

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Sandra S. Vladimirov

**ISPITIVANJE BIOMARKERA
HOMEOSTAZE HOLESTEROLA I
METABOLIZMA VITAMINA D KOD
PACIJENATA SA KOLOREKTALNIM
KARCINOMOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Sandra S. Vladimirov

**ASSESSMENT OF BIOMARKERS OF
CHOLESTEROL HOMEOSTASIS AND
VITAMIN D METABOLISM IN PATIENTS
WITH COLORECTAL CANCER**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Aleksandra Zeljković, mentor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Bratislav Trifunović
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije,
Univerzitet odbrane u Beogradu

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Vesne Spasojević-Kalimanovske i prof. dr Aleksandre Zeljković. Uzorci su sakupljeni na Klinici za opštu hirurgiju, Vojnomedicinske Akademije. U toku izrade i pisanja doktorske disertacije imala sam veliku podršku i pomoć i zato se iskreno zahvaljujem:

Mentorima, prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj i prof. dr Aleksandri Zeljković na ukazanom poverenju i velikoj podršci, znanju i motivaciji koje su mi pružile ne samo u izradi i pisanju ove doktorske disertacije, već i u mom celokupnom dosadašnjem profesionalnom usavršavanju, a posebno na velikom strpljenju i kreativnim rešenjima za sve nedoumice i pitanja;

Prof. emertiusu dr Zorani Jelić-Ivanović na ukazanom poverenju, pruženom znanju, podršci i razumevanju;

Prof. dr Bratislavu Trifunoviću na ostvarenoj saradnji i zalaganju za odabir ispitivanih pacijenata kao i na stručnim savetima, ljubaznosti i razumevanju pri izradi ove doktorske disertacije;

Prof. dr Slavici Spasić na svemu što sam od nje naučila o statistici, validaciji metoda i naučnom radu;

Prof dr Jeleni Kotur-Stevuljević i prof dr Nataši Bogavac-Stanojević na uvek korisnim, kreativnim i inspirativnim odgovorima na moja pitanja;

Prof dr Aleksandri Stefanović, prof dr Jeleni Vekić i prof dr Ani Ninić na svakom stručnom savetu, saradnji, kolegijalnom odnosu i razumevanju;

Dr Dejanu Zeljkoviću na divnoj saradnji, entuzijazmu i posvećenosti prilikom odabira pacijenata i sakupljanja uzoraka, kao i stručnim savetima;

Prof dr Bojanu Markoviću i kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, uz koje sam naučila osnove rada na LC-MS, na stručnim savetima i pomoći prilikom savladavanja ove tehnike.

Posebnu zahvalnost dugujem Milici, Jeleni, Mironu i Jasmini na divnom druženju, bezrezervnom razumevanju i podršci! Hvala i mlađim kolegama Mariji, Tamari, Sanji Vujčić i Sanji Erceg na saradnji i razumevanju, kao i tehničarima Marini i Vesni, koje su uvek rado pomagale i olakšavale svakodnevni rad u laboratoriji.

Neizmerno sam zahvalna kolegici Tamari Gojković na pomoći i znanju koje mi je prenela tokom rada u laboratoriji, timskom duhu i kreativnim razmenama ideja, bezrezervnoj podršci i motivaciji, optimizmu i divnom druženju.

Svojim prijateljima se posebno zahvaljujem jer su imali mnogo razumevanja i pružali mi veliku podršku.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju, podršci i inspiraciji!

Izvod

Kolorektalni karcinom (CRC) je maligno oboljenje sa visokom prevalencijom u razvijenim zemljama. Holesterol poseduje mnogobrojne funkcije, te se pretpostavlja da ima ulogu i u procesima maligne transformacije i proliferacije. Procena efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije holesterola, određivanjem cirkulišućih nivoa neholesterolskih sterola (NHS), može pružiti značajne podatke o metabolizmu holesterola, kao i njegovom uticaju na status drugih biomolekula (vitamin D, steroidni hormoni). Ciljevi ovog istraživanja bili su uvođenje i validacija metoda tačne hromatografije sa tandem masenom detekcijom (HPLC-MS/MS) za kvantifikaciju markera sinteze (dezmosterol i latosterol) i apsorpcije holesterola (kampesterol, β -sitosterol) u serumu i izolovanoj serumskoj frakciji lipoproteina visoke gustine (HDL), kao i razvoj i validacija metode za kvantifikaciju prekursora (7-dehidroholesterol, 7-DHC) i metabolita vitamina D (25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃) u serumu. Osim toga, ispitali smo i status markera sinteze i apsorpcije holesterola, kao i metabolizma vitamina D kod osoba sa CRC, i nastojali da utvrdimo povezanost između metabolizma ovih jedinjenja, kao i da procenimo njihov prediktivni potencijal za CRC.

U istraživanju je učestvovao 101 pacijent sa dijagnozom CRC i 114 zdravih ispitanika. Pacijenti su podeljeni prema patološkim karakteristikama na sledeće grupe: karcinom kolona (CA kolona) i karcinom rektuma (CA rektuma); gradus I i objedinjeni gradusi II i III; stadijumi A i B, te stadijumi C i D. Koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji, kao i koncentracije parametara statusa vitamina D u serumu, određivani su HPLC-MS/MS metodama. Na osnovu koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji, izračunati su različiti indeksi homeostaze holesterola, dok je odnos metabolita vitamina D (VDMR) izračunat na osnovu koncentracija 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ u serumu.

Rezultati studije su pokazali da je holesterol glavni interferent prilikom određivanja NHS, pa je u tom smislu izvršena priprema odgovarajućeg matriksa za kvantitativnu analizu. Varijacije unutar serije su bile 4.7-10.3% za NHS u serumu i 3.6-13.6% za NHS u HDL frakciji, a između serija 4.6-9.5% za NHS u serumu i 2.5-9.8% za NHS u HDL frakciji. Studije prinosa analita su pokazale zadovoljavajuće rezultate: 89.8-113.1% za NHS u serumu i 85.3-95.8% za NHS i HDL frakciji. Pacijenti su imali značajno niže koncentracije NHS u serumu ($p < 0,001$, za sve) i u HDL frakciji ($p < 0,001$ za dezmosterol i β -sitosterol, $p < 0,005$ za kampesterol, $p < 0,05$ za latosterol). Kod pacijenata sa CRC uočen

je snižen odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu ($p < 0,05$). Udeo svakog NHS u HDL frakciji u odnosu na ukupne koncentracije pojedinačnih HNS u serumu bio je povišen kod pacijenata. Odnos koncentracija markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu bio je viši kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma ($p < 0,05$). Kod pacijenata sa gradusom I CRC odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u HDL frakciji je bio povišen ($p < 0,05$). Kod pacijenata sa stadijumom A i B bolesti, koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji bile su niže u odnosu na ostale stadijume ($p < 0,05$). Snižene koncentracije dezmosterola (OR:0,608; CI: 0,427-0,864; $p < 0,01$), kao i snižene koncentracije kampesterola u serumu (OR:0,695; CI: 0,573-0,843; $p < 0,005$), su nezavisni prediktori prisustva CRC i pokazuju veoma dobru dijagnostičku tačnost za identifikaciju prisustva CRC. Koncentracije 7-DHC, 25(OH)D3 ($p < 0,005$, za oba) i vrednost VDMR ($p < 0,01$) su niži kod pacijenata sa CRC. Koncentracije 7-DHC su bile više ($p < 0,05$) kod pacijenata sa CA kolona ($p < 0,05$). Pacijenti sa gradusom I imali su više koncentracije 25(OH)D3 u odnosu na pacijente sa ostalim gradusima ($p < 0,05$), a 25(OH)D3 je identifikovan kao nezavisni prediktor CRC visokog gradusa (OR: 0,898; CI: 0,823-0,979; $p < 0,05$). Kod pacijenata sa CRC, koncentracije ukupnog holesterola i markera apsorpcije holesterola u serumu su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3. Utvrđeno je da je 25(OH)D3 značajan prediktor CRC, ali se ovaj značaj gubi nakon uključivanja ukupnog holesterola u prediktivni model.

Dobijeni rezultati ukazuju na promene efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije holesterola kod pacijenata sa CRC, te sledstveno narušavanje homeostaze holesterola, kao i posledične promene metabolizma vitamina D. Dalja istraživanja ovih poremećaja mogla bi da omoguće uvođenje dodatnih farmakoloških i nefarmakoloških preventivnih i terapijskih mera kod ovih pacijenata.

Ključne reči: kolorektalni karcinom; neholesterolski steroli u serumu i HDL frakciji; promene nivoa sinteze i apsorpcije holesterola; metaboliti vitamina D; nezavisni prediktori kolorektalnog karcinoma.

Naučna oblast: Medicinske nauke - Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.161.2:[616-006.6:616.348/.351(043.3)]

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a malignancy highly prevalent in developed countries. Cholesterol is a biomolecule with multiple functions and suspected important role in malignant transformation and proliferation. Assessing the efficiency of cholesterol synthesis and absorption processes, by determining circulating levels of non-cholesterol sterols (NCS), can provide significant data on cholesterol metabolism as well as its effect on other biomolecules (vitamin D, steroid hormones). The objectives of this study were to introduce and validate liquid chromatography - tandem mass detection (HPLC-MS/MS) methods for quantification of cholesterol synthesis (desmosterol and lathosterol) and cholesterol absorption (campesterol, β -sitosterol) markers in serum and serum high density lipoprotein fraction (HDL), as well as the method for quantification of vitamin D status parameters (7-dehydrocholesterol (7-DHC), 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃). In addition, we examined the status of cholesterol synthesis and absorption markers, as well as vitamin D metabolites in individuals with CRC, and explored the association between these two metabolic pathways, as well as evaluated their predictive potential for CRC.

The study involved 101 patients with CRC diagnosis and 114 healthy subjects. Patients were divided according to pathological characteristics into the following groups: colon cancer (colon CA) and rectal cancer (rectal CA); grade I, and grade II and III combined; stages A and B and stages C and D. NCS concentrations in serum and HDL fraction, as well as concentrations of serum vitamin D status parameters, were determined by HPLC-MS/MS. Based on NCS concentrations in serum and HDL fraction, different cholesterol homeostasis indices were calculated. Vitamin D metabolite ratio (VDMR) was calculated based on serum 25(OH)D₃ and 24,25(OH)₂D₃ concentrations.

The study results showed that cholesterol was the main interferent in the determination of NCS, and in this respect, the appropriate matrix for quantitative analysis was prepared. Within-series variations were 4.7-10.3% for serum NHS and 3.6-13.6% for NCS in HDL fraction, whereas between series variations were 4.6-9.5% for serum NHS and 2.5-9.8% for NCS in HDL fraction. Recovery study has shown satisfactory results: 89.8–113.1% for serum NCS and 85.3–95.8% for NHS and HDL fraction.

Patients had significantly lower NCS concentrations ($p < 0.001$, for all) in serum and in the HDL fraction ($p < 0.001$ for desmosterol and β -sitosterol, $p < 0.005$ for campesterol, $p < 0.05$ for lathosterol). An decreased serum desmosterol-to-lathosterol concentration ratio

($p < 0.05$) was observed in CRC. The proportion of each NCS in the HDL fraction relative to the total serum concentrations of individual NCS was increased in patients with CRC. The cholesterol synthesis-to-absorption markers ratio was higher in patients with CA colon compared to patients with CA rectum ($p < 0.05$). In HDL fraction, desmosterol-to-lathosterol ratio was higher ($p < 0.05$), in patients with grade I CRC. Concentrations of absorption markers in HDL fraction were lower in patients with stage A and B ($p < 0.05$). Reduced serum concentrations of desmosterol (OR: 0.608; CI: 0.427-0.864, $p < 0.01$), as well as reduced serum campesterol concentrations (OR: 0.695; CI: 0.573-0.843, $p < 0.005$), were detected as independent predictors of CRC and these parameters exhibited very good diagnostic accuracy for CRC. The concentrations of 7-DHC, 25(OH)D₃ ($p < 0.005$, for both), VDMR ($p < 0.01$) were lower in patients with CRC. 7-DHC concentrations were higher ($p < 0.05$) in patients with CA colon ($p < 0.05$). Patients with grade I CRC had a higher concentration of 25(OH)D₃ than patients with other grades ($p < 0.05$). 25(OH)D₃ was identified as an independent predictor of high-grade CRC (OR: 0.898; CI: 0.823-0.979; $p < 0.05$). Total cholesterol and serum cholesterol absorption markers correlated positively with 25(OH)D₃ and 24,25(OH)₂D₃ concentrations in CRC patients. 25(OH)D₃ concentration was revealed as significant predictor for CRC, but this significance was lost after the addition of total cholesterol in the prediction model.

The results obtained in this study indicate that in patients with CRC changes in cholesterol synthesis and absorption result in impairment of not only cholesterol homeostasis, but changes in vitamin D metabolism as well. Further investigation of these disorders could allow the introduction of additional pharmacological and non-pharmacological preventive and therapeutic measures in these patients.

Key words: colorectal cancer; non-cholesterol sterols in serum and HDL fraction; changes in cholesterol synthesis and absorption; vitamin D metabolites; independent predictors of colorectal cancer

Scientific field: Medical sciences - Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC N°: 577.161.2:[616-006.6:616.348/.351(043.3)]

Lista skraćenica:

1,25(OH) ₂ D	kalcitriol; 1,25-dihidroksivitamin D	<i>engl. 25-hydroxyvitamin D</i>
25(OH)D	kacidiol; 25-hidroksi vitamin D	<i>engl. 1,25-dihydroxyvitamin D</i>
27OHC	27-hidroksiholesterol	<i>engl. 27-hydroxycholesterol</i>
7-DHC	7-dehidroholesterol	<i>engl. 7-dehydrocholesterol</i>
ABCA1	ATP-vezujući kasetni protein A1	<i>engl. ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG	ATP-vezujući kasetni protein G	<i>engl. ATP-binding cassette transporter G</i>
ACAT	acil-holesterol acil transferaza	<i>engl. acil-cholesterol acyl transferase</i>
Acetil-CoA	acetil koenzim A	<i>engl. acetyl Coenzyme A</i>
ACN	acetonitril	<i>engl. acetonitrile</i>
AJCC	Američki zajednički odbor za kancer	<i>engl. American Joint Committee on Cancer</i>
APCI	hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom	<i>engl. atmospheric pressure chemical ionization</i>
ApoB48	apolipoprotein B-48	<i>engl. apolipoprotein B-48</i>
ATP	adenozin trifosfat	<i>engl. adenosine triphosphate</i>
AUC	površina ispod ROC krive	<i>engl. area under curve</i>
BSA	albumin iz goveđeg seruma	<i>engl. bovine serum albumin</i>
CD36		<i>engl. cluster of differentiation 36</i>
CEL	pankreasna lipaza	<i>engl. carboxyl ester lipase</i>
CHL	surogat matriks - kolesterol	
CHOD-PAP		<i>engl. cholesterol oxidase/peroxidase aminophenazone</i>
CIMP	CpG island metilator fenotip	<i>engl. CpG island methylator phenotype</i>
CIN	hromozomska nestabilnost	<i>engl. chromosome instability</i>
CRC	kolorektalni karcinom	<i>engl. colorectal carcinoma</i>
CYP24A1	1 α -hidroksilaza	<i>engl. cytochrome P450 family 24</i>

CYP24A1	24-hidroksilaza	<i>subfamily A member 1 engl. cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i>
CYP27A1	sterol 27-hidroksilaza	<i>engl. cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1</i>
CYP27B1	sterol 27-hidroksilaza	<i>engl. cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1</i>
CYP27B1	sterol kalcidiol 1-monooksigenaza	<i>engl. cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1</i>
CYP2R1	25-hidroksilaza	<i>engl. cytochrome P450 family 2 subfamily member R1</i>
DHCR24	24-dehidroholesterol reduktaza	<i>engl. 24-dehydrocholesterol reductase</i>
DHCR7	7-dehidroholesterol reduktaza	<i>engl.</i>
DI		<i>engl. dual isotope ratio method</i>
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina	
ELISA	enzimski imuhoesej	<i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplazatski retikulum	<i>engl. endoplasmatic reticulum</i>
ESI	elektrosprej jonizacija	<i>engl. electrospray ionization</i>
FAP	familijarna adenomatozna polipoza	<i>engl. familial adenomatous polyposis</i>
FDA	Američka Uprava za hranu i lekove	<i>engl. Food and Drug Administration</i>
GC	gasna hromatografija	<i>engl. gas chromatography</i>
GLUT1	transporter za glukozu 1	<i>engl. glucose transporter 1</i>
GLUT3	transporter za glukozu 3	<i>engl. glucose transporter 3</i>
GPO-PAP		<i>engl. glycerol-3-Phosphate oxidase-peroxidase/ aminophenazone</i>
HDL	lipoprotein visoke gustine	<i>engl. high-density lipoprotein</i>
HDL-h	holesterol sadržan u HDL	
HIF1 α	hipoksijom-indukovan faktor α	<i>engl. hipoxia-inducible factor α</i>

HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA	<i>engl. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA</i>
HNPCC	nasledni nepolipozni kancer kolona	<i>engl. hereditary nonpolyposis colon cancer</i>
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi	<i>engl. high-performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS/MS	tečna hromatografija visoke efikasnosti spregnuta sa masenim detektorom	<i>engl. high-performance liquid chromatography with tandem mass detection</i>
IDMS	izotopska diluciona masena spektrometrija	<i>engl. isotopic dilution mass spectrometry</i>
Insig-1		<i>engl. insulin-induced gene protein 1</i>
iRNK	informaciona ribonikleinska kiselina	
IS	interni standard	
ITM	indeks telesne mase	
KG	kontrolna grupa	
KOH	kalijum hidroksid	
KVis	koeficijent varijacije između serija	
KVus	koeficijent varijacije unutar serije	
LC	tečna hromatografija	<i>engl. liquid chromatography</i>
LDHA	laktat dehidrogenaza A	
LDL	lipoproteini male gustine	<i>engl. low-density lipoprotein</i>
LDL-h	holesterol sadržan u LDL	
LDLR	LDL receptor	<i>engl. LDL receptor</i>
LOD	limit detekcije	<i>engl. limit of detection</i>
LOQ	limit kvantifikacije	<i>engl. limit of quantification</i>
LXR	jetreni X receptor	<i>engl. liver X receptor</i>
m/z	masa/naelektrisanje	
MIDA		<i>engl. mass isotopomer distribution analysis</i>
MIN	mikrosatelitska nestabilnost	<i>engl. microsatellite instability</i>

MMI		<i>engl. multi mode ionization</i>
MRM	praćenje višestrukih reakcija	<i>engl. multiple reaction monitoring</i>
MS	masena spektrometrija	<i>engl. mass spectrometry</i>
MTBE	metil-terc-butyl etar	<i>engl. methyl-tert-butyl eter</i>
MTH	surogat matriks - metanol	
mTORC 1	mTOR kompleks 1	<i>engl. mTOR complex 1</i>
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat	<i>engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFLD	bolest nealkoholne masne jetre	<i>engl. non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	nealkoholni steatohepatitis	<i>engl. non-alcoholic steatohepatitis</i>
NHS	neholesterolski steroli	
NHS _{HDL}	koncentracija NHS u HDL frakciji	
NPC1L1		<i>engl. Niemann-Pick-C1-like-1</i>
OR	odnos verovatnoće	<i>engl. odds ratio</i>
PDK1	piruvat dehidogenaza kinaza	
PIK-IS	površina pika internog standarda	
PIK-NHS	površina pika neholesterolskog sterola	
PPAR- γ		<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTFE	politetrafluoroetilen	<i>engl. polytetrafluoroethylene</i>
PTH	paratireoidni hormon	
ROC		<i>engl. receiver operating characteristic</i>
RTH	reverzni transport holesterola	
RXR	retinoidni X receptor	<i>engl. retinoid X receptor</i>
SAD	Sjedinjene Američke Države	
SCAP		<i>engl. SREBP cleavage-activating protein</i>
Sd	standardna devijacija	

SNR	odnos signala i šuma	<i>engl. signal to noise ratio</i>
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi	<i>engl. solid phase extraction</i>
SR-B1	receptor hvatača B klase, tipa 1	<i>engl. scavenger receptor B1</i>
SREBP	proteini koji se vezuju za sterol-regulatorne elemente	<i>engl. sterol regulatory element binding protein</i>
StAR		<i>engl. steroidogenic acute regulatory protein</i>
SZO	Svetska zdravstvena organizacija	
TNM	tumor-limfni čvorovi-metastaze	<i>engl. tumour-lymph nodes-metastasis</i>
UH	ukupan holesterol	
UVB	ultraljubičasto zračenje B	<i>engl. ultra violet B</i>
VDBP	vitamin D-vezujući protein	<i>engl. vitamin D binding protein</i>
VDMR	odnos metabolita vitamina D	<i>engl. vitamin D metabolite ratio</i>
VDR	vitamin D receptor	<i>engl. vitamin D receptor</i>
VDRE	regulatorni elementi odgovora na vitamin D	<i>engl. vitamin D responsive elements</i>
VEGF	vaskularni endotelijani faktor rasta	<i>engl. vascular endothelial growth factor</i>
Xsr	aritmetička srednja vrednost	

Sadržaj

1	UVOD.....	1
1.1	Kolorektalni karcinom.....	1
1.1.1	Epidemiološke karakteristike CRC.....	1
1.1.2	Klasifikacija i etiopatogeneza CRC.....	3
1.1.3	Uloga premalignih lezija.....	4
1.1.4	Patološke karakteristike CRC.....	5
1.1.5	Prognoza CRC.....	8
1.1.6	Faktori rizika i prevencija nastanka CRC.....	8
1.2	Metaboličke potrebe maligno izmenjene ćelije.....	9
1.3	Značaj lipidomike u otkrivanju biomarkera.....	12
1.4	Metabolizam holesterola i njegova uloga u organizmu.....	13
1.4.1	Sinteza holesterola.....	14
1.4.2	Apsorpcija holesterola i fitosterola.....	17
1.4.3	Metode za direktnu procenu sinteze i apsorpcije holesterola.....	20
1.4.4	Hromatografska analitika NHS u cilju procene homeostaze holesterola.....	21
1.4.5	Poremećaji koncentracije holesterola kao osnova bolesti.....	23
1.4.6	Aktivni holesterol - modulator intracelularne homeostaze holesterola.....	25
1.4.7	Homeostaza holesterola u cirkulaciji.....	26
1.4.8	Lipoproteinske čestice - medijatori procesa održavanja homeostaze holesterola.....	27
1.4.9	Uloga lipoproteinskih čestica u malignim bolestima.....	27
1.5	Struktura, hemijske osobine i metabolizam vitamina D.....	28
1.5.1	Veza između biosintetskih puteva holesterola i vitamina D.....	31
1.5.2	Mehanizam delovanja vitamina D.....	31
1.5.3	Vitamin D i maligne bolesti.....	33
2	Ciljevi istraživanja.....	36
3	Materijal i metode.....	38
3.1	Studija, ispitanici i uzorci.....	38
3.2	Metode za određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih parametara.....	40
3.3	Metode za kvantitativnu analizu NHS u serumu i HDL frakciji.....	40
3.3.1	Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa.....	40

3.3.2	Priprema uzoraka za HPLC-MS/MS analizu ukupne koncentracije NHS u serumu.....	41
3.3.3	Priprema uzoraka za analizu koncentracija NHS _{HDL} upotrebom HPLC-MS/MS.....	42
3.3.4	Instrumentalni uslovi za kvantifikaciju NHS upotrebom HPLC-MS/MS.....	42
3.3.5	Optimizacija surogat matriksa za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji.....	43
3.3.6	Validacija metode	44
3.3.7	Izračunavanje indeksa homeostaze holesterola	56
3.4	Metoda za kvantitativnu analizu metabolita vitamina D u serumu	58
3.4.1	Reagensi i aparatura.....	58
3.4.2	Priprema uzoraka	59
3.4.3	Validacija metode za određivanje koncentracija metabolita vitamina D	60
3.5	Metoda za određivanje koncentracije vitamin D vezujućeg proteina u serumu.....	63
3.6	Statistička analiza	65
4	Rezultati.....	66
4.1	Razvoj i optimizacija metode za analizu NHS u serumu i HDL frakciji.....	66
4.1.1	Rešavanje problema efekta matriksa holesterola i optimizacija standardnih krivih.....	70
4.1.2	Validacija metode	72
4.2	Razvoj i optimizacija metode za analizu statusa vitamina D u serumu.....	75
4.2.1	Validacija metode	77
4.3	Analiza markera sinteze i apsorpcije holesterola u ispitivanim populacijama.....	79
4.3.1	Ispitivanje razlika u antropometrijskim, biohemijskim i lipidnim parametrima, koncentracijama NHS u serumu i HDL frakciji i indeksima homeostaze holesterola između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC.....	79
4.3.2	Korelaciona analiza između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara i koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola kod zdravih ispitanika.....	86
4.3.3	Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na pol i ITM zdravih ispitanika.....	91
4.3.4	Korelaciona analiza između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara i koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola kod pacijenata sa CRC.....	103

4.3.5 Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji, i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na patološke karakteristike CRC.....	108
4.3.6 Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na pol i ITM pacijenata sa CRC.....	126
4.3.7 Korelaciona analiza apsolutnih i relativnih koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji kod zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC.....	138
4.4 Procena prediktivnog potencijala markera homeostaze holesterola.....	142
4.5 Analiza statusa vitamina D kod pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma i zdravih ispitanika.....	145
4.6 Ispitivanje razlika između parametara statusa vitamina D u odnosu na pol i ITM kod zdravih ispitanika.....	147
4.7 Ispitivanje razlika između parametara statusa vitamina D u odnosu na patološke karakteristike CRC, pol i ITM.....	148
4.8 Ispitivanje povezanosti između parametara metabolizma holesterola i statusa vitamina D.....	151
4.9 Procena prediktivnog potencijala markera statusa vitamina D.....	153
5 Diskusija.....	155
6 Zaključci.....	178
7 Literatura.....	181

1 UVOD

1.1 Kolorektalni karcinom

Poslednjih godina zapažen je globalni trend porasta incidencije kao i mortaliteta od nezaraznih bolesti, među kojima i onkoloških oboljenja [1]. Kao veoma heterogeno oboljenje kancer i dalje predstavlja veliki izazov kako na polju prevencije tako i lečenja.

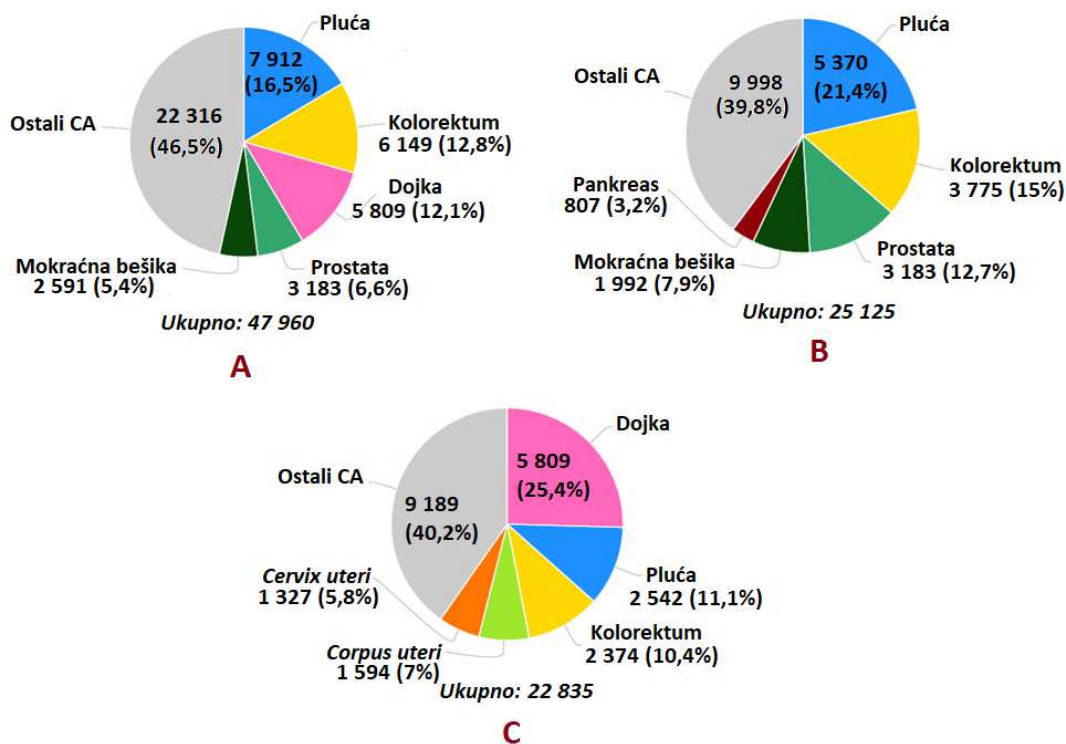
Kolorektalni karcinom (*engl. colorectal carcinoma; CRC*), kao jedan od najzastupljenijih tipova kancera u savremenom društvu, povezan je sa starijim životnim dobom, faktorima sredine i životnim navikama, te socioekonomskim statusom. Iz tog razloga, strategije za prevenciju i lečenje CRC zahtevaju primenu multidisciplinarnog pristupa [1, 2].

1.1.1 Epidemiološke karakteristike CRC

Prema aktuelnim epidemiološkim podacima tokom 2018. godine registrovano je 1,8 miliona novoobolelih od CRC, dok je 881.000 ljudi umrlo od posledica ove bolesti. CRC je treća po zastupljenosti vrsta kancera u svetu, kao i četvrti uzročnik smrtnosti među malignim bolestima [1]. Važnu epidemiološku karakteristiku CRC predstavlja uočena sprega između stope oboljevanja, smrtnosti i socioekonomskih prilika, te se sa pravom ovo oboljenje smatra jednim od markera socioekonomskog statusa [2]. Incidencija CRC podložna je značajnim varijacijama u odnosu na podneblje, pa tako stope oboljevanja korigovane za godine starosti mogu među državama varirati i do 12 puta [3]. Trenutno je incidencija oboljevanja od CRC oko 3 puta viša u ekonomski razvijenim zemljama u odnosu na nerazvijene zemlje, dok je smrtnost značajno veća u zemljama sa nižim indeksom razvijenosti [4]. Ovaj obrazac se može pripisati različitim geografskim i ekološkim faktorima, ali i sociološko-kulturološkim navikama, pre svega u ishrani i načinu života. Kada je reč o evropskom kontinentu, u centralnoj i istočnoj Evropi stopa oboljevanja od CRC je manja od stopa zabeleženih u zapadnoj, južnoj i severnoj Evropi [5]. Na globalnom nivou CRC predstavlja treći po učestalosti malignitet u muškoj, a drugi u ženskoj populaciji [4]. Takođe značajna epidemiološka karakteristika CRC je da od ove bolesti u nešto većem stepenu oboljevalju muškarci (1,1-1,6 puta), ali i da incidencija

kancera kolorektuma naglo raste sa godinama starosti [5]. Naime, u čak 90% slučajeva do pojave CRC dolazi posle 50. godine života, dok samo 4% slučajeva oboli pre 40. godine [6].

Najnoviji podaci govore da je u 2018. godini u Srbiji zabeleženo 47.960 novodijagnostikovanih slučajeva oboljevanja od svih tipova kancera dok je broj umrlih osoba iznosio 26.919. Značajan je podatak da je CRC u ovoj statistici zauzeo drugo mesto po broju novoobolelih (12.8%) kod oba pola. U Srbiji CRC je drugi po učestalosti karcinom u muškoj, a treći u ženskoj populaciji svih uzrasta [7] (slika 1). Slično kao i u svetu, u Srbiji stope oboljevanja od CRC rastu sa godinama starosti i najviše su kod muškaraca starosti između 70 i 74 godine i kod žena starijih od 75 godina. Međutim, naročito zabrinjava podatak da se u našoj zemlji uočava porast broja obolelih kod osoba mlađih od 40 godina [5].



Slika 1. Broj slučajeva i učestalost oboljevanja od kancera u 2018. godini u Srbiji, A-oba pola, B-muški pol, C-ženski pol. Preuzeto iz: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf>, pristup: 12.07.2019.

Srbija se smatra zemljom sa visokom stopom mortaliteta od CRC koja iznosi 5.2% za karcinom rektuma i 6.6% za karcinom kolona. Kod oba pola, stope mortaliteta za CRC takođe rastu sa starošću i najviše su posle 75. godine starosti [1].

1.1.2 Klasifikacija i etiopatogeneza CRC

U najvećem broju slučajeva CRC je adenokarcinom koji nastaje iz patoloških lezija u epitelnim ćelijama kolorektalne mukoze [8]. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) predlaže podelu epitelnih kancera kolona i rektuma na sledeći način [9]:

- ❖ Premaligne lezije
- ❖ Seratne lezije
- ❖ Hamartomi
- ❖ Karcinomi
- ❖ Neuroendokrine neoplazme

CRC se u većini slučajeva razvija kao posledica slučajnih mutacija, što znači da najčešće nije povezan sa poznatim naslednim mutacijama koje se obično dovode u vezu sa razvojem malignih bolesti [3]. Naime, svega 30% karcinoma kolona i rektuma se može smatrati naslednim [10]. Sa druge strane, smatra se da u osnovi nastanka ove bolesti leže pre svega progresivne akumulacije višestrukih genetskih mutacija i epigenetskih promena koje uzrokuju tranziciju normalne mukoze do benignog adenoma, displazije i naposljetku karcinoma [11]. Genetska nestabilnost se u širem smislu smatra osnovom procesa kancerogeneze kod CRC. Pojmom *genetska nestabilnost* su obuhvaćena tri glavna molekularna fenotipa [12-16]:

- mikrosatelitska nestabilnost (*engl. microsatellite instability; MIN*),
- hromozomska nestabilnost (*engl. chromosome instability; CIN*),
- CpG island metilator fenotip (*engl. CpG island methylator phenotype; CIMP*).

Mikrosatelitska nestabilnost je jedinstvena molekularna promena koju karakteriše povećana podložnost mutacijama. Najčešće je rezultat poremećaja u funkcionisanju sistema za *mismatch* reparaciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i odlikuje se prisustvom kratkih repetitivnih DNK sekvenci dužine 1-6 bp (*engl. short tandem repeats*), tzv *mikrosatelita* [12, 17].

