavajući antiinflamatorna svojstva (178). Studije na PTX3 deficijentnim miševima opisale su povećano oštećenje miokarda i pojačan stepen ateroskleroze i time podržale kardioprotektivnu ulogu PTX3 (179,180). Smatra se da u urođenom imunskom odgovoru PTX3 ima dvostruku ulogu: s jedne strane štiti od neželjene aktivacije komplementa, a s druge strane povećava komplementom posredovano oštećenje tkiva u ishemiji i reperfuziji (181). Veza između PTX3 i sistema komplementa potvrđena je nalazom visokih vrednosti PTX3 unutar koronarnih arterijskih trombova koji su uglavnom sastavljeni od rezidentnih makrofaga, neutrofila i penastih ćelija (182).

Iako su neke studije pokazale da su visoke vrednosti PTX3 kod SAP i STEMI bolesnika povezane sa nepovoljnijom prognozom i većim rizikom od mortaliteta, rezultati našeg istraživanja nisu dokazali nezavisnu prediktivnu vrednost PTX3 za težinu i ishod AIM (Tabela 14), što je u suprotnosti sa studijom Tomandlove i saradnika (147). Pomenutom studijom je utvrđeno da su povišene vrednosti PTX3 nezavisni prediktor jednogodišnjeg mortaliteta pacijenata sa AIM i da je njegova prognostička vrednost kao pojedinačnog biomarkera jednako dobra kao i GRACE (*The Global Registry of Acute Coronary Events*) i TIMI (*Thrombolysis in myocardial infarction*) skor za procenu rizika (147). Dalje, Kimura i saradnici (183) su kod pacijenata sa SAP istraživali odnos vrednosti PTX3 i komponenti koronarnog plaka, kao i ishod nakon perkutane koronarne intervencije (engl. *percutaneous coronary intervention*, PCI) i dokazali da su maksimalne vrednosti PTX3 posle PCI bile u korelaciji sa nestabilnošću plaka pre PCI i neželjenim srčanim događajima, predlažući PTX3 kao dobar prognostički marker ishoda SAP bolesnika podvrgnutih ovoj intervenciji. Međutim, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li potencijalna prognostička vrednost PTX3 u AKS odražava njegov uticaj na koagulaciju i aktivaciju komplementa, ili su visoki nivoi PTX3 zaštitni odgovor koji odražava stepen inflamacije i oštećenja miokarda.

Budući da su brojni eksperimenti pružili dokaze o ulozi imunskog sistema kao glavnog modulatora inicijacije i progresije ateroskleroze, jedan deo naše studije obuhvatio je ispitivanje IgG anti-oxLDL antitela i njihove povezanosti sa aterosklerozom. U ovoj studiji nije zapažena statistički značajna razlika u koncentracijama pomenutih antitela između tri ispitivane grupe (Tabela 4), što je u saglasnosti sa studijama Rossi i saradnika (184), kao i Virelle i saradnika (185) u kojima nije pronađena povezanost titra anti-oxLDL antitela i težine angiografski dokazane KAB. S druge strane, rezultati naše studije su u suprotnosti sa rezultatima studija Inoue i saradnika (186), Laczik i saradnika (187) i Gruzdeve i saradnika (188). Inoue i saradnici su pronašli povišeni titar IgG anti-oxLDL antitela kod pacijenata sa AIM u odnosu na osobe bez potvrđene KAB i sugerisali da ova antitela predstavljaju marker nestabilnosti koronarnog plaka (186). Laczik i saradnici su dokazali povećane koncentracije IgG anti-oxLDL antitela kod bolesnika sa AKS u odnosu na zdrave ispitanike i predložili ulogu ovih antitela u destabilizaciji aterosklerotskog plaka (187), dok su Gruzdeva i saradnici zapazili pozitivnu povezanost koncentracija IgG anti-oxLDL antitela i broja koronarnih arterija sa stenozom > 75% kod STEMI bolesnika (188). Izrazita nedoslednost u dobijenim rezultatima mogla bi se pripisati heterogenom dizajnu studija, različitoj etničkoj pripadnosti učesnika studija, kao i razlikama u specifičnosti i tipu određivanih antitela, tako da su za sigurniju procenu povezanosti IgG anti-oxLDL antitela i KVB neophodne dobro osmišljene prospektivne studije sa dovoljnim brojem učesnika i dobro definisanim karakteristikama populacije.

Uprkos opsežnim istraživanjima IgG anti-oxLDL antitela, još uvek ne postoji konsenzus o njihovoj ulozi u bolestima povezanim sa aterosklerozom. Iako postoje studije koje ukazuju na protektivnu ulogu IgG anti-oxLDL antitela (129,130), većina autora sugerise da su ova antitela potencijalno aterogena budući da doprinose stvaranju oxLDL-IC koji se vezuju za endotelom obloženu intimu arterijskog zida uzrokujući dodatno oštećenje endotela (189,190). Naime, oxLDL-IC imaju sposobnost da indukuju aktivaciju komplementa u ateromatoznoj leziji, dovodeći do generisanja C3a i C5a komponenti komplementa koje zahvaljujući hemotaktičnim svojstvima doprinose ubrzavanju inflamatorne reakcije i ekspresiji adhezionih molekula na endotelnim ćelijama što stimuliše oslobađanje hemokina i drugih medijatora i izaziva proliferaciju vaskularnih GMC (191,192). Činjenica da oxLDL-IC pokreću snažan inflamatorni odgovor u makrofagama potvrđena je i studijom novijeg datuma u kojoj je zapaženo da oxLDL-IC deluju kao prajmer signali za aktivaciju multiproteinskog kompleksa, NLRP3 inflamazoma, preko Fcγ receptora, CD36 i

TLR4 (engl. *Toll-like receptor 4*) dovodeći do sekrecije velikih količina proinflamatornog citokina, IL-1 β (193). NLRP3 inflamazom je kritična komponenta urođenog imunskog sistema koja posreduje u aktivaciji kaspaze-1 i u sekreciji proinflamatornih citokina IL-1 β i IL-18 kao odgovor na mikrobnu infekciju i oštećenje ćelija (194). Izlučeni IL-1 β pokreće inflamatornu kaskadu koja obuhvata pojačano stvaranje IL-6, IL-8, faktora nekroze tumora α , VCAM-1 i MCP-1, čime se promovise regrutovanje i infiltracija neutrofila i monocita. Pod uticajem IL-1 β stvara se trombocitni faktor rasta koji stimuliše proliferaciju GMC, olakšava stvaranje penastih ćelija i povećava proizvodnju MMP nakon degradacije ekstracelularnog matriksa. Pomenuta aktivacija NLRP3 inflamazoma odvija se u makrofagama pod uticajem različitih stimulusa kao što su: mitohondrijalna disfunkcija, lizozomska oštećenja, prisustvo oxLDL i ROS (194). Smatra se da NLRP3 inflamazom predstavlja vezu između metabolizma lipida i inflamacije, a sve je više dokaza da ima ključnu ulogu u aterogenezi, budući da je eksprimiran u aterosklerotskim plakovima srazmerno težini bolesti. Takođe, potvrđeno je proaterogeno dejstvo anti-oxLDL antitela specifičnih za MDA u *in vitro* studiji na apoE i LDL-R deficitarnim miševima gde je pokazano da pomenuta antitela blokiraju preuzimanje i degradaciju oxLDL od strane makrofaga i da su u korelaciji sa progresijom ateroskleroze (195).