Hromozomsku nestabilnost uzrokuje varijacija u genetskom materijalu koja se često manifestuje kao gubitak ili promena aranžmana hromozoma tokom deobe ćelije, te za posledicu ima promene u broju hromozoma ili njihovoj strukturi. Takav primer su mutacije

APC ili drugih gena koji aktiviraju *Wnt* signalni put i dovode do poremećaja na nivou hromozoma [15].

CIMP u širem smislu podrazumeva generalizovanu hipermetilaciju genoma koja rezultuje smanjenjem ekspresije tumor-supresorskih gena [14].

1.1.3 Uloga premalignih lezija

Prvi korak u kancerogenezi predstavlja razvoj specifične vrste neoplastičnih polipa u mukozi kolona. Epidemiološke, kliničke, patološke i genetičke studije su dokazale da većina kancera kolona nastaje od adenomatoznih polipa. Ovo potvrđuju i rezultati ispitivanja histopatoloških preparata kancera kolona nakon operacije, koji često sadrže jedan ili više adenoma u blizini ruba karcinoma. Takođe, činjenica je da rizik za pojavu CRC značajno raste sa pojavom većeg broja adenomatoznih polipa unutar kolona, što je dokazano na primeru pacijenata koji boluju od familijarne adenomatozne polipoze (FAP), oboljenja koje karakteriše masivno prisustvo adenomatoznih polipa u kolonu. Kada je FAP u pitanju, smatra se da primarni etiološki faktor kancerogeneze predstavlja mutacija *APC* gena na *5q* hromozomu koja dalje uzrokuje nastanak polipa, dok adenomi nastaju kada dođe do gubitka i drugog alela *APC* gena ili mutacije [18]. Termin *maligni polip* se koristi za polipe koji sadrže invazivne adenokarcinome u submukozi i studije su pokazale da je njihova prevalencija među endoskopsko uklonjenim polipima 2-5% [8]. Rizik za razvoj kancera kolona je naročito visok kada su polipi veći od 1cm (1-1,5% godišnje) [19]. Kod osoba obolelih od FAP je pojava kancera kolona neminovna u slučaju da se ne podvrgnu kolektomiji [20].

Sa druge strane, kod naslednog nepolipoznog kancera kolona (*engl. hereditary nonpolyposis colon cance; HNPCC*) javlja se znatno manje polipa, a kancer se razvija iz sesilnih polipa. I ovo oboljenje je genetski uslovljeno mutacijama *hMLH1*, *hMSH2*, i *hMSH6* gena zaduženih za *mismatch* reparaciju. Ove mutacije dovode do smanjene funkcionalnosti enzima koji učestvuju u procesu DNK reparacije, te vremenom dolazi do akumulacije mutacija. Do nastanka kancera dolazi kada ove mutacije zahvate onkogene i tumor-supresorske gene [6].

Smatra se da se 80-85% nenaslednih kancera kolona mogu pripisati mutaciji *APC* gena [21]. Veruje se da ove mutacije uzrokuju prvenstveno nastanak adenomatoznih polipa, što su pokazale i studije u kojima je dokazano prisustvo pomenutih mutacija u

aberantnim fokalnim kriptama, koje predstavljaju najraniji oblik displastičnih kripti. Međutim, činjenica je i da većina adenoma ostaje benigna, što ukazuje na to da je preduslov za dalju malignu transformaciju prisustvo dodatnih promena u genetskom materijalu ćelija [22]. U prilog tome govori i podatak da se u 40% slučajeva CRC javlja *k-ras* mutacija [23]. Gen *k-ras* kodira sintezu proteina koji učestvuje u signalnom putu čija aktivacija indukuje rast kolonocita, te bujanje adenoma i tranziciju do karcinoma [24]. Dodatno, oko 50% lezija sa displazijom visokog gradusa i 75% nastalih CRC pokazuje i mutaciju *p53* gena. Naime, *p53* gen ima ulogu prekidača dalje ćelijske deobe nakon pojave oštećenja DNK. Ovaj mehanizam omogućava reparaciju DNK prilikom manjih oštećenja, ili indukuje apoptozu kada je oštećenje ireverzibilno. Gubitkom funkcije *p53* gena gubi se i kontrola nad replikacijom oštećene DNK, greške se akumuliraju i dolazi do tzv. *gubitka heterozigotnosti* [25], koji predstavlja jedan od uzroka genetske nestabilnosti. Ćelije koje su izgubile heterozigotnost imaju jedan umesto dva funkcionalna alela pojedinih gena. Najčešće su ovom promenom pogođeni tumor-supresorski geni, koji usled nedostatka jednog alela gube svoju funkcionalnost. Primer za ovaj mehanizam je *DCC* gen, čiji gubitak funkcije dovodi do progrediranja adenoma. Od epigenetskih mehanizama kancerogeneze značajno je pomenuti DNK metilaciju koja takođe dovodi do inaktivacije tumor-supresorskih gena. Oko 25% CRC se povezuje sa metilacijom i inaktivacijom *p14* gena, koji indukuje *p53* signalni put, dok čak 35% slučajeva CRC pokazuje metilaciju *p16* gena, takođe tumor-supresora [3, 24-26] .

1.1.4 Patološke karakteristike CRC

Kao što je već pomenuto, progresija CRC se odvija kroz niz histopatoloških stadijuma koji variraju od lezija jedne kripe, preko adenomatoznih polipa, pa sve do karcinoma. Klasifikacija stadijuma se najčešće bazira na preporuci Američkog komiteta za kancer (*engl. American Joint Committee on Cancer, AJCC*) koja predlaže podelu prema tzv. TNM (*tumor-limfni čvorovi-metastaze*) karakteristikama bolesti [27]. Kriterijumi za pomenutu klasifikaciju su dubina penetracije tumora u zid kolorektuma, obim širenja na regionalne limfne čvorove i prisustvo udaljenih tumora, odnosno diseminacija metastaza. Dubina invazije tumora se definiše T stadijumom u rastućem poretku od T1 (invazija submukoze do *muscularis proprie*) do T4 (invazija u visceralni peritoneum, serozne strukture i druge organe) (slika 2). Zahvaćenost limfnih čvorova se utvrđuje njihovim prebrojavanjem u preparatu koji mora sadržati najmanje 12 limfnih čvorova. Na sličan

način se definiše i M stadijum, odnosno prisustvo metastaza i to na osnovu broja zahvaćenih organa [28]. Pored TNM klasifikacije, danas su još uvek u upotrebi i stariji sistemi klasifikacija za podelu kancera prema stadijumima, poput Dukes i Astler-Coller klasifikacije [29].

Svaki od ovih sistema klasifikacije tumora analogan je TNM sistemu klasifikacije. U tabeli 1 je prikazan uporedni pregled svakog stadijuma u odnosu na različite sisteme klasifikacije.

Tabela 1. Uporedni pregled različitih klasifikacija CRC

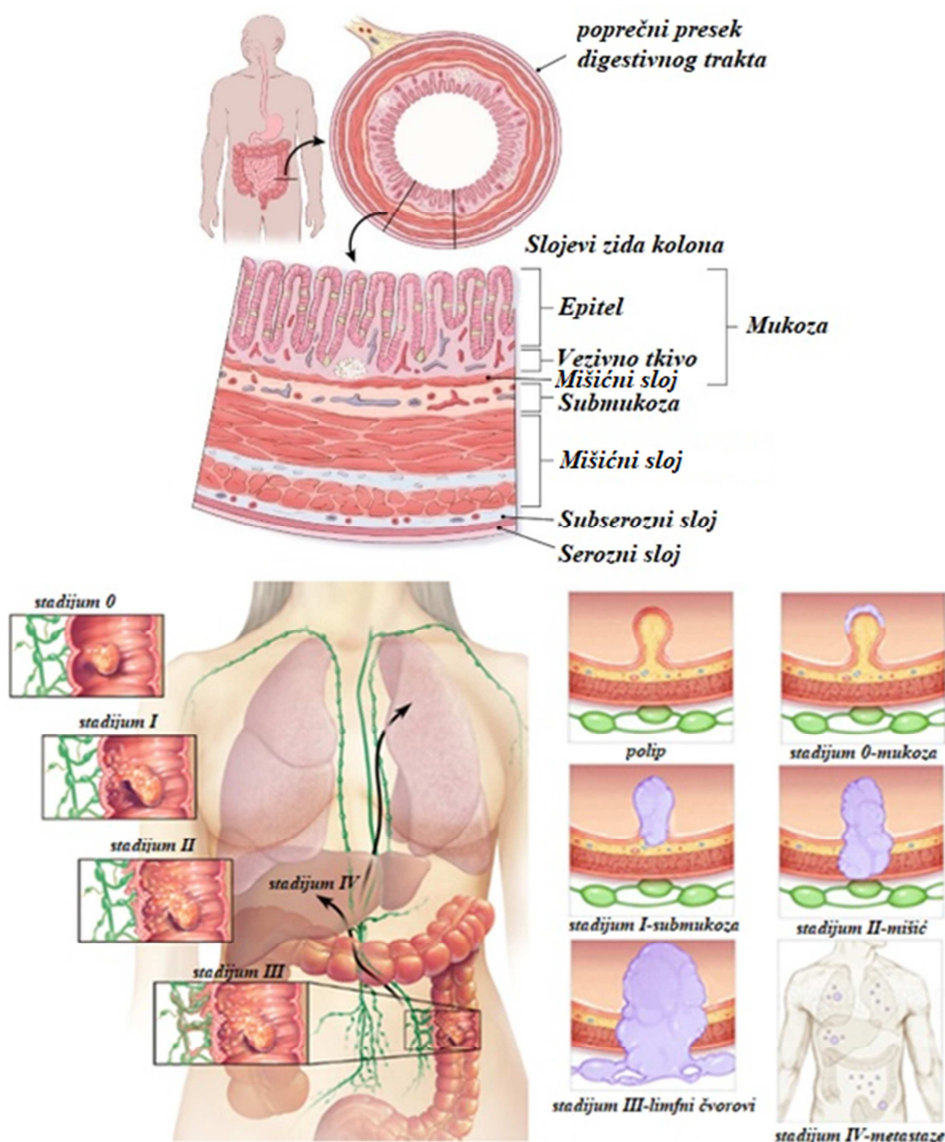
<i>Anatomski stadijum/prognostičke grupe</i>					
<i>Stadijum</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Dukes</i>	<i>Astler-Coller</i>
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	D	D
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	D	D

Tis-ćelije kancera ograničene na intreepitelni ili intramukozni sloj, bez širenja kroz *muscularis* mukoze do submukoze

Uz modifikacije preuzeto iz: <https://cancerstaging.org>, pristup 15.6.2019.

Sistem gradusa obuhvata podelu prema stepenu diferencijacije ćelija. Kao gradus I označavaju se dobro diferencirane ćelije, sa pravilno oformljenim tubulima i najmanje polimorfizama jedra i mitoze. Tumor koji se svrstava u gradus III je najslabije diferenciran, sadrži samo mestimično glandularne strukture i ima visoku učestalost mitoze. U gradus II

se svrstavaju tumori koji se prema histološkim karakteristikama nalaze između prethodno opisana dva gradusa [30].



Slika 2. Grafički prikaz stadijuma kolorektalnog kancera. Uz modifikacije preuzeto iz: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>; <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/multimedia/colon-cancer-stages/img-20007084>; <http://leadingagehackfest.org/victoria/how-to-get-colon-cancer.php>, pristup 19.07.2019.

1.1.5 Prognoza CRC

Patološki stadijumi koreliraju sa prognozom kancera. Na globalnom nivou, oko 20% pacijenata se dijagnostikuje u IV stadijumu [31], sa identifikovnim metastazama, dok kod oko 30% pacijenata, uprkos tome što metastaze nisu detektovane pre ili tokom operacije, posle izvesnog vremena se javljaju rekurentni maligniteti zbog prisustva neotkrivenih mikrometastaza. Metastaze se najčešće javljaju u regionalnim limfnim čvorovima i jetri. Kancer kolona vrlo rano metastazira u jetru zbog prisustva venske drenaže preko portne cirkulacije. Udaljene metastaze poput onih u plućima, peritoneumu, karlici i nadbubrežnim žlezdama se javljaju tek nakon invazije kancerskih ćelija u jetru i limfne čvorove. Što se rektalnih kancera tiče, zbog nedostatka serozne membrane, oni rano penetriraju u obližnje karlične organe [3].

Gradus tumora se uglavnom tumači kao prognostički marker nezavisno od stadijuma. Visoki gradus, odnosno slabo diferencirana histologija tumora je povezana sa slabijim preživljavanjem pacijenata [8]. Oko 20% CRC je slabo diferencirano i klasifikuju se kao tumori visokog gradusa [3].

1.1.6 Faktori rizika i prevencija nastanka CRC

Kao što je već istaknuto, iako CRC predstavlja oboljenje kompleksne etiologije, sa dominantno genetsko-molekularnom osnovom, kod manjeg broja pacijenata se javljaju nasledne forme oboljenja.

Poznati faktori rizika za nastanak CRC se mogu podeliti na nepromenjive i promenjive. Promenjive faktore rizika čine faktori sredine, koji u širem smislu podrazumevaju geografsko-ekološke, demografske i socio-ekonomske činioce. Najznačajniji promenjivi faktori koji se dovode u vezu sa povećanim rizikom za razvoj CRC su smanjena fizička aktivnost, gojaznost i *Diabetes melitus*, pušenje i konzumiranje alkohola, kao i povećan unos crvenog mesa [3, 5]. Smanjenju rizika doprinose upotreba hormonske supstitucione terapije posle menopauze, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, povećan unos voća, povrća, vlakana i namirnica bogatih omega 3 masnim kiselinama [32-35]. Nepromenjivi faktori rizika koji se dovode u vezu sa nastankom CRC su starost, pol, prisustvo inflamatorne bolesti creva i pozitivna porodična anamneza [5].

Strategije prevencije CRC obuhvataju primarnu prevenciju, koja podrazumeva redukciju promenljivih faktora rizika i sekundarnu prevenciju, odnosno skrining posle 50. godine života [5, 35]. Jasno je da kada se govori o prevenciji, promenjivi faktori rizika predstavljaju jedino polje delovanja sa ciljem smanjenja incidencije ove bolesti. U prilog značaju faktora sredine na rizik za razvoj CRC govori izražena varijabilnost u globalnoj distribuciji incidencije CRC [4]. Brojne epidemiološke studije navode na zaključak da velika varijabilnost u stopi oboljevanja od CRC u različitim geografskim područjima upravo proističe iz različitih faktora sredine kojima su stanovnici izloženi [36]. Ovaj zaključak potvrđuju i migracione studije, koje analiziraju stope oboljevanja kod pripadnika istih etničkih grupa koji žive na različitim podnebljima. Tako je utvrđeno da se stope oboljevanja značajno razlikuju kod Japanaca koji žive u Japanu i onih koji žive u SAD. Studija Flood i saradnika je pokazala da Japanci koji žive u Japanu u značajno manjoj meri oboljevaju od CRC u odnosu na pripadnike iste etničke grupacije koja je migrirala u SAD, što ukazuje na to da su faktori sredine značajan faktor rizika za nastanak CRC [37].

Pretpostavlja se da bi eliminisanje ili smanjenje stepena izloženosti faktorima rizika za razvoj CRC kroz primarnu prevenciju doprinelo smanjenju stope oboljevanja od ovog karcinoma, dok bi sekundarna prevencija uticala na povećanje uspešnosti lečenja zbog veće mogućnosti ranog dijagnostikovanja bolesti [5].

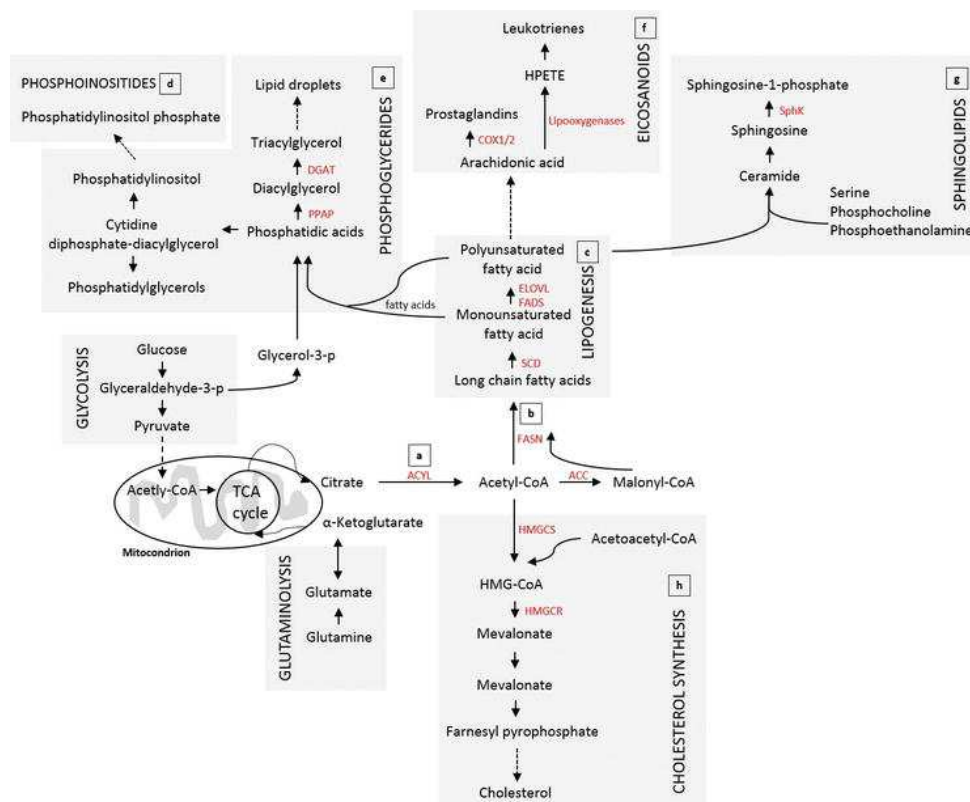
1.2 Metaboličke potrebe maligno izmenjene ćelije

U poslednjih dvadeset godina učinjen je revolucionaran napredak u razumevanju molekularnih i genetskih osnova kancerogeneze. Uporedo sa otkrivanjem gena i značajnih signalnih puteva, otkrivaju se i novi medijatori kancerogeneze, kao i metaboliti koji obezbeđuju uslove za specifično funkcionisanje maligno izmenjene ćelije.

Osnovna osobina ćelija tumora je otpornost na apoptozu, te neograničena proliferacija. Sa metaboličke tačke gledišta, ovi procesi iziskuju pozitivan energetske bilans kako bi se obezbedila energija neophodna za odvijanje kancerogeneze, održavanje vijabilnosti i podržavanje proliferacije [38]. Ćelijski rast i izgradnja novih ćelija, *a priori* zahtevaju prisustvo gradivnih elemenata i nutrijenata. Studije su pokazale da biosinteza osnovnih gradivnih elemenata ćelije poput proteina, masnih kiselina i nukleinskih kiselina biva modifikovana i/ili pospešena prilikom kancerogeneze, najverovatnije u cilju

održavanja intenzivnog rasta i deobe maligno izmenjenih ćelija. Lipidi imaju naročito značajnu ulogu u ovim procesima [39]. Ovi molekuli su neophodni za sintezu i modifikaciju lipidnog dvosloja ćelijskih membrana novonastalih ćelija, ali imaju i druge uloge koje se dovode u vezu sa ćelijskom signalizacijom i preživljavanjem. Za proces održavanja kancerogeneze naročito je značajan *hipoksijom-indukovan faktor* (HIF1 α) [40, 41]. HIF1 α indukuje aktivnost transportera za glukozu, GLUT1 i GLUT3, omogućavajući influks glukoze u ćelije kancera [40], kao i aktivnost enzima glikolize [41]. Takođe, on aktivira *laktat dehidrogenazu A* (LDHA) i *piruvat dehidrogenazu kinazu* (PDK1), koji sprečavaju konverziju piruvata u acetil koenzim A (acetil-CoA) i inhibiraju oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama [40], te promoviše angiogenezu okolnog vaskularnog tkiva, povećanjem ekspresije vaskularnog endotelijanog faktora rasta (*engl. vascular endothelial growth factor; VEGF*) [41].

Prema jednoj od hipoteza, favorizovanje anaerobne glikolize kao energetskog izvora u ćelijama tumora predstavlja mehanizam za uštedu drugih biomolekula koji potom ostaju dostupni za obezbeđivanje gradivnih materija za ćelijsku proliferaciju. Na primer, smanjenjem gubitka atoma ugljenika posredstvom respiracije, tumorske ćelije usmeravaju C atome na izgradnju gradivnih blokova koji su esencijalni za njihovu proliferaciju. Sličan efekat se ostvaruje i zahvaljujući povezanosti metabolizma glukoze i lipida preko acetil-CoA. Naime, u većini eukariotskih ćelija piruvat koji nastaje u procesu glikolize, u mitohondrijama se pod dejstvom piruvat dehidrogenaze kovertuje u acetil-CoA. Acetil-CoA je prekursor mnogih lipidnih molekula, od kojih pre svega treba spomenuti masne kiseline. Iz palmitinske kiseline nastaju nezasićeni derivati koji služe kao gradivni elementi za sintezu drugih lipidnih molekula poput fosfoglicerida, fosfoinozitida, eikozanoida i sfingolipida. Sa druge strane, acetil-coA je i prekursor holesterola, čija se sinteza odvija u mevalonatskom putu kroz niz enzimskih reakcija [42, 43] (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz povezanosti metabolizma glukoze i metabolizma lipida preko ciklusa limunske kiseline i acetil-CoA. Preuzeto iz: Lim JY, Kwan HY. Roles of Lipids in Cancer. In Lipid Metabolism 2018 Nov 5. IntechOpen.

Dodatno, studije su pokazale da u uslovima kancerogeneze dolazi do aktivacije *mTOR* kompleksa 1 (*mTORC 1*) i transkripcionih faktora - proteina koji se vezuju za sterol-regulatorne elemente (engl. sterol regulatory element binding protein; *SREBP*). *SREBP* imaju ulogu regulatora transkripcije gena važnih za sintezu i metabolizam masnih kiselina, holesterola, triglicerida (TG) i fosfolipida [44]. *SREBP* je regulisan preko *mTORC 1* [45]. Prethodne studije sprovedene u brojnim malignim bolestima su pokazale da disregulacija *mTOR* signalizacije učestvuje u proliferaciji kancerskih ćelija. Naime, *mTOR* i *SREBP* povećavaju biosintezu lipida posredstvom *Akt* signalizacije i na taj način promovišu proliferaciju tumorskih ćelija [42, 46-48]. Signalizacija posredstvom *mTORC 1* dovodi i do indukcije biosinteze masnih kiselina u ćelijama kancera i to aktivacijom *SREBP* preko kinaze *S6* [49], ili fosforilacijom *SREBP* inhibitora *Lipin 1* [45]. Pored uloge u metabolizmu lipida, *mTORC 1* učestvuje i u promociji biosinteze proteina i nukleotida [42]. Imajući u vidu sve prethodno pomenuto, može se zaključiti da je metaboličko reprogramiranje ćelija tumora ključno za nastanak i progresiju bolesti.

Poznato je da kako se maligne ćelije umnožavaju i obrazuju trodimenzionalno maligno tkivo, lokalna hipoksija i nedostatak nutrijenata uzrokuju rast novih krvnih sudova

koji prožimaju rastući tumor. Uprkos tome, ova *ad hoc* vaskularizacija nije savršena u smislu da ne obezbeđuje dovoljne količine kiseonika, te uzrokuje ćelijski stres usled nedostatka kiseonika i hranljivih materija [40]. Međutim, izuzetno adaptivne po svojoj prirodi, kancerske ćelije razvijaju sopstveni metabolizam u cilju recikliranja svih dostupnih materija i njihove bolje iskorišćenosti [50]. Uprkos ovom značajnom stepenu autonomije koji poseduju sve kancerske ćelije i koji je neophodan za njihovo preživljavanje, primećeno je da i u organizmu, kao celini, dolazi do određenih poremećaja homeostaze u uslovima tumorogeneze i aktivne proliferacije i širenja kancera [51]. Zanimljivo je opažanje da se gojaznost, kao neosporni faktor rizika za određene tipove kancera [52, 53], može na ovaj način povezati sa metabolizmom maligne ćelije. Naime, inicijalni pozitivni energetski bilans, kao i veće rezerve nutrijenata i gradivnih materija koje su prisutne u stanjima prekomernog unosa hrane i smanjene potrošnje energije mogu olakšati i ubrzati kancerogenezu. Sa druge strane, postoje dokazi da restrikcija unosa kalorija dovodi do smanjenog rizika za pojavu kancera [54]. Iako su ovi dokazi čvrsti, saznanja savremene nauke o mehanizmima povezanosti metabolizma, odnosno energetskog i nutritivnog stanja organizma i razvoja kancera su nepotpuna [38]. Mnoge studije su se bavile ispitivanjem uticaja ishrane bogate lipidima na pospešivanje tumorogeneze i rasta tumora i/ili razvoja metastaza. Postoje indicije da dijeta sa visokim sadržajem lipida kod miševa dovodi do promocije razvoja kancera CRC [55]. Takođe, sličan uticaj ima i povećana endogena biosinteza holesterola.

Svakako, uvođenje novih analitičkih tehnika omogućava dodatne načine za istraživanje ove problematike i otvara novo poglavlje u rasvetljavanju metaboličkih puteva. Ovaj pristup izrodio je savremene naučne discipline, tzv. *omike* [56-58].

1.3 Značaj lipidomike u otkrivanju biomarkera

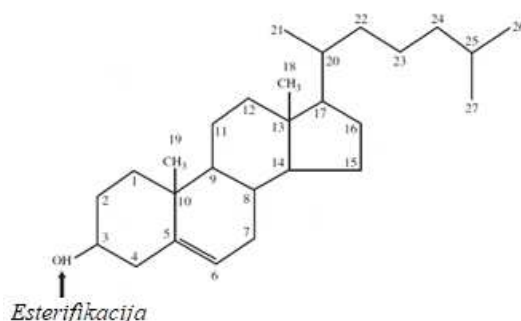
Detaljna analiza lipidnih molekula je oblast interesovanja naučne discipline *lipidomike*, koja zajedno sa *genomikom* i *proteomikom* predstavlja ključnu kariku u procesu razumevanja ćelijske fiziologije i patofiziologije. Danas, biologija lipida s pravom predstavlja značajnu istraživačku oblast. Lipidomika je veoma mlada istraživačka grana, koja se brzo razvija, podržana napretkom analitičkih tehnika poput masene spektrometrije

(MS) i podstaknuta otkrićima koja su dokazala značaj lipida u mnogim metaboličkim bolestima poput gojaznosti, ateroskleroze, infarkta, hipertenzije i dijabetesa [59-64].

Lipidi učestvuju u brojnim fiziološkim procesima, a njihova struktura i lokalizacija unutar ili izvan ćelije diktiraju njihove uloge. Tako na primer TG predstavljaju skladišta energije, steroli (holesterol) i glicerofosfolipidi strukturne komponente ćelijskih membrana, a sfingolipidi deo signalne kaskade. Kako su lipidi ključan izvor energije i gradivni elementi ćelija, ne iznenađuje činjenica da imaju značajnu ulogu i u kancerogenezi, a u tom smislu se naročito izdvaja holesterol [65].

1.4 Metabolizam holesterola i njegova uloga u organizmu

Holesterol predstavlja dominantni lipidni molekul prisutan kod većine životinjskih vrsta. Po svojoj strukturi ovo jedinjenje pripada sterolima. Molekul holesterola se sastoji iz tetraciklične ciklopentano-perhidrofenantrenske strukture sa izo-oktil bočnim lancem na poziciji C-17, dvostrukom vezom između položaja C5-C6 i alkoholnom grupom u položaju C3. Ova alkoholna grupa podleže esterifikaciji u biološkim sistemima [66, 67] (slika 4).



Slika 4. Hemijska struktura holesterola.

Kod sisara holesterol ima vitalnu ulogu i neophodan je za fiziološko funkcionisanje ćelije, kako kao komponenta ćelijske membrane i intraćelijskih membranskih struktura, tako i kao prekursor izuzetno značajnih biološki aktivnih jedinjenja poput vitamina D, steroidnih hormona i žučnih kiselina [68, 69].

Steroli su u velikom udelu prisutni u membranama eukariotskih ćelija u kojima obavljaju značajan broj funkcija. Slobodan (neesterifikovan) holesterol je u ćelijama prisutan u relativno konstantnoj količini (0,3-0,4 mol/mol fosfolipida) i njegova količina prati količinu drugih konstituenata lipidnog dvosloja, prevashodno fosfolipida i

sfingolipida. Najveći udeo neesterifikovanog holesterola sadrži plazma membrana (30-50% lipida membrane, odnosno 60-80% ukupne količine holesterola u ćeliji), zatim Goldžijev kompleks, dok mitohondrije i endoplazmatski retikulum (ER) sadrže znatno manje količine (do 5%). Holesterol se nalazi i u endocitnim odeljcima, s obzirom na to da oni nastaju od plazma membrane i ingestovanih lipoproteina male gustine (*engl. low-density lipoprotein; LDL*) [70].

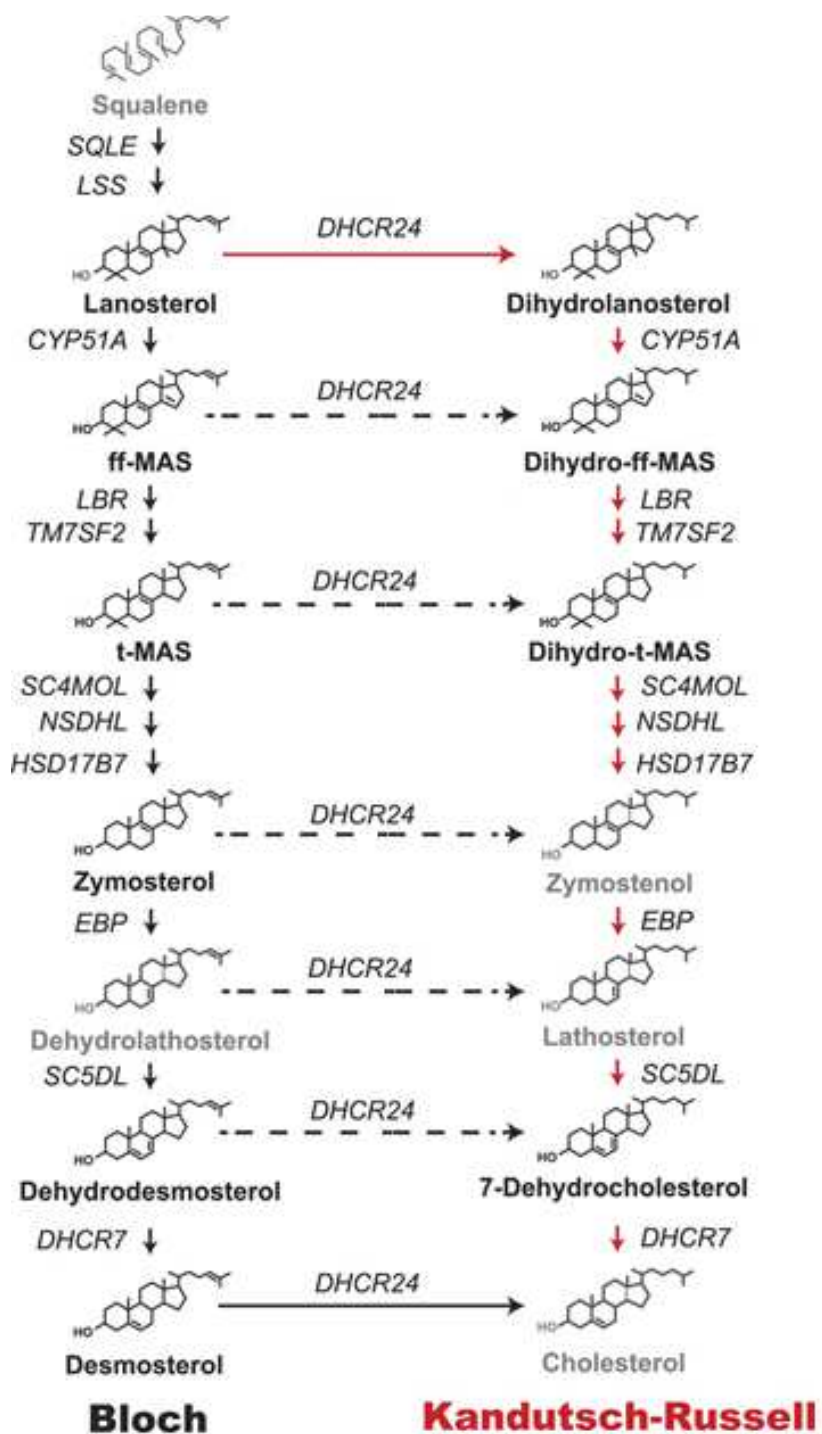
Poznato je da eukariotske ćelije dobijaju holesterol iz dva glavna izvora: putem ishrane i endogenom sintezom. Oba ova procesa su izuzetno važna i za održavanje homeostaze holesterola u organizmu.

1.4.1 Sinteza holesterola

Poznato je da svaka ćelija humanog organizma sintetiše holesterol. Ovo ciklično jedinjenje, dominantno ugljovodonične strukture, koje sadrži 27 C atoma, 46 H atoma i u neesterifikovanom obliku jedan atom kiseonika, nastaje iz acetyl-CoA. Kompleksnost i obim procesa biosinteze holesterola najbolje opisuje činjenica da je za nastanak jednog molekula holesterola neophodno 18 molekula acetyl-CoA, koji sadrže ukupno 36 C atoma [71]. Ovaj proces je i energetski zahtevan o čemu govori podatak da se za sintezu jednog molekula holesterola iskoristi 15 atoma nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH*) [72].

Biosinteza holesterola započinje u endoplazmatskom retikulumu i zahteva više od 30 kaskadnih enzimskih reakcija. Prve dve reakcije su reverzibilne i katalizuju ih tiolaza i HMG-CoA sintaza, a omogućavaju kondenzaciju dva molekula acetata i formiranje acetoacetyl-CoA. Nakon kondenzacije sa još jednim molekulom acetata nastaje 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Reakcija redukcije HMG-CoA do mevalonata koja sledi je ujedno i glavna regulatorna reakcija celog procesa. Nakon toga, dešavaju se uzastopne reakcije transformacije mevalonata do izopentenilpirofosfata. Šest molekula izopentenilpirofosfata se dalje kondenzuju i formiraju molekul skvalena [73]. Skvalen dalje ciklizuje kroz niz reakcija do lanosterola, prvog molekula sa ciklopentanoperhidrofenantrenskom strukturom holesterola. Od lanosterola se put sinteze račva na dva puta: *Blochov i Kandutsch-Russelov* put. *Blochov* put sinteze se odvija preko zimosterola, zatim dezmosterola do holesterola, dok se *Kandutsch-Russelov* put odigrava preko latosterola i 7-dehidroholesterola (7-DHC) do holesterola [74.75]. Ova dva puta se

paralelno odvijaju, a za cilj imaju biosintezu istog molekula, holesterola (slika 5). *In vivo* studije fluksa holesterola su pokazale da ova dva puta ispoljavaju tkivnu specifičnost [73].

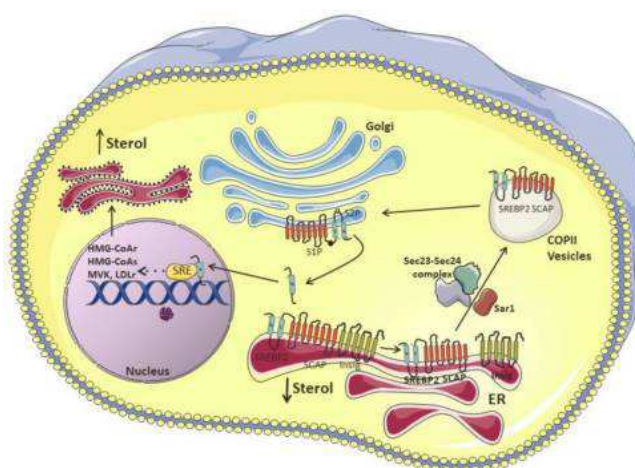


Slika 5. Šematski prikaz puteva sinteze holesterola. Preuzeto iz: Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife*. 2015,26;4:e07999

Najznačajniji element u mehanizmu regulacije biosinteze holesterola je SREBP-2 transkripcijski faktor koji utiče na transkripciju gena za ključne enzime biosintetskog puta

holesterola poput HMG-CoA reduktaze, HMG-CoA sintaze i mevalonat kinaze, kao i LDL receptora koji je značajan za preuzimanje holesterola od strane ćelije [76]. Novija istraživanja navode da bi i skvalen monooksigenaza mogla biti kontrolni enzim procesa biosinteze holesterola [77].

SREBP-2 se nalazi na membrani endoplazmatskog retikuluma i sastoji se iz dva transmembranska heliksa čiji su NH₂- i COOH- terminalni domeni orijentisani ka citozolu [78]. NH₂- terminalni domen sadrži aktivni element koji se u jedru vezuje za sterol-regulatorni element (SRE) i aktivira transkripciju ciljnih gena. U membrani endoplazmatskog retikuluma, SREBP je povezan sa dva proteina, *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) i *insulin-induced gene protein 1* (Insig-1) [79-81]. U stanju snižene koncentracije holesterola u ćeliji, SCAP-SREBP kompleks se disocira od Insig-1 proteina koji se potom degradira, a sam kompleks se posredstvom COPII vezikula prenosi do Goldžijevog aparata, gde SREBP biva oslobođen delovanjem dve proteaze, pri čemu postaje aktivan NH₂- domen [82, 83] (slika 6). Regulatorna uloga SREBP2 prevazilazi indukciju ekspresije gena uključenih u sintezu holesterola i njegovo preuzimanje posredstvom LDL receptora, već vezivanjem za promoterski region *ABCA1* gena inhibira i efluks holesterola [83]. Pored toga zanimljivo je da se i mikroRNK molekul (*miR-33*) transkribuje uporedo sa SREBP2 i dovodi do zaustavljanja efluksa holesterola, na taj način omogućavajući brzo popunjavanje ćelijskih depoa holesterola [84, 85].



Slika 6. Šematski prikaz mehanizma regulacije sinteze holesterola posredstvom SREBP. Preuzeto iz: Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Quintao ECR, Moore KJ, Lottenberg AM. *Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis*. *Nutrients*. 2018 Jun 13;10(6):760.

Najnovije studije su pokazale da se transkripciona aktivnost SREBP2 može aktivirati i posredstvom jetrenog X receptora (*engl. liver X receptor; LXR*). Naime,

SREBP2 inhibira ubikvitin E3 ligaza, *Rnf145*, koja predstavlja ciljni gen LXR transkripcionog faktora i indukuje ubikvitinaciju dva lizinska ostatka blizu vezujućeg mesta SCAP za COPII vezikulu. Ovo onemogućava transport SCAP-SREBP kompleksa do Goldžijevog aparata. Pomenuti mehanizam upućuje na to da su glavni regulatori sinteze i efluksa holesterola SREBP i LXR, koji su i sami u međusobnoj vezi, te zajedno doprinose održavanju homeostaze holesterola [86, 87].

Značaj biosinteze holesterola ilustruje činjenica da su defekti u putevima sinteze holesterola inkompatibilni sa preživljavanjem kod miševa. Potpuni gubitak funkcije enzima uključenih u biosintezu holesterola je retko opisan kod ljudi, a deficijencije ovih enzima dovode do ozbiljnih malformacija i oboljenja [88].

1.4.2 Apsorpcija holesterola i fitosterola

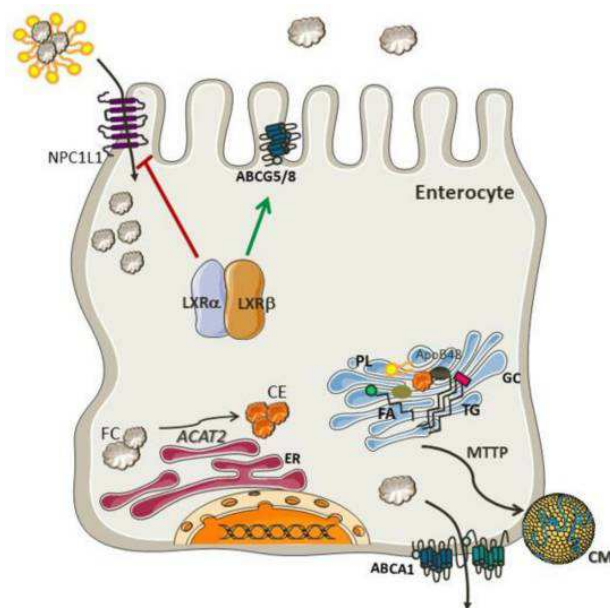
Kao što je već napomenuto, većina ćelija sintetiše holesterol, ali dominantna mesta produkcije svakako predstavljaju hepatociti i enterociti. Međutim, pored *de novo* sinteze, u enterocitima se odvijaju i drugi procesi koji doprinose ukupnoj količini holesterola u organizmu. Tako se na primer, smatra da se 300-400 mg/dan holesterola apsorbuje iz hrane [72, 89].

S obzirom na to da je holesterol hidrofobni molekul, njegova apsorpcija u crevu zavisi od povećanja rastvorljivosti. U tu svrhu holesterol trpi određene fizičko-hemijske modifikacije u lumenu tankog creva (emulzifikacija, hidroliza i micelarna solubilizacija), pre preuzimanja od strane enterocita. Micelarna solubilizacija holesterola je ključna za apsorpciju holesterola. Takođe, poznato je da je holesterol koji potiče iz žuči neesterifikovan, dok je dijetarni holesterol delimično esterifikovan. Iz ovog razloga, pankreasna lipaza (*engl. carboxyl ester lipase; CEL*) hidrolizuje estre holesterola pre transporta do enterocita. Funkcije CEL su izuzetno značajne u procesu formiranja micela i ne ogledaju se isključivo u hidrolizi holesterola. CEL poseduje funkciju sličnu fosfolipazi A2, ima ulogu u hidrolizi fosfolipida, te može indirektno učestvovati u formiranju micela. Pored toga enterociti mogu endocitozom preuzeti CEL koji tada doprinosi intracelularnom transportu holesterola i formiranju hilomikrona [72, 90]. Što se bilijarnog holesterola tiče, njegove fizičko-hemijske osobine utiču na apsorpciju u tankom crevu. Bilijarni holesterol je već micelarizovan i dostupan za apsorpciju. Za razliku od

njega, dijetarni kolesterol mora najpre da se oslobodi iz hrane. Na kraju, svega polovina od ukupne količine kolesterola prisutne u tankom crevu se apsorbuje [91, 92].

Micelarizovan i neesterifikovan kolesterol koji je dospeo do membrane enterocita dalje preuzima *Niemann-Pick-C1-like-1* (NPC1L1) protein koji olakšava njegov transport u enterocit [93]. NPC1L1 je prisutan u četkastom pokrovu proksimalnog dela tankog creva (jejunum). O značaju ovog proteina u procesu apsorpcije kolesterola i biljnih sterola/stanola, govore rezultati dve studije sprovedene na NPC1L1-deficijentnim miševima, kod kojih je zapaženo značajno smanjenje apsorpcije kolesterola [94, 95]. Nakon ulaska u enterocit, kolesterol se ponovo esterifikuje sa masnim kiselinama posredstvom enzima *acil-kolesterol acil transferaze* (ACAT) prisutnog na membrani endoplazmatskog retikuluma [96]. Nastali kolesterol estri se dalje u Goldžijevom aparatu inkorporiraju u hilomikrone zajedno sa TG, fosfolipidima i apolipoproteinima B-48 (ApoB48). Na kraju se hilomikroni transportuju u limfu, a zatim i cirkulaciju putem *ductus toracicus* [72].

U proksimalnom delu tankog creva nalaze se pored NPC1L1 proteina i dva ATP vezujuća kasetna proteina ABCG5 i ABCG8 [96, 97]. Uloga ovih proteina je da malu količinu slobodnog kolesterola sekretuju nazad u lumen tankog creva. Regulacija ova dva procesa: apsorpcije posredstvom NPC1L1 i sekrecije nazad u lumen tankog creva posredstvom ABCG5/8 je posredovana LXR nuklearnim receptorima [98, 99]. LXR se ponašaju kao senzori za kolesterol, te dovode do inhibicije NPC1L1 i aktivacije ABCG5/8 transportera [100]. Dodatno, LXR povećava i ekspresiju ABCA1 transportera, koji se nalaze na bazolateralnoj strani enterocita i potpomažu ekskreciju kolesterola u cirkulaciju posredstvom lipoproteina visoke gustine (*engl. high-density lipoprotein; HDL*) (slika 6) [72]. Suštinski, uloga LXR receptora je sprečavanje akumulacije kolesterola u enterocitima. Značajno je napomenuti da su za očuvanje integriteta enterocita značajni kako apsorbovani tako i *de novo* sintetisani kolesterol [101].



Slika 7. Šematski prikaz procesa apsorpcije holesterola. Preuzeto iz: Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Quintao ECR, Moore KJ, Lottenberg AM. *Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. Nutrients.* 2018 Jun 13;10(6):760.

Donedavno se smatralo da je isključivo NPC1L1 odgovoran za apikalni transport holesterola u enterocit. Skorašnje studije su identifikovale alternativne holesterol transportne proteine u mnogim ćelijama, a među njima receptor hvatač B klase, tipa 1 (*engl. scavenger receptor B; SR-B1*), CD36 i kalveolin-1, koji bi mogli imati ulogu i u apsorpciji holesterola [72].

Hranom se u organizam unose i fitosteroli, strukturni analozi holesterola. Smatra se da su fitosteroli korisni za organizam i da povoljno utiču na nivo holesterola. Kako organizam životinja nije sposoban da produkuje fitosterole, njihovo prisustvo u organizmu potiče isključivo iz dijetarnih izvora [102]. Najzastupljeniji dijetarni fitosteroli su brazikasterol, kampesterol, β -sitosterol i stigmasterol, i to u orašastim plodovima, integralnim žitaricama, određenim vrstama povrća i biljnim uljima [103]. Iako njihov unos isključivo zavisi od ishrane, trenutne promene u dijetarnom režimu se ne odražavaju na njihove koncentracije u plazmi. Smatra se da serumske koncentracije fitosterola odražavaju u najvećoj meri dijetarne navike podneblja, te da bi tek drastično povećanje unosa u odnosu na uobičajen izazvalo značajnije promene koncentracija ovih jedinjenja u serumu [104].

Iako se zna da se apsorpcija fitosterola obavlja istim mehanizmima kao i holesterol, posredstvom NPC1L1, efikasnost apsorpcije biljnih sterola je manja u poređenju sa holesterolom [105]. Pored NPC1L1 transportera, za proces apsorpcije fitosterola značajan

je i ABCG5/G8 transportni sistem [94]. Takođe, pokazano je da postoji različit afinitet ABCG5/G8 sistema prema fitosterolima u odnosu na holesterol. Efluks fitosterola posredstvom ABCG5/G8 je veći u odnosu na holesterol, o čemu govori i podatak da je kod ljudi pojava sitosterolemije isključivo primećena kod homozigotne mutacije ABCG5/G8 [104].

Mnoge studije su pokazale da fitosteroli utiču na nivo holesterola u plazmi [106]. Prema nekim hipotezama, fitosteroli ostvaruju inhibitorni efekat na koncentraciju holesterola u plazmi zbog kompeticije sa holesterolom za NPC1L1 na apikalnoj membrani enterocita [104]. Sa druge strane, novije studije pretpostavljaju da se njihov efekat na apsorpciju holesterola ostvaruje i na nivou micela, te da prisustvom u micelama fitosteroli umanjuju rastvorljivost holesterola [90]. Dodatno, kvantifikacija fitosterola se koristi za procenu apsorpcije samog holesterola. Ovakav pristup se opravdava činjenicom da se fitosteroli apsorbuju u količini koja je proporcionalna apsorpciji holesterola. Prvi su ovu metodu opisali Tilvis i Miettinen još 1986. godine [107], i do danas je ostala najprimenjivija metoda za procenu stanja apsorpcije holesterola. Danas se preporučuje određivanje koncentracija više različitih fitosterola kao (surogat) markera apsorpcije. Dodatno, ova metoda se pokazala izuzetno korisnom i u interventnim studijama, u kojima se procenjuje uticaj farmakološkog ili dijetarnog tretmana na apsorpciju holesterola. Tako je ova metodologija našla primenu u ispitivanju dejstva statina, dijetarnih faktora i metaboličkih oboljenja na proces apsorpcije holesterola [108-110].

1.4.3 Metode za direktnu procenu sinteze i apsorpcije holesterola

Najranije metode za procenu sinteze holesterola su podrazumevale merenje odnosa između koncentracije holesterola u serumu i količine ekskretovanih žučnih soli fecesom. Ova metoda je obuhvatala i računsku korekciju za količinu holesterola unetog putem hrane. Međutim, novije metode za procenu sinteze holesterola se zasnivaju na direktnom praćenju stepena inkorporiranja deuterizovanih izotopa u molekule holesterola (*engl. dual isotope ratio method; DI*) ili distribucije izotopomera (*engl. mass isotopomer distribution analysis; MIDA*). Problem ovih metoda predstavlja kratak vremenski okvir merenja koji često dovodi do podcenjivanja prinosa *de novo* sinteze zbog cirkardijalnog ritma [111].

Apsorpcija holesterola može se direktno proceniti metodom intestinalne perfuzije i dualnim izotopskim metodom merenja holesterola u serumu i fecesu. Obe metode

podrazumevaju korišćenje radioaktivnih ili stabilnih izotopa. Iako jedino intestinalna perfuzija omogućava direktno merenje nivoa apsorpcije holesterola kod ljudi, široka upotreba ove metode je ograničena zbog neophodnosti intubacije i izlaganja zračenju. Metod dualnog merenja izotopa se može izvoditi u plazmi i u fecesu. Nedostatak metode koja se bazira na merenju koncentracije markera u fecesu je potreba za 72-časovnim sakupljanjem fecesa. Sa druge strane, nedostatak metode koja podrazumeva merenje u plazmi je činjenica da rezultat oslikava jednokratno stanje apsorpcije [112-114].

1.4.4 Hromatografska analitika NHS u cilju procene homeostaze holesterola

Sve prethodno navedene metode procene sinteze i apsorpcije holesterola bazirane su na praćenju izotopski obeleženih prekursora holesterola ili distribucije izotopski obeleženog holesterola. Kao što je već istaknuto, ove metode su zametne sa analitičkog aspekta, ali i praktično neprimenjive u uslovima kliničkih studija i rutinske dijagnostike. Mogućnost izvođenja analize u što većem broju uzoraka za što kraće vreme, minimalna invazivnost, niži troškovi izvođenja i što veći komfor pacijenta predstavljaju važne uslove koji moraju biti zadovoljeni prilikom razmatranja uvođenja nove dijagnostičke metode.

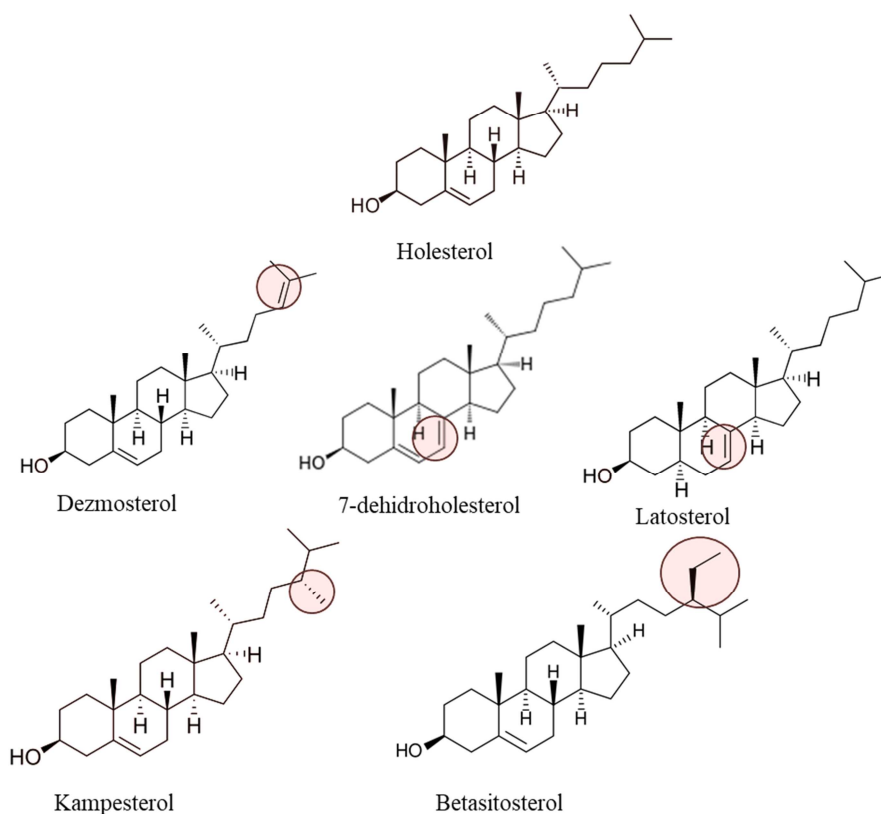
Klinički potencijal analize homeostaze holesterola u organizmu ogleda se u personalizovanom pristupu lečenju određenog broja oboljenja. Kao što je već pomenuto, lipidomika je pružila značajan doprinos na tom polju. Naime, homeostazu holesterola je moguće proceniti kvantifikacijom neholesterolskih sterola (NHS) u koje spadaju: prekursori holesterola koji se koriste kao surogat markeri sinteze holesterola (dezmosterol i latosterol), i fitosteroli (kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol), surogat markeri za procenu apsorpcije holesterola [111]. Prednosti ovog načina procene homeostaze holesterola nalaze se u činjenici da se radi o neinvazivnom, za ispitanike neškodljivom postupku koji pruža klinički relevantne podatke o poremećajima na nivou homeostaze holesterola.

Analitičke metode koje se koriste za određivanje koncentracije NHS su izotopska dilucionna masena spektrometrija (*engl. isotopic dilution mass spectrometry*; IDMS), kao i metode gasne i tečne hromatografije [111, 115-118].

Što se hromatografskih metoda tiče, u prošlosti je korišćena uglavnom gasna hromatografija (*engl. gas chromatography*; GC), ali danas se sve više upotrebljava tečna hromatografija visoke efikasnosti (*engl. high-performance liquid chromatography*; HPLC)

spregnuta sa tandem masenim detektorom (HPLC-MS/MS). Prednost ovog pristupa ogleda se u mogućnosti istovremenog određivanja velikog broja metabolita, pri čemu za većinu rutinskih analiza nije neophodno vršiti derivatizaciju uzorka [115]. Dodatnu prednost može predstavljati mogućnost proširenja panela na analizu oksisterola i drugih steroidnih jedinjenja.

HPLC-MS/MS tehnika poseduje izuzetne analitičke performanse za analizu steroidnih jedinjenja, široko polje upotrebe i veliku osetljivost i specifičnost. Ove karakteristike su od naročitog značaja ako se ima u vidu da NHS, kao strukturni izomeri holesterola, predstavljaju klasu hemijski sličnih jedinjenja. Dodatni problem predstavlja i činjenica da ih je hromatografski veoma teško razdvojiti, kako međusobno, tako i od holesterola koji je prisutan u koncentracijama i do 1000 puta višim u odnosu na koncentraciju sterola [115, 118]. Strukture najčešće određivanih NHS, kao i strukturne razlike u odnosu na molekul holesterola su predstavljene na slici 8.



Slika 8. Strukturne formule molekula neholesterolskih sterola

Uprkos svim pogodnostima određivanja biomarkera homeostaze holesterola upotrebom HPLC-MS/MS tehnike, ova metodologija predstavlja analitički izazov. Kako su HPLC-MS/MS aparati u većini slučajeva neautomatizovani sistemi, često zahtevaju

optimizaciju uslova metode prema određenom tipu aparata, te validaciju same metode [119-121]. Dodatni problem koji je specifičan za primenu HPLC-MS/MS je interferencija matriksa koja može u velikoj meri da smanji osetljivost metode [122]. Sa povećanjem potrebe za uvođenjem ovakvih parametara u kliničku praksu, raste i potreba za rešavanjem analitičkih prepreka. Međutim, uprkos predloženom velikom kliničkom i dijagnostičkom potencijalu, određivanje markera homeostaze holesterola nije standardizovano niti harmonizovano, te je uočena velika varijacija u rezultatima između različitih laboratorija. Harmonizaciji predstoji proces standardizacije i uvođenja referentnih metoda i materijala [117,118].

1.4.5 Poremećaji koncentracije holesterola kao osnova bolesti

Količina neesterifikovanog intracelularnog holesterola je veoma precizno i strogo kontrolisana, zbog činjenice da promene u njegovoj koncentraciji nepovoljno utiču na metabolizam ćelije [123]. Pored toga, poznato je da i promene u količini holesterola u cirkulaciji predstavljaju faktore rizika za mnoga oboljenja. Tako na primer, dislipidemija, preciznije hiperholesterolemija dovodi do razvoja ateroskleroze, te mnogih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja [110]. Takođe, dislipidemija se sreće i kod mnogih metaboličkih, infektivnih, neurodegenerativnih pa i malignih oboljenja [124-127]. Sinteza, apsorpcija i korišćenje holesterola od strane ćelija su usko povezani i međusobno uslovljeni procesi, sa ciljem da se spreči prekomerno akumuliranje holesterola u ćeliji. Poremećaji na nivou koncentracije holesterola u cirkulaciji se manifestuju na dva načina – kao hiperholesterolemija i hipoholesterolemija. Uzroci nastanka ovih poremećaja variraju od problema na nivou apsorpcije do genetskih oboljenja. Tako se na primer usled mutacije gena na hromozomu 19 javlja prekomerna sinteza holesterola, uprkos dovoljnim količinama holesterola u cirkulaciji, te dolazi do nastanka familijarne hiperholesterolemije [128]. Sa druge strane hipoholesterolemija se može javiti kao posledica oboljenja jetre, hipotiroidizma i genetskih oboljenja poput familijarne hipobetalipoproteinemije i *Smit-Lemli-Opitz* sindroma [124].

Povećanje i sniženje koncentracije holesterola u organizmu mogu uzrokovati brojne simptome, sindrome ili bolesti. Sniženi nivoi holesterola su povezani sa mentalnim oboljenjima, neuropsihijatrijskim poremećajima i mortalitetom kod starih osoba [129, 130]. Povišene koncentracije holesterola se dovode u vezu sa mnogim kardiovaskularnim i

cerebrovaskularnim oboljenjima. Ova oboljenja su uzrokovana aterosklerozom u čijoj osnovi leži akumulacija holesterola u plakovima unutar zidova krvnih sudova [106]. Mehanizam nastanka ovog oboljenja delom se pripisuje ili povišenoj sintezi, ili povišenoj apsorpciji holesterola. Iz svih navedenih razloga, od izuzetne važnosti su procena i praćenje promena na nivou ova dva procesa [110]. Količina holesterola je regulisana kontrolom sinteze holesterola, koja se obavlja u svim tkivima, zatim njegove redistribucije u samoj ćeliji, organelama i plazma membrani, interćelijskog transporta pomoću lipoproteinskih čestica, reverznog transporta iz ćelija perifernih tkiva ka jetri, te procesima apsorpcije i eliminacije [72]. Ravnoteža između procesa sinteze i apsorpcije holesterola čini osnovu mehanizma održavanja homeostaze holesterola u organizmu.

Holesterol predstavlja glavnu komponentu lipidnih splavova, te utiče na regulaciju membranskih proteina, receptora, kao i fluiditet membrane [131]. Pored toga, kolesterol i ostali lipidi učestvuju u produkciji hormona [70]. Studije su pokazale da povišen nivo holesterola učestvuje u kancerogenezi, a da disfunkcija metabolizma holesterola utiče na progresiju kancera. Dve istraživačke grupe su pokazale da kolesterol može direktno aktivirati *Hedgehog* signalizaciju i uzrokovati diferencijaciju i proliferaciju ćelija, te kancerogenezu [132-134]. U kanceru usne duplje, koncentracija holesterola u tkivu kancera je značajno viša u odnosu na zdravo tkivo [135]. Prethodne studije su pokazale da povišene koncentracije holesterola u cirkulaciji promovišu *Akt* signalizaciju, smanjuju apoptotsku aktivnost kod LNCap ćelijske linije kancera prostate, i povećavaju agresivnost tumora kod životinjskih modela [136]. Dodatno, kako su pokazale brojne studije mevalonatski put je ushodno regulisan kod brojnih kancera (leukemija, limfom, multipli mijelom, kancer dojke, jetre, pankreasa, jednjaka i prostate) [137]. Takođe, studije su pokazale da su povišene koncentracije holesterola u serumu pozitivan faktor rizika za razvoj kancera kolona. Ista korelacija je pronađena i za druge malignitete, uključujući reproduktivne organe žena, kancer pluća i maligni melanom [39].

Međutim, studije govore da se niske koncentracije holesterola javljaju i 10 godina pre detekcije kancera kolona. Ovo zapažanje je otvorilo mogućnost da se niske koncentracije holesterola iskoriste kao biomarker povećanog rizika za pojavu kolorektalnog karcinoma. Naime, pretpostavlja se da snižavanje nivoa holesterola kod gojaznih pacijenata može predstavljati ranu subkliničku manifestaciju pojave kancera. Kako autori navode, moguće objašnjenje je da su niske koncentracije holesterola u serumu posledice rasta i razvoja

malignog tkiva [127, 138]. Ovo stanovište je sve više aktuelno kada je u pitanju uloga holesterola u mehanizmu nastanka i razvoja kancera.

Pored toga, bilo je pokušaja da se statini, kao lekovi koji smanjuju sintezu holesterola inhibicijom HMG-CoA reduktaze, koriste kao hemopreventivna sredstva. Pretpostavlja se da bi statini mogli da smanje proliferaciju ćelija kancera, umanje rizik od oboljevanja, ali i utiču na smanjenje mortaliteta pacijenata sa kancerom. Rezultati istraživanja na tom polju su međutim kontradiktorni. Svakako, benefit upotrebe lekova koji regulišu koncentraciju holesterola, kao i mehanizme njihovog dejstva na kancerogenezu treba još istražiti [139].

1.4.6 Aktivni holesterol - modulator intracelularne homeostaze holesterola

Holesterol u lipidnom dvosloju plazma membrane formira sa ostalim lipidima komplekse konstantnog stehiometrijskog odnosa (sterol:fosfolipid molski odnos iznosi 1:1-1:2). Međutim, osim holesterola kompleksiranog sa ostalim komponentama lipidnog dvosloja, određena količina holesterola u plazma membrani predstavlja tzv. *aktivni* holesterol ćelijskih membrana koji može da se razmenjuje između intracelijskih odeljaka [140]. Ovaj *pool* holesterola je lako dostupan, te brzo cirkuliše između ćelijskih odeljaka, povezujući ćelijske strukture u funkcionalnu celinu i na taj način predstavlja važan regulator ćelijske homeostaze holesterola [70]. Regulacija ove homeostaze je bazirana na mehanizmu povratne sprege, a započinje redistribucijom aktivnog holesterola u endoplazmatski retikulum i mitohondrije, što znači da se količina holesterola u endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijama menja kao odgovor na male promene u sadržaju *aktivnog* holesterola u plazma membrani. Vezivanje sterola u intracelijskim organelama za regulatorne enzime, transportere i transkripcione faktore (*SREBP*, *SCAP*, *Insig-1*, *LXR*), reguliše homeostazu koja za cilj ima ponovno uspostavljanje stehiometrijskih odnosa sterola i drugih lipida u plazma membrani. Ovaj mehanizam je ključan za održavanje intracelularne homeostaze holesterola [70, 140].

Metabolička aktivnost može da usmeri redistribuciju holesterola nasuprot difuzionoj ravnoteži koja je prisutna u stanju dinamičke ravnoteže. Tako, usled povećanih metaboličkih potreba u stanjima intenzivne deobe i proliferacije ćelija, može doći do ubrzane sinteze, esterifikacije, hidrolize, ekskrecije, aktivnog transporta i transformacije holesterola u aktivne metabolite i signalne molekule [70, 140-142].

1.4.7 Homeostaza holesterola u cirkulaciji

Procesi sinteze i apsorpcije holesterola, kao osnovni izvori ovog molekula, usko su povezani i međusobno regulisani kako bi se održavao balans celokupnog holesterola u organizmu. Održavanje balansa holesterola manifestuje se tako što povećanje sinteze dovodi do smanjenja apsorpcije i obrnuto [110]. Postojanje ovog mehanizma je pokazano u studijama koje su koristile statine kako bi se ostvarila direktna inhibicija HMG-CoA-reduktaze [144]. Usled smanjenja nivoa sinteze primenom terapije statinima, zapaženo je proporcionalno povećanje apsorpcije holesterola. Tako su kod osoba na terapiji atorvastatinom primećene niže koncentracije markera sinteze holesterola za 76%, ali i posledično povećanje apsorpcije holesterola za 70%. Kod istih ispitanika je zapažena i ushodna regulacija gena za sintezu i preuzimanje holesterola (*SREBP-2*, *HMG-CoA* reduktaze, *LDLR*, i *NPC1L1*) i nishodna regulacija *ABCG5/8*, odgovornih za efluks holesterola iz enterocita do lumena intestinuma [143]. Ovaj kompenzatorni mehanizam omogućava održavanje homeostaze između dijetarnog, *de novo* sintetisanog i ekskretovanog holesterola. Takođe, studije su pokazale da povećani unos holesterola umanjuje sintezu, ali i dovodi do povećane konverzije holesterola u žučne kiseline, koje se potom konjuguju sa aminokiselinama, sekretuju u žuč i eliminišu putem fecesa [145]. Međutim, poznato je da se tek oko 5% žučnih kiselina eliminiše, dok se ostatak reapsorbuje u tankom crevu [146]. Imajući u vidu ovaj proces recirkulacije žučnih kiselina, može se zaključiti da u stanjima regulisane homeostaze holesterola, glavni odgovor organizma na povećan unos holesterola predstavlja smanjenje njegove sinteze [82].

Međutim, McNamara i saradnici su primetili da postoji veoma velika varijabilnost između ispitanika u odgovoru na povećanu apsorpciju holesterola [147]. Ovu varijabilnost je moguće pripisati promenama u transkripcionoj i posttranskripcionoj regulaciji proteina koji su u vezi sa efluksom i preuzimanjem holesterola, ali i njegovom sintezom [82]. Utvrđeno je tako da postoje različiti obrasci homeostaze holesterola koji se mogu pripisati pomenutim interindividualnim razlikama i istaknuta je potreba za određivanjem nivoa sinteze i apsorpcije holesterola, te procenom očuvanosti homeostaze u cilju personalizovanja preventivnih mera i terapije [110].

1.4.8 Lipoproteinske čestice - medijatori procesa održavanja homeostaze holesterola

Holesterol je lipofilno jedinjenje, koje se transportuje u cirkulaciji pomoću endogenih transportera, poznatih kao lipoproteinske čestice. I dijetarni holesterol kao i onaj koji je *de novo* sintetisan se transportuju kroz cirkulaciju lipoproteinskim česticama [148].

Osnovna uloga HDL u cirkulaciji je transport viška holesterola iz ćelija perifernih tkiva do jetre, gde se vrši njihova transformacija u žučne kiseline i eliminacija iz organizma. Reverzni transport holesterola (RTH) predstavlja značajnu komponentu procesa regulacije homeostaze holesterola. Najnovije studije su pokazale da u procesima intenzivne sinteze holesterola u ćeliji, i prekursori sinteze holesterola putem RTH bivaju preuzeti na HDL čestice.

Osim toga, kao što je već opisano HDL čestice imaju značajnu ulogu u preuzimanju apsorbovanog holesterola i fitosterola iz enterocita.

LDL čestice su uključene u transport *de novo* sintetisanog holesterola iz jetre ka periferiji. Svi ovi procesi posredovani lipoproteinskim česticama, potpomažu održavanje homeostaze. Iz ovog razloga se pretpostavlja da bi i različite klase lipoproteina mogle imati različite i značajne uloge u mnogim oboljenjima, uključujući i kancer [149, 150].