Osim promena u koncentraciji HDL-h, kod bolesnika sa KVB se javljaju i značajne promene u strukturi i funkciji HDL čestica, što sugerise da je neophodno izvršiti procenu njihove funkcionalnosti, kao i detaljniju analizu distribucije pojedinačnih HDL subfrakcija. Kada je reč o distribuciji velikih HDL 2 i malih HDL 3 subfrakcija, našom studijom je utvrđeno da su STEMI bolesnici imali značajno manji udeo HDL 2a, a veći udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija od zdravih osoba (Tabela 6), da bi se nakon korekcije za tradicionalne faktore rizika koji su u većoj meri bili zastupljeni kod bolesnika u odnosu na ispitanike KG, pored već utvrđene, dobila i statistički značajna razlika u udelu ukupnih HDL 2 i HDL 3 subfrakcija (Tabela 7). U uslovima ishemije miokarda metabolizam i distribucija HDL subfrakcija su izmenjeni u smislu smanjenog udela velikih HDL 2 i povećanog udela malih, gustih HDL 3 subfrakcija. Ovakva distribucija je nezavisna od starosti, prisustva HTA i statusa pušenja, što znači da je zastupljena kod pacijenata različite starosti, kao i kod pušača i nepušača i kod osoba sa različitim vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska. Manja zastupljenost većih HDL 2 subfrakcija kod naših STEMI bolesnika podržava činjenicu da ove čestice imaju veći ateroprotektivni potencijal i u skladu je sa rezultatima studija Johansson i saradnika (39), kao i Mueller i saradnika (40). Johanson i saradnici su utvrdili inverznu povezanost HDL 2, a naročito HDL 2b subfrakcija sa težinom KAB i progresijom koronarnih lezija (39), dok su Mueller i saradnici pronašli manju zastupljenost HDL 2 subfrakcija kod osoba koje su preživele AIM u odnosu na zdrave ispitanike (40). S druge strane, zapažen povišen relativni udeo malih, gustih HDL 3 subfrakcija kod naših STEMI bolesnika u poređenju sa zdravim osobama (Tabela 7) ukazuje na poremećenu funkcionalnost ovih čestica koja se manifestuje smanjenim kapacitetom efluksa holesterola i smanjenom antioksidativnom sposobnošću. Naime, dobro je dokumentovano da antiaterogena svojstva HDL čestica, naročito malih, gustih, proteinima bogatih HDL 3 subfrakcija, mogu biti kompromitovana u AIM, tim pre što se AIM karakteriše ishemijom miokarda koja je udružena sa niskom koncentracijom HDL-h, pojačanim oksidativnim stresom, akutnom inflamacijom i rizikom od ponovljenih kardiovaskularnih događaja (196). Niska koncentracija HDL-h u AIM odražava značajne promene u metabolizmu lipoproteina u inflamatornom okruženju, što zauzvrat može dovesti do modifikacije lipidne i proteinske komponente HDL čestica (197). Male HDL čestice su posebno osetljive na oksidativne modifikacije, tako da prooksidativni enzimi, kao što su MPO, mogu modifikovati specifične aminokiseline u apoA-I (69), a oksidativni stres može umanjiti aktivnost LCAT *in vitro* (49), što za posledicu ima smanjenje kapaciteta RTH. Tokom inflamacije dolazi do višestrukih promena u proteinskim i lipidnim komponentama HDL čestica koje dovode do izmenjene funkcionalnosti ovih čestica (198). Kratkoročno ovakve promene mogu biti korisne i rezultirati povećanjem UH u perifernim ćelijama radi poboljšanja odbrane organizma, ali dugoročno one povećavaju rizik od ateroskleroze.

Pored distribucije HDL subfrakcija, u ovoj studiji je nakon korekcije za tradicionalne faktore rizika: starost, HTA i status pušenja, analizirana i distribucija LDL subfrakcija u grupi STEMI bolesnika i kontrolnih ispitanika. Iako se relativni udeli većine LDL subfrakcija nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa (Tabela 8), pronađena veća zastupljenost najmanje i najgušće LDL IV subfrakcije kod STEMI bolesnika u odnosu na ispitanike KG (Tabela 8) podržava hipotezu da prisustvo sdLDL čestica povećava rizik za razvoj KVB. Do sada su brojne velike prospektivne studije, koje su se bavile distribucijom LDL čestica, dale dokaze o većoj prevalenci sdLDL kod pacijenata sa KVB, kao i o tome da su ove čestice markeri subkliničke ateroskleroze u svim populacijama (95-97).

Uzimajući u obzir da su KVB udružene sa značajnim promenama u metabolizmu lipida i lipoproteina, u našoj studiji je osim veličine HDL i LDL čestica, istraživano i prisustvo rizičnog lipoproteinskog fenotipa u ispitivanim grupama. Dobijeni rezultati su pokazali da su dijometri lipoproteinskih čestica kod SAP i STEMI bolesnika bili pomereni ka manjim vrednostima u poređenju sa ispitanicima KG (Tabela 5), što je u skladu sa hipotezom da su male HDL i male LDL čestice faktori rizika za razvoj ateroskleroze (199). Osim toga, ispitivanjem rizičnih fenotipova HDL i LDL čestica u ovoj studiji je dokazan značajno veći udeo LDL B i HDL 3 fenotipa kod obe grupe bolesnika u odnosu na ispitanike KG (Tabela 5), što je i očekivano budući da je prisustvo aterogenog lipoproteinskog fenotipa uobičajeno za pacijente sa KVB (200). Pronađene značajne razlike u profilu lipoproteina između zdravih osoba i SAP odnosno STEMI bolesnika u skladu su sa studijom Zeljkovic i saradnika (201) kojom je opisana povezanost KAB sa dominacijom malih, gustih HDL i sdLDL čestica. Takođe, postoji saglasnost naših rezultata i sa drugom studijom Zeljkovic i saradnika (202) u kojoj je utvrđeno da je akutni moždani udar povezan sa nepovoljnom raspodelom HDL i LDL subfrakcija koja se ogleda u povećanom udelu sdLDL i malih HDL 3 subfrakcija. Naši rezultati su podržali i prethodnu studiju Alabakovske i saradnika (203) u kojoj je pokazana obrnuta korelacija između veličine LDL čestica i incidence AIM, kao i dominacija rizičnog LDL B fenotipa u grupi pacijenata sa AIM. Osim toga, rezultati naše studije su potvrdili prethodna istraživanja Pascot i saradnika (204) koji su prisustvo malih HDL čestica okarakterisali kao nepovoljan lipoproteinski profil, a mali dijametar HDL čestica kao važan faktor rizika za razvoj KAB.

U sledećem koraku naše studije analizirani su markeri inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije kod zdravih i STEMI ispitanika u odnosu na istovremeno prisustvo rizičnih HDL 3 i LDL B fenotipova. Posle podele kontrolnih ispitanika na grupu bez i grupu sa rizičnim fenotipom, pronađene su značajno više koncentracije TG i niže koncentracije HDL-h kod ispitanika KG sa rizičnim fenotipom (Tabela 9) što je i očekivano budući da je hipertrigliceridemija istaknuta kao važan prediktor LDL B fenotipa, a zajedno sa niskom koncentracijom HDL-h je karakteristična za aterogeni lipoproteinski fenotip. Interesantno je da su kontrolni ispitanici sa rizičnim fenotipom imali značajno veće koncentracije IgG anti-oxLDL antitela u odnosu na ispitanike bez ovog fenotipa (Tabela 10), što sugeriše da se oksidativna modifikacija LDL čestica i posledično povećana sekrecija pomenutih antitela obično dešavaju kod zdravih osoba sa nepovoljnim lipoproteinskim profilom. Smatra se da su u fiziološkim uslovima IgG anti-oxLDL antitela odgovorna za neutralizaciju i pojačan klirens oxLDL, čime je podržana njihova protektivna uloga. Takva činjenica je potvrđena studijom Schioppa i saradnika (205) u kojoj je pokazano smanjeno napredovanje ateroskleroze kod miševa nakon izvršene pasivne imunizacije anti MDA-apoB-100 humanim antitelima, pri čemu su pruženi dokazi da se ovaj ateroprotektivni efekat, u principu, može javiti i *in vivo*.

Kada su u pitanju STEMI bolesnici, ista podela na dve grupe prema prisustvu rizičnog lipoproteinskog fenotipa nije dokazala postojanje značajnih razlika u osnovnim biohemijskim parametrima (Tabela 11), kao ni u koncentraciji IgG anti-oxLDL antitela (Tabela 12). Potencijalni mehanizam za objašnjenje izostanka razlike u koncentracijama pomenutih antitela bi mogao predstavljati formiranje nerastvorljivih oxLDL-IC koji se deponuju u tkivima i izazivaju oštećenje (116,117), a imaju izraženije proinflamatorne efekte na makrofage od antitela ili samog oxLDL (193). Kod STEMI bolesnika sa rizičnim fenotipom nađena je značajno veća koncentracija PTX3 u