1.4.9 Uloga lipoproteinskih čestica u malignim bolestima

Nekoliko studija je prikazalo snižene koncentracije holesterola u lipoproteinima u serumu onkoloških pacijenata. Studije su pokazale da 41,3% pacijenata sa CRC imaju povišene nivoe holesterola sadržanog u LDL (LDL-h), dok većina pacijenata ima normalne nivoe holesterola sadržanog u HDL (HDL-h) [151]. Dodatno, sniženi HDL-h i povišeni LDL-h su dovedeni u vezu sa lošijim prognostičkim ishodima kod pacijenata sa metastatskim CRC [152]. Sa druge strane, prilikom analize lipidnog profila kod pacijenata sa malignim bolestima zapaženo je da se razvoj malignog tumora ipak u najvećoj meri odražava na koncentracije holesterola u HDL česticama [153].

Zapažena je negativna korelacija koncentracija HDL-h sa rizikom za nastanak kancera, ali i pozitivna korelacija sa ekspresijom *ciklina D*, molekula koji se dovodi u vezu sa inicijacijom i progresijom tumorogeneze [154]. Nekoliko studija je pokazalo da lipoproteini mogu da stimulišu rast ćelija kancera dojke *in vitro*, kao i povećavaju

agresivnost malignih tumora kod miševa [155]. Takođe, dodavanjem HDL u kulture ćelija indukovala se proliferacija ćelija humanog karcinoma dojke [156]. Ovi nalazi su konzistentni i sa studijama koje su pokazale povećanu ekspresiju SR-B1 u ćelijama kancera, što ukazuje na to da se tokom karcinogeneze, ćelije tumora koriste HDL česticama posredovanim RTH kako bi zadovoljile svoje potrebe za holesterolom [156]. Naime, kao što je već navedeno, tokom RTH, HDL uklanja višak holesterola sa periferije i usmerava ga ka jetri u cilju njegove eliminacije. Smanjeni nivoi HDL holesterola koji su jedna od karakteristika lipidnog profila kod onkoloških pacijenata su praćeni povišenom ekspresijom SR-B1. Međutim, ostaje da se istraži u kojoj meri povećana funkcionalnost SR-B1 doprinosi ovom snižavanju nivoa HDL holesterola. Takođe, postoje brojni pokušaji da se ovaj mehanizam iskoristi kao sistem za ciljanu aplikaciju lekova, pošto je primećeno da nemaligno tkivo pokazuje znatno manju ekspresiju SR-B1 u odnosu na maligno tkivo. Očekuje se da će ovaj način isporučivanja lekova do kancerske ćelije posredstvom HDL čestice značajno smanjiti rast tumora, ali i toksičnost hemoterapije [156, 157].

1.5 Struktura, hemijske osobine i metabolizam vitamina D

Metabolizam holesterola obuhvata i transformacije ovog biomolekula u različite derivate koji poseduju biološku aktivnost. Vitamin D, kao derivat holesterola, privlači značajnu pažnju istraživača [158].

Vitamini D grupe su lipofilna jedinjenja steroidne strukture. Dva najpoznatija predstavnika ove grupe vitamina su ergokalciferol (vitamin D₂) i holekalciferol (vitamin D₃). Vitamin D₂ se proizvodi u biljkama i gljivama, dok vitamin D₃ proizvode životinje i čovek [158, 159]. Kada se nađu u sistemskej cirkulaciji, vitamini D₂ i D₃ iz hrane, kao i vitamin D₃ iz kože, se vezuju za specifičan α 1-globulin (vitamin D-vezujući protein; *engl. vitamin D binding protein; VDBP*). Veruje se da ovaj protein ima ulogu u regulaciji cirkulišućih koncentracija kalcidiola (25(OH)D), kalcitriola (1,25(OH)₂D) i njihovih metabolita [160].

Vitamin D se u organizam unosi ishranom, ali i proizvodi u ćelijama kože. Nakon oralne ingestije vitamini D grupe se vezuju za hilomikrone i tako absorbuju iz tankog creva u limfni sistem [161]. Oko 50% oralno unete doze se uspešno absorbuje [162].

Proces fotosinteze vitamina D₃ počinje dejstvom UV B fotona talasne dužine 290-315 nm na provitamin D₃ (7-dehidroholesterol) u koži. Nakon što apsorbuje foton, molekul 7-dehidroholestera podleže reakciji fotolize B prstena i formira se previtamin D₃. Ovaj molekul je izuzetno termodinamički nestabilan i brzo podleže izomerizaciji trostrukih veza dajući vitamin D₃. Proces se odvija u membranama ćelija kože, nakon čega vitamin D₃ biva oslobođen u ekstracelularni prostor odakle dalje prelazi u dermalne kapilare i sistemsku cirkulaciju, i biva preuzet od strane VDBP [159].

Biološki značajni metaboliti vitamina D, ne poseduju intrizičku biološku aktivnost *per se*. Vitamini D₂ i D₃ moraju da se najpre hidroksilizuju u jetri do 25(OH)D, koji predstavlja cirkulišuću formu vitamina D i u fiziološkim koncentracijama ispoljava neznatnu biološku aktivnost na metabolizam kalcijuma. Najveći deo cirkulišućeg 25(OH)D metaboliše se u jetri preko 23,25(OH)₂D i 23,25,26(OH)₃D u neaktivne metabolite koji se izlučuju putem žuči [163]. Mali deo 25(OH)D podleže daljoj hidroksilaciji u ćelijama bubrežnih tubula. Nakon hidroksilacije u položaju C1 u bubrežima nastaje 1 α ,25(OH)₂D (kalcitriol), biološki aktivna forma vitamina D [158]. Zapaženo je da, osim bubrega, i aktivirani makrofagi, ćelije kolona, prostate, dojke, mozga, β ćelije pankreasa, vaskularni glatki mišići, neke ćelije limfoma, kože i kostiju takođe sintetišu 1,25(OH)₂D. Reakcije hidroksilacije katalizuju enzimi 25-hidroksilaza (*engl. cytochrome P450 family 2 subfamily member R1; CYP2R1*), sterol 27-hidroksilaza (*engl. cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1; CYP27A1*) i sterol kalcidiol 1-monooksigenaza (*engl. cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1; CYP27B1*), koji pripadaju grupi enzima CYP P450. Metabolisanje 25(OH)D do 1,25(OH)₂D regulišu paratireoidni hormon (PTH) i nivo fosfata u serumu. PTH i niske koncentracije fosfata povećavaju proizvodnju 1,25(OH)₂D. 25(OH)D i 1,25(OH)₂D predstavljaju supstrate za 24-hidroksilazu (*engl. cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1; CYP24A1*), koja se nalazi u bubrežima i ostalim tkivima. Ova hidroksilacija 1,25(OH)₂D u položaju C24 predstavlja prvi korak u procesu degradacije vitamina D do hidrosolubilnog produkta, kalcitrične kiseline, koja se izlučuje putem bubrega [158].

Poznato je da su koncentracije aktivnog metabolita 1,25(OH)₂D, regulisane na nivou bubrega mehanizmom povratne sprege. Tako, povećane koncentracije 1,25(OH)₂D indukuju aktivnost CYP24A1 te produkciju 24,25(OH)₂D, odnosno sopstveni katabolizam [164]. Ovaj homeostatski mehanizam se u poslednje vreme koristi i u cilju što preciznijeg određivanja statusa vitamina D, tačnije praćenju efektivne koncentracije vitamina D u

organizmu. Određivanje serumskog 25(OH)D, podložno je uticaju brojnih varijacija u odnosu na pol, godišnje doba, nadmorsku visinu, izloženost sunčevim zracima, ishranu, demografske varijable (etnička pripadnost, ITM), genetske faktore (polimorfizmi gena metabolizma i transporta). Postoje dokazi da analiza 24,25(OH)₂D može da pruži klinički značajne informacije koje bi mogle da umanje uticaj ovih interindividualnih razlika [165]. Wagner i saradnici ističu značaj određivanja 24,25/25VD odnosa, takozvanog odnosa metabolita vitamina D (*engl. vitamin D metabolite ratio; VDMR*), kao prediktora uspešnosti suplementacije vitaminom D₃. Ova studija pokazuje značaj istovremenog određivanja VDMR, kao novog markera za praćenje katabolizma vitamina D i odgovora na suplementaciju, kao i potencijal korišćenja ovog odnosa prilikom donošenja odluke o režimu doziranja [166]. Studije su pokazale da suplementacija vitaminom D dovodi do značajnog povećanja koncentracije 25(OH)D, što ukazuje da tokom suplementacije dolazi do indukcije katabolizma posredstvom povećanja CYP24A1 aktivnosti. Dodatno, autori su utvrdili da je VDMR određen pre početka terapije može da predvidi obim povećanja koncentracije 25(OH)D izazvan suplementacijom [166]. Informacije o metaboličkom profilu vitamina D otvaraju nove mogućnosti na polju individualizacije ishrane i terapije. Dodatno, sa analitičkog aspekta, prisustvo 24,25(OH)₂D u cirkulaciji predstavlja interferenciju prilikom određivanja 25(OH)D imunohemijskim metodama. Pretpostavlja se da bi uporedo određivanje oba metabolita omogućilo uklanjanje već pomenute interferencije. 25(OH)D je nesumnjivo klinički najrelevantiji marker statusa vitamina D u organizmu i najčešće određivan metabolit vitamina D, upravo zbog dostupnosti imunohemijskih metoda u rutinskoj kliničkoj praksi. Iz ovog razloga, neki autori pretpostavljaju da bi korekcija rezultata imunitestova za koncentraciju 24,25(OH)₂D pružio relevantnije kliničke zaključke [165]. Napredak u metodama tečne hromatografije otvorio je put razvoju pojedinih metoda kojima je moguće istovremeno kvantifikovati i 24,25(OH)₂D i 25(OH)D u serumu [167]. Pretpostavlja se da bi dalja istraživanja u tom smeru mogla da pruže dodatne dokaze o ulogama ovih metabolita u humanom organizmu.

Hemijski je okarakterisan veliki broj metabolita vitamina D i pretpostavlja se postojanje još nekih. Većinom, ovi metaboliti predstavljaju međuproizvode u degradaciji 1,25(OH)₂D i ne pokazuju biološku aktivnost, osim 1,25(OH)₂D-26,23-laktona koji nastaje u bubrezima kada su plazmatske koncentracije 1,25(OH)₂D veoma visoke [163]. Pretpostavlja se da ovaj lakton ima antagonističko dejstvo u odnosu na 1,25(OH)₂D i sprečava njegovu toksičnost i prekomernu produkciju [168].

1.5.1 Veza između biosintetskih puteva holesterola i vitamina D

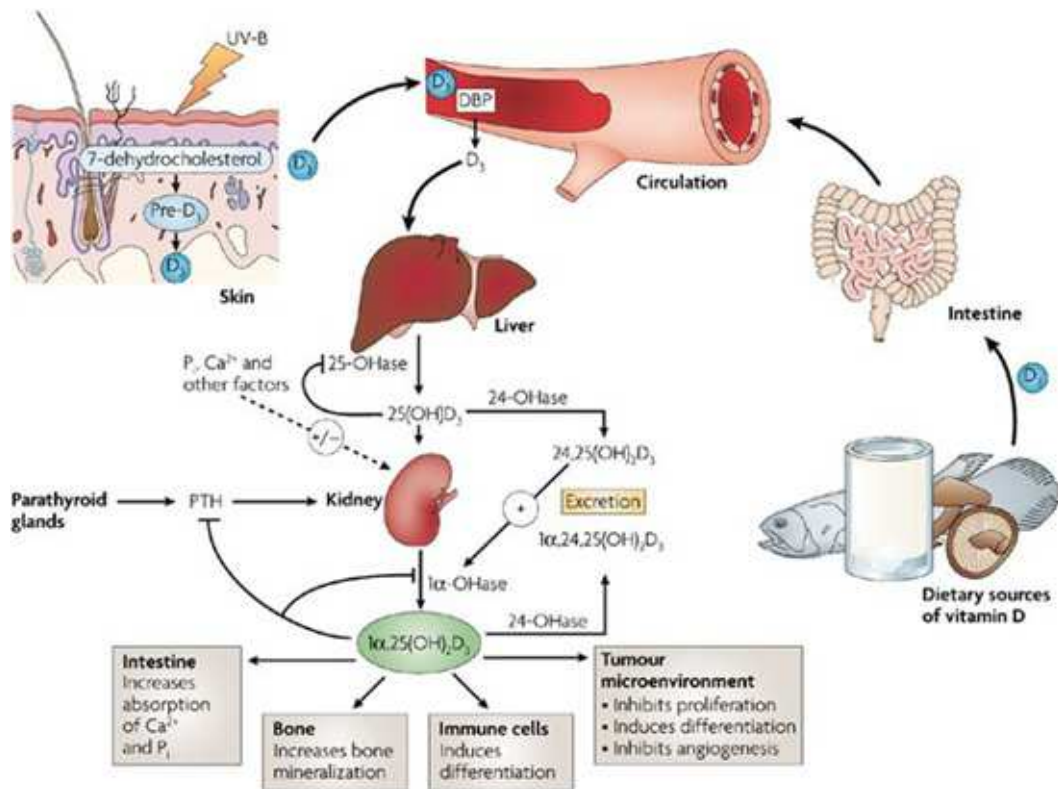
Poznato je da je prekursor u sintetskom putu holesterola, 7-dehidroholesterol (7-DHC), istovremeno i prekursor sinteze vitamina D. Nekoliko studija sugeriše da postoji veza između vitamina D i serumskog holesterola [169-174]. Prilikom izlaganja UV zračenju, 7-DHC biva konvertovan u previtamin D₃ i potom pod uticajem temperature dalje u vitamin D₃ (holekalciferol) [159]. Sa druge strane, enzim 7-dehidroholesterol reduktaza (DHCR7), krajnji enzim biosinteze holesterola u *Kandutsch-Russellovom* putu, katalizuje reakciju prevođenja 7-DHC u holesterol [75]. Prabhu i saradnici su ukazali na ulogu DHCR7 kao metaboličkog *prekidača* između sinteze holesterola i vitamina D [170, 171]. Eksperimenti na ćelijskim kulturama su pokazali da visoki nivoi holesterola u ćeliji inhibiraju ovaj enzim, što dovodi do zaustavljanja biosinteze holesterola. Posledično nagomilavanje 7-DHC povećava produkciju vitamina D u ćelijama kože [170]. Jedna od ponuđenih hipoteza odnosi se na to da fotoni UVB zračenja i enzim DHCR7 ostvaruju kompeticiju za zajednički supstrat 7-DHC u koži. S tim u vezi, nameće se zaključak da kod osoba sa visokom aktivnošću DHCR7 sinteza holekalciferola može biti manje efikasna, uz sledstveno višu koncentraciju holesterola u koži. Ovo potvrđuju i studije genotipizacije koje su pronašle vezu između polimorfizama DHCR7 i serumskih koncentracija 25(OH)D i holesterola. Nedavna studija je pokazala da u uslovima male izloženosti UV zracima, koncentracije supstrata 7-DHC utiču na regulaciju pomenutog metaboličkog procesa, u većoj meri nego aktivnost samog enzima DHCR7 [172]. Pored toga, pokazano je da holekalciferol i 7-DHC inhibiraju aktivnost HMG-CoA reduktaze u koži. Pri nižim koncentracijama 25(OH)D, usled manje izloženosti suncu i slabije inhibicije HMG-CoA reduktaze može se povećati sinteza 7-DHC. U prilog ovim tvrdnjama govori i podatak da su kod osoba sa *Smith-Lemli-Opitz* sindromom (sindrom sa genetskom deficijencijom DHCR7) koncentracije vitamina D povišene [173].

1.5.2 Mehanizam delovanja vitamina D

Nevezane, cirkulišuće forme kalcitriola, odnosno 1,25(OH)₂D, sposobne su da proizvedu fiziološki efekat dejstvom na ciljna tkiva i to posredstvom genomskih i negenomskih mehanizama prenošenja signala. Genomski mehanizam dejstva 1,25(OH)₂D sličan je dejstvu steroidnih i tireoidnih hormona na ciljna tkiva [174]. Poput hormona, aktivan oblik vitamina D se sintetiše kao odgovor na neki fiziološki stimulus, sistemskom

cirkulacijom se prenosi do mesta dejstva koje predstavlja specifični, visokoafinitetni, nuklearni receptor. Receptor za $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ je DNK-vezujući protein sa visokim afinitetom za vezivanje $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [158]. Afinitet ovih receptora za $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ je oko 1000 puta veći nego afinitet za $25(\text{OH})\text{D}$. Međutim kako je koncentracija ovog metabolita mnogo veća nego koncentracija $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, pretpostavlja se da i $25(\text{OH})\text{D}$ ostvaruje biološki efekat. Receptor se nalazi u najmanje 26 ciljnih tkiva i reguliše više od 50 gena. Po građi je sličan receptorima za steroidne i tireoidne hormone. Sastoji se od 3 domena: N-terminalni DNK- vezujući domen sa dva Zn prsta koja se vezuju za DNK u regionima tzv. *regulatornim elementima odgovora na vitamin D* (engl. *vitamin D responsive elements; VDRE*), C-terminalnog mesta za vezivanje liganda, i regiona koji premošćava ova dva domena [175]. Rezultat vezivanja $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ za vitamin D receptor (VDR) je formiranje kompleksa, njegovo vezivanje za DNK i modulacija ekspresije hormon-senzitivnih gena. Modulacija transkripcije uzrokuje indukciju ili supresiju specifičnih informacionih ribonukleinskih kiselina (iRNK) i na kraju promene u ekspresiji proteina koji su neophodni za nastanak biološkog odgovora. VDR ispoljava svoj genomski efekat vezivanjem za VDRE koji se nalaze u promoterskim regionima ciljnih gena u tkivima [174]. Iako se VDR dominantno vezuje za RXR (engl. *retinoid X receptor*), obrazujući VDR-RXR dimer, VDR se takođe može vezivati i za druge nuklearne receptore poput tireoidnih, receptora za vitamin A, PPAR- γ i dr. Receptor je široko distribuiran u organizmu što ukazuje na njegove brojne i različite homeostatske funkcije [158].

Otkriće ekspresije receptora za vitamin D u različitim humanim tkivima uključujući imunske ćelije, mišiće, adipozno tkivo, kostnu srž, kolorektalni epitel i ćelije kancera proširilo je značaj vitamina D van okvira osteotropne funkcije. (slika 9)



Slika 9. Pregled metabolizma, fizioloških i patoloških funkcija vitamina D. Preuzeto iz: Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):684-700.

1.5.3 Vitamin D i maligne bolesti

Veliki broj do sada identifikovanih metabolita vitamina D i njihovi mnogostruki efekti predstavljaju aktivno polje istraživanja kod kompleksnih patofizioloških stanja poput kancera. U okviru antikancerogenog dejstva vitamina D izdvajaju se antiinflamatorni, antioksidativni, prodiferencijacioni i antiapoptotski efekti, opisani kako u zdravim, tako i u maligno transformisanim ćelijama [176, 177].

Hipoteza o vezi između ultravioletnog B zračenja (UVB), vitamina D i kancera je predložena još 1974. godine kada je uočena obrnuta korelacija između regionalne distribucije sunčevog zračenja i mortaliteta od kancera kolona. Kasnije su tome pridodati i podaci koji su se ticali kancera dojke i jajnika i potvrđen je niži mortalitet u regionima koji su bili više izloženi sunčevom zračenju. Veza između vitamina D i kancera je potvrđena i brojnim studijama [178]. Studija Churilla i saradnika iz 2011. je pokazala da onkološki pacijenti imaju značajno niže srednje vrednosti serumskih koncentracija vitamina D u odnosu na pacijente lečene u ustanovama primarne zdravstvene zaštite, koji nisu oboleli od kancera, sa istog geografskog područja [179]. Ista studija govori i u prilog činjenici da je

deficijencija vitamina D široko rasprostranjena kod pacijenata obolelih od kancera i da korelira sa napredovanjem bolesti. Visoka prevalencija deficijencije vitamina D je u vezi sa kancerima koji se javljaju u anatomskim regijama glave i vrata, dojke, vulve, prostate, pankreasa, želuca, jajnika, jednjaka, usne duplje i CRC, mijeloproliferativnim neoplazmama i mijelodisplastičnim sindromima, multiplim mijelomom, ne-Hočkinovim limfomom i hroničnom limfocitnom leukemijom [180]. Sa druge strane, serumske koncentracije 25(OH)D iznad 25 nmol/L dovode se u vezu sa smanjenjem incidence za nastanak kancera, smanjenjem ukupnog mortaliteta uzrokovanog kancerom i smanjenjem mortaliteta od kancera digestivnog trakta. Poboljšanje statusa vitamina D može doprineti i smanjenju rizika od nastanka CRC [181].

Meta-analiza Yin i saradnika je pokazala da se povišene koncentracije vitamina D u serumu iznad 50 nmol/L mogu povezati sa smanjenjem rizika za razvoj rektalnog kancera za 59%, a kancera kolona za 22% [182]. Visoki nivoi 25(OH)D se dovode u vezu sa boljom prognozom kod kancera dojke, prostate i pluća u odnosu na niske nivoe 25(OH)D [183]. U studiji je prikazana korelacija između serumskih nivoa 25(OH)D ispod 27 ng/ml i rizika za pojavu kancera dojke posle menopauze, dok je rizik bio umanjen kada je za ciljnu koncentraciju 25(OH)D uzeta vrednost od 35 ng/ml [184]. Ovaj podatak ukazuje na to da je neophodno odrediti precizne *cut-off* vrednosti koncentracija 25(OH)D koje predstavljaju povišen rizik, kako bi prevencija bila delotvorna. Pored toga, primećeno je i da status vitamina D ima veze sa samom prognozom bolesti i stopom mortaliteta [185].

Mnoge epidemiološke i opservacione studije su konstatovale vezu između deficijencije vitamina D i incidencije i/ili mortaliteta od CRC. Sa druge strane, i dalje postoji kontroverza u vezi sa analizom i interpretacijom podataka mnogih epidemioloških i prospektivnih interventnih studija. Nakon korekcije za već poznate faktore rizika za nastanak CRC, primećeno je da se kod pacijenata sa CRC sa visokim koncentracijama 25(OH)D u cirkulaciji javlja za 30-40% manji rizik u odnosu na pacijente sa niskim koncentracijama 25(OH)D u serumu [186]. Dodatno, neke studije su dovele u vezu polimorfizme gena za vitamin D sa prognozom CRC i odgovorom na terapiju [187]. Različite studije na animalnim modelima, analizirale su efekat ishrane sa visokim i niskim sadržajem vitamina D, te kao i studije sprovedene na genetski modifikovanim miševima, pokazale da vitamin D inhibira tumorogenezu u kolonu [188]. Na osnovu ovih i sličnih podataka se zaključuje da vitamin D poseduje protektivnu ulogu kada je u pitanju CRC, koja se ostvaruje ili smanjivanjem rizika i/ili obustavljanjem tumorogeneze. Pojedina

istraživanja su pokazala da kalcitriol promoviše diferencijaciju epitelijskih ćelija kolona doprinoseći tako održavanju intestinalne epitelijske barijere [189]. Dodatno, vitamin D potpomaže održavanje intestinalne homeostaze posredstvom kompleksnih efekata koje ostvaruje na različite ćelije imunskog sistema, enzime antioksidativne zaštite i regulaciju mikrobioma [190, 191]. Takođe, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira proliferaciju, angiogenezu i invazivni kapacitet ćelija karcinoma, čineći ih osjetljivim na apoptozu. Pored toga, on sprečava aktivaciju stromalnih fibroblasta inhibirajući njihovu sposobnost da izmene ekstracelularni matriks i indukuju migraciju ćelija kancera [192].

Iz svega navedenog se da zaključiti da vitamin D poseduje širok dijapazon antikancerogenih i hemoprotektivnih efekata, te bi rasvetljavanje mehanizama nastanka široko rasprostranjene deficijencije ovog hormona moglo da doprinese prevenciji malignih bolesti.

2 *Ciljevi istraživanja*

Rasvetljavanje metaboličkih mehanizama koji su aktivni u ćelijama kancera otvara mogućnost za otkrivanje novih ranih biomarkera, koji bi omogućili brzu i efikasnu identifikaciju pojedinaca sa povećanim rizikom i uputili ih na adekvatne preventivne i terapijske procedure. Napretkom koji je postignut na polju razvoja novih analitičkih tehnologija, stvorene su mogućnosti za personalizovnim pristupom proceni rizika od oboljevanja, kao i lečenju malignih bolesti. Međutim, nove potencijalne biomarkere je potrebno detaljno validirati, kako sa analitičkog, tako i sa kliničkog aspekta, pre uvođenja u rutinsku kliničku praksu.

Aktuelna saznanja o uticaju holesterola, njegovih derivata, prekursora i metabolita na rizik za pojavu CRC su oprečna, tako da su dalja istraživanja u ovoj oblasti neophodna. Jedan od aktivnih derivata holesterola je vitamin D. Iako je deficijencija vitamina D odavno povezana sa nastankom i razvojem kancera, potencijalna veza ove deficijencije sa metabolizmom holesterola nije dovoljno ispitana.

S obzirom na sve navedeno, ciljevi našeg istraživanja su bili:

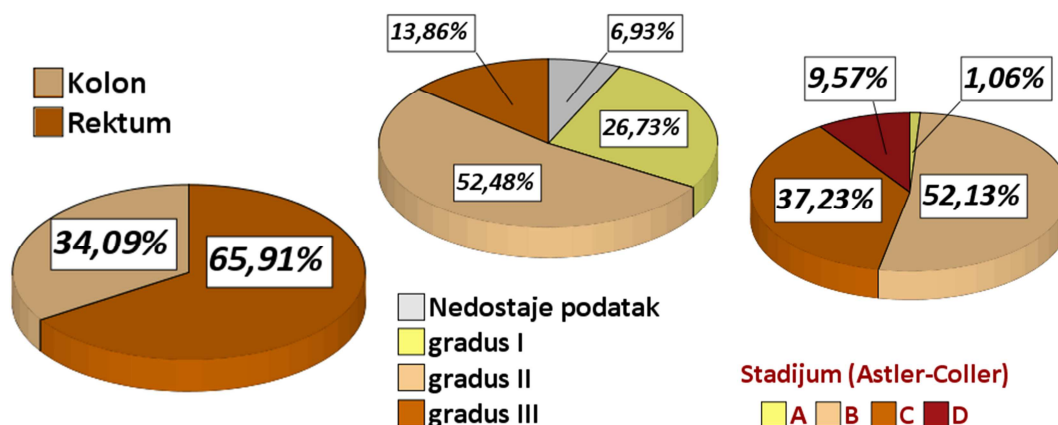
- ❖ Uvođenje i validacija HPLC-MS/MS metode za određivanje neholesterolskih sterola u serumu (NHS) i serumskoj HDL frakciji (NHS_{HDL});
- ❖ Uvođenje i validacija HPLC-MS/MS metode za određivanje metabolita vitamina D u serumu;
- ❖ Određivanje i analiza koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika;
- ❖ Ispitivanje povezanosti ovih biomarkera sa parametrima lipidnog statusa kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika;
- ❖ Analiza zastupljenosti NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata i zdravih ispitanika;
- ❖ Utvrđivanje postojanja različitih obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola u zavisnosti od prisustva i težine bolesti;

- ❖ Određivanje koncentracije metabolita vitamina D i VDBP u serumu pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika i ispitivanje razlika u koncentracijama između ove dve grupe;
- ❖ Ispitivanje uticaja sezone, starosti, pola, gojaznosti i statusa lipidnih parametara na koncentraciju metabolita vitamina D u serumu kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika;
- ❖ Ispitivanje povezanosti između metabolizma holesterola i vitamina D kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika;
- ❖ Utvrđivanje potencijala svih ispitivanih biomarkera u predikciji rizika za nastanak CRC.

3 Materijal i metode

3.1 Studija, ispitanici i uzorci

Ovo istraživanje je dizajnirano kao opservaciono i prvobitno je uključivalo 126 pacijenata sa postavljenom dijagnozom CRC. Selekcija ispitanika izvršena je u periodu između 2014. i 2016. godine na Klinici za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Za učešće u studiji su selektovane osobe kojima je prvi put postavljena dijagnoza CRC, te su primljeni u Kliniku za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije. Nakon standardnih dijagnostičkih procedura, sprovedenih u saglasnosti sa smericama propisanim u *Nacionalnom vodiču za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma*, pacijenti su upućivani na elektivnu resekciju kolorektuma. Kriterijumi uključivanja pacijenata u studiju bili su: odraslo doba, prva pojava bolesti, odsustvo drugih malignih bolesti ili ne-malignih sistemskih bolesti creva, bubrega i jetre, odustvo upotrebe hipolipidemijske terapije, suplemenata vitamina D i nekorišćenje neoadjuvantne hemioterapije. Postoperativni histopatološki nalaz potvrdio je prisustvo adenokarcinoma kolorektuma kod 121 pacijenta. Nakon isključivanja ispitanika sa nepotpunim kliničkim ili laboratorijskim podacima, finalna grupa pacijenata se sastojala od 101 ispitanika (34 žena i 67 muškaraca), starosti od 32 do 83 godine. Na dijagramima su prikazane karakteristike grupe pacijenata sa CRC u odnosu na primarnu lokalizaciju tumora, stadijume i graduse potvrđene patohistološkim nalazom (slika 10).



Slika 10. Karakteristike ispitivane populacije pacijenata sa CRC

Koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola su određene kod 96 pacijenata, dok su koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji određene kod 73 pacijenta. Status vitamina D određen je kod 82 učesnika. Za kontrolnu grupu (KG) prvobitno smo selektovali 114 ispitanika (58 žena i 56 muškaraca), zdravih volontera starosti od 30 do 75 godina, odabranih prilikom redovnih godišnjih sistematskih pregleda. Svi ispitanici u kontrolnoj grupi zadovoljavali su sledeće kriterijume: odrasla životna dob, negativna porodična anamneza za CRC, odsustvo bilo kakve akutne ili hronične maligne i nemaligne bolesti, odusustvo bilo koje terapije koja bi mogla da utiče na njihov lipidni status ili nivo vitamina D. Zbog nedostatka uzorka, koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji određene su kod 93, a status vitamina D kod 77 zdravih ispitanika. Relevantni podaci o učesnicima u istraživanju dobijeni su korišćenjem standardizovanog upitnika koji je osmišljen i odobren na Katedri za medicinsku biohemiju i odobren od strane Etičkog odbora, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Prikupljene su osnovne informacije o antropometrijskim karakteristikama pacijenata, navikama, životnom stilu i ishrani, upotrebi bilo kakvih lekova i ličnoj i porodičnoj anamnezi. Na osnovu podataka o težini i visini svakog ispitanika, računski je određen indeks telesne mase (ITM), korišćenjem sledećeg obrazca: $ITM = \text{telesna težina (kg)} / \text{telesna visina (m}^2\text{)}$. Iste procedure prikupljanja podataka su korišćene za pacijente i kontrolnu grupu i obe grupe su proučavane u istom vremenskom periodu.

Protokol studije je dizajniran prema etičkim principima Helsinške deklaracije. Etički komitet Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br. 530/2) i Etički odbor Vojnomedicinske akademije pažljivo su ispitali i odobrili studiju. Svi učesnici su informisani o cilju i dizajnu studije i svi su potpisali informisani pristanak pre uključivanja u studiju.

3.2 Metode za određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih parametara

Određivanje koncentracije ukupnog holesterola (UH), TG, LDL-h, HDL-h, ukupnih proteina i albumina izvršeno je upotrebom biohemijskog analizatora Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, SAD) pomoću komercijalnih testova za rutinsku primenu (Biosystems, Spain).

Koncentracije UH je određena *CHOD-PAP* metodom, koncentracije TG su određene *GPO-PAP* metodom, a koncentracije HDL-h i LDL-h su određene direktnim testovima. Koncentracija ukupnih proteina je određena komercijalnom rutinskom metodom sa bakar (II) acetatom. Koncentracija albumina određena je reakcijom sa bromkrezol zelenim.

3.3 Metode za kvantitativnu analizu NHS u serumu i HDL frakciji

3.3.1 Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa

Za identifikaciju pikova dezmosterola, 7-dehidroholesterola, latosterola, kampesterola i β -sitosterola koristili smo analitičke standarde HPLC čistoće (Supelco, Bellefonte, PA, SAD). Kao interni standard (IS) koristili smo deuterizovani analog holesterola d₆-holesterol (HPLC čistoća) proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Standard holesterola čistoće > 99% i goveđi serumski albumin (BSA) su nabavljeni od proizvođača Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD), dok je kalijum hidroksid (KOH) proizveden od strane POCH (Center Valley, PA, SAD). Korišćeni su etanol, metanol, n-heksan i acetonitril (HPLC čistoća) proizvođača Fisher (Pittsburgh, PA, SAD).

Za inicijalno razdvajanje neholesterolskih sterola je korišćena kolona C-18 Porochell 120-EC kolone (75 × 4,6mm × 2,7 μ m) (Agilent Technologies, SAD). Uspešno razdvajanje, dalji razvoj i validacija metode kao i analiza uzoraka izvršeni su upotrebom C-18 Porochell 120-EC kolone (150 × 4,6mm × 2,7 μ m) (Agilent Technologies, SAD).

Komercijalni reagens za taloženje ne-HDL holesterola proizveo je BioSystems (Costa Brava, Barcelona, Španija) i sadržao je fosfotungstat (0,4 mmol/L) i magnezijum hlorid (20 mmol/L). Tokom razvoja metode korišćene su kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (*engl. solid phase extraction, SPE*) X-C Strata (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) i Oasis HLB (Waters, Milford, MA, SAD)

Sav laboratorijski materijal koji se koristi u preanalitičkoj i analizičkoj fazi procesa određivanja koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji sačinjen je isključivo od borosilikatnog stakla ili plastike visoke gustine (nastavci za pipete, Pasterove pipete, itd.). Pored toga, procedura pranja staklenog posuđa bila je vrlo rigorozna, a podrazumevala je upotrebu anjonskog deterdženta, zatim ispiranje običnom i destilovanom vodom, uranjanje staklenog posuđa u rastvor hrom-sumporne kiseline preko noći, ispiranje destilovanom vodom i sušenje. Ove procedure se sprovode kako bi se umanjio uticaj interferenata iz plastike [193], ili nedovoljno dobro opranog posuđa na kvantifikaciju NHS. Uoči samog početka rada staklene epruvete sa zatvaračima napravljenim od politetrafluoroetilena (*engl. polytetrafluoroethylene, PTFE*) su isprane n-heksanom.

3.3.2 Priprema uzoraka za HPLC-MS/MS analizu ukupne koncentracije NHS u serumu

U staklene konusne epruvete pripremljene detaljnim protokolom pranja i ispranih n-heksanom dodato je po 50 μ L IS i upareno do suva pod blagom strujom azota. Na ovaj način pripremljene epruvete je moguće čuvati nedelju dana na -20 °C. Pre pripreme svake serije uzoraka epruvete sa IS se odmrznu i u njih se dodaje po 100 μ L seruma. Nakon kratkog mešanja, u svaku epruvetu se dodaje i po 1 mL 2% KOH u etanolu nakon čega se smeša snažno meša u toku 15 s kako bi se omogućilo taloženje proteina. Naredni korak je bazna hidroliza koja se odvija tokom inkubacije smeše 30 min na 45 ° C. Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorci se razblažuju sa 500 μ L dejonizovane vode HPLC čistoće, i dodaje se po 2 mL n-heksana u svaki uzorak. Nakon snažnog vorteksiranja u trajanju od 30 sekundi i nakon centrifugiranja 5 min na 1500 \times g gornji sloj se pažljivo uklanja i prebacuje u drugu čistu staklenu epruvetu. Proces ekstrakcije se obavlja ukupno tri puta. Svi organski slojevi se na kraju sjedinjuju u istu epruvetu nakon čega se dodaje 4 mL dejonizovane vode HPLC čistoće kako bi se uklonio višak KOH. Ekstrakt se zatim pažljivo sakuplja staklenom pipetom i prebacuje u čistu epruvetu, a zatim suši pod blagim mlazom

azota i na kraju rekonstituiše sa 20 μL metanola HPLC čistoće. Na samom kraju, 10 μL metanolnog ekstrakta se injektuje u kolonu. Nakon analize koncentracije se izračunavaju iz odgovarajućih kalibracionih krivih i koriguju prema faktoru ukoncentrisavanja.

3.3.3 Priprema uzoraka za analizu koncentracija NHS_{HDL} upotrebom HPLC-MS/MS

Protokol za taloženje ne-HDL čestica je definisao proizvođač taložnog reagensa. Ukratko, 200 μL seruma se dodaje u 500 μL taložnog reagensa, smeša se dobro promeša na vorteks-mešalici i ostavi da se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon toga, smeša se centrifugira na $6000 \times g$ tokom 10 minuta. Supernatant koji sadrži HDL frakciju seruma (650 μL) se potom pažljivo ukloni i prebaci u staklenu konusnu epruvetu koja sadrži prethodno uparen IS (50 μL d₆-holesterola, 1 mg / mL). Nakon toga, sledi prethodno opisana procedura pripreme uzorka za određivanje NHS u serumu, koja obuhvata saponifikaciju, ekstrakciju, te desalinizaciju, sušenje i rekonstituisanje ekstrakta u 20 μL metanola.

Na kraju se uzorci analiziraju na isti način kao i NHS u serumu, koristeći istu metodu na HPLC-MS/MS aparatu, a koncentracije se izračunavaju iz odgovarajućih kalibracionih krivih i koriguju za razblaživanje uzoraka reagensom za taloženje (3,5 puta) i ukoncentrisavanje uzoraka uparavanjem (10 puta).

3.3.4 Instrumentalni uslovi za kvantifikaciju NHS upotrebom HPLC-MS/MS

Kao što je već pomenuto, sve analize se izvode pod istim hromatografskim i MS-MS uslovima. Razdvajanje NHS se vrši korišćenjem kolone Porochell 120 EC (150 \times 4.6mm \times 2.7 μm). Hromatografski uslovi su podrazumevali izokratsko eluiranje sa stalnim protokom mobilne faze od 0,6 mL/min i temperaturom kolone od 30°C. Koristili smo sledeći sastav mobilne faze: 18:2:80, metanol: voda: acetonitril (v/v), sa 0,1% mravlje kiseline. Zapremina injektovanja uzorka je 10 μL , i svi NHS su eluirani za 45 min. Vrednosti m/z tranzicije za svaki analit prikazane su u tabeli 2. Kvantifikacija je izvršena praćenjem višestrukih reakcija (*engl. multiple reaction monitoring; MRM*) na tandem masenom spektrometru Agilent 6420 opremljenom MMI (*engl. multi mode*) jonskim

izvorom, odnosno integrisanim jonskim izvorom za hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom (*engl. atmospheric pressure chemical ionization; APCI*) i elektrosprej jonskim izvorom (*engl. electrospray ionization; ESI*). Za potrebe naše analize korišćen je APCI mode MMI jonskog izvora.

Tabela 2. Retenciona vremena i instrumentalni uslovi na MS/MS za interni standard i NHS.

<i>Analit</i>	<i>Retenciono vreme (min)</i>	<i>MRM tranzicije (m/z)</i>	<i>Koliziona energija (eV)</i>
<i>Holesterol-d6 (IS)</i>	30,437	375,3→105,2/95,2/81,3	50/35/52
<i>Dezmosterol</i>	20,329	367,2→95,3/81,2	52/52
<i>7-dehidroholesterol</i>	23,668	367,3→131,3/105,3/81,2	40/50/50
<i>Latosterol</i>	29,495	369,4→107/95/81,4	40//40/47
<i>Kampesterol</i>	36,444	383,2→161/135,3/81,3	20/20/40
<i>β-sitosterol</i>	43,469	397,3→95/69,4/107	40/40/40

3.3.5 Optimizacija surogat matriksa za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji

U preliminarnoj studiji, za procenu efekta matriksa, vršeno je poređenje signala smeše standarda NHS istih koncentracija, rastvorenih u metanolu i u lipidnom ekstraktu. Lipidni ekstrakt je dobijen standardnom procedurom pripreme uzoraka objašnjene u poglavlju 3.3.3. Takođe, ispitivani su i signali iz neobogaćenog lipidnog ekstrakta. Dobijeni signali NHS iz metanolnog rastvora, rastvora lipidnog ekstrakta i neobogaćenog lipidnog ekstrakta su poređeni, te dobijene razlike u vrednostima signala predstavljaju stepen uticaja matriksa na kvantifikaciju NHS.

Nakon što smo utvrdili stepen uticaja matriksa testirali smo uticaj različitih surogat matriksa na odnos površina pikova NHS i IS (PIK-NHS/PIK-IS). Prvi testiran matriks je bio metanol (MTH), drugi - 0,1% goveđi serumski albumin (BSA), treći - holesterol (CHL; 5 mmol/L), a četvrti je sadržao i proteine i holesterol (BSA + CHL; 0,1% + 5 mmol/L). Sva četiri ispitivana matriksa bila su opterećena istom smešom standarda NHS. Vrednosti dobijenih odnosa PIK-NHS/PIK-IS su upoređeni metodom linearne regresije, a potom ispitani i nivoi značajnosti za dobijene vrednosti nagiba (b) *Studentovim* t testom.

Na kraju, bilo je neophodno odrediti odgovarajuću koncentraciju holesterola za konstrukciju kalibracionih krivih. Pripremljeni su metanolni rastvori različitih koncentracija holesterola (2,5 mmol/L, 3,6 mmol/L, 5 mmol/L, 6,125 mmol/L, 7,5 mmol/L, 10,0 mmol/L). Konstantna količina NHS standarda je rastvorena u svakom od ovih rastvora holesterola i rezultati su testirani korišćenjem linearne regresione analize.

3.3.6 Validacija metode

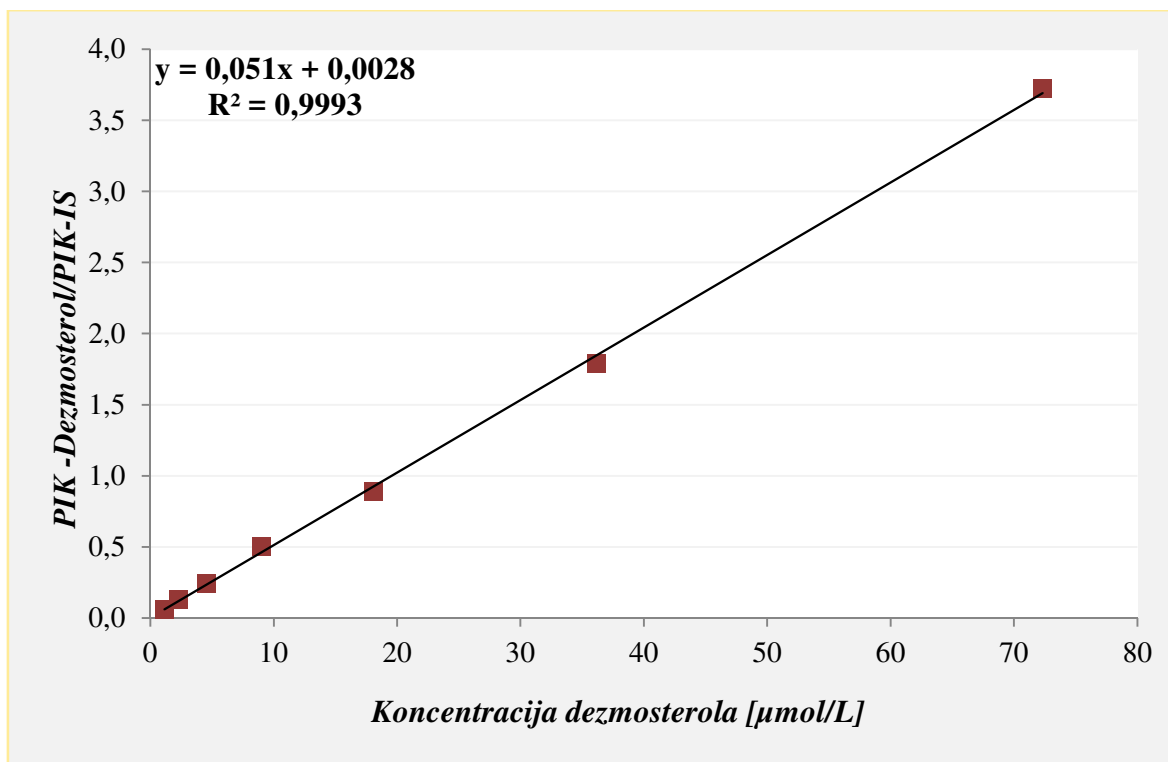
Posle uspostavljanja optimalnih preanalitičkih i analitičkih uslova za kvantifikaciju svih pet NHS, neophodno je bilo sprovesti validaciju metode prema preporukama Američke Uprave za hranu i lekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) [194] u okviru koje se ispituju sledeće karakteristike metode: linearnost, limit detekcije i limit kvantifikacije, preciznost, tačnost (*Recovery test*);

3.3.6.1 Linearnost

Nakon optimizacije kvantitativne metode konstruisane su odgovarajuće kalibracione krive. Na x-osi kalibracione krive nalazi se odnos između izmerene površine pika svakog sterola i površine pika IS, dobijenih u svakom kalibracionom nivou, dok se na y-osi nalaze odgovarajuće koncentracije svakog sterola. Pripremljeni su i analizirani sveži standardi za kalibraciju u 7 različitih nivoa koncentracije.

Za kvantifikaciju dezmosterola i 7-dehidroholesterola u serumu i HDL frakciji su korišćene iste standardne krive, dok su za kvantifikaciju svih ostalih NHS zbog različite koncentracije holesterola u matriksu korišćene posebne kalibracione krive za serum i za HDL frakciju. Naime, u serumu su latosterol, kampesterol i β -sitosterol kvantifikovani upotrebom kalibracione krive koja je sadržala 5 mmol/L holesterola, dok su isti ovi NHS u HDL frakciji kvantifikovani korišćenjem kalibracione krive sa 2,5 mmol/L holesterola.

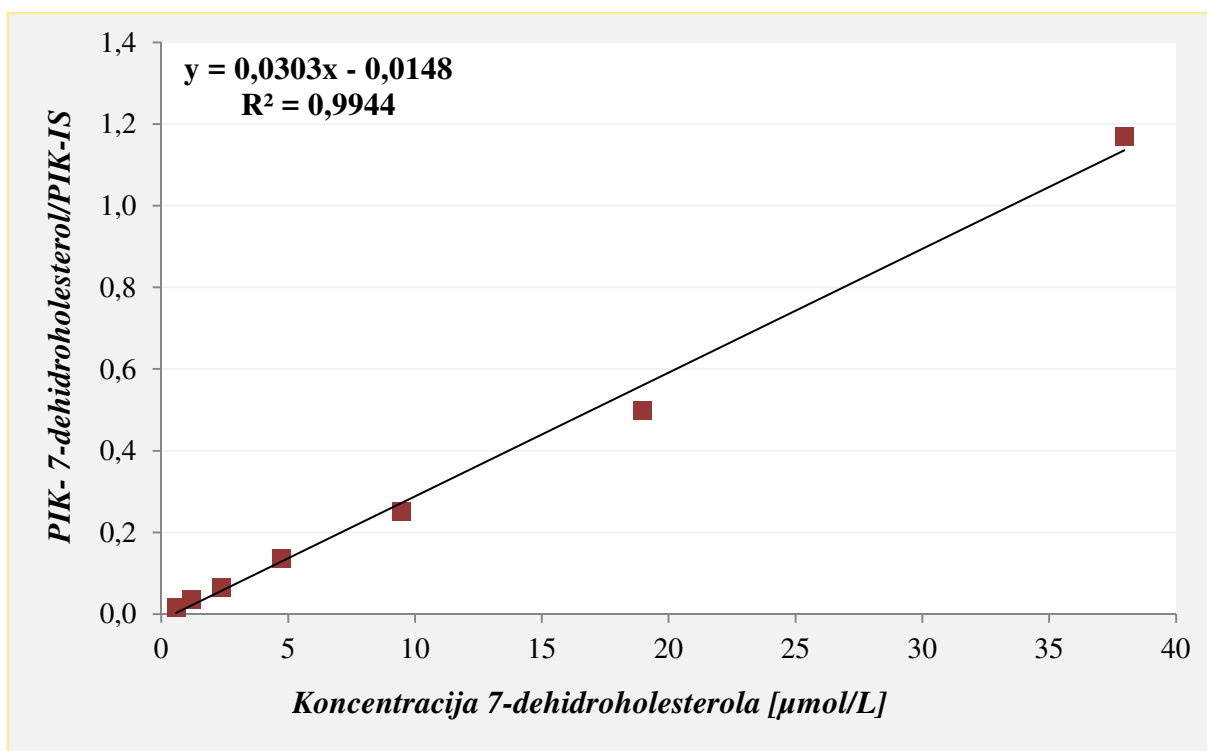
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju dezmosterola u serumu i HDL frakciji, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 11.



Slika 11. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije dezmosterola u serumu i HDL frakciji.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u rastvoru metanola i obuhvata raspon koncentracija 5,00 – 72,34 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9996.

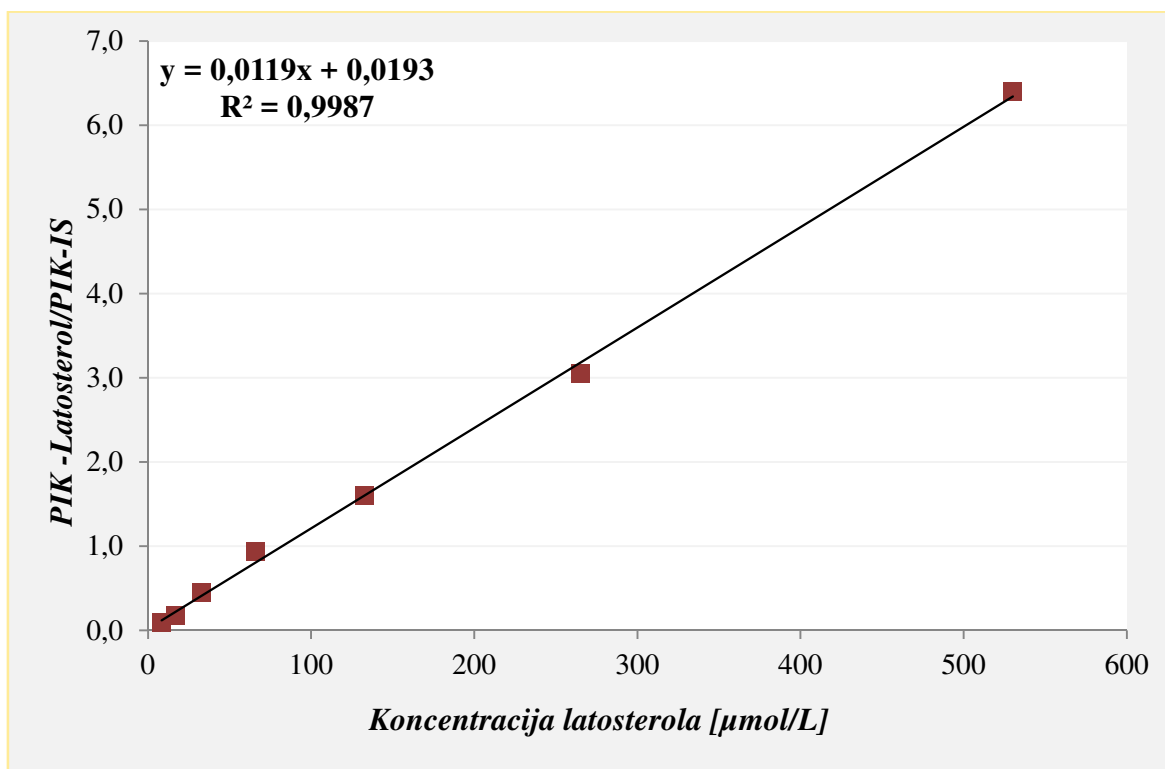
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvanifikaciju 7-dehidroholesterolu u serumu i HDL frakciji, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 12.



Slika 12. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije 7-dehidroholesterolu u serumu i HDL frakciji.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u rastvoru metanola i obuhvata raspon koncentracija 5,56 – 37,96 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9972.

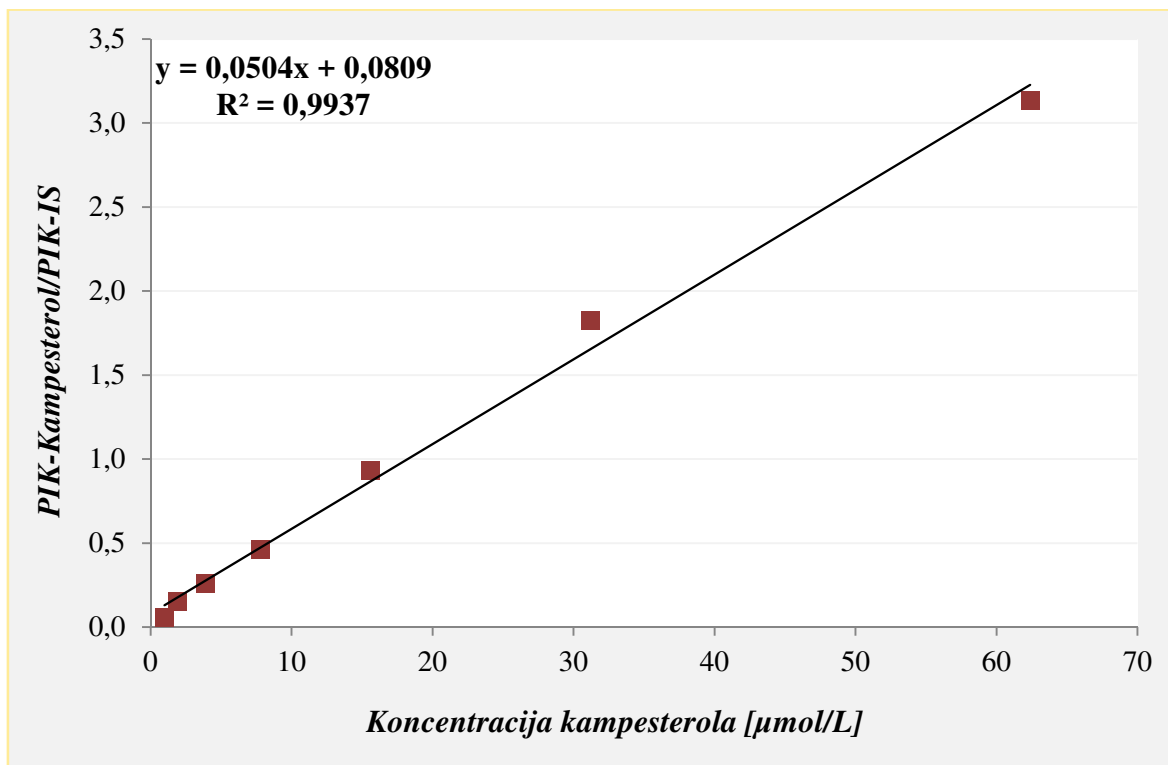
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju latosterola u serumu, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 13.



Slika 13. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije latosterola u serumu.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 3,56 – 530,19 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9993.

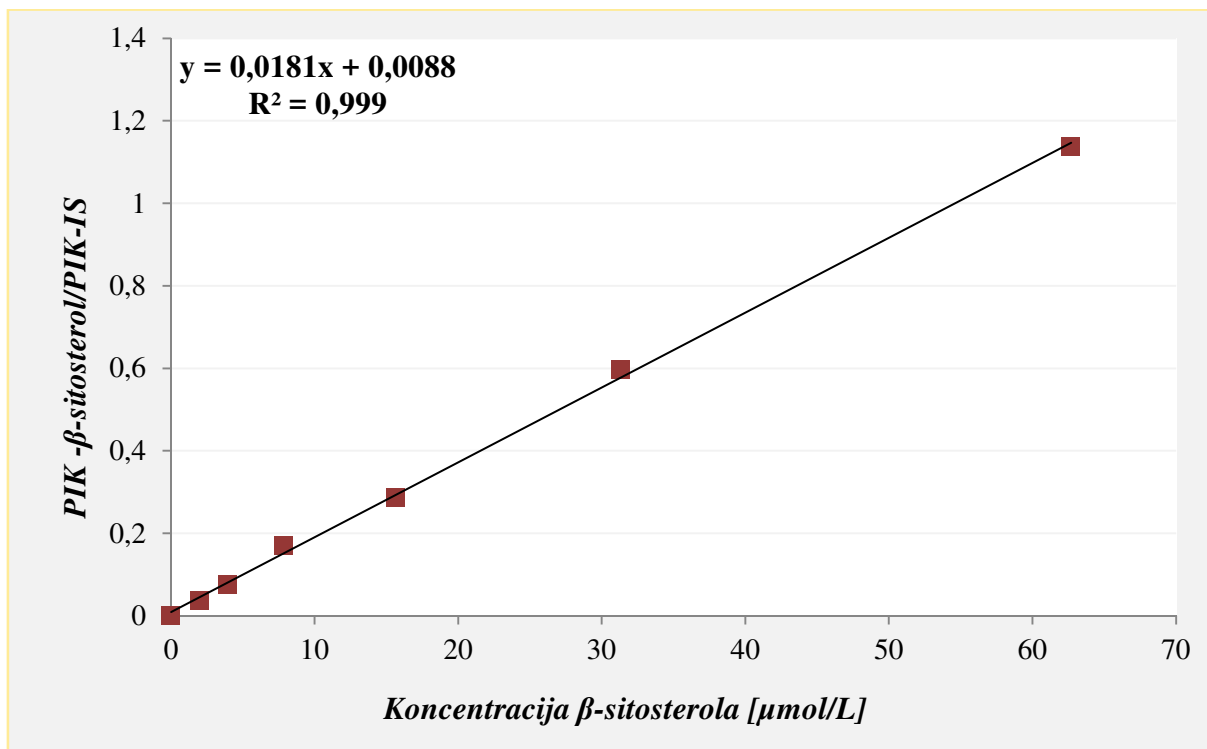
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju kampesterola u serumu, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 14.



Slika 14. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije kampesterola u serumu.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 3,06 – 62,39 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9968.

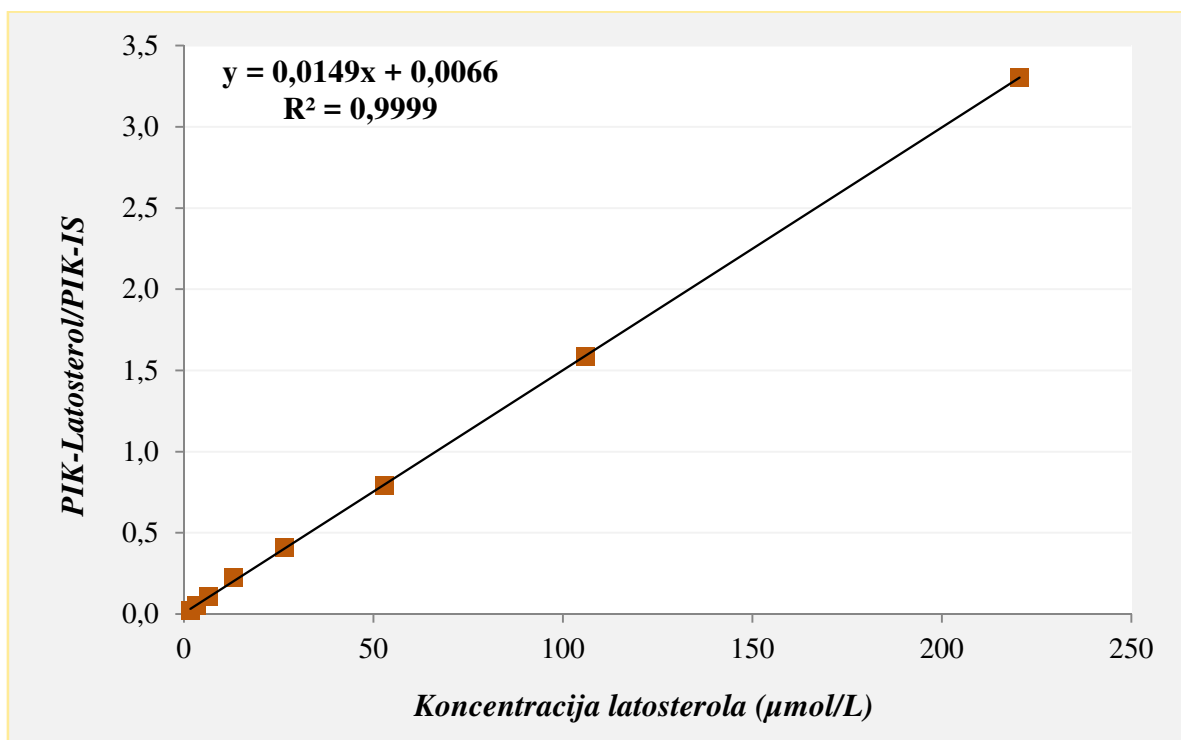
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju β -sitosterola u serumu, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 15.



Slika 15. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije β -sitosterola u serumu.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 8,41 – 62,69 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9995.

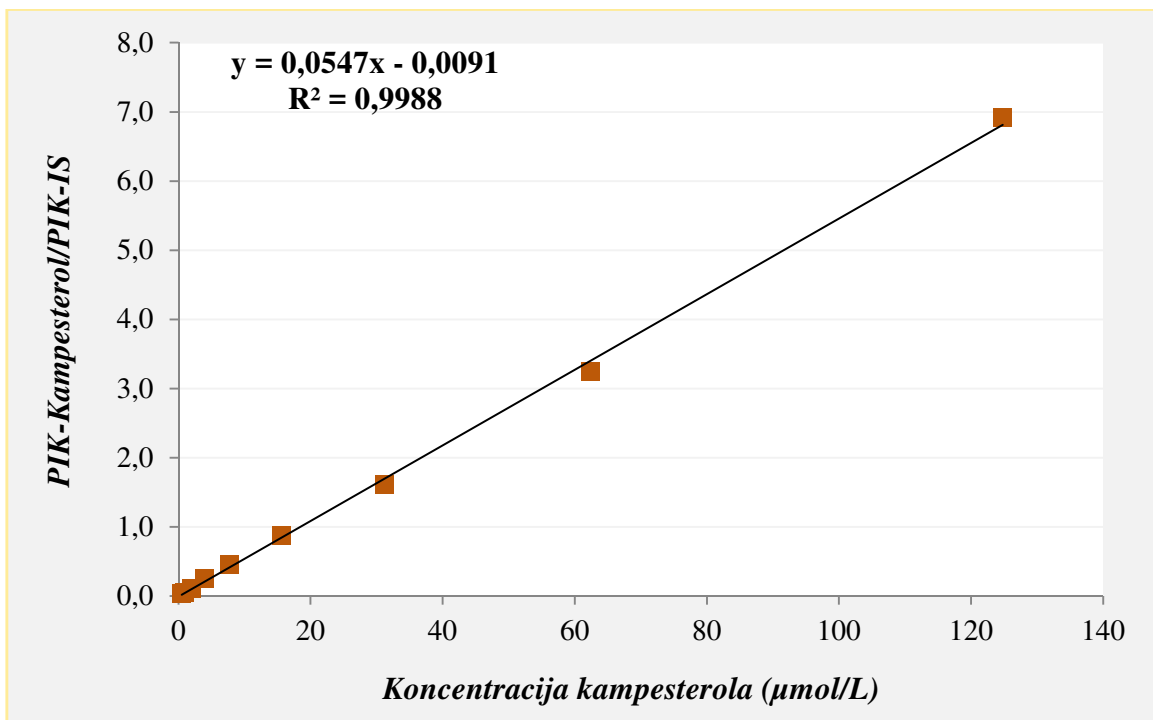
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju latosterola u HDL frakciji, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 16.



Slika 16. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije latosterola u HDL frakciji.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (2,5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 3,56 – 530,19 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,99995

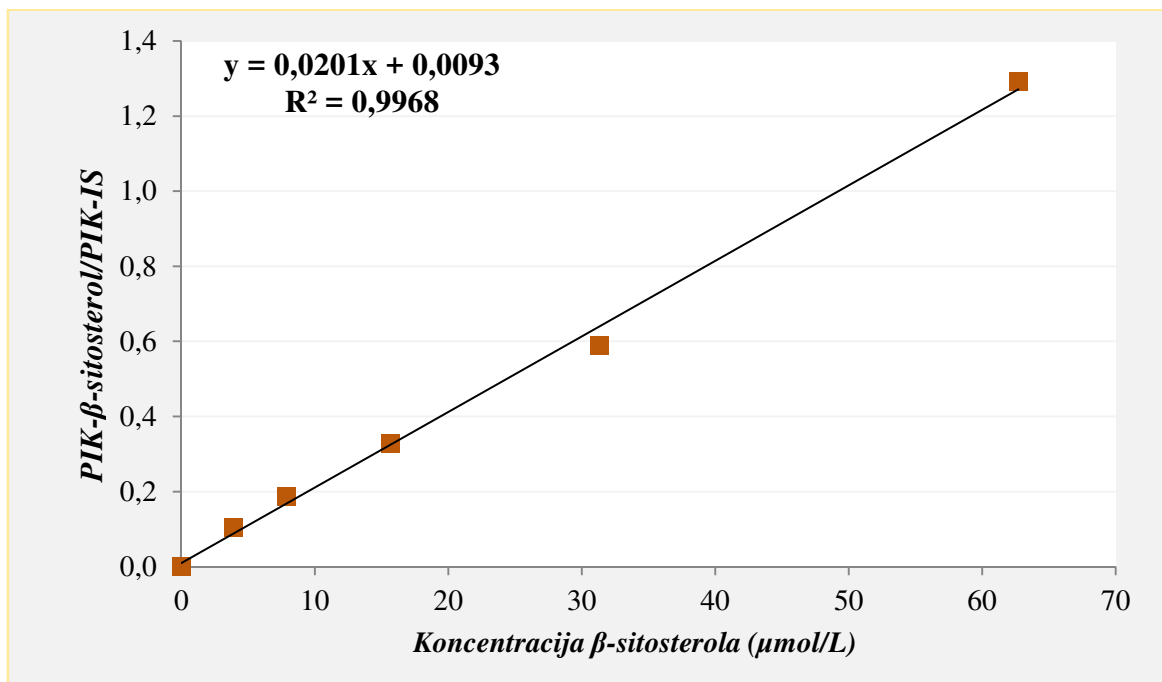
Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvanitifikaciju kampesterola u HDL frakciji, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 17.



Slika 17. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije kampesterola u HDL frakciji.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (2,5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 3,06 – 62,39 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9994.

Kalibraciona kriva koja je korišćena za kvantifikaciju β -sitosterola u HDL frakciji, kao i jednačina prave sa koeficijentom korelacije su predstavljeni na slici 18.



Slika 18. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije β -sitosterola u HDL frakciji.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u metanolnom rastvoru standarda holesterola (2,5 mmol/L) i obuhvata raspon koncentracija 8,41 – 62,69 $\mu\text{mol/L}$. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9984.

3.3.6.2 Limiti detekcije i limiti kvantifikacije

Uporedo sa utvrđivanjem linearnosti neophodno je odrediti limite detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ), koji govore o osetljivosti metode. Limit detekcije se definiše kao najniža detektabilna koncentracija analita, dok limit kvantifikacije predstavlja najniža koncentracija analita koja se određenom metodom može precizno i tačno kvantifikovati.

Postoji više načina izračunavanja i određivanja limita detekcije i kvantifikacije metode. Mi smo se odlučili na eksperimentalni metod iz realnih uzoraka. Sa tim ciljem, izabrani su uzorci niskih koncentracija koji su razblaženi tako da koncentracije ispitivanih analita odgovaraju odnosima signala i šuma (SNR) 3 za LOD vrednost, odnosno 10 za LOQ vrednost.

3.3.6.3 *Preciznost unutar serije i između serija*

Za potpuno sagledavanje varijacija prisutnih prilikom preanalitičkog i analitičkog postupka neophodno je ispitati kako preciznost unutar serije tako i preciznost između serija. Pre samog ispitivanja preciznosti novouspostavljene metode za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji, bilo je neophodno pripremiti dva *pool*-a uzoraka seruma dobijenih od dvadeset zdravih dobrovoljaca. Uzorci sa niskim koncentracijama NHS su odabrani za testiranje preciznosti u niskom opsegu koncentracija, dok su uzorci sa višim vrednostima odabrani za pool koji će predstavljati viši opseg koncentracija. Oba *pool*-a su najpre bila dobro izmešana kako bi se obezbedila njihova homogenost. Pripremljeno je po 5 alikvota iz svakog *pool*-a i svi su pripremljeni i analizirani u triplikatu u istom danu. Ista procedura je sprovedena i za ispitivanje preciznosti u HDL frakciji.