odnosu na STEMI bolesnike bez rizičnog fenotipa (Tabela 12), što ide u prilog činjenici da male HDL 3 čestice stimuliraju ekspresiju PTX3. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima studije Norata i saradnika (145) koji su dokazali da upravo HDL 3 čestice indukuju ekspresiju PTX3 *in vitro* i *in vivo* uglavnom preko PI3K/Akt puta. Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti i sa studijom Liu i saradnika (146) u kojoj je pokazano da PTX3 utiče na akumulaciju lipida u makrofagama povećanjem preuzimanja oxLDL i inhibicijom efluksa holesterola. Dalje, STEMI bolesnici sa rizičnim fenotipom imali su značajno nižu koncentraciju MDA od bolesnika bez rizičnog fenotipa (Tabela 12). Ovaj rezultat je neočekivan, posebno ako se u obzir uzme činjenica da toksični aldehidi predstavljaju indikatore kasne faze oksidativnog oštećenja lipida koji igraju važnu ulogu u modifikaciji LDL čestica, a samim tim i u patogenezi ateroskleroze (121). Dodatno, poznato je da MDA nastaje tokom sinteze TXA2 čija je produkcija povećana u ishemiji miokarda koja je inače u osnovi SAP i AIM. U našoj studiji je istraživana koncentracija MDA kao krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije kod sve tri grupe ispitanika i pronađene su značajno više koncentracije MDA kod SAP bolesnika u poređenju sa ispitanicima KG (Tabela 4), što bi potencijalno moglo ukazivati na postojanje perzistirajućeg oksidativnog stresa i iscrpljivanje zaštitnih antioksidativnih mehanizama u hroničnim KVB. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima studije Kotur-Stevuljevic i saradnika (206), koji su sugerisali snažno uzajamno učešće oksidativnog stresa i inflamatornih markera u razvoju ateroskleroze. Uočena je i saglasnost sa studijom Shao (207) kojom je potvrđeno da izloženost visokim koncentracijama MDA progresivno i dramatično modifikuje apoA-I na HDL česticama lišavajući ga sposobnosti da promoviše efluks holesterola, čime se posledično podstiče stvaranje penastih ćelija, a samim tim i aterogeneza. Međutim, u našoj studiji nije uočena razlika u koncentracijama LDL-h i IgG anti-oxLDL antitela između STEMI bolesnika i zdravih ispitanika (Tabele 3 i 4), pa sledstveno ni vrednosti MDA kod STEMI bolesnika nisu bile više u odnosu na zdrave osobe. Sve ovo je verovatno bio razlog prisustva nižih koncentracija MDA kod STEMI bolesnika sa rizičnim fenotipom u odnosu na one bez rizičnog fenotipa (Tabela 12). Iako se MDA već dugu godinu koristi kao pogodan marker lipidne peroksidacije, biološke funkcije ovog molekula u bolestima povezanim sa aterosklerozom još uvek nisu dovoljno proučene, što može da bude dodatni razlog neusaglašenosti rezultata naše studije sa poznatim mehanizmima koji povezuju dislipidemiju i redoks disbalans.

U ovom istraživanju ispitivana je i aktivnost PON1 u serumu i raspodela pomenutog enzima unutar HDL subfrakcija, kao i njihova veza sa parametrima lipidnog statusa, markerima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije. Imajući u vidu da je uzajamna povezanost PON1 i HDL čestica daleko kompleksnija od jednostavne interakcije ligand-nosač, za potpuniju procenu statusa enzima analizirana je njegova distribucija na pojedinačnim HDL subfrakcijama kod kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika. Rezultati naše studije su pokazali da je kod STEMI bolesnika uprkos povećanom udelu malih HDL 3b i 3c subfrakcija (Tabele 6 i 7), pronađen manji udeo PON1 unutar HDL 3b (Tabele 16 i 17), a samim tim i smanjena arilesterazna aktivnost ovog enzima, što bi se moglo pripisati promenama u metabolizmu i sazrevanju HDL čestica (72). Uzimajući u obzir da su naši STEMI bolesnici imali hipertrigliceridemiju, razumno bi bilo pretpostaviti da akumulacija TG u HDL česticama posredovana povećanom aktivnošću CETP, uzrokuje smanjenu konformacionu stabilnost apoA-I koja rezultira nestabilnom vezom sa PON1 i dovodi do oslobađanja PON1 sa HDL čestica, što su zapravo i opisali Carnuta i saradnici (208) i Brites i saradnici (209). Štaviše, kod naših STEMI bolesnika uočena dominacija malih HDL 3b i HDL 3c subfrakcija udružena sa smanjenom arilesteraznom aktivnošću PON1 na ovim subfrakcijama, sugerise da je antioksidativna sposobnost HDL 3 čestica u AIM značajno redukovana, što je u saglasnosti sa rezultatima studije Dullaart i saradnika (210) i Annema i saradnika (211) koji su dokazali da je kod bolesnika sa AIM smanjen antiinflamatorni kapacitet HDL čestica. Naši rezultati su u skladu i sa studijom Tan i saradnika (212) u kojoj je pronađena smanjena aktivnost PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama i smanjen kapacitet efluksa holesterola kod bolesnika sa AKS u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, uočena je i saglasnost naših rezultata sa studijom Bounfaa i saradnika (213) gde je pokazano da su HDL čestice kod pacijenata sa AKS bile manje efikasne u posredovanju efluksa holesterola od HDL čestica zdravih osoba, ali se kao takav niži efluks holesterola kod pacijenata sa AKS nije mogao

objasniti niskom koncentracijom HDL u plazmi, već je bio rezultat modifikacije apoA-I/ABCA1 puta.

Rezultati korelacione analize kod zdravih ispitanika nisu pokazali postojanje značajne povezanosti distribucije arilesterazne aktivnosti PON1 unutar različitih HDL subfrakcija sa parametrima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije (Tabela 20), dok je u grupi STEMI bolesnika situacija bila nešto drugačija. Kod STEMI bolesnika primećena je pozitivna korelacija između relativnog udela PON1 na HDL 2b subfrakciji i koncentracije MDA (Tabela 23), što je dodatno potvrđeno i multiplom linearnom regresionom analizom (Tabela 24). Ovakav nalaz ide u prilog činjenici da u uslovima pojačanog oksidativnog stresa verovatno dolazi do strukturnih modifikacija HDL čestica koje dalje mogu dovesti do izmenjene distribucije i aktivnosti PON1, što je i pokazano rezultatima studije Kotur-Stevuljević i saradnika sprovedenoj na bolesnicima sa akutnim moždanim udarom (214). Takođe, u grupi STEMI bolesnika zapažena je i negativna korelacija između relativnog udela PON1 na HDL 2a subfrakciji i koncentracije PTX3 (Tabela 23), čime je dodatno potvrđen uticaj akutne inflamacije na slabljenje antioksidativne aktivnosti PON1. Ovakav rezultat je u skladu sa studijom Meisinger i saradnika (215) u kojoj je dokazano da izražena akutna inflamacija može izazvati poremećaj arilesterazne aktivnosti PON1 i posledično gubitak funkcionalnosti HDL čestica.

Što se tiče paraoksonazne aktivnosti PON1 u cirkulaciji, u KG nije dokazana značajna korelacija sa HDL subfrakcijama (Tabela 25), parametrima lipidnog statusa (Tabela 26), markerima inflamacije, imunskih procesa i lipidne peroksidacije (Tabela 27), kao ni sa raspodelom PON1 na HDL subfrakcijama (Tabela 28), za razliku od STEMI grupe gde su zapažene određene korelacije. Naime, kod STEMI bolesnika je uočeno da paraoksonazna aktivnost PON1 negativno korelira sa inflamatornim markerom, PTX3 (Tabela 31), kao i sa udelom PON1 na HDL 3b i HDL 3c subfrakcijama (Tabela 32), što bi se moglo objasniti dejstvom izražene inflamacije na HDL subfrakcije i na aktivnost samog enzima u cirkulaciji. Tako su Rached i saradnici (196) u grupi STEMI bolesnika po prvi put dokumentovali da su dve ključne ateroprotektivne aktivnosti HDL čestica: ćelijski efluks holesterola i antioksidativna sposobnost, narušene u ranoj fazi STEMI i da je to u vezi sa istovremenom modifikacijom HDL lipidoma i proteoma, pretežno malih, gustih HDL 3 subfrakcija u uslovima akutne sistemske inflamacije. Štaviše, ovi autori su kod STEMI bolesnika uočili smanjen kapacitet malih HDL 3b i HDL 3c subfrakcija da odlože oksidaciju LDL izazvanu slobodnim radikalima (196). Dalje, u nedavnoj pilot studiji, Bains i saradnici (216) su dokazali negativnu povezanost aktivnosti PON1 sa inflamatornim markerima i sugerisali da je smanjena aktivnost PON1 u akutnoj inflamaciji rezultat promena u strukturi samog enzima i/ili promena u HDL okruženju. Pomenute promene u HDL okruženju mogu prouzrokovati modifikacije u proteinima povezanim sa HDL česticama kao što su apoA-I i PON1 i time kratkoročno i dugoročno uticati na funkcionalnost ovih čestica.