Preciznost između serija je takođe određena u niskom i visokom opsegu koncentracija, svaka iz odgovarajućeg *pool*-a seruma. Svakog dana, tokom uzastopnih pet dana, je analiziran u triplikatu po jedan alikvot oba *pool*-a. Ista procedura je sprovedena i za ispitivanje preciznosti u HDL frakciji. Preciznost je izražena u procentima kao vrednost koeficijenta varijacije unutar serije, odnosno između serija (KV_{us} i KV_{is}, redom)

3.3.6.4 *Tačnost metode (recovery studija)*

Određivanje tačnosti metode je značajno zbog utvrđivanja stepena slaganja između stvarne koncentracije analita i koncentracije dobijene primenom ispitivanog analitičkog postupka. Međutim, kada su u pitanju bioanalitičke metode, često se zbog prisustva analita u ispitivanom matriksu, umesto standardne metode ispitivanja tačnosti sprovodi *recovery* studija, odnosno procena prinosa analita [194]. Kod *recovery* studije značajno je odrediti bazalnu vrednost analita, prisutnu u uzorku, a potom opteretiti uzorak različitim poznatim koncentracijama rastvora standarda i utvrditi da li postoji slaganje između dodatih, dobijenih i očekivanih vrednosti.

Za našu *recovery* studiju mi smo najpre u etanolu pripremili smeše rastvora standarda, svih ispitivanih NHS, odgovarajućih koncentracija (tabela 2), i alikvotirali po 100 µL svakog od pripremljenih rastvora u epruvete koje su već sadržale uparen IS. Ova smeša je ponovo uparena pre dodavanja po 100 µL seruma i sprovođenja već opisanog načina pripreme uzoraka. Bazalna vrednost analita u pool-u, odnosno nulta tačka je određena tako što je 100 µL etanola upareno u pet epruveta sa IS pre dodavanja 100 µL seruma.

Kada je u pitanju određivanje NHS u HDL-frakciji postupak je bio modifikovan tako da je 650 μ L etanolnog rastvora smeša standarda odgovarajućih koncentracija (tabela 3) dodavano u epruvete sa IS i upareno, a potom su u iste epruvete dodavano 650 μ L supernatana pool-a, dobijenih nakon precipitacije ne-HDL lipoproteinskih čestica. U oba slučaja, dalji tok pripreme je tekao kao što je opisano u poglavljima 3.3.3 i 3.3.4.

Koncentracije standardnih rastvora kojima su obogaćeni serum i HDL frakcija date su u tabeli 3.

3.3.6.1 Klinička evaluacija metode

Klinička evaluacija bioanalitičke metode, ne predstavlja obaveznu preporuku vodiča za validaciju, ali se često u toku samog rada nameće kao korisna, naročito kada je u pitanju uvođenje novih metodologija u rutinsku kliničku praksu. U ovoj studiji smo za inicijalnu kliničku evaluaciju metode testirali 20 uzoraka plazme dobijenih od zdravih dobrovoljaca i utvrdili smo srednje vrednosti koncentracija NHS i NHS_{HDL}.

Tabela 3. Koncentracije NHS kojima su opterećeni serum i HDL frakcija u *recovery* studiji.

<i>Parametar</i>	<i>Dezmosterol</i> ($\mu\text{mol/L}$)		<i>7-dehidroholesterol</i> ($\mu\text{mol/L}$)		<i>Latosterol</i> ($\mu\text{mol/L}$)		<i>Kampesterol</i> ($\mu\text{mol/L}$)		<i>β-sitosterol</i> ($\mu\text{mol/L}$)	
	<i>serum</i>	<i>HDL frakcija</i>	<i>serum</i>	<i>HDL frakcija</i>	<i>serum</i>	<i>HDL frakcija</i>	<i>serum</i>	<i>HDL frakcija</i>	<i>serum</i>	<i>HDL frakcija</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,08	0,14	0,59	0,07	1,67	0,21	1,95	0,24	1,26	0,12
2	2,16	0,28	1,18	0,14	2,50	0,42	2,92	0,48	2,52	0,24
3	3,32	0,56	2,36	0,28	3,31	0,84	3,9	0,96	5,04	0,48
4	6,64	1,12	4,72	0,56	6,62	1,68	7,8	1,96	10,08	0,96
5	8,68	2,26	9,49	1,19	13,25	3,31	15,6	3,90	20,25	1,96

3.3.7 Izračunavanje indeksa homeostaze holesterola

U cilju kompletne analize statusa homeostaze holesterola u ispitivanim populacijama, bilo je neophodno analizirati indekse homeostaze izvedene iz vrednosti koncentracija NHS određivanih u serumu i HDL frakciji.

Za procenu efikasnosti ukupnog procesa sinteze holesterola korišćena je sledeća jednačina, koja označava zbirne koncentracije markera sinteze: $Sinteza = [Dezmosterol] + [Latosterol]$, gde su: $[Dezmosterol]$ - koncentracija dezmosterola u serumu $[\mu\text{mol/L}]$, $[Latosterol]$ - koncentracija latosterola u serumu $[\mu\text{mol/L}]$

Analogno, zastupljenost markera sinteze holesterola na HDL česticama izračunata je kao zbir koncentracija markera sinteze u HDL frakciji na sledeći način: $Sinteza_{HDL} = [Dezmosterol_{HDL}] + [Latosterol_{HDL}]$, gde su: $[Dezmosterol_{HDL}]$ - koncentracija dezmosterola u HDL frakciji $[\mu\text{mol/L}]$, $[Latosterol_{HDL}]$ - koncentracija latosterola u HDL frakciji $[\mu\text{mol/L}]$

Za procenu efikasnosti procesa apsorpcije holesterola koristili smo zbir koncentracija markera apsorpcije, na sledeći način: $Apsorpcija = [Kampesterol] + [\beta\text{-Sitosterol}]$, gde su: $[Kampesterol]$ - koncentracija kampesterola u serumu $[\mu\text{mol/L}]$, $[\beta\text{-sitosterol}]$ - koncentracija β -sitosterola u serumu $[\mu\text{mol/L}]$

Za procenu zastupljenosti markera apsorpcije holesterola na HDL česticama, koristili smo sledeći proračun: $Apsorpcija_{HDL} = [Kampesterol_{HDL}] + [\beta\text{-sitosterol}_{HDL}]$, gde su: $[Kampesterol_{HDL}]$ - koncentracija kampesterola u HDL frakciji $[\mu\text{mol/L}]$, $[\beta\text{-sitosterol}_{HDL}]$ - koncentracija β -sitosterola u HDL frakciji $[\mu\text{mol/L}]$

Relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji su izračunate tako što je koncentracija svakog NHS u odgovarajućem medijumu korigovana u odnosu na vrednost koncentracije holesterola u istom medijumu. Relativne koncentracije svakog NHS ($Dezmosterol/holesterol$, $Latosterol/holesterol$, $Kampesterol/holesterol$, $\beta\text{-sitosterol/holesterol}$) izračunate su kao: $[NHS]/UH$, gde je $[NHS]$ koncentracija odgovarajućeg NHS (dezmosterol, latosterol, kampesterol, β -sitosterol) u serumu izražena u $\mu\text{mol/L}$, dok su koncentracije UH izražene u mmol/L .

Analogno određivanju relativnih koncentracija NHS u serumu, određene su i relativne koncentracije ovih markera u HDL frakciji ($Dezmosterol_{HDL}/HDL\text{-h}$, $Latosterol_{HDL}/HDL\text{-h}$, $Kampesterol_{HDL}/HDL\text{-h}$, $\beta\text{-sitosterol}_{HDL}/HDL\text{-h}$) prema sledećem

obrazcu: $[NHS_{HDL}]/HDL-h$, gde je $[NHS_{HDL}]$ koncentracija odgovarajućeg NHS (dezmosterol, latosterol, kampesterol, β -sitosterol) u HDL frakciji izražena u $\mu\text{mol/L}$, dok su koncentracije HDL-h izražene u mmol/L .

Dodatno, izračunati su i indeksi udela svakog NHS u HDL frakciji u odnosu na njegovu ukupnu koncentraciju u plazmi ($Dezmosterol_{HDL}/Dezmosterol$, $Latosterol_{HDL}/Latosterol$, $Kampesterol_{HDL}/Kampesterol$, $\beta\text{-sitosterol}_{HDL}/\beta\text{-sitosterol}$), prema sledećem obrazcu: $[NHS_{HDL}]/[NHS]$, gde je NHS_{HDL} koncentracija odgovarajućeg NHS (dezmosterol, latosterol, kampesterol, β -sitosterol) u HDL frakciji izražena u $\mu\text{mol/L}$, a $[NHS]$ koncentracija odgovarajućeg NHS (dezmosterol, latosterol, kampesterol, β -sitosterol) u serumu izražena u $\mu\text{mol/L}$.

Takođe, izračunati su i indeksi $Dezmosterol/Latosterol$ i $Dezmosterol_{HDL}/Latosterol_{HDL}$, koji govore o međusobnom odnosu markera sinteze u cirkulaciji i HDL frakciji, prema sledećim obrazcima: $[Dezmosterol]/[Latosterol]$ i $[Dezmosterol_{HDL}]/[Latosterol_{HDL}]$.

Izračunati su i indeksi *Sinteza/Apsorpcija* koji ukazuju na promene u zbirnim koncentracijama markera sinteze holesterola u odnosu na zbirnu koncentraciju markera apsorpcije holesterola u serumu.

Analogno uvedeni su i indeksi koji govore o promenama u zbirnim koncentracijama markera sinteze u odnosu na zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji: $Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}$.

3.4 Metoda za kvantitativnu analizu metabolita vitamina D u serumu

U cilju određivanja koncentracija metabolita vitamina D u serumu pacijenata obolelih od CRC i zdravih ispitanika, razvili smo, optimizovali i validirali kvantitativnu HPLC-MS/MS metodu. Ovom metodom određivali smo koncentracije dva metabolita vitamina D3: 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3.

3.4.1 Reagensi i aparatura

Za kvantifikaciju 25(OH)D3, 24,25(OH)₂D3 korišćeni su analitički standardi HPLC čistoće proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD). Deuterizovane interne standarde 25(OH) D3-d6 i 1,25(OH)₂D3-d6 je proizveo Medical Isotopes (Pelham, SAD). Za pripremu uzoraka su korišćeni etanol, metanol, etil-acetat, metil-terc-butil etar (MTBE) i acetonitril (HPLC čistoća) proizvođača Fisher (Pittsburgh, PA), SAD).

Optimalno hromatografsko razdvajanje 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3 i odgovarajućih internih standarda u vremenskom periodu od 20 min postignuto je upotrebom Kinetex F5 (150 × 4.6mm, 2.6µm, 100A) LC kolone (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) sa odgovarajućom pretkolonom i pomoću izokratskog eluiranja mobilnom fazom sastava metanol : voda (85:15, v: v). Protok mobilne faze bio je 0,3 ml / min, a temperatura kolone 20°C. Kvantifikaciju smo vršili analizom pikova dobijenih praćenjem višestrukih reakcija (MRM) na tandem masenom spektrometru Agilent 6420 sa APCI jonskim izvorom. M/z tranzicije svakog od određivanih metabolita i internih standarda, kao i njihova retenciona vremena su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti retencionih metabolita vitamina D i njihovih odgovarajućih IS.

<i>Analit</i>	<i>Retenciono vreme (min)</i>	<i>MRM tranzicije (m/z)</i>	<i>Koliziona energija (eV)</i>
25(OH)D3	13,5	383,3 → 115; 105,1	108; 48
24,24(OH) ₂ D3	8,2	381,2 → 141,1; 105,2	116; 60
25(OH)D3-d6	13,5	389,4 → 115,2; 105,3	136; 56
1,25(OH) ₂ D3-d6	9,6	405,4 → 105	60

3.4.2 Priprema uzoraka

Uzorci seruma za analizu vitamina D su alikvotirani, pakovani i skladišteni zaštićeni od svetlosti, te čuvani na -80°C do sprovođenja analize. Ispitivanje statusa vitamina D, određivanjem koncentracije njegovih metabolita, sprovedeno je primenom HPLC-MS/MS metode razvijene i potpuno validirane u našoj laboratoriji.

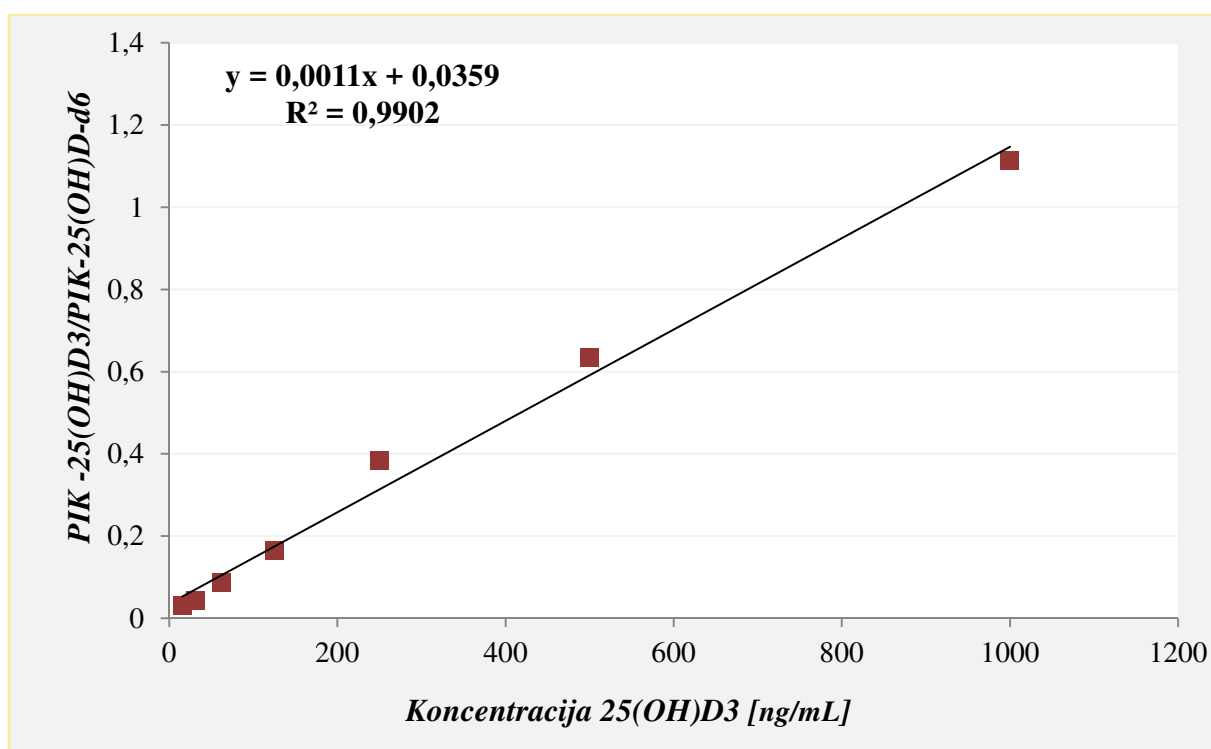
Najpre smo 500 µL seruma prebacili u reakcionu epruvetu koja je sadržala unapred uparenu smešu IS (100 µL, c=1 µg/mL). Nakon toga, u istu epruvetu je dodato 2,5 mL ohlađenog acetonitrila da bi se omogućila denaturacija proteina. Ovu smešu smo snažno vorteksirali u trajanju od 30 sekundi i centrifugirali na 4000 × g u trajanju od 30 min. Izdvojeni supernatant je dekantovan u čistu reakcionu epruvetu i uparen pod strujom azota do 500µL. Posle toga, dodali smo 1 mL vode HPLC čistoće, zajedno sa 2 mL smeše MTBE: etilacetat (9: 1, v: v). Ovu smešu smo potom snažno promešali pomoću vorteks-mešalice, gornji sloj prebacili u čistu epruvetu i uparili do suva pod strujom azota. Ovaj postupak ekstrakcije je ponovljen ukupno tri puta, i svi ekstrakti su svaki put nakon izdvajanja dodavani u istu vialu i uparavani do suva. U završnom koraku, ekstrakt smo rekonstituisali u 20 µL metanola i injektovani u HPLC-MS/MS aparat. Kvantifikaciju metabolita smo izvršili korišćenjem odgovarajuće kalibracione krive, a dobijene vrednosti korigovali za faktor ukoncentrisavanja uzoraka.

3.4.3 Validacija metode za određivanje koncentracija metabolita vitamina D

Kao i u prethodnom slučaju, i metodu za određivanje koncentracija metabolita vitamina D u serumu, koju smo uspostavili i optimizovali u našoj laboratoriji, bilo je neophodno kompletno validirati prema preporukama FDA [194].

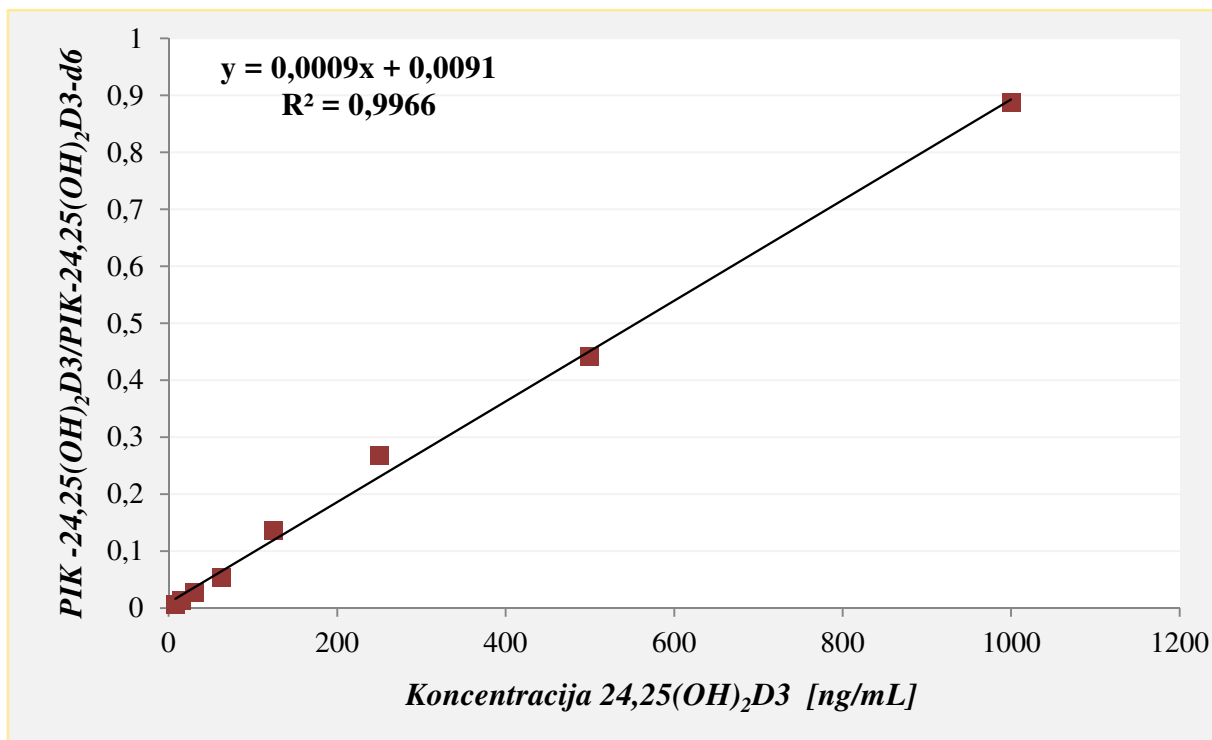
3.4.3.1 Linearnost

Nakon optimizacije metode konstruisali smo odgovarajuće kalibracione krive. Na x-osi kalibracione krive nalazio se odnos između izmerene površine pika svakog metabolita vitamina D i površine pika odgovarajućeg IS, dok su se na y-osi nalazile odgovarajuće koncentracije svakog analita. Pripremljeni su i analizirani sveži standardi za kalibraciju rastvoreni u etanolu (7 različitih nivoa koncentracije).



Slika 19. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije 25(OH)D3 u serumu.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u etanolnom rastvoru standarda 25(OH)D3 i obuhvata raspon koncentracija 15,6-1000,0 ng/mL. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9950 (slika 19).



Slika 20. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije 24,25(OH)₂D3 u serumu.

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u etanolnom rastvoru standarda 24,25(OH)₂D3 i obuhvata raspon koncentracija 7,8-1000,0 ng/mL. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9982 (slika 20).

3.4.3.2 LOQ I LOD

Kao i u slučaju prethodne metode za kvantifikaciju NHS i NHS_{HDL}, utvrdili smo minimalne detektabilne i kvantitabilne koncentracije za novouspostavljenu metodu za analizu metabolita vitamina D (LOQ i LOD, redom).

3.4.3.3 Preciznost

Postupak provjere preciznosti metode je izvršen na isti način kao i ispitivanje preciznosti metode za određivanje NHS u serumu. Za ovu namenu prikupljena su dva sveža *pool-a* sačinjena od seruma 20 zdravih dobrovoljaca, koja su pripremana u preanalitičkoj fazi kao i ostali uzorci za analizu statusa vitamina D. Kao što je već opisano, posebna pažnja prilikom preanalitičkog procesa je usmerena na zaštitu uzoraka seruma od svetlosti.

Nakon pažljivog mešanja *pool* je homogenizovan i odmah alikvotiran u 10 odgovarajućih reakcionih epruveta sa uparenom smešom IS (25(OH)D3-d6 i

1,25(OH)₂D₃-d₆) i potom iskorišćen za određivanje varijacije unutar serije, u istom danu i pod istim uslovima. Preostali *pool* je odmah posle mešanja alikvotiran u odgovarajuće zapremine, zaštićen od svetlosti i zamrznut na -80 °C za dalje ispitivanje preciznosti između serija. Preciznost između serija je određena na već opisan način iz seruma pripremljenih u pentuplikatu i odvijala se u 10 različitih dana.

3.4.3.4 Tačnost

Tačnost metode za određivanje statusa vitamina D je proverena *Recovery* testom. Kao što je prethodno opisano, uzorke *pool*-a seruma obogaćivali smo sa pet različitih koncentracija standardnih rastvora 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ pripremljenih u etanolu. U epruvetama sa uparenom smešom IS, dodavali smo po 500 µL smeše standardnih rastvora ispitivanih metabolita vitamina D. Pre dodavanja uzoraka seruma, standardni rastvori i etanol su upareni pod strujom azota. Uzorak za šestu, nultu tačku, pripreman je tako što je u epruvetu sa IS dodato 500 µL etanola. U tabeli 5 su prikazane koncentracije standardnih rastvora kojima su obogaćivani uzorci *pool*-a seruma.

Tabela 5. Koncentracije metabolita vitamina D korišćene u *recovery* studiji.

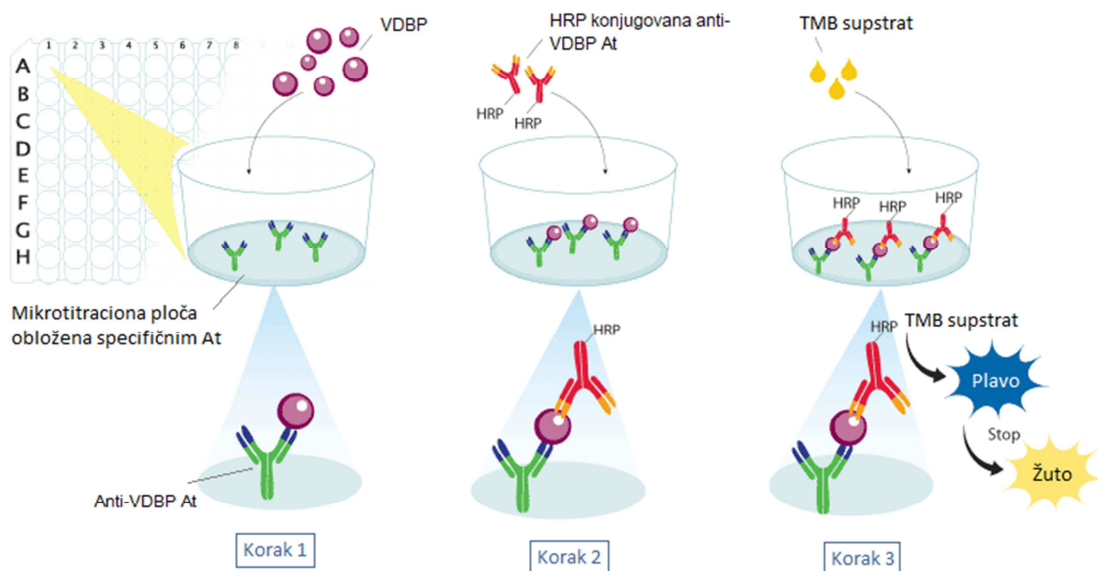
<i>Parametar</i>	<i>25(OH)D₃</i>	<i>24,25(OH)₂D₃</i>
<i>Konc. nivo</i>	<i>(ng/mL)</i>	<i>(ng/mL)</i>
<i>0</i>	0	0
<i>1</i>	146	117
<i>2</i>	324	184
<i>3</i>	527	291
<i>4</i>	916	432
<i>5</i>	1000	795

Nakon uspešne validacije metode, na osnovu koncentracija analiziranih markera statusa vitamina D (25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃), u cilju dodatne analize statusa vitamina D, izračunat je i VDMR prema sledećem obrascu: $[25(OH)D_3]/[24,25(OH)_2D_3]$.

3.5 Metoda za određivanje koncentracije vitamin D vezujućeg proteina u serumu

Koncentracije VDBP u serumu zdravih osoba i pacijenata sa CRC određivali smo enzimskim imuno-esejom (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*). U ovu svrhu koristili smo komercijalni Human VDPB Quantikine® ELISA Kit (R&D, Minneapolis, MN, SAD) koji sadrži sve potrebne reagense, mikrotitarsku ploču obloženu odgovarajućim antitelima i liofilizovana antitela. ELISA čitač firme LKB (LKB Vertriebs GmbH, Wien, Austria) smo koristili za očitavanje apsorbancija.

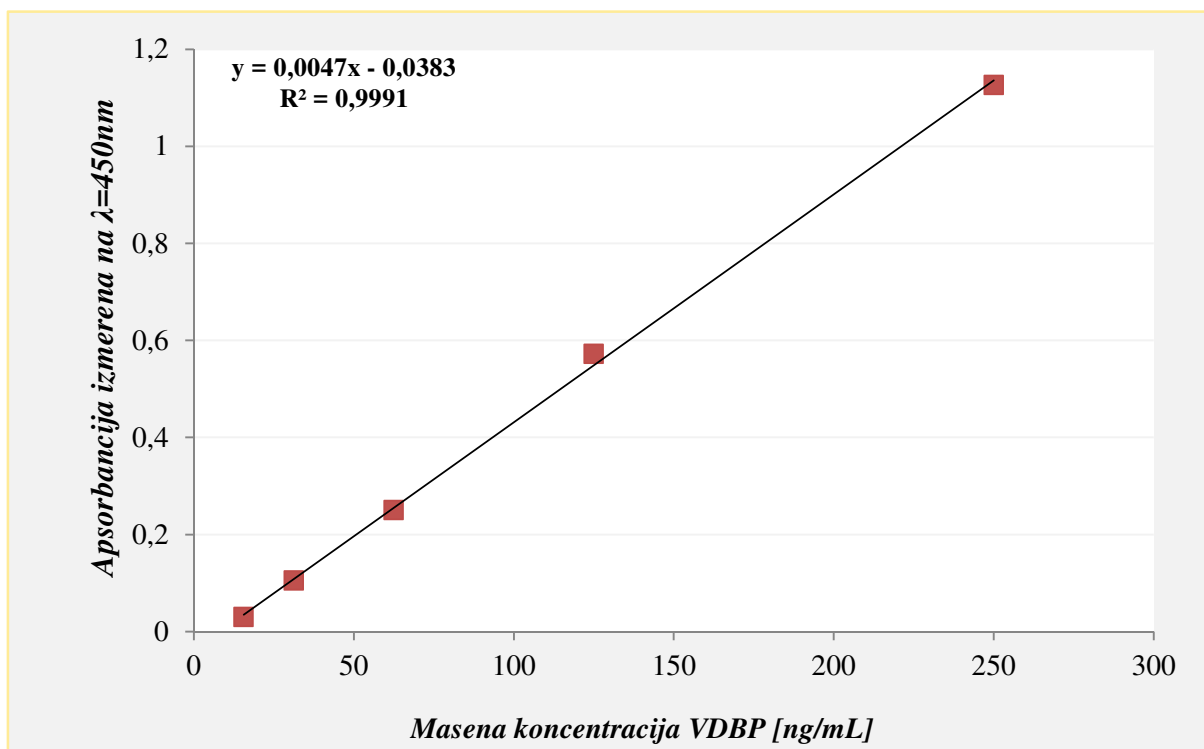
Princip testa se zasniva na vezivanju antigena iz uzorka (VDBP) za primarno antitelo, te detekciji antigen-antitelo kompleksa pomoću sekundarnog antitela za koji je vezan enzim. Kvantifikaciju nastalih kompleksa omogućava enzimska reakcija u kojoj dolazi do nastanka boje čiji se intenzitet meri na 450 nm. Princip je prikazan na slici 21. Postupak, te priprema uzoraka za određivanje VDBP su sprovedeni prema procedurama proizvođača testa.



Slika 21. Šematski prikaz postupka izvođenja VDPB Quantikine® ELISA testa.

Masena koncentracija VDBP u serumu ispitanika izračunata je korišćenjem dobijenih jednačina standardne krive nakon korigovanja za razblaženje uzorka. Krajnje koncentracije su izražene u $\mu\text{g/mL}$.

Na slici 22 su predstavljene standardna kriva i jednačina standardne krive iz koje je izračunata vrednost masene koncentracije VDBP.



Slika 22. Kalibraciona kriva za određivanje masene koncentracije VDBP u serumu.

3.6 Statistička analiza

Prilikom odabira adekvatnog surogat matriksa za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji, koristili smo regresionu analizu za testiranje vrednosti nagiba (b). Dobijene vrednosti za b smo poredili *Studentovim* t testom. Značajnom razlikom je smatran nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Kao deo validacije metoda, testiranje tačnosti je izvršeno korišćenjem *Recovery* testa. Konstruisane su krive sa dodatim i dobijenim vrednostima analita i njihovi odnosi su ispitani regresionom analizom. Varijacija metode unutar serije i između serija izražena je kao koeficijent varijacije KV, koji se izračunava prema sledećoj jednačini: $KV[\%] = Sd / X_{SR} \times 100$, gde su X_{SR} – aritmetička srednja vrednost, Sd – standardna devijacija.

Provera raspodele podataka vršena je *Shapiro-Wilk* testom. Većina podataka nije pratila normalnu raspodelu, te su ti podaci prikazani kao medijane sa interkvartilnim rasponima. Podaci koji su pratili normalnu raspodelu prikazani su kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Podaci koji nisu pratili normalnu raspodelu su testirani neparametarskim *Kruskal-Wallis* testom i *Mann-Whitney post-hoc* testom, dok su podaci koji su pratili normalnu raspodelu poređeni *Student t* testom. Kategoričke podatke smo prikazali kao apsolutne frekvencije i analizirali *Chi-kvadrat* testom. Za grafičko prikazivanje razlika između parametara poređenih neparametarskim testovima, koristili smo *boxplot* grafike. Svaki *boxplot* grafik sadrži pravougaonik koji predstavlja 50% vrednosti, horizontalna linija u pravougaoniku predstavlja medijanu, dok gornja i donja stranica pravougaonika predstavljaju granice interkvartilnog raspona (25. i 75. percentil). Maksimalna i minimalna vrednost su predstavljene su horizontalnim linijama iznad pravougaonika, zvezdicama su predstavljene ekstremne vrednosti, a krugovima netipične vrednosti.

Za ispitivanje povezanosti između različitih parametara korišćena je *Spearman* korelaciona analiza. Prediktivni potencijal parametara je testiran binarnom logističkom regresionom analizom. Multivarijantnu logističku regresiju smo koristili za vršenje korekcije u odnosu na kovarijable od značaja korišćenjem *enter* modela. P vrednost $\leq 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Vrednosti OR predstavljaju odnos verovatnoće za svaku nezavisnu promenljivu, dok 95%CI (OR) predstavlja opseg 95-procentnog intervala pouzdanosti, odnosno njegovu donju i gornju granicu. Proveru dijagnostičke tačnosti smo

vršili analizom *ROC* (engl. *receiver operating characteristic*) krive. Vrednosti površine ispod *ROC* krive (AUC) u opsegu 0,90-1 su definisale odličnu dijagnostičku tačnost, 0,80-0,90 - dobru dijagnostičku tačnost, 0,70-0,80 - umerenu dijagnostičku tačnost, 0,6-0,70 - slabu dijagnostičku tačnost, dok je za vrednosti AUC od 0,5-0,6 smatrano da ne zadovoljavaju kriterijume prihvatljive dijagnostičke tačnosti.

Svi podaci su analizirani pomoću *Excel* (verzija 2010; Microsoft, SAD) programa i statističkog softvera *IBM® SPSS® Statistics version 22* (IBM, SAD).

4 Rezultati

4.1 Razvoj i optimizacija metode za analizu NHS u serumu i HDL frakciji

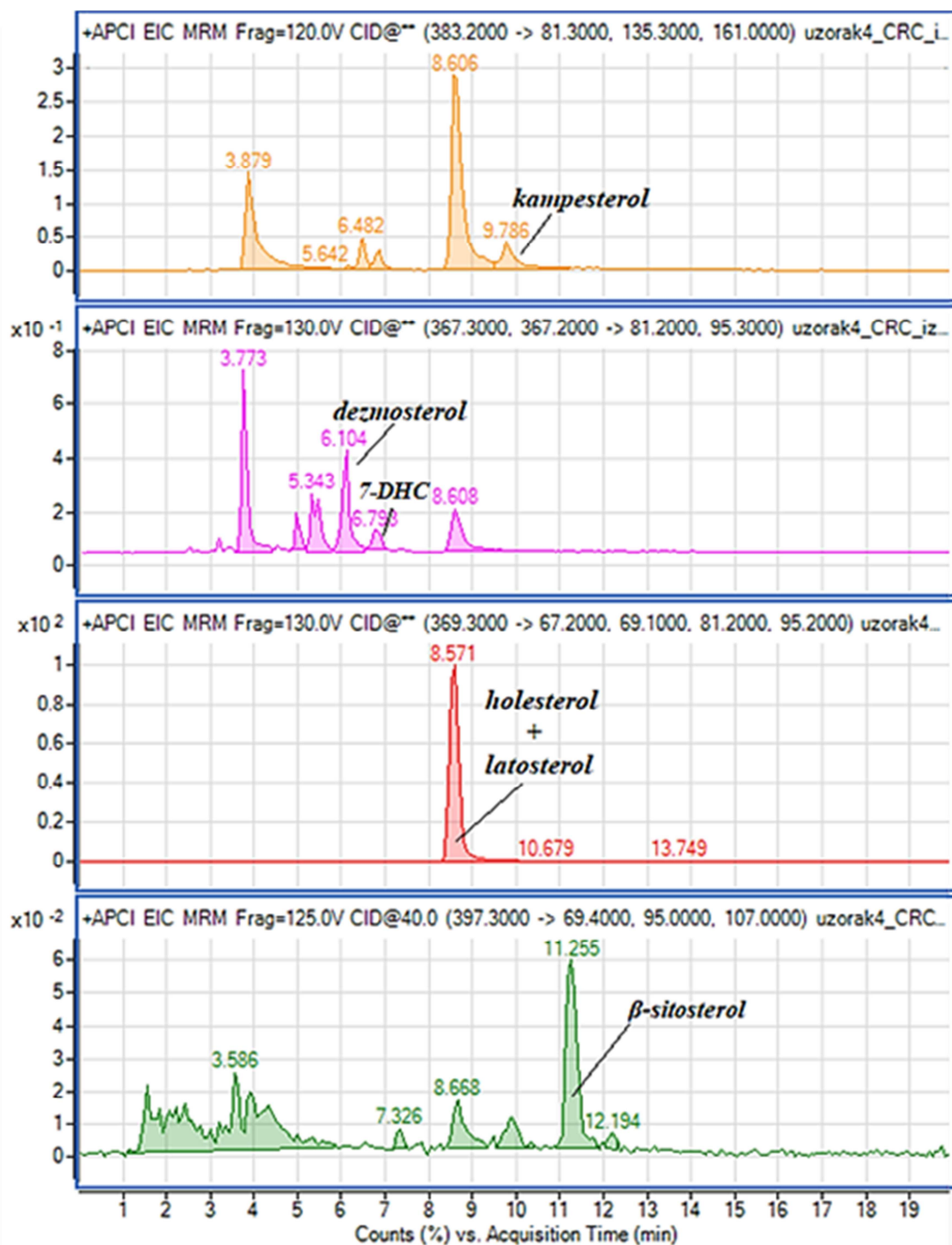
U cilju kvantifikacije NHS u serumu i HDL frakciji dobijenoj iz seruma, pristupili smo razvoju bioanalitičke metode za određivanje ovih analita HPLC-MS/MS metodom.

Tokom razvoja ove metode, testirali smo različite protokole za pripremu uzoraka. Preliminarni eksperimenti su podrazumevali ispitivanje različitih metoda za taloženje proteina, zatim korišćenje različitih saponifikacionih reagenasa, te ispitivanje različitih tipova i protokola ekstrakcije u cilju postizanja optimalnog razdvajanja analita od interesa. Na ovaj način smo izvršili optimizaciju preanalitičkih i analitičkih faza određivanja NHS i obezbedili optimalne analitičke performanse.

U prvoj fazi ispitivali smo efekte različitih rastvora za taloženje proteina i saponifikaciju. U tu svrhu pripremali smo i testirali različite koncentracije rastvora NaOH i KOH u vodi i etanolu/metanolu. Pored toga, testirani su i različiti protokoli koji su uključivali i primenu različitih SPE kolona za ekstrakciju (podaci nisu prikazani). Na kraju, optimizovan protokol je podrazumevao taloženje proteina i saponifikaciju pomoću 2% KOH u etanolu, nakon čega je usledila tečno-tečna ekstrakcija. Pored toga što je ova vrsta ekstrakcije dala najbolji prinos analita od interesa iz uzorka, priprema reagenasa je jednostavna i jeftina, a sama procedura ne zahteva specijalnu opremu.

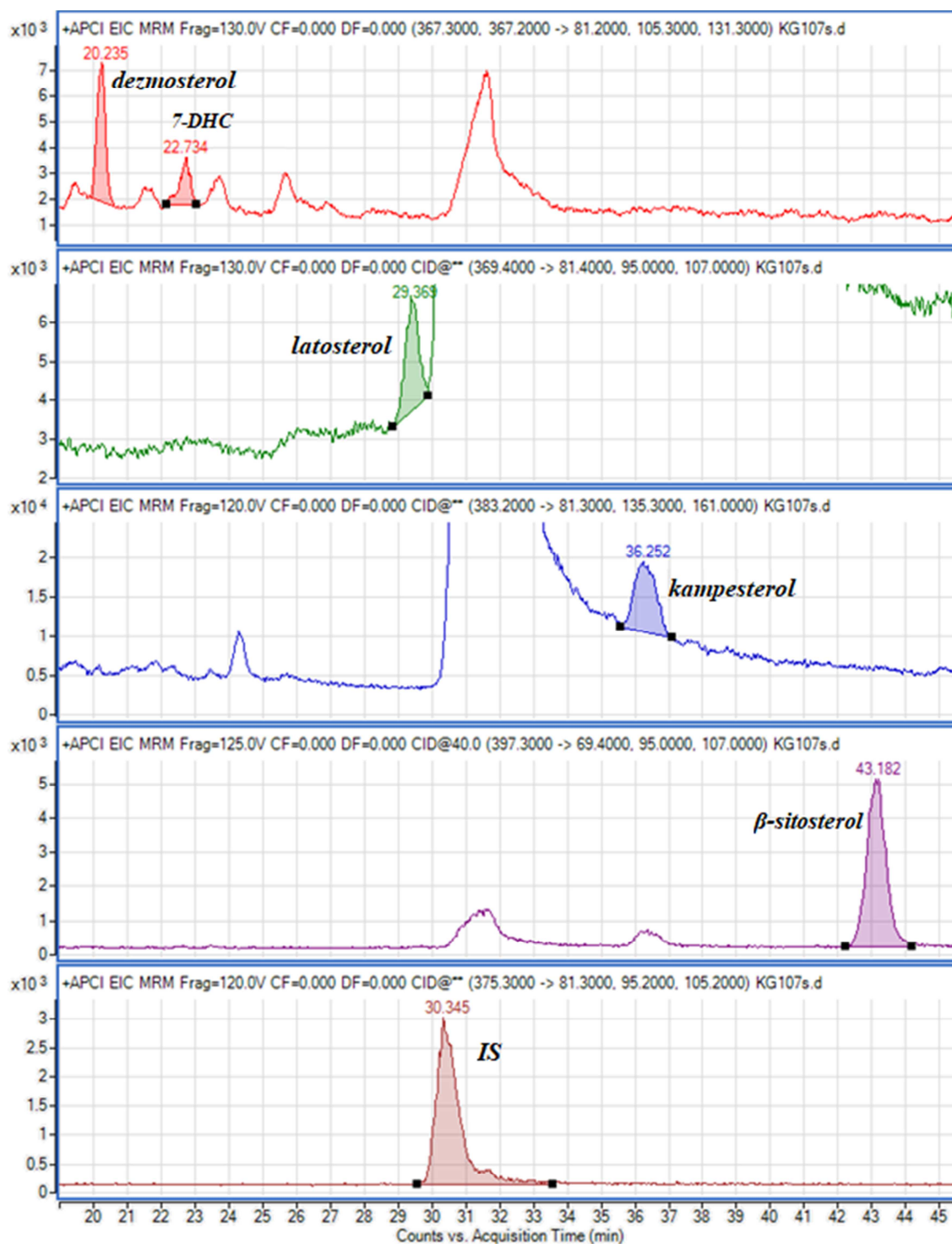
Dodatno, za analizu NHS_{HDL} metoda je pretrpela određene modifikacije u smislu povećanja zapremine uzorka i uvođenja dodatnog protokola za izdvajanje HDL lipoproteinske frakcije pomoću komercijalnog reagensa.

Što se hromatografskih uslova tiče, prvobitno je za razdvajanje ciljnih NHS korišćena Porochell 120 EC (75 × 4.6 mm × 2.7 μm) kolona, ali se latosterol i holesterol nisu uspešno razdvojili (slika 23). Na prikazanom hromatogramu vide se maksimalni postignuti rezultati razdvajanja pri ispitivanim hromatografskim uslovima. Međutim, kao što se može videti optimalno razdvajanje pikova postignuto je za sve analizirane NHS osim za pikove latosterola i holesterola, čije razdvajanje nije bilo moguće ni pri primeni različitih hromatografskih uslova (temperatura kolone, protok i sastav mobilne faze...) na ovoj koloni.



Slika 23. Hromatogram dobijen analizom uzorka sa označenim svim analiziranim NHS.

Optimalno razdvajanje pikova svih NHS, uključujući i pikove latosterola i holesterola postignuto je primenom dvostruko duže kolone Porochell 120 EC ($150 \times 4.6 \text{ mm} \times 2.7 \mu\text{m}$) i upotrebom mobilne faze ACN: MeOH: voda, 80: 18: 2 (v: v: v). (slika 24) Uvođenjem duže kolone vreme razdvajanja pikova od interesa je produženo, ali je omogućeno razdvajanje problematičnih pikova uz adekvatne faktore rezolucije, te kvantifikacija latosterola.



Slika 24. Hromatogram dobijen analizom uzorka sa označenim svim analiziranim NHS i IS.

Retenciona vremena ispitivanih analita su prikazana u tabeli 2.

Optimizacija instrumentalnih uslova na masenom spektrometru podrazumevala je upoređivanje rezultata dobijenih upotrebom ESI sa MMI jonskim izvorom koji poseduje mogućnost ESI i APCI jonizacije. APCI jonizacija se pokazala kao podesnija za bioanalizu sterola, tako da smo nastavili sa daljom razvojem i optimizacijom metode pomoću MMI

izvora. Konačni uslovi na masenom spektrometru su bili: temperatura gasa od 325 °C, temperatura isparavanja 250 °C, protok gasa od 5 L/min, pritisak rasprašivača od 30 psi, pozitivni kapilarni napon 2000V, pozitivna struja korone 4 µA i pozitivno punjenje od 2000 V. Vrednosti kolizione energije i MRM tranzicije za analite od interesa prikazani su u tabeli 2.

4.1.1 Rešavanje problema efekta matriksa holesterola i optimizacija standardnih krivih

Rezultati studije ispitivanja uticaja matriksa su pokazali da je jonizacija latosterola, kampesterola i β-sitosterola u biološkom materijalu pospešena za oko 30% u odnosu na standardne rastvore. Dodatno, preliminarna validacija je pokazala nepovoljne rezultate *recovery* studija (podaci nisu prikazani), što ukazuje da se tačna kvantifikacija ne može postići upotrebom metanolnih rastvora za konstruisanje kalibracionih krivih. Iz tog razloga, pristupili smo potrazi za odgovarajućim surogat matriksom. U odeljku 3.3.6 detaljno je prikazan protokol eksperimenta za ispitivanje interferencije matriksa prilikom analize NHS u serumu i HDL frakciji. Upoređivanje surogat matriksa smo izvršili analiziranjem odnosa površina pikova NHS i površine pika internog standarda (IS) u različitim matriksima (MTH, CHL, BSA, BSA+CHL) linearnom regresijom. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Vrednosti nagiba krive za uporednu analizu različitih matriksa korišćenjem linearne regresione analize.

<i>Matriks</i>	<i>CHL</i> (5 mmol/L)	<i>BSA</i> (0.1%)	<i>BSA+CHL</i> (0.1% + 5 mmol/L)
<i>MTH</i>	1,600	0,983	1,583
<i>CHL (5mmol/L)</i>	-	1,630	0,991
<i>BSA (0,1%)</i>	-	-	1,614

Značajnosti vrednosti nagiba su određene korišćenjem *Student t-test*-a. Nivo značajnosti je bio $p \leq 0,05$.

Kao što se vidi u tabeli 6, postoji značajna razlika između CHL i MTH, CHL i BSA, BSA + CHL i MTH, kao i BSA + CHL i BSA, dok razlike između BSA i MTH i BSA + CHL i CHL nisu bile značajne. Na osnovu sprovedene statističke analize zaključili

smo da je CHL najbolji kandidat za surogat matriks, dok BSA samostalno ili u kombinaciji sa CHL nije značajno doprinio uticaju matriksa.

Nakon identifikacije holesterola kao glavnog interferenta u metodi za određivanje biomarkera homeostaze holesterola, pristupili smo određivanju optimalne koncentracije holesterola koja bi mogla da nam posluži kao surogat matriks u metodi za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji. Na način opisan u odeljku 3.3.6, testirali smo metanolne rastvore holesterola sledećih koncentracija: 2,5 mmol/L, 3,6 mmol/L, 5 mmol/L, 6,125 mmol/L, 7,5 mmol/L, 10,0 mmol/L, korišćenjem linearne regresione analize. Rezultati ove analize su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Rezultati poređenja različitih rastvora holesterola metodom linerane regresije.

Koncentracija holesterola (mmol/L)	Nagib, b(%)				
	3,625	5	6,125	7,5	10
2,5	1,946	2,063	2,343	2,396	2,915
3,625	-	1,058	1,204	1,231	1,492
5	-	-	1,136	1,162	1,414
6,125	-	-	-	1,023	1,239
7,5	-	-	-	-	1,211

Značajnosti vrednosti nagiba su određene korišćenjem *Student t-test*-a.

Kao što se vidi u tabeli 7, rastvor koncentracije 2,5 mmol/L značajno se razlikovao od svih drugih testiranih rastvora. Značajne rezlike nije bilo između metanolnih rastvora koncentracije 3,625 mmol/L i 5 mmol/L. S obzirom na to da su srednje vrednosti koncentracija UH u ispitivanim uzorcima iznosile oko 5 mmol/L, odlučili smo se za rastvor koncentracije 5 mmol/L kako bismo obuhvatili očekivani koncentracioni opseg holesterola u humanim uzorcima i simulirali efekat matriksa holesterola. Na kraju, za konstrukciju kalibracionh krivih latosterola, kampesterola, β -sitosterola korišćeni su metanolni rastvori holesterola, jer se ovi analiti eluiraju sa kolone nakon holesterola. Za kvantifikaciju analita koji se eluiraju pre holesterola (dezmosterola i 7-dehidroholesterola), korišćeni su metanolni rastvori odgovarajućih standarda. Izbor odgovarajućeg surogat matriksa je potvrđen rezultatima *recovery* studije (tabela 8). Analogno tome, NHS analiza u HDL frakciji je izvedena sa MTH krivom za kvantifikaciju dezmosterola i 7-dehidroholesterola,

dok su latosterol, kampesterol i β -sitosterol kvantifikovani korišćenjem CHL kalibracione krive koncentracije 2,5 mmol/L.

Tabela 8. Rezultati *recovery* studije za svih pet NHS.

NHS	Recovery			
	Ukupni		HDL frakcija	
	Koeficijent korelacije (r)	Nagib (b), %	Koeficijent korelacije (r)	Nagib (b), %
<i>Dezmosterol</i>	0,997	113,1	0,998	95,8
<i>7-dehidroholesterol</i>	0,998	108,2	0,993	95,6
<i>Latosterol</i>	0,999	97,4	0,995	88,3
<i>Kampesterol</i>	0,999	90,7	0,996	85,3
<i>β-sitosterol</i>	0,994	89,8	0,982	87,5

4.1.2 Validacija metode

Jednačine standardnih krivih za NHS i NHS_{HDL} date su u tabeli 9. U skladu sa smernicama FDA, prihvatljive varijacije unutar serije i između serija bile su manje od 15% [194]. Oba parametra preciznosti su bila zadovoljavajuća za svaki od analiziranih sterola. Ovi rezultati su sumirani u tabeli 10.

Tabela 9. Kalibracione krive, rasponi koncentracija kalibracionih krivih, koncentracije NHS i NHS_{HDL} kod zdravih ispitanika, limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za NHS.

NHS	Jednačina kalibracione krive i koeficijent korelacije		Opseg lineranosti (μmol/L)	LOD (μmol/L)		LOQ (μmol/L)		Koncentracije kod zdravih dobrovoljaca (n=20) *	
	NHS	NHS _{HDL}		NHS	NHS _{HDL}	NHS	NHS _{HDL}	NHS (μmol/L)	NHS _{HDL} (μmol/L)
<i>Dezmosterol</i>	y = 0,051x + 0,0028 r = 0,9996	y = 0,051x + 0,0028 r = 0,9996	5,00 – 72,34	0.06	0.009	0.20	0.031	3,16 (2,65-4,10)	0,22 (0,17-0,28)
<i>7-dehidroholesterol</i>	y = 0,030x – 0,0148 r = 0,9971	y = 0,030x – 0,0148 r = 0,9971	5,56 – 37,96	0.07	0.011	0.22	0.034	2,06 (1,18-2,52)	0,31 (0,26-0,36)
<i>Latosterol</i>	y = 0,012x + 0,0193 r = 0,9993	y = 0,015x + 0,0075 r = 0,9998	3,56 – 530,19	0.40	0.061	1.40	0.215	23,88 (16,28-33,28)	0,91 (0,67-1,49)
<i>Kampesterol</i>	y = 0,050x + 0,0809 r = 0,9968	y = 0,052x + 0,0279 r = 0,9987	3,06 – 62,39	0.20	0.031	1.20	0.185	5,64 (3,69-6,95)	0,52 (0,43-0,65)
<i>β-sitosterol</i>	y = 0,018x + 0,0088 r = 0,9994	y = 0,020x + 0,0309 r = 0,9982	8,41 – 62,69	0.10	0.015	0.33	0.051	6,55 (3,89-8,45)	0,91(0,65-1,15)

*Vrednosti koncentracija u realnim uzorcima, prikazani u tabeli su prethodno korigovane u odnosu na odgovarajući faktor razblaženja/ukoncentrisavanja.

Tabela 10. Preciznost unutar serije i između serija za NHS i NHS_{HDL}

	NHS	Unutar serije				Između serije			
		Niska koncentracija		Visoka koncentracija		Niska koncentracija		Visoka koncentracija	
		Koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	KV, %	Koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	KV, %	Koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	KV, %	Koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	KV, %
Serum	<i>Dezmosterol</i>	2.54±0.186	7.3	4.61 ± 0.425	9.2	2.67±0.159	6.0	4.28 ± 0.227	5.3
	<i>7-dehidroholesterol</i>	1.05±0.083	7.9	2.45 ± 0.156	6.4	1.15±0.093	8.1	2.62 ± 0.207	7.9
	<i>Latosterol</i>	16.23±1.68	10.3	30.96 ± 2.908	9.4	16.20±1.463	9.0	30.80 ± 2.367	7.7
	<i>Kampesterol</i>	3.41±0.345	10.1	6.04 ± 0.621	10.3	3.66±0.349	9.5	6.24 ± 0.575	9.2
	<i>β-sitosterol</i>	3.45±0.163	4.7	8.47 ± 0,532	6.3	3.63±0.168	4.6	8.63 ± 0.421	4.8
HDL frakcija	<i>Dezmosterol</i>	0.17±0.012	7.1	0.23 ± 0.029	12.6	0.15±0.006	4.0	0.25± 0.019	7.8
	<i>7-dehidroholesterol</i>	0.14±0.008	5.8	0.33 ± 0.045	13.6	0.19±0.009	4.5	0.36 ± 0.036	9.8
	<i>Latosterol</i>	0.49±0.018	3.7	1.29 ± 0.108	8.4	0.53±0.020	3.8	1.46 ± 0.093	8.8
	<i>Kampesterol</i>	0.41±0.036	8.8	0.51 ± 0.060	11.7	0.37±0.019	5.1	0.61 ± 0.050	8.4
	<i>β-sitosterol</i>	0.58±0.021	3.6	1.33 ± 0.127	9.6	0.62±0.022	3.5	1.23 ± 0.033	2.5

KV – Koeficijent varijacije

Dobijeni su zadovoljavajući rezultati za razliku između očekivanih i dobijenih koncentracija u ispitivanom rasponu koncentracija. Za ispitivanu metodu, *recovery* je iznosio između 85,3-113,0%, što je u opsegu prihvatljivih vrednosti za *recovery* studiju ako se uzme opšteprihvaćen kriterijum od $\pm 25\%$ [194]. Pored toga, uočen je i visok stepen korelacije između očekivanih vrednosti koncentracija NHS u *pool*-u obogaćenom standardima i dobijenih koncentracija za svaki NHS, kako kod analize ukupnih NHS, tako i prilikom analize NHS u HDL frakciji. Rezultati *recovery* analize prikazani su u tabeli 8.

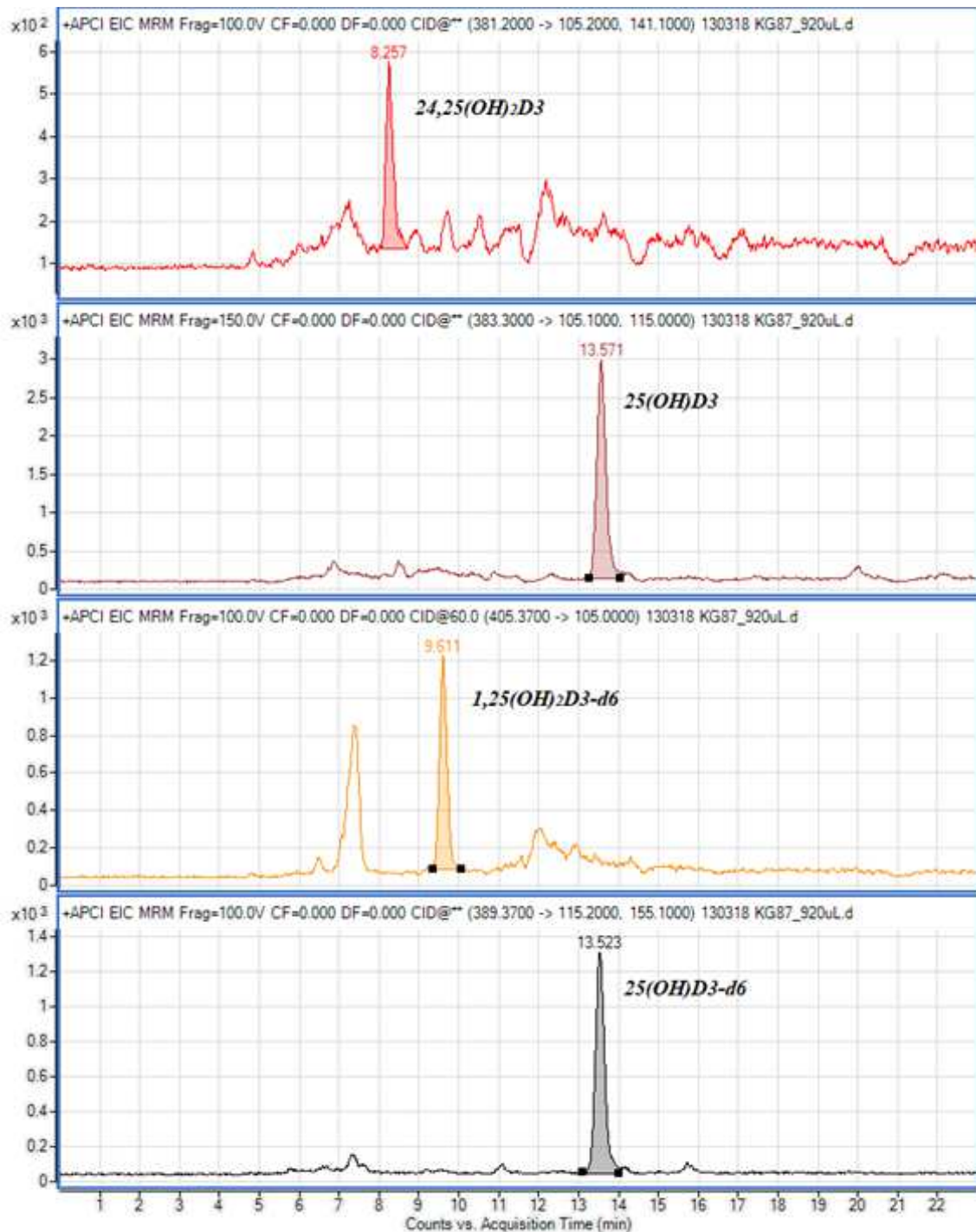
Metoda je primenjena na analizu NHS i NHS_{HDL} u uzorcima seruma dobijenih od 20 zdravih dobrovoljaca i prosečne koncentracije analita od interesa su prikazane u tabeli 9.

4.2 Razvoj i optimizacija metode za analizu statusa vitamina D u serumu

Razvoj metode za određivanje koncentracije metabolita vitamina D u serumu podrazumevao je takođe detaljnu optimizaciju preanalitičkog i analitičkog protokola kako bi se postigla optimalna kvantifikacija ciljnih analita.

Primarno je sprovedeno podešavanje parametara masenog spektrometra pomoću odgovarajućih analitičkih standarda za svako ispitivano jedinjenje, sa ciljem da se obezbede optimalni intenzitet signala kao i zadovoljavajuća selektivnost i osetljivost metode. Kako su metaboliti vitamina D jedinjenja koja relativno teško jonizuju, najpre smo testirali oba raspoloživa jonska izvora (APCI i ESI), i odabrali APCI izvor kao optimalan za kvantifikaciju analita od interesa. Kolizione energije za svaki ispitivani analit su predstavljene u tabeli 4.

Optimizacija hromatografskih uslova je podrazumevala testiranje različitih kolona, te smeša i protoka mobilnih faza, sve u cilju postizanja optimalnog razdvajanja analita od interesa. Testirali smo kolone *Porochell 120* 7.5 × 4.6, 2.7 μm, *Extend 50* × 2.1, 3.5 μm i *Kinetex F5* 100 Å, 100 × 4.6 mm, 2.6 μm, sa odgovarajućim pretkolonama. Optimalno razdvajanje je postignuto sa *Kinetex F5* kolonom. Retencionna vremena pikova od interesa su prikazana u tabeli 4, dok je hromatogram uzorka prikazan na slici 25.



Slika 25. Hromatogram dobijen analizom uzorka sa označenim svim analiziranim metabolitima vitamina D i njihovim IS.

Kao što je prikazano na slici 25, oba analizirana metabolita vitamina D ($25(OH)D_3$ i $24,25(OH)_2D_3$) su razdvojena prema m/z tranzicijama i hromatografski, a svi pikovi su eluirani sa kolone u vremenu od 22 min. Uprkos tome, ukupno vreme analize je produženo na 60 min zbog interferencije fosfolipida koju smo uočili tokom preliminarnih analiza uzoraka seruma. Naime, poznato je da fosfolipidi često interferiraju prilikom analiziranja

jedinjenja iz seruma. Sa ciljem sprečavanja nagomilavanja fosfolipida i njihovog *carry-over-a*, inicijalno smo koristili komercijalne *PHREE*[®] kolone za precipitaciju proteina i uklanjanje fosfolipida iz uzoraka. Međutim, ovaj problem je na kraju uspešno rešen produžavanjem vremena analize za vreme ispiranja kolone 100% ACN sa protokom 0,8 mL/min, te ponovnu ekvibraciju pre naredne analize.

Pripremu uzoraka su obuhvatali koraci precipitacije proteina i tečno-tečne ekstrakcije. Ispitali smo različite rastvore i smeše za precipitaciju proteina (etanol, metanol, ZnSO₄) da bi se na kraju optimalni rezultati postigli upotrebom ohlađenog acetonitrila u odnosu zapremina acetonitril:serum 5:1, te centrifugiranjem na 4000 × g u trajanju od 30 min. Nakon ovog postupka dobijali smo čvrst, masivan talog proteina, adheriran na zid epruvete tako da se supernatant mogao dekantovati pažljivim prelivanjem u sekundarnu epruvetu za ekstrakciju. Pre ekstrakcije iz supernatanta je bilo neophodno ukloniti acetonitril uparavanjem, kako bi se obezbedio optimalni medijum za tečno-tečnu ekstrakciju. Protokol ekstrakcije je detaljno ispitan i testirani su različiti rastvarači i njihove smeše kako bi se postigao optimalan prinos. Finalnu smešu rastvarača za tečno-tečnu ekstrakciju činili su metil-terc-butil etar i etil-acetat u međusobnom odnosu 1:9 (v:v) uz upotrebu 2 mL ove smeše prilikom svake ekstrakcije.

4.2.1 Validacija metode

Jednačine standardnih krivih za ispitivane metabolite vitamin D date su u tabeli 11.

Tabela 11. Kalibracione krive, rasponi koncentracija kalibracionih krivih, limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ u serumu

<i>Analit</i>	<i>Jednačina kalibracione krive i koeficijent korelacije (r)</i>	<i>Opseg lineranosti (ng/mL)</i>	<i>LOD (ng/mL)</i>	<i>LOQ (ng/mL)</i>
25(OH)D ₃	$y = 0,0011x + 0,00359$ $r = 0,9982$	15,6 – 1000,0	1,17	3,89
24,25(OH) ₂ D ₃	$y = 0,0009x + 0,0091$ $r = 0,9950$	7,8 – 1000,0	0,58	1,93

U skladu sa smernicama FDA, prihvatljive varijacije unutar serije i između serija bile su manje od 15% [194]. Oba parametra preciznosti su bila zadovoljavajuća za svaki od analiziranih metabolita vitamina D. Ovi rezultati su sumirani u tabeli 12.

Tabela 12. Preciznost unutar serije i između serija za 25(OH)D3 i 24,25(OH)2D3 u serumu

Parametar	Preciznost							
	Unutar serije				Između serija			
	Niska koncentracija		Visoka koncentracija		Niska koncentracija		Visoka koncentracija	
	Koncentracija (ng/mL)	KV %	Koncentracija (ng/mL)	KV %	Koncentracija (ng/mL)	KV %	Koncentracija (ng/mL)	KV %
25(OH)D3	19,4 ± 0,96	4,9	30,6 ± 1,42	4,6	18,04 ± 1,57	8,7	31,2 ± 1,37	7,6
24,25(OH)2D3	8,1 ± 0,15	3,1	15,3 ± 0,84	5,5	8,2 ± 0,29	4,4	16,1 ± 1,43	8,9

KV – Koefficient varijacije

Dobijeni su zadovoljavajući rezultati za razliku između očekivanih koncentracija i utvrđenih koncentracija u rasponu koncentracija od pet nivoa. Za utvrđenu metodu, *recovery* je iznosio 101,5 i 100% za 25(OH)D i 24,25(OH)2D, dok su prihvatljive vrednosti u rasponu ± 25% prema smernicama FDA [194]. Takođe je postojala dobra korelacija između koncentracija analita u uzorcima opterećenim standardima i analitički dobijenih koncentracija za svaki ispitivani analit. Rezultati *recovery* analize prikazani su u tabeli 13.

Tabela 8. Rezultati *recovery* testa za 25(OH)D3 i 24,25(OH)2D3 u serumu

Analit	Recovery	
	Koefficient korelacije (r)	Nagib (b), %
25(OH)D3	0,993	101,5
24,25(OH)2D3	0,993	100,0

4.3 Analiza markera sinteze i apsorpcije holesterola u ispitivanim populacijama

U cilju razumevanja poremećaja u metabolizmu holesterola izvršili smo analizu markera sinteze i apsorpcije holesterola, kao i njihovih međusobnih odnosa u ispitivanim populacijama. Ispitivan je uticaj antropometrijskih parametara, te osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara. Sa posebnom pažnjom smo istražili uticaj patoloških karakteristika CRC, kao i pola i ITM na promene u metabolizmu holesterola.

4.3.1 Ispitivanje razlika u antropometrijskim, biohemijskim i lipidnim parametrima, koncentracijama NHS u serumu i HDL frakciji i indeksima homeostaze holesterola između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC

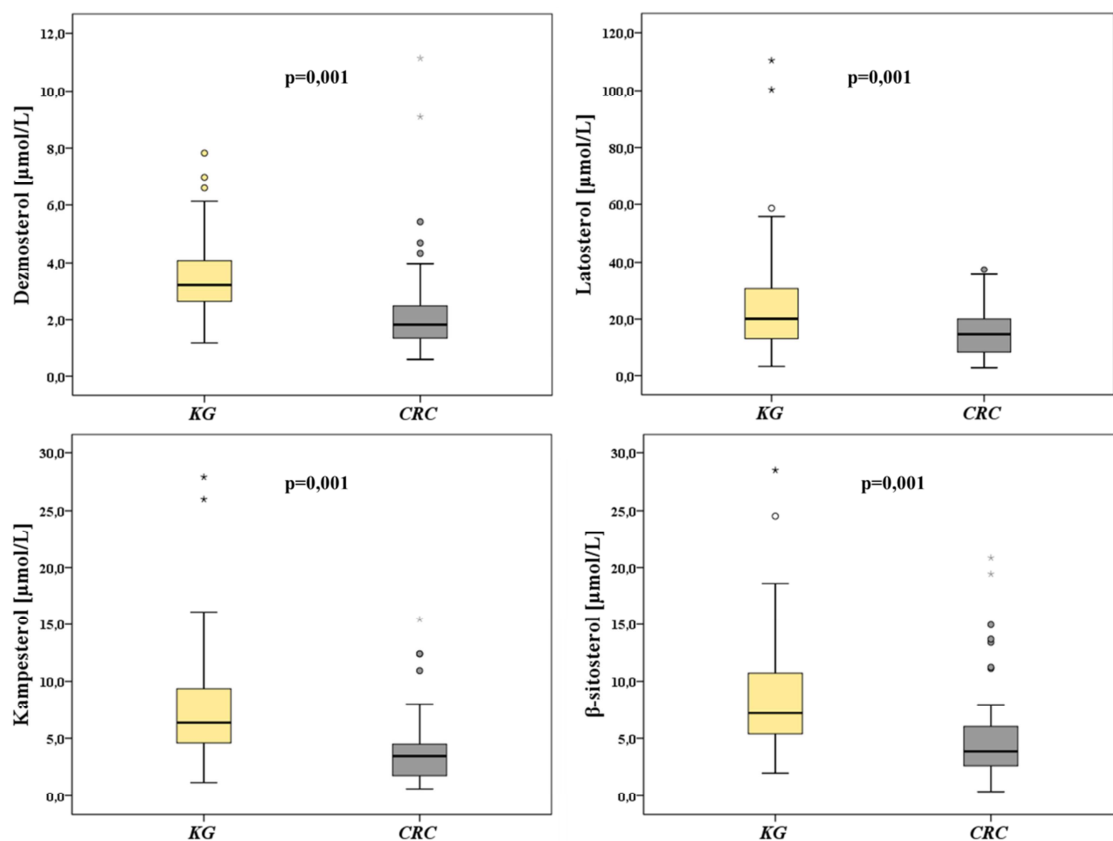
Razlike u demografskim, antropometrijskim i osnovnim biohemijskim parametrima između ispitivanih grupa prikazane su u tabeli 14. Dobijeni rezultati ukazali su na postojanje statistički značajne razlike u godinama starosti između pacijenata i kontrola. Naime, pacijenti su bili značajno stariji u odnosu na zdrave ispitanike uključene u studiju. Razlike u vrednostima ITM između dve grupe nije bilo. Što se koncentracija osnovnih biohemijskih parametara tiče, uočljive su statistički značajne razlike između koncentracija svih ispitivanih parametara, osim koncentracije TG. Koncentracije ukupnih proteina, albumina, UH, LDL-h i HDL-h su značajno niže kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 14).