Na aktivnost PON1, osim akutne inflamacije i oksidativnog stresa može uticati i dislipidemija. S tim u vezi, sledeći korak u našem istraživanju bio je ispitivanje promena relativne distribucije HDL subfrakcija i udela PON1 unutar različitih HDL subfrakcija u uslovima povećane zastupljenosti sdLDL čestica kod zdravih osoba i STEMI bolesnika. Uprkos tome što su uloge sdLDL čestica u razvoju i progresiji ateroskleroze dobro poznate, još uvek postoje oprečni stavovi u pogledu kliničkog značaja određivanja ovog parametra. Iako se generalno očekuje da zdrave osobe imaju manju zastupljenost sdLDL čestica od bolesnika sa KVB, rezultati ove studije to nisu potvrdili (Tabela 5). Moguće objašnjenje za opisani fenomen trebalo bi tražiti u individualnim varijacijama tj. genetskim faktorima i životnim navikama učesnika studije, kao i u postojanju subkliničkih faktora rizika bez znakova razvijene KVB, poput gojaznosti, insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma.

Nakon podele kontrolnih ispitanika i STEMI bolesnika na grupu sa povećanim (sdLDL > 50%) i smanjenim udelom sdLDL čestica (sdLDL ≤ 50%), rezultati naše studije su potvrdili da su ispitanici obe grupe sa povećanim udelom sdLDL imali veći udeo malih HDL 3 subfrakcija (Tabela 33). Pretpostavljamo da bi kod kontrolnih ispitanika pronađen veći udeo HDL 3 subfrakcija mogao predstavljati zaštitni odgovor na veću zastupljenost sdLDL čestica, što očigledno ne važi i za

STEMI bolesnike. Smatra se da je izmenjena distribucija malih HDL 3 čestica kod STEMI bolesnika uslovljena hipertrigliceridemijom, sniženom koncentracijom HDL-h i obiljem sdLDL čestica. U takvim uslovima se zahvaljujući pojačanoj aktivnosti CETP, ubrzava katabolizam i remodelovanje HDL od velikih ka manjim česticama obogaćenim TG koje se pod dejstvom enzima HL konvertuju u male guste HDL 3 čestice, što konačno rezultira akumulacijom ovih čestica (44).

Analiza distribucije PON1 na HDL subfrakcijama u odnosu na zastupljenost sdLDL čestica pokazala je da su zdravi ispitanici sa povećanim udelom sdLDL imali veći udeo PON1 unutar HDL 2b subfrakcije u odnosu na ispitanike sa manjim udelom (Tabela 34, Slika 32, panel a), što je u saglasnosti sa studijom Perovic Blagojevic i saradnika (217) u kojoj je dokazan povećani udeo PON1 unutar HDL 2b subfrakcije kod žena sa sindromom policističnih ovarijuma koje su imale LDL B fenotip. Međutim, pronađeni manji udeo PON1 unutar HDL 2b kod STEMI bolesnika sa povećanim udelom sdLDL u odnosu na bolesnike sa manjim udelom (Tabela 34 Slika 32, panel a), mogao bi se objasniti činjenicom da drugi faktori prisutni kod STEMI bolesnika, kao što su oksidativni stres i inflamacija, mogu izmeniti distribuciju PON1 unutar HDL subfrakcija. U prilog tome idu i rezultati multiple linearne regresione analize koji su otkrili da je kod STEMI bolesnika koncentracija MDA bila nezavisno povezana sa većim udelom PON1 unutar HDL 2b (Tabela 24), što sugerise da je pojačana lipidna peroksidacija, a ne dislipidemija *per se*, stimulisala aktivnost PON1. Nasuprot tome, nalaz povećanog udela PON1 unutar HDL 3a kod STEMI bolesnika sa većim udelom sdLDL u odnosu na bolesnike sa smanjenim udelom (Tabela 34), bi se mogao tumačiti kao posledica veće zastupljenosti HDL 3a subfrakcije kod STEMI bolesnika sa većim udelom sdLDL. Štaviše, multipla linearna regresiona analiza potvrdila je nezavisnu povezanost između povećanog udela sdLDL i povećanog udela PON1 unutar HDL 3a subfrakcije kod STEMI bolesnika (Tabela 34, Slika 32, panel b), dok ista povezanost nije zapažena kod kontrolnih ispitanika (Slika 32, panel b). Takođe, uočeni veći udeo PON1 unutar HDL 2a kod ispitanika KG bio je inverzno povezan sa visokim udelom sdLDL (Tabela 24), što sugerise da bi veća zastupljenost ovih čestica mogla smanjiti aktivnost PON1 unutar HDL 2a subfrakcije čak i u odsustvu KVB. Međutim, pošto se mali broj studija bavio distribucijom PON1 unutar HDL subfrakcija, naročito u prisustvu povećanog udela sdLDL, potrebna su dodatna istraživanja da bi se potvrdila ova pretpostavka.

S obzirom na to da ne postoje konzistentni rezultati u pogledu prognostičke vrednosti ispitivanih parametara za kardiovaskularne događaje, jedan deo naše studije obuhvatio je upravo ispitivanje prognostičke sposobnosti IgG anti-oxLDL antitela, kao i veličine lipoproteinskih čestica u predviđanju ishoda i težine bolesti kvantifikovane SYNTAX skorom. Nakon podele STEMI bolesnika prema SXNTAX skorom na grupu sa niskim i grupu sa umerenim rizikom, utvrđene su značajno niže koncentracije IgG anti-oxLDL antitela kod STEMI bolesnika sa umerenim rizikom (Tabela 14), a potencijalni razlog smanjenja koncentracije ovih antitela bi mogao biti intenzivno formiranje nerastvorljivih oxLDL-IC i njihovo nagomilavanje u aterosklerotskom tkivu (218). Uprkos zapaženoj razlici u koncentracijama IgG anti-oxLDL antitela između STEMI bolesnika sa različitim rizikom (Tabela 14, Slika 28), rezultati naše studije nisu dokazali nezavisnu prediktivnu vrednost ovih antitela za težinu i ishod KAB. Dobijeni rezultati su u skladu sa EPIC-Norfolk prospektivnom epidemiološkom studijom (engl. *European Prospective Investigation into Cancer*) u kojoj nije utvrđena nezavisna veza između koncentracije IgG anti-oxLDL antitela i rizika od KAB (219). Takođe, uočena je saglasnost naših rezultata i sa studijom Tsimikas i saradnika (220) koji su uzimajući u obzir tradicionalne faktore rizika, primenom multiple regresione analize, pokazali da IgG anti-oxLDL antitela nisu bila nezavisni prediktor prisustva KAB, ni budućih kardiovaskularnih događaja. S druge strane, naši rezultati su u suprotnosti sa nedavnom meta-analizom (221) koja je podržala koncept da IgG anti-oxLDL antitela mogu imati ulogu u promovisanju aterosklerotskog procesa i ukazala na pozitivnu korelaciju ovih antitela sa budućim kardiovaskularnim događajima.

Što se tiče prediktivne vrednosti veličine LDL čestica, kod STEMI bolesnika sa umerenim rizikom pronađen je značajno manji dijametar LDL čestica (Tabela 15, Slika 29) nezavisno od starosti, glikemije, veličine HDL čestica, imunskog odgovora i inflamatornog statusa ovih bolesnika, sugerisući da LDL dijametar ima ulogu nezavisnog prediktora umerenog rizika, što je i

potvrđeno logističkom regresionom analizom (Slika 30). To znači da STEMI bolesnici sa manjim LDL dijametrom imaju veću verovatnoću za razvoj težeg oblika KAB i nepovoljnijeg ishoda nakon koronarne revaskularizacije. Naime, SYNTAX skor pomaže interventnim kardiolozima u proceni složenosti koronarnih arterijskih lezija, pri čemu vrednosti SYNTAX skora > 22 ukazuju na kompleksniju bolest i nepovoljniju prognozu kod pacijenata podvrgnutih revaskularizaciji primenom PCI (222). Iako se za izračunavanje SYNTAX skora koristi veliki broj parametara kao što su: krvni sud u kome se nalaze lezije, broj lezija, prisustvo lezija u proksimalnom ili distalnom delu krvnog suda, bifurkaciona ili hronična totalna okluzija itd., postoje izvesna ograničenja u njegovoj kliničkoj upotrebi, pri čemu su STEMI bolesnici najbolji primer u tom pogledu. Glavna ograničenja standardnog SYNTAX skora predstavljaju odsustvo kliničkih i laboratorijskih parametara, kao i odsustvo individualizovanog pristupa u stratifikaciji rizika, te stoga, neke smernice preporučuju dodavanje kliničkih varijabli koje mogu uticati na prognozu (223). Generalno posmatrano, rezultati naše studije mogli bi da posluže kao osnova za buduće studije koje će istraživati da li dodavanje biomarkera uz SYNTAX skor može dodatno poboljšati njegovu sposobnost predviđanja ishoda bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Analizom dobijenih rezultata u našoj studiji, definisani su sledeći zaključci:

- Potvrđena je hipoteza da u KAB dominira prisustvo proaterogenih malih, gustih HDL i LDL čestica
- U KG rizični HDL 3 i LDL B fenotip utiču na koncentracije IgG anti-oxLDL antitela, što podržava koncept da je LDL B fenotip podložniji oksidaciji, a da HDL 3 fenotip ima manje izraženu antioksidativnu sposobnost, čime je stimulirana oksidacija LDL čestica i stvaranje IgG anti-oxLDL antitela.
- Kod STEMI bolesnika rizični HDL 3 i LDL B fenotip utiču na povećanje koncentracije inflamatornog markera PTX3, čime je podržana hipoteza o sinergističkom delovanju dislipidemije i inflamacije u patogenezi ateroskleroze.
- Kod STEMI bolesnika utvrđena je smanjena antioksidativna sposobnost i narušena funkcionalnost HDL 3 subfrakcija, što je potkrepljeno uočenom povećanom zastupljenošću malih HDL 3b i HDL 3c subfrakcija, kao i prisustvom manjeg udela PON1 unutar ovih subfrakcija u poređenju sa ispitanicima KG.
- Pojačana lipidna peroksidacija, u većoj meri u odnosu na dislipidemija utiče na povećanje procentualne zastupljenosti PON1 unutar HDL 2b subfrakcije, dok dislipidemija nezavisno od lipidne peroksidacije i inflamacije povećava procentualnu zastupljenost PON1 unutar HDL 3a subfrakcije, čime je podržana hipoteza da različiti patološki uslovi utiču na distribuciju PON1 između HDL 2 i HDL 3 subfrakcija.
- Veća zastupljenost sdLDL čestica smanjuje aktivnost PON1 unutar HDL 2a subfrakcije čak i u odsustvu KAB.
- Aktuelnom studijom nije dokazana prediktivna vrednost IgG anti-oxLDL antitela za težinu i ishod KAB.
- Manji dijametar LDL čestica je nezavisni prediktor umerenog do visokog rizika procenjenog SYNTAX skorom, što ukazuje na veću verovatnoću za razvoj težeg oblika KAB i nepovoljnijeg ishoda nakon koronarne revaskularizacije.

7. LITERATURA

1. Uredba o nacionalnom programu prevencije, lečenja i kontrole kardiovaskularnih bolesti do 2020. godine. Sl. Glasnik RS br. 11/2010.
2. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd 2012.
3. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet* 2014;383:999-08.
4. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med* 2016;4:256-67.
5. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016;37:2315-81.
6. Rapp JH, Owens CD, Johnson MD. Blood vessel and lymphatic disorders. In: Mc Phee SJ, Papadakis MA, eds. *Current medical diagnosis and treatment*. New York: Mc Graw Hill Companies; 2011. p. 446-69.
7. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
8. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: An overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1815-1826.
9. Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: A new look. *Transl Res* 2009;153: 217-223.
10. Rizzo M, Berneis K, Zeljkovic A, Vekic J. Should we routinely measure low-density and high-density lipoprotein subclasses? *Clin Lab* 2009;55:421-429.
11. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014;5:927-946.
12. Greenland P, Knoll MD, Stamler J et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA* 2003;290:891-897.
13. Reiner Ž, Catapano AL, Backer GD, Graham J, Taskinen MR et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of: European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. *Eur Heart J* 2011;32:1769-18.
14. Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B. *Kardiologija*. Beograd. Zavod za Udžbenike, 2011.
15. Sharma R, Rana A, Kumar C, Thakur S. Endothelium dysfunction, inflammation and cardiovascular disorder. *Webmed-Central Pharmaceutical Sciences* 2011;2(9):WMCOO2176.
16. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis* 2008;197:1-11.
17. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010;10:36-46.
18. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013;424:245-52.
19. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 2013;22:399-411.
20. Bakić M. Patogenetski aspekti ateroskleroze. *Acta Medica Medianae* 2007;46:25-29.

21. Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circulation* 2014;114:214-26.
22. Gotto AM, Amarenco P, Assman G et al. The ILIB dyslipidemia and coronary heart disease (3rd edition). International Lipid Information Bureau NY 2003.
23. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Stone NJ, Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:720-732.
24. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J* 2021;42:2439-2454.
25. Gordon DJ, Probstfield JL, Garison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
26. Eckardstein A, Kardassis D. High Density Lipoproteins. 2015. Cham: Springer.
27. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006;58:342-74.
28. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011;17:594-603.
29. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small dense HDL - guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:144-53.
30. Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 2011;57:392-410.
31. Majkić-Singh N. Metabolizam lipida i lipoproteina. U Majkić-Singh N. Medicinska biohemija, II izdanje. Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Srbije. 2006;167-204.
32. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther* 2004;101:17-38
33. Shaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Cohn SD, Shaefer MM, Castelli WP et al. Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994;35:871-82.
34. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assman G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27.
35. Nofer JR, Kehler B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, Von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002;161:1-16.
36. Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1- induced expression of E-selectin in an *in vivo* model of acute inflammation. *Circulation* 2001;103:108-112.
37. Uhlir CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-23.
38. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 2000;41:1481-508.
39. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb* 1991;11:174-182.

40. Mueller O, Chang E, Deng D, Franz T, Jing D, Kincaid R, et al. PROCAM study: risk prediction for myocardial infarction using high-density lipoprotein (HDL) subfractionation is independent of HDL cholesterol. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:490-498.
41. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in 127 male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2181-2187.
42. Asztalos BF, Collins D, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Relation of gemfibrozil treatment and high-density lipoprotein subpopulation profile with cardiovascular events in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Metabolism* 2008;57:77-83.
43. Watanabe H, Soderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, et al. Decreased highdensity lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:897-902.
44. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1881–1888.
45. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;208:3-9.
46. Navab M, Reddy S, Van Lenten BJ, Anantharamaiah GM, Fogelman AM. Role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50:145-149.
47. Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005;178:217–230.
48. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: A surface plasmon resonance study. *Biochemistry* 2000;39:5712–5721.
49. La Marca V, Maresca B, Spagnuolo MS, Cigliano L, Dal Piaz F, Di Lorio G, et al. Lecithin-cholesterol acyltransferase in brain: Does oxidative stress influence the 24 hydroxycholesterol esterification? *Neurosci Res* 2016;105:19–27.
50. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;208:3-9.
51. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis* 2016; 251:454-459.
52. Kim DS, Burt AA, Rosenthal EA, Ranchalis JE, Eintracht JF, Hatsukami TS, et al. HDL-3 is a superior predictor of carotid artery disease in a case-control cohort of 1725 participants. *J Am Heart Assoc* 2014; 3:e000902.
53. Kingwell BA, Chapman MJ, Kontush A, Miller NE. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:445-64.
54. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res* 2013;54:2950-63.
55. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:312–8
56. Mackness M, Mackness B. Current aspects of paraoxonase-1 research. In: Komoda T, editor. *The HDL handbook*. Chapter 11. Elsevier Acad Press, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK, 2014;273-291.
57. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507.

58. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1 -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact* 2016; 259:51-62.
59. Deakin S, Moren X, James RW. Very low density lipoproteins provide a vector for a secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis* 2005;179:17-25.
60. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005;180:55-61.
61. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases, *Biochimie* 2017;132:19-27.
62. Gugliucci A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodelling ex vivo. *Clin Chim Acta* 2014;429:38-45.
63. Gaidukov L, Viji RI, Yacobson S, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. ApoE induces serum paraoxonase PON1 activity and stability similar to ApoA-I. *Biochemistry* 2010;49:532-538.
64. Aviram M. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins-paraoxonases protect against atherosclerosis and diabetes development. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:169-71.
65. Mackness M, Mackness B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:829-837.
66. Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, Caccavello R, Kimura S. Activation of paraoxonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL2 fraction and VLDL. *Clin Chim Acta* 2014;430:9-14.
67. Miljkovic M, Stefanovic A, Vekic J, Zeljkovic A, Gojkovic T, Simic-Ogrizovic S, et al. Activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL 2 and HDL 3 subclasses in renal disease. *Clin Biochem* 2018;60:52-58.
68. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2813-20.
69. Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest* 2013; 123:3815-28.
70. Katakami N, Sakamoto K, Kaneto H, Matsuhisa M, Shimizu I, Ishibashi F, et al. Combined effect of oxidative stress-related gene polymorphisms on atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379:861-865.
71. Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Common genetic variants in the myeloperoxidase and paraoxonase genes and the related cancer risk: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2012;30:287-322.
72. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 2015;439:5-13.
73. Stefanovic A, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Vekic J, Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, et al. HDL 2 particles are associated with hyperglycaemia, lower PON1 activity and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Biochem* 2010;43:1230-1235.
74. Ivanisevic J, Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Kotur-Stevuljevic J, Spasojevic-Kalimanovska V, et al. Associations of lipoprotein subclasses and oxidative stress status in pulmonary and pulmonary plus extrapulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2018;35:198-205.
75. Dullaart RP, Otvos JD, James RW. Serum paraoxonase-1 activity is more closely related to HDL particle concentration and large HDL particles than to HDL cholesterol in Type 2 diabetic and non-diabetic subjects. *Clin Biochem* 2014;47:1022-1027.
76. Passaro A, Vigna GB, Romani A, Sanz JM, Cavicchio C, Bonaccorsi G, et al. Serum distribution of paraoxonase-1 (PON-1) and lipoprotein phospholipase a2 (LP-PLA2) across lipoprotein subclasses in subjects with type 2 diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:1752940.

77. Muchová J, Andrežalová L, Oravec S, Nagyová Z, Garaiova I, Ďuracková Z. High density lipoprotein subfractions and paraoxonase 1 in children. *Acta Biochim Pol* 2016;63:555–563.
78. Murillo FE, Ponce-Ruíz N, Rojas-García AE, BernalHernández YY, Mackness M, Ponce-Gallegos J, et al. PON1 concentration and high-density lipoprotein characteristics as cardiovascular biomarkers. *Arch Med Sci Atheroscler Dis* 2019;4:e47–e54.
79. Fisher WR. The structure of the lower-density lipoproteins of human plasma: Newer concepts derived from studies with the analytical ultracentrifuge. *Ann Clin Lab Sci* 1972;2:198-208.
80. Williams PT, Vranizan KM, Krauss RM. Correlations of plasma lipoproteins with LDL subfractions by particle size in men and women. *J Lipid Res* 1992;33:765-774.
81. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:189-210.
82. Segrest JP, Jones MK, de Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001;42:1346-1367.
83. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43:1363-79.
84. Krauss R, Burke D. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. 1982; *J Lipid Res* 23:97-104.
85. Austin MA, Krauss RM. Genetic control of low-density lipoprotein subclasses. *Lancet* 1986;2:592–95.
86. Austin MA. Genetic and environmental influences on LDL subclass phenotypes. *Clin Genet* 1994;46:64-70.
87. Rizzo M, Berneis K. Should we measure routinely the LDL peak particle size? *Int J Cardiol* 2006;107:166-170.
88. Rizvi AA, Stoian AP, Janez A, Rizzo M. Lipoproteins and Cardiovascular Disease: An Update on the Clinical Significance of Atherogenic Small, Dense LDL and New Therapeutical Options. *Biomedicines* 2021; 9:1579.
89. Teng B, Sniderman AD, Krauss RM, Kwiterovich PO, Milne RW, Marcel YL. Modulation of apolipoprotein B antigenic determinants in human low density lipoprotein subclasses. *J Biol Chem* 1985;260:5067-5072.
90. Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen TD, et al. Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein LDL is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem* 1994;7:511-519.
91. Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res* 1998;39:1263-1273.
92. Nordestgaard BG, Zilversmit DB. Comparison of arterial intimal clearances of LDL from diabetic and nondiabetic cholesterol-fed rabbits. Differences in intimal clearance explained by size differences. *Arteriosclerosis* 1989;9:176-183.
93. De Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991;11:298-306.
94. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, Berneis K, Griffin B, Zambon A, et al. “European panel on low density lipoprotein (LDL) subclasses”: A statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses. *Curr Vasc Pharmacol* 2011;9:533-571.
95. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y, Nakajima K, White CC, et al. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: Results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem* 2010;56:967-976.

96. Ikezaki H, Lim E, Cupples LA, Liu C, Asztalos BF, Schaefer EJ. Small dense low-density lipoprotein cholesterol is the most atherogenic lipoprotein parameter in the prospective Framingham Offspring Study. *J Am Heart Assoc* 2021;10, e019140.
97. Duran EK, Aday A, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Pradhan AD. Triglyceride-rich lipoprotein cholesterol, small dense LDL cholesterol, and incident cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2020;75: 2122-2135.
98. Liou L, Kaptoge S. Association of small, dense LDL-cholesterol concentration and lipoprotein particle characteristics with coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15, e0241993.
99. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: A report of the american college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines. *Circulation* 2019;140, e596–e646.
100. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2020;41:111-188.
101. Nilsson J, Nordin Fredricson G, Schiopu A, Shah PK, Jansson B, Carlsson R. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2007;13:1021-1030.
102. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol* 2010;610:403-417.
103. Grundy SM. Oxidized LDL and atherogenesis: relation to risk factors for coronary heart disease. *Clin Cardiol* 1993;16:13-5.
104. Chisolm GM, Chai YC. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1697-1707.
105. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695.
106. Farahi L, Sinha SK, Lusis AJ. Roles of macrophages in atherogenesis. *Front Pharmacol* 2021;12:785220.
107. Pawlinski R, Wang JG, Owens AP, Williams J, Antoniak S, Tencati M, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 2010;116:806-814.
108. Owens AP 3rd, Mackman N. Sources of tissue factor that contribute to thrombosis after rupture of an atherosclerotic plaque. *Thromb Res*. 2012;129 (Suppl 2): S30–S33.
109. Owens AP 3rd, Passam FH, Antoniak S, Marshall SM, McDaniel AL, Rudel L, et al. Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *J Clin Invest* 2012;122:558-568.
110. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/ EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood* 2002;99:199-206.
111. Meisel SR, Xu XP, Edgington TS, Cercek B, Ong J, Kaul S, et al. Dose-dependent modulation of tissue factor protein and procoagulant activity in human monocyte-derived macrophages by oxidized low density lipoprotein. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:596-603.
112. Leibundgut G, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidation-specific epitopes and immunological responses: Translational biotheranostic implications for atherosclerosis. *Curr Opin Pharm* 2013;13:168-179.
113. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 2014;114:1743-1756.
114. Kacharava AG, Tertov VV, Orekhov AN. Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. *Ann Med* 1993;25:551-555.

115. Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: Epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva Cardioangiol* 2007;55:821-837.
116. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res* 2006;47:1975-1983.
117. Hammad SM, Twal WO, Barth JL, Smith KJ, Saad AF, Virella G, et al. Oxidized LDL immune complexes and oxidized LDL differentially affect the expression of genes involved with inflammation and survival in human U937 monocytic cells. *Atherosclerosis* 2009;202:394-404.
118. Griffith RL, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 1988;168:1041-59.
119. Svensjo E, Boschcov P, Ketelhuth DF, Jancar S, Gidlund M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. *Inflamm Res* 2003;52:215-20.
120. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; doi.org/10.1155/2014/360438.
121. Milicevic NP, Lui-Bush CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as targets of immunity and the implications for atherosclerosis. *Adv Immunol* 2016;131:1-59.
122. Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1372-37.
123. Van Dijk RA, Kolodgie F, Ravandi A, Leibundgut G, Hu PP, Prasad A, et al. Differential expression of oxidation-specific epitopes and apolipoprotein(a) in progressing and ruptured human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *J Lipid Res* 2012;53:2773-90.
124. Tsimikas S, Palinski W, Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:95-100.
125. Cyrus T, Pratico D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, et al. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103: 2277-82.
126. Moohebati M, Kabirirad V, Ghayour-Mobarhan M, Esmaily H, Tavallaie S, Akhavan Rezayat A et al. Investigation of serum oxidized low-density lipoprotein IgG levels in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Int J Vasc Med* 2014; 2014: 845960.
127. Lopes-Virella MF, Virella G. Pathogenic role of modified LDL antibodies and immune complexes in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2013;20:743-54.
128. Mironova M, Virella G, Lopes-Virella MF. Isolation and characterization of human autoantibodies to oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:222-229.
129. Kamath AV, Williams SP, Bullens S, Cowan KJ, Stenberg Y, Cherry SR, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of a human monoclonal antibody to oxidized LDL in cynomolgus monkey using PET imaging. *PloS One* 2012; 7: e45116.
130. Nilsson J, Nordin Fredrikson G, Schiopu A, Shah PK, Jansson B, Carlsson R. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2007;13:1021-1030.
131. Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB, Rubin SM, et al. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1444-1448.

132. Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005; 112:651-657.
133. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
134. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
135. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008; 28:1-13.
136. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation* 2002;105:2019-2023.
137. Riedel M, Lafitte M, Pucheu Y, Latry K, Couffinhal T. Prognostic value of high-sensitivity C-reactive protein in a population of post-acute coronary syndrome patients receiving optimal medical treatment. *Eur J Prev Cardiol* 2012;19:1128-1137.
138. Cristell N, Cianflone D, Durante A, Ammirati E, Vanuzzo D, Banfi M, et al. High-sensitivity C-reactive protein is within normal levels at the very onset of first ST-segment elevation acute myocardial infarction in 41% of cases. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58:2654–2661.
139. Satoh K, Shimokawa H. High-sensitivity C-reactive protein: still need for next-generation biomarkers for remote future cardiovascular events. *Eur Heart* 2014;35:1776-1778.
140. Fornai F, Carrizzo A, Forte M, Ambrosio M, Damato A, Ferrucci M, et al. The inflammatory protein pentraxin 3 in cardiovascular disease. *Immun Ageing* 2016;13:25.
141. Peri G, Introna M, Corradi D, Lacuitti G, Signorini S, Avanzini F, et al. PTX 3, a prototypical long pentraxin is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 2000;102:636-641.
142. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* 2010;11:328-334.
143. Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, et al. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS One* 2014;9:e100045. doi:10.1371/journal.pone.0100045.
144. Napoleone E, di Santo A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, Donati MB, et al. The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J Leukoc Biol* 2004; 76:203-9.
145. Norata GD, Marchesi P, Pirillo A, Uboldi P, Chiesa G, Maina V, et al. Long pentaxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:925-931.
146. Liu W, Jiang J, Yan D, Li D, Li W, Ma Y, et al. Pentraxin 3 promotes oxLDL uptake and inhibits cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells. *Exp Mol Pathol* 2014;96:292-299.
147. Tomandlova M, Jarkovsky J, Tomandl J, Kubkova L, Kala P, Littnerova S, et al. Prognostic value of pentraxin-3 level in patients with STEMI and its relationship with heart failure and markers of oxidative stress. *Disease Markers* 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/159051>.
148. Kimura S, Inagaki H, Haraguchi G, Sugiyama T, Miyazaki T, Hatano Y, et al. Relationships of elevated systemic pentraxin-3 levels with high-risk coronary plaque components and impaired myocardial perfusion after percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation acute myocardial infarction. *Circ J* 2014; 78:159-169.
149. Haybar H, Parsa SA, Khaheshi I, Zayeri ZD. Pentaxin level is the key to determine primary percutaneous coronary intervention (PCI) or fibrinolysis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2018; doi:10.2174/1871529X19666181120161.

150. Minelli S, Minelli P, Montinari MR. Reflections on Atherosclerosis: Lesson from the past and future research directions. *J Multidiscip Healthc* 2020;13:621.
151. Li L, Liu S, Tan J, Wei L, Wu D, Gao S, et al. Recent advance in treatment of atherosclerosis: key targets and plaque-positioned delivery strategies. *J Tissue Eng* 2022;13: 20417314221088508.
152. Pirillo A, Bonacina F, Norata GD, Catapano AL. The interplay of lipids, lipoproteins, and immunity in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2018;20:1-9.
153. Yadav M, Palmerini T, Caixeta A, Madhavan MV, Sanidas E, Kirtane AJ, et al. Prediction of coronary risk by SYNTAX and derived scores: synergy between percutaneous coronary intervention with taxus and cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1219-1230.
154. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, et al. ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J* 2018;39:3021-3104.
155. Algina J, Olejnik S. Conducting power analyses for ANOVA and ANCOVA in between-subjects designs. *Evaluation & the Health Professions* 2003;26:288-314.
156. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310:2191-2194.
157. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
158. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurements of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.
159. Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, Lowe WF, Blanche PJ, Krauss RM. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res* 1992;33:1876-1881.
160. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins, *J Lipid Res* 2004;45:773-775.
161. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:29-35.
162. Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. Enzymatic assessment paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: A practical zymogram method to assess HDL function. *Clin Chim Acta* 2013;415:162-168.
163. Bundy JD, Li C, Stuchlik P, Bu X, Kelly TN, Mills KT, et al. Systolic blood pressure reduction and risk of cardiovascular disease and mortality: a systematic review and network meta-analysis. *JAMA Cardiol* 2017;2:775-781.
164. Amar J, Chamontin B. Cardiovascular risk factors, atherosclerosis and pulse pressure. *Adv Cardiol* 2007;44:212-222.
165. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013;93:359-404.
166. Sahakyan KR, Somers VK, Rodriguez-Escudero JP, Hodge DO, Carter RE, Sochor O, et al. Normal-weight central obesity: implications for total and cardiovascular mortality. *Ann Intern Med* 2015;163:827-835.
167. Cheng C, Sun JY, Zhou Y, Xie QY, Wang LY, Kong XQ, et al. High waist circumference is a risk factor for hypertension in normal-weight or overweight individuals with normal metabolic profiles. *J Clin Hypertens* 2022;24:908-917.
168. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124:11-20.

169. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, Masaki K, Chen R, Sharp DS, et al. A prospective study of HDL-C and cholesteryl ester transfer protein gene mutations and the risk of coronary heart disease in the elderly. *J Lipid Res* 2004;45:948-953.
170. Libby P, Aikawa M. Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability. *Clin Cardiol* 2003;26:1-14.
171. Aikawa M, Sugiyama S, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, Hill CC, et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;106:1390-1396.
172. Rosenson RS. Myocardial injury: The acute phase response and lipoprotein metabolism. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:933-940.
173. Arnold N, Lechner K, Waldeyer C, Shapiro MD, Koenig W. Inflammation and cardiovascular disease: The future. *Eur Cardiol* 2021;16:e20.
174. Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol* 2003;163:269-275.
175. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front Immunol* 2018;9:430.
176. Soeki T, Niki T, Kusunose K, Bando S, Hirata Y, Tomita N, et al. Elevated concentrations of pentraxin 3 are associated with coronary plaque vulnerability. *J Cardiol* 2011;58:151-157.
177. Nebuloni M, Pasqualini F, Zerbi F, Lauri E, Mantovani A, Vago L, et al. PTX3 expression in the heart tissues of patients with myocardial infarction and infectious myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:27-35.
178. Maugeri N, Rovere-Querini P, Slavich M, Coppi G, Doni A, Bottazzi B, et al., Early and transient release of leukocyte pentraxin 3 during acute myocardial infarction. *J Immunol* 2011;187:970-979.
179. Norata GD, Marchesi P, Pulakazhi Venu VK, Pasqualini F, Anselmo A, Moalli F, et al. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2009;120:699-708.
180. Salio M, Chimenti S, Angelis N, Molla F, Maina V, Nebuloni M, et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:1055-1064.
181. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U, Schwaeble WJ, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* 2003;33:465-473.
182. Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T, Hasegawa G, et al. Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions. *J Pathol* 2008;215:48-55.
183. Kimura S, Sugiyama T, Hishikari K, Nakagama S, Nakamura S, Misawa T, et al. Relationship of systemic pentraxin-3 values with coronary plaque components on optical coherence tomography and post-percutaneous coronary intervention outcomes in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2020;292:127-135.
184. Rossi GP, Cesari M, De Toni R, Zanchetta M, Maiolino G, Pedon L, et al. Antibodies to oxidized low-density lipoproteins and angiographically assessed coronary artery disease in white patients. *Circulation* 2003;108:2467-2472.
185. Virella G, Virella I, Leman RB, Pryor MB, Lopes Virella MF. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res* 1993;23:95-101.
186. Inoue T, Yaguchi I, Uchida T, Kamishirado H, Nakahara S, Hayashi T, et al. Clinical significance of the antibody against oxidized low-density lipoprotein in acute myocardial infarction. *Cardiology* 2002;98:13-17.
187. Laczik R, Szodoray P, Veres K, Szomják E, Csípo I, Sipka S. et al. Assessment of IgG antibodies to oxidized LDL in patients with acute coronary syndrome. *Lupus* 2011;20:730-735.

188. Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, Belik E, Karetnikova V, Shilov A, et al. Multivessel coronary artery disease, free fatty acids, oxidized LDL and its antibody in myocardial infarction. *Lipids Health Dis* 2014;13:111.
189. Lopes-Virella MF, Virella G. The role of immune and inflammatory processes in the development of macrovascular disease in diabetes. *Front Biosci* 2003; 8:750-768.
190. Virella G, Lopes-Virella MF: Lipoprotein autoantibodies: measurement and significance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:499-505.
191. Niculescu F, Rus H. The role of complement activation in atherosclerosis. *Immunol Res* 2004;30:73-80.
192. Oksjoki R, Kovanen PT, Pentikainen MO. Role of complement activation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:477-482.
193. Rhoads JP, Lukens JR, Wilhelm AJ, Moore JL, Fernandez YM, Kanneganti TD, et al. Oxidized low-density lipoprotein immune complex priming of the Nlrp3 inflammasome involves TLR and FcγR cooperation and is dependent on CARD9. *J Immunol* 2017;198:2105-2114.
194. Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci* 2019;20(13):3328.
195. Shaw PX, Horkko S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W, Silverman GJ, et al. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1333-1339.
196. Rached F, Lhomme M, Camont L, Gomes F, Dauteuille C, Robillard P, et al. Defective functionality of small dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:1254-1261.
197. Soran H, Hama S, Yadav R, Durrington PN. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:353-366.
198. Feingold KR, Grunfeld C. Effect of inflammation on HDL structure and function. *Curr Opin Lipidol* 2016;27:521-530.
199. Rosenson RS. Clinical role of LDL and HDL subclasses and apolipoprotein measurement. *ACC Cur J Rev* 2004;13:33-37.
200. Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Transl Res* 2009;153:217-223.
201. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Topic A, Bogavac-Stanojevic N, et al. Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clin Exp Med* 2008; 8: 109-116.
202. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010;210:548-554.
203. Alabakovska SB, Labudovic DD, Tosheska KN, Todorova BB. Low density lipoprotein particle size phenotyping in healthy persons and patients with myocardial infarction. *Croat Med J* 2002;43:290-295.
204. Pascot A, Lemieux I, Bergeron J, Tremblay A, Nadeau A, Prud'homme D, et al. HDL particle size: a marker of the gender difference in the metabolic risk profile. *Atherosclerosis* 2002;160:399-406.
205. Schiopu A, Bengtsson J, Söderberg I, Janciauskiene S, Lindgren S, Ares MS, et al. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:2047-2052.
206. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Kalimanovska-Spasojevic V, Stanojevic-Bogavac N, et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007;40:181-187.

207. Shao B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:490-501.
208. Carnuta MG, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M, et al. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep* 2017;7:7295.
209. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin* 2017; 8:66-77.
210. Dullaart RP, Annema W, Tio RA, Tietge UJ. The HDL anti-inflammatory function is impaired in myocardial infarction and may predict new cardiac events independent of HDL cholesterol. *Clin Chim Acta* 2014;433:34-38.
211. Annema W, Willemsen HM, de Boer JF, Dikkers A, Van der Git M, Nieuwland W, et al. HDL function is impaired in acute myocardial infarction independent of plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Lipidol* 2016;10:1318-1328.
212. Tan Y, Liu TR, Hu SW, Tian D, Li C, Zhong JK, et al. Acute coronary syndrome remodels the protein cargo and functions of high-density lipoprotein subfractions. *PLoS One* 2014;9:e94264.
213. Bounafaa A, Berrougui H, Ikhlef S, Essamadi A, Nasser B, Bennis A, et al. Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients. *Clin Biochem* 2014;47:318-325.
214. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 2015;241:192-198.
215. Meisinger C, Freuer D, Bub A, Linseisen J. Association between inflammatory markers and serum paraoxonase and arylesterase activities in the general population: A cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 2021;20:81.
216. Bains Y, Caccavello R, Kotani K, Gugliucci A. Paraoxonase 1, HDL subclasses and post surgery acute inflammation: A pilot study. *Antioxidants* 2019;8:192.
217. Perovic Blagojevic IM, Vekic JZ, Macut DP, Ignjatovic SD, Miljkovic Trailovic MM, Zeljkovic AR, et al. Overweight and obesity in polycystic ovary syndrome: association with inflammation, oxidative stress and dyslipidaemia. *Br J Nutr* 2022;128:604-612.
218. Sage A, Tsiantoulas D, Binder C, Mallat Z. The role of B cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2019;16:180-196.
219. Ravandi A, Boekholdt SM, Mallat Z, Talmud PJ, Kastelein JJ, Wareham NJ, et al. Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: Results from the EPIC-Norfolk Study. *J Lipid Res* 2011;52:1829-1836.
220. Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ, Miller ER, Witztum JL, McConnell JP, et al. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res* 2007;48:425-433.
221. Iseme RA, McEvoy M, Kelly B, Agnew L, Walker FR, Handley T, et al. A role for autoantibodies in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2017;113:1102-1112.
222. Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, Morice MC, Colombo A, Dawkins K, et al. The SYNTAX Score: An angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention* 2005;1:219-227.
223. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI), Wijns W, Kolh P, Danchin N, Di Mario C, et al. Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2010;31:2501-55.

Biografija autora

Saška Đekić je rođena 30. jula 1979. godine u Knjaževcu, Srbija. Na Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 1998/1999. godine, a diplomirala je na smeru diplomirani farmaceut septembra 2004. godine, sa prosečnom ocenom 8,97.

Po završetku studija, jednogodišnji pripravnički staž obavila je u apoteci „Eskulap“ u Knjaževcu, nakon čega je 2005. godine položila stručni ispit. Do 1. februara 2006. godine radila je u apoteci „Eskulap“ u Knjaževcu, a nakon toga se zaposlila u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku, JZU Dom zdravlja Doboj, gde je stekla višegodišnje radno iskustvo, a gde i danas radi kao rukovodilac odjela.

Zdravstvene specijalističke studije iz oblasti Medicinska biohemija upisala je školske 2007/2008. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Banjaluci, a specijalistički ispit sa temom “Laboratorijska dijagnostika bolesti pankreasa” položila je 2011. godine sa odličnom ocenom. Poslediplomske doktorske studije na modulu Medicinska biohemija, upisala je školske 2016/2017. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Ima 4 naučna rada objavljena u celosti u međunarodnim časopisima. Od toga jedan je sa M21 liste, jedan sa M22 liste i dva rada su sa M23 liste. U radovima sa M21 i M22 liste je prvi autor. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu imala je 8 saopštenja.

Publikovani radovi koji čine sastavni deo doktorske teze

1. **Djekic S**, Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Kafedzic S, Zdravkovic M, Ilic I, Hinic S, Cerovic M, Stefanovic M, Kotur-Stevuljevic J, Vukasinovic A, Ivanisevic J, Memon L, Vukovic-Dejanovic V, Neskovic AN, Bogavac-Stanojevic N. Investigation of IgG anti-oxLDL antibody levels and HDL and LDL subclasses in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Arch Med Sci* 2021; DOI: 10.5114/aoms/135779. (IF₂₀₂₁ = 3,71; rang časopisa M22 (63/172) u kategoriji *Medicine, General & Internal*)
2. **Djekic S**, Vekic J, Zeljkovic A, Kotur-Stevuljevic J, Kafedzic S, Zdravkovic M, Ilic I, Hinic S, Cerovic M, Stefanovic M, Mihajlovic M, Neskovic A, Bogavac-Stanojevic N. HDL subclasses and the distribution of paraoxonase-1 activity in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci* 2023; 24(11):9384; DOI: 10.3390/ijms24119384. (IF₂₀₂₂ = 5,60; rang časopisa M21 (66/285) u kategoriji *Biochemistry and Molecular Biology*)

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сашка Ђекић

Број индекса 34/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Значај одређивања аутоантитела *IgG* класе на оксидовани *LDL*, *LDL* и *HDL* субфракција и параоксоназе 1 код болесника са акутним инфарктом миокарда са елевацијом *ST* сегмента и стабилном ангином пекторис“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

образац изјаве о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Сашка Ђекић**

Број индекса **34/2016**

Студијски програм **медицинска биохемија**

Наслов рада **„Значај одређивања аутоантитела IgG класе на оксидовани LDL, LDL и HDL субфракција и параоксоназе 1 код болесника са акутним инфарктом миокарда са елевацијом ST сегмента и стабилном ангином пекторис“**

Ментори **проф. др Наташа Богавац-Станојевић**

проф. др Александар Н. Нешковић

доц. др Марија Здравковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истовестна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Значај одређивања аутоантитела *IgG* класе на оксидовани *LDL*, *LDL* и *HDL* субфракција и параоксоназе 1 код болесника са акутним инфарктом миокарда са елевацијом *ST* сегмента и стабилном ангином пекторис“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.