Tabela 14. Demografske i antropometrijske karakteristike, i koncentracije osnovnih biohemijskih parametara u serumu zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC.

<i>Parametar</i>	<i>KG</i> (<i>n=114</i>)	<i>CRC</i> (<i>n=101</i>)	<i>p</i>
<i>Starost (god)</i>	53 (49,29-59,00)	66,0 (58,00-73,25)	<0,001
<i>ITM (kg/m²)</i>	25,9 (23,45-28,19)	24,8 (22,58-27,04)	0,074
<i>Ukupni proteini (g/L)</i>	72,7 ±6,7	65,9 ±7,29	<0,001
<i>Albumin (g/L)[#]</i>	46,7 (44,75-49,06)	38,8 (35,50-42,87)	<0,001
<i>UH (mmol/L)</i>	5,6 (4,70-6,33)	4,4 (3,85-5,09)	<0,001
<i>TG (mmol/L)</i>	1,3 (0,93-1,61)	1,3 (1,00-1,56)	0,835
<i>HDL-h (mmol/L)</i>	1,3 (1,04-1,52)	1,0 (0,77-1,23)	<0,001
<i>LDL-h (mmol/L)</i>	3,6 (2,85-4,33)	2,8 (2,13-3,34)	<0,001

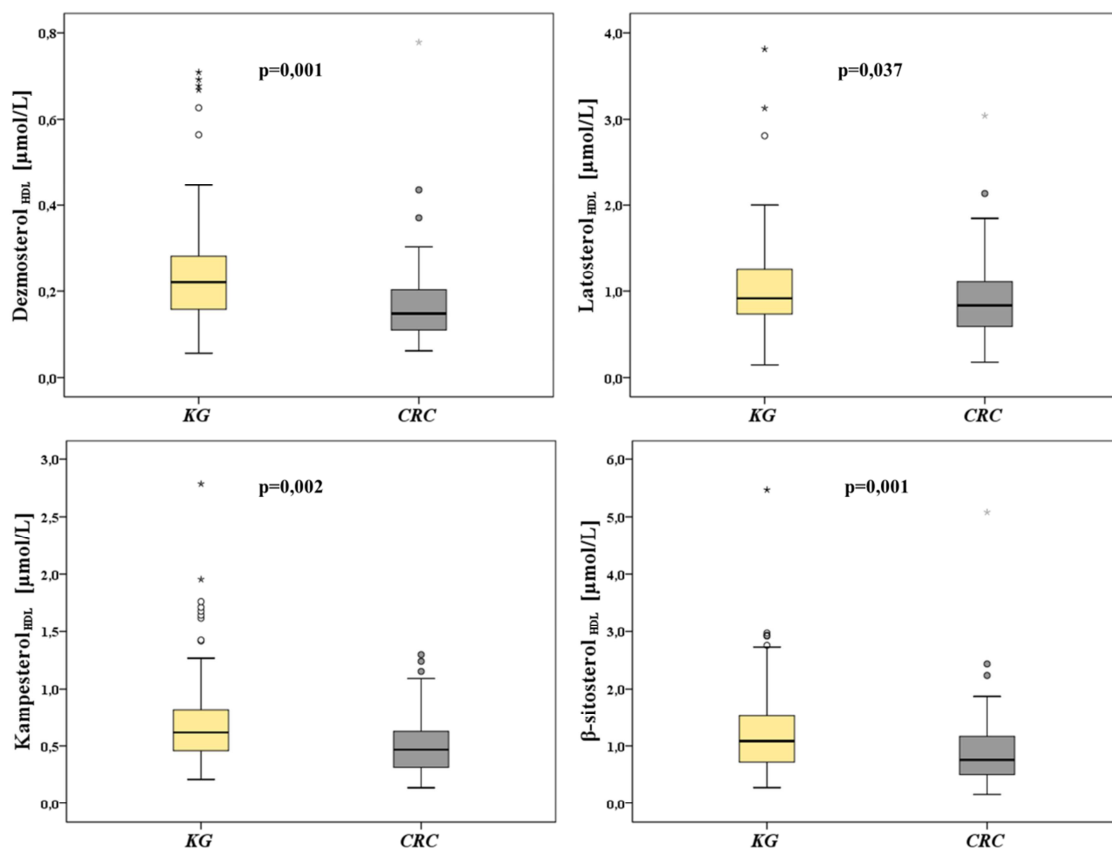
Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom
[#] – Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija, a vrednosti poređene *Student t*-testom.

Dalje smo ispitivali razlike u koncentracijama markera sinteze holesterola između pacijenata i zdravih ispitanika. Na slici 26 su prikazane apsolutne koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC. Uočava se da su apsolutne koncentracije dezmosterola značajno niže kod pacijenata (medijana: 1,81 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,38-2,29 μmol/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijana: 3,15 μmol/L; interkvartilni raspon: 2,62-4,10 μmol/L). Apsolutne koncentracije latosterola su takođe značajno niže kod pacijenata (medijana: 14,94 μmol/L; interkvartilni raspon: 10,27-20,02 μmol/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijana: 19,34 μmol/L; interkvartilni raspon: 13,18-30,54 μmol/L). Apsolutne koncentracije kampesterola su značajno niže u grupi obolelih od CRC (medijana: 2,95 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,74-4,48 μmol/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijana: 6,66 μmol/L; interkvartilni raspon: 4,6-9,68 μmol/L). Takođe, apsolutne koncentracije β-sitosterola su značajno niže u grupi obolelih od CRC (medijana: 3,11 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,94-4,75 μmol/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijana: 7,87 μmol/L; interkvartilni raspon: 5,67-11,58 μmol/L) (slika 26).



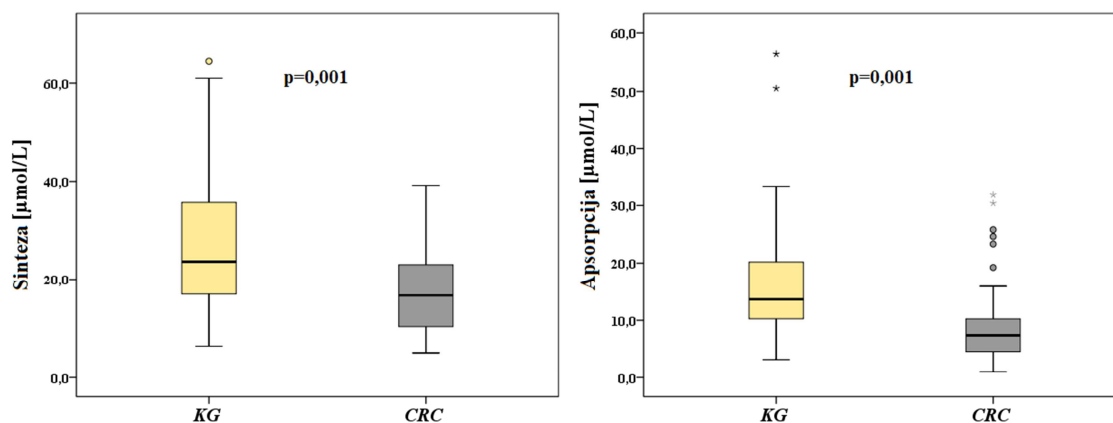
Slika 26. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC.

U kontrolnoj grupi (medijana: 0,24 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,17-0,31 $\mu\text{mol/L}$) su zapažene značajno više apsolutne koncentracije *dezmosterola*_{HDL} u odnosu na pacijente (medijana: 0,17 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,11-0,22 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, koncentracije *latosterola*_{HDL} su bile više u KG (medijana: 0,95 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,75-1,26 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa CRC (medijana: 0,88 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,62-1,24 $\mu\text{mol/L}$). Apsolutne koncentracije *kampesterola*_{HDL} su bile više kod zdravih ispitanika (medijana: 0,67 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,46-0,87 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente (medijana: 0,49 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,33-0,65 $\mu\text{mol/L}$). Apsolutne koncentracije *β -sitosterola*_{HDL} su bile više kod zdravih ispitanika (medijana: 1,17 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,79-1,70 $\mu\text{mol/L}$) nego kod na pacijenata (medijana: 0,79 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,55-1,18 $\mu\text{mol/L}$) (slika 27).



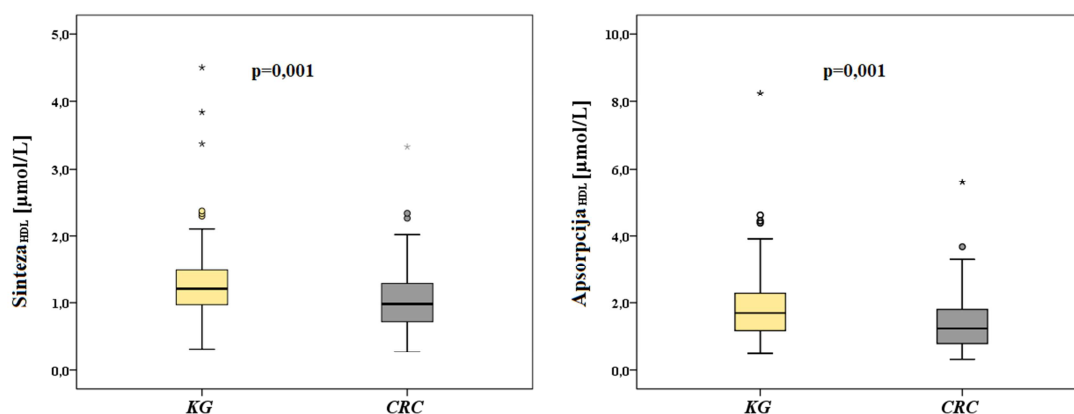
Slika 27. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu, bile su značajno više kod zdravih ispitanika (medijana: 22,88 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 16,39-36,96 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente obolele od CRC (medijana: 16,52 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 12,17-22,71 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu su bile značajno više kod zdravih ispitanika (medijana: 13,83 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 10,3-20,83 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente obolele od CRC (medijana 5,6 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 3,72-9,18 $\mu\text{mol/L}$) (slika 28).



Slika 28. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji, bile su značajno više kod zdravih ispitanika (medijana: 1,20 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,97-1,47 µmol/L) u odnosu na pacijente obolele od CRC (medijana: 0,98 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,72-1,30 µmol/L). Takođe, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su bile značajno više kod zdravih ispitanika (medijana: 1,70 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,16-2,29 µmol/L) u odnosu na pacijente obolele od CRC (medijana: 1,24 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,80-1,82 µmol/L) (slika 29).



Slika 29. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji između zdravih ispitanika i pacijenata obolelih od CRC.

Relativne koncentracije markera apsorpcije kao i relativne koncentracije dezmosterola su se značajno razlikovale između dve grupe, dok između relativnih koncentracija latosterola nije bilo statistički značajne razlike. Dodatno, nije bilo razlika ni u relativnim koncentracijama NHS u HDL frakciji između ispitivanih grupa (tabela 15).

Tabela 15. Relativne koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC.

<i>Parametar</i>	<i>KG</i> (n=87)	<i>CRC</i> (n=70)	<i>p</i>
<i>Dezmosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,6 (0,49-0,69)	0,4 (0,31-0,54)	<0,001
<i>Latosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	3,7 (2,35-6,03)	3,4 (2,10-4,54)	0,054
<i>Kampesterol/holesterol</i> (mmol/mol)	1,2 (0,849-1,619)	0,8 (0,46-0,96)	<0,001
<i>β-sitosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	1,4(0,99-1,86)	0,9 (0,59-1,24)	<0,001
<i>Dezmosterol_{HDL} /HDL-h</i> (mmol/mol)	0,2 (0,13-0,22)	0,1 (0,11-0,21)	0,140
<i>Latosterol_{HDL} /HDL-h</i> (mmol/mol)	0,7 (0,50-1,0)	0,8 (0,58-1,18)	0,249
<i>Kampesterol_{HDL} /HDL-h</i> (mmol/mol)	0,5 (0,33-0,69)	0,5 (0,34-0,69)	0,931
<i>β-sitosterol_{HDL} /HDL-h</i> (mmol/mol)	0,8 (0,57-1,29)	0,8 (0,55-1,22)	0,812

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Sinteza/Apsorpcija* je bio značajno viši kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike. Odnos *Dezmosterol/Latosterol* u serumu i u HDL frakciji je bio značajno niži kod pacijenata sa CRC u odnosu zdrave ispitanike. Odnosi *NHS_{HDL}/NHS* su bili značajno veći kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 16).

Tabela 16. Razlike u indeksima homeostaze holesterola u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika.

<i>Parametar</i>	<i>KG</i> (<i>n=87</i>)	<i>CRC</i> (<i>n=70</i>)	<i>P</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,17 (0,12-0,25)	0,14 (0,08-0,2)	0,045
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	1,37 (0,9-2,9)	2,81 (1,58-3,81)	0,006
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}_{HDL}}$	0,68 (0,42-1,13)	0,78 (0,56-1,12)	0,406
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Dezmosterol}}$	0,7 (0,50-0,10)	0,8 (0,60-0,11)	0,005
$\frac{\text{Latosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}}$	0,05 (0,03-0,07)	0,06 (0,04-0,08)	0,021
$\frac{\text{Kampesterol}_{HDL}}{\text{Kampesterol}}$	0,10 (0,07-0,13)	0,16 (0,11-0,27)	0,001
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{HDL}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,15 (0,11-0,19)	0,21 (0,16-0,43)	0,001
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Sinteza}}$	0,05 (0,03-0,07)	0,06 (0,04-0,08)	0,048
$\frac{\text{Apsorpcija}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}}$	0,13 (0,09-0,16)	0,18 (0,14-0,36)	0,001
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}_{HDL}}$	0,23 (0,17-0,31)	0,18 (0,14-0,26)	0,004

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

4.3.2 Korelaciona analiza između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara i koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola kod zdravih ispitanika

Kod zdravih ispitanika smo analizirali i korelacije između NHS u serumu i HDL frakciji i antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara (tabela 17). Koncentracije dezmosterola u serumu su pozitivno korelirale sa ITM, koncentracijom ukupnih proteina, albumina, UH, TG, HDL-h i LDL-h. Koncentracije latosterola u serumu su pozitivno korelirale sa ITM, koncentracijama TG i LDL-h, dok je primećena negativna korelacija sa koncentracijama HDL-h. Koncentracije kampesterola u serumu su negativno korelirale sa ITM, a pozitivno sa koncentracijom UH i LDL-h. Koncentracije β -sitosterola u serumu su takođe pokazale negativnu korelaciju sa ITM i pozitivnu sa LDL-h, ali i sa HDL-h. Kada je reč o koncentraciji *dezmosterola_{HDL}*, jedina korelacija je zabeležena sa koncentracijom albumina, i to pozitivna, dok su koncentracije *latosterola_{HDL}* negativno korelirale sa godinama starosti. Koncentracije *kampesterola_{HDL}* i *β -sitosterola_{HDL}* su korelirale negativno sa ITM, koncentracijama TG i HDL-h.

Tabela 17. Korelacije između antropometrijskih karakteristika, osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara sa koncentracijama NHS i NHS_{HDL} kod zdravih ispitanika

Parametar		Godine starosti	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
<i>Dezmosterol</i> (μmol/L)	ρ	-0,063	0,317	0,260	0,290	0,360	0,276	-0,155	0,406
	<i>p</i>	0,523	0,001	0,006	0,004	0,001	0,005	0,115	0,001
<i>Latosterol</i> (μmol/L)	ρ	-0,077	0,208	-0,160	0,017	0,090	0,225	-0,375	0,194
	<i>p</i>	0,434	0,035	0,104	0,868	0,363	0,021	0,001	0,047
<i>Kampesterol</i> (μmol/L)	ρ	0,011	-0,347	0,008	0,029	0,390	0,111	0,134	0,347
	<i>p</i>	0,908	0,001	0,933	0,784	0,001	0,263	0,176	0,001
<i>β-sitosterol</i> (μmol/L)	ρ	0,093	-0,384	-0,059	-0,026	0,336	0,012	0,236	0,277
	<i>p</i>	0,348	0,001	0,552	0,804	0,001	0,905	0,016	0,004
<i>Dezmosterol</i> _{HDL} (μmol/L)	ρ	-0,005	-0,062	0,063	0,226	0,153	-0,179	0,160	0,061
	<i>p</i>	0,964	0,551	0,535	0,034	0,131	0,078	0,115	0,549
<i>Latosterol</i> _{HDL} (μmol/L)	ρ	-0,222	0,132	-0,018	0,100	-0,021	-0,132	-0,006	-0,023
	<i>p</i>	0,029	0,206	0,861	0,357	0,840	0,197	0,956	0,826
<i>Kampesterol</i> _{HDL} (μmol/L)	ρ	0,062	-0,504	-0,127	-0,025	0,094	-0,357	0,375	-0,010
	<i>p</i>	0,544	0,001	0,217	0,816	0,361	0,001	0,001	0,922
<i>β-sitosterol</i> _{HDL} (μmol/L)	ρ	0,027	-0,492	-0,134	0,075	0,189	-0,275	0,316	0,116
	<i>p</i>	0,792	0,001	0,189	0,488	0,064	0,006	0,002	0,258

Rezultati su dobijeni *Spearman* korelacionom analizom.

Zbirne koncentracije markera sinteze u serumu su korelirale pozitivno sa vrednošću ITM, koncentracijama TG i LDL-h, a negativno sa koncentracijom HDL-h. Zbirne koncentracije kampesterola i β-sitosterola su korelirale pozitivno sa koncentracijama UH, HDL-h i LDL-h, dok je negativna korelacija postojala samo sa vrednostima ITM. Odnos *Dezmosterol/Latosterol* je korelirao pozitivno sa koncentracijom ukupnih proteina, albumina i HDL-h. Odnos *Sinteza/Apsorpcija* pozitivno je korelirao sa vrednostima ITM, a negativno sa vrednostima HDL-h. (tabela 18).

Tabela 18. Korelacije između antropometrijskih karakteristika i osnovnih biokemijskih i lipidnih parametara sa indeksima homeostaze holesterola u serumu zdravih ispitanika

Parametar		Starost (god)	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
Sinteza (μ mol/L)	ρ	-0,082	0,278	-0,128	-0,002	0,097	0,203	-0,356	0,236
	<i>p</i>	0,431	0,008	0,218	0,987	0,350	0,050	0,001	0,022
Apsorpcija (μ mol/L)	ρ	0,066	-0,356	-0,044	-0,009	0,351	0,053	0,193	0,300
	<i>p</i>	0,507	0,001	0,657	0,929	0,001	0,592	0,049	0,002
<u>Dezmosterol</u> <u>Latosterol</u>	ρ	0,075	-0,098	0,352	0,216	0,146	-0,013	0,316	-0,010
	<i>p</i>	0,475	0,356	0,001	0,047	0,161	0,904	0,002	0,922
<u>Sinteza</u> <u>Apsorpcija</u>	ρ	-0,092	0,404	-0,011	0,037	-0,169	0,092	-0,362	-0,052
	<i>p</i>	0,380	0,001	0,918	0,738	0,103	0,377	0,001	0,622

Rezultati su dobijeni *Spearman* korelacionom analizom.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji su negativno korelirale sa godinama starosti, dok su zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji negativno korelirale sa ITM i koncentracijama TG, a pozitivno sa koncentracijama HDL-h. Odnos $Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}$ je pozitivno korelirao sa ITM, negativno sa HDL-h. Odnos $dezmosterol_{HDL}/dezmosterol$ je negativno korelirao sa ITM, koncentracijama TG i LDL-h, a pozitivno sa koncentracijama HDL-h. Odnos $latosterol_{HDL}/latosterol$ je negativno korelirao sa koncentracijama TG i LDL-h, a pozitivno sa koncentracijama HDL-h. Odnos $kampesterol_{HDL}/kampesterol$ je negativno korelirao sa koncentracijama UH, TG i LDL-h, a pozitivno sa koncentracijama HDL-h. Odnos β - $sitosterol_{HDL}/\beta$ - $sitosterol$ su negativno korelirale sa koncentracijama UH, TG i LDL-h, a pozitivno sa koncentracijama HDL-h (tabela 19).

Tabela 19. Korelacije između antropometrijskih karakteristika i osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara sa indeksima homeostaze holesterola u HDL frakciji kod zdravih ispitanika

Parametar		Starosti (god)	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
$Sinteza_{HDL}$ ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,227	0,091	0,074	0,178	0,014	-0,103	-0,019	0,004
	p	0,025	0,385	0,473	0,100	0,895	0,315	0,851	0,970
$Apsorpcija_{HDL}$ ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,053	-0,509	-0,131	0,050	0,164	-0,314	0,341	0,081
	p	0,604	0,001	0,200	0,643	0,108	0,002	0,001	0,432
$\frac{Sinteza_{HDL}}{Apsorpcija_{HDL}}$	ρ	-0,139	0,446	0,124	0,051	-0,098	0,144	-0,242	-0,062
	p	0,178	0,001	0,229	0,643	0,343	0,163	0,018	0,546
$\frac{Dezmosterol_{HDL}}{Dezmosterol}$	ρ	0,040	-0,350	-0,181	-0,047	-0,169	-0,414	0,293	-0,284
	p	0,700	0,001	0,080	0,670	0,102	0,001	0,004	0,005
$\frac{Latosterol_{HDL}}{Latosterol}$	ρ	-0,043	-0,117	0,019	0,023	-0,146	-0,293	0,342	-0,284
	p	0,689	0,281	0,858	0,837	0,169	0,005	0,001	0,007
$\frac{Kampesterol_{HDL}}{Kampesterol}$	ρ	0,022	-0,189	-0,157	0,001	-0,308	-0,526	0,394	-0,456
	p	0,830	0,072	0,128	0,995	0,002	0,001	0,001	0,001
$\frac{\beta - sitosterol_{HDL}}{\beta - sitosterol}$	ρ	-0,079	-0,177	-0,110	0,161	-0,186	-0,374	0,237	-0,271
	p	0,445	0,092	0,290	0,142	0,071	0,001	0,021	0,008
$\frac{Sinteza_{HDL}}{Sinteza}$	ρ	-0,051	-0,169	0,043	0,043	-0,144	-0,261	0,336	-0,299
	p	0,640	0,125	0,691	0,707	0,184	0,015	0,001	0,005
$\frac{Apsorpcija_{HDL}}{Apsorpcija}$	ρ	-0,034	-0,174	-0,124	0,133	-0,233	-0,461	0,316	-0,346
	p	0,747	0,097	0,230	0,226	0,023	0,001	0,002	0,001

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

4.3.3 Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na pol i ITM zdravih ispitanika

Muškarci i žene u kontrolnoj grupi su se razlikovali prema vrednostima ITM, koncentracijama albumina i HDL-h u serumu. Muškarci su imali viši ITM, više vrednosti koncentracija albumina, ali niže koncentracije HDL-h u odnosu na žene. Razlika između muškaraca i žena kada su u pitanju koncentracije ukupnih proteina, UH, TG i LDL-h nije bilo (tabela 20).

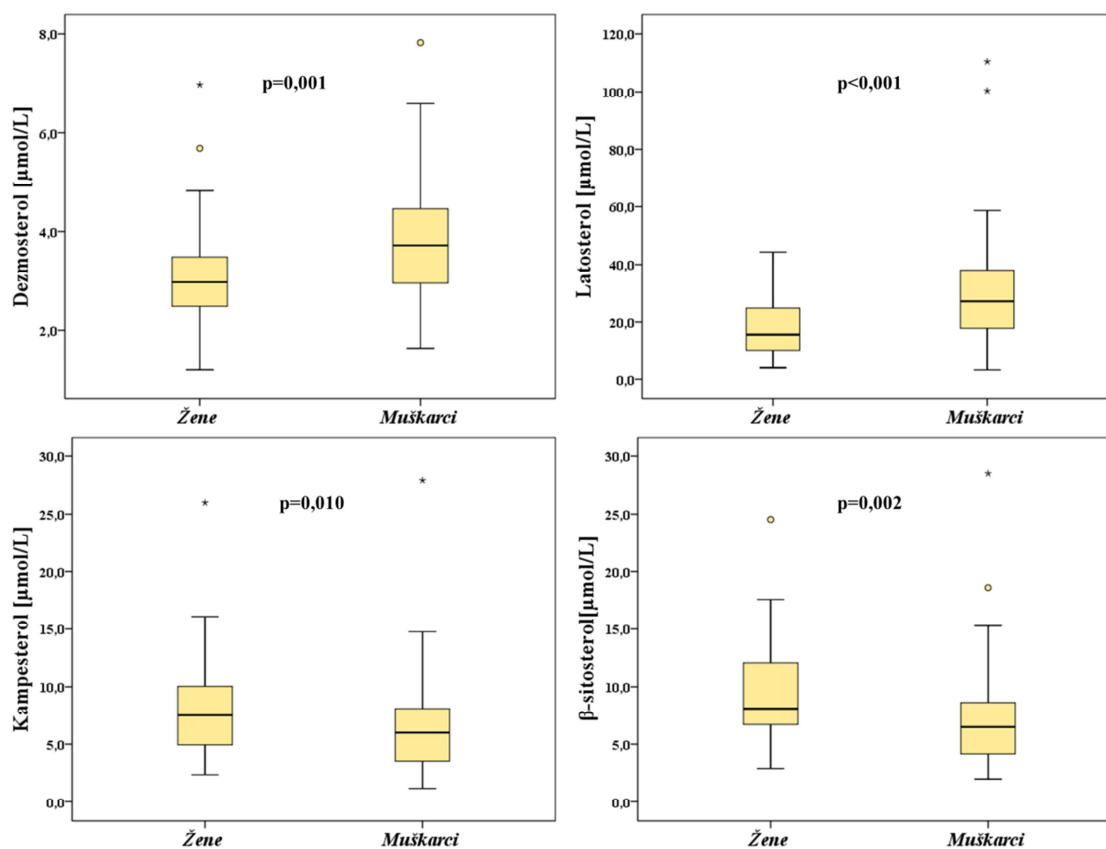
Tabela 20. Razlike u antropometrijskim, biohemijskim i lipidnim parametrima prema polu u grupi zdravih ispitanika

<i>Parametar</i>	<i>Muškarci (n=56)</i>	<i>Žene (n=58)</i>	<i>p</i>
<i>ITM (kg/m²)</i>	26,91 (24,61-28,53)	24,81 (22,91-27,89)	0,008
<i>Ukupni protein (g/L)</i>	71,33 (68,02-75,16)	74,28 (67,05-79,56)	0,818
<i>Albumin (g/L)</i>	47,43 (44,58-50,74)	46,4 (44,35-47,9)	0,021
<i>UH (mmol/L)</i>	5,32 (4,54-6,11)	5,78 (5,21-6,63)	0,146
<i>TG (mmol/L)</i>	1,34 (1,05-1,69)	1,26 (0,96-1,52)	0,102
<i>HDL-h (mmol/L)</i>	1,16 (0,94-1,28)	1,47(1,17-1,9)	0,001
<i>LDL-h (mmol/L)</i>	3,62(2,78-4,27)	3,68(2,88-4,47)	0,658

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Na slici 30 su prikazane razlike u koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu između osoba muškog i osoba ženskog pola u grupi zdravih ispitanika. Statistički značajna razlika je uočena kada su u pitanju koncentracije sva četiri parametra (dezmosterol, latosterol, kampesterol, β -sitosterol). Koncentracije dezmosterola u serumu su bile više kod osoba muškog pola (medijana: 3,51 μ mol/L; interkvartilni raspon: 3,03-3,74 μ mol/L) u odnosu na osobe ženskog pola (medijana: 2,49 μ mol/L; interkvartilni raspon: 2,97-3,51 μ mol/L). Takođe i koncentracije latosterola u serumu su bile više kod muškaraca (medijana: 25,99 μ mol/L; interkvartilni raspon: 17,8-26,33 μ mol/L) u odnosu na žene (medijana: 9,78 μ mol/L; interkvartilni raspon: 15,36-25,99 μ mol/L). Sa druge strane, serumske koncentracije kampesterola su bile niže kod muškaraca (medijana: 4,94 μ mol/L; interkvartilni raspon: 7,57-10,46 μ mol/L) u odnosu na žene

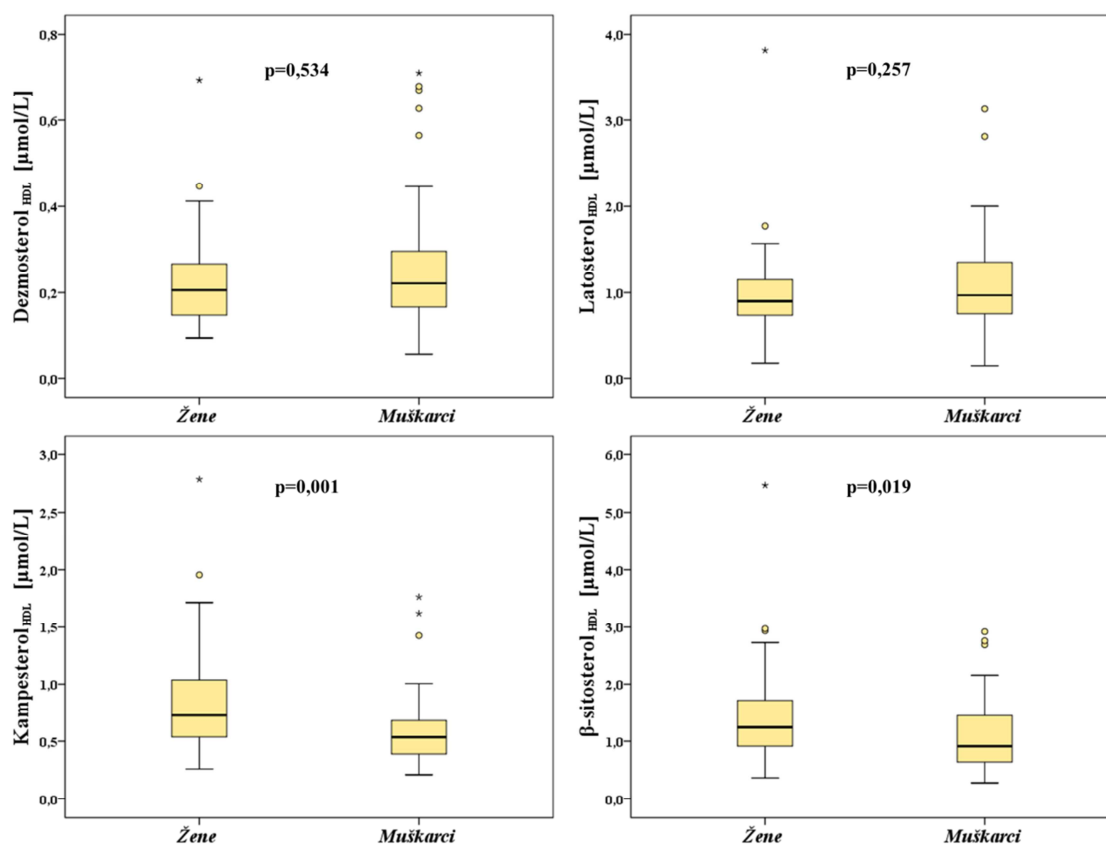
(medijana: 10,46 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 3,45-5,57 $\mu\text{mol/L}$), kao i koncentracije β -sitosterola (medijana: 12,52 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 4,04-6,4 $\mu\text{mol/L}$ i medijana: 6,72 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 8,15-12,52 $\mu\text{mol/L}$, za muškarce i žene, redom).



Slika 30. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu između osoba ženskog i osoba muškog pola u grupi zdravih ispitanika.

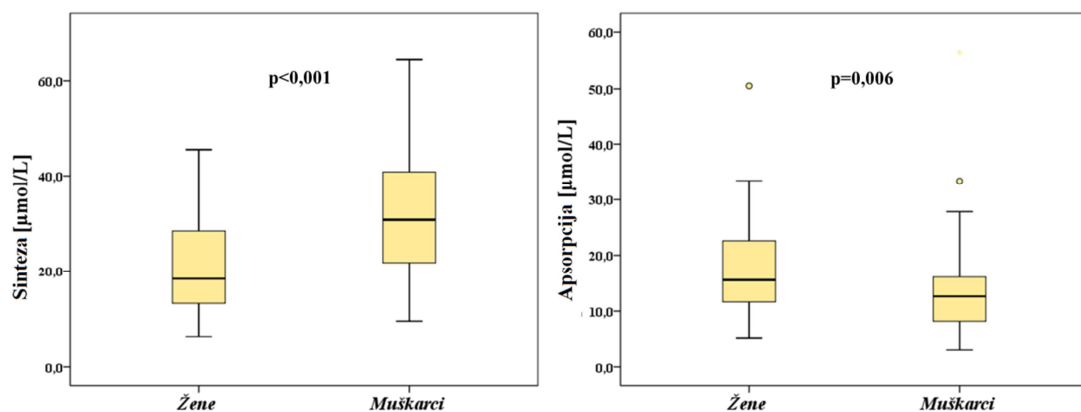
Na slici 31 su prikazane razlike između koncentracija ispitivanih parametara u HDL frakciji u odnosu na pol. Apsolutne koncentracije *dezmosterola*_{HDL} se nisu značajno razlikovale kod osoba muškog pola (medijana: 0,22 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,16-0,29 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe ženskog pola (medijana: 0,23 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,17-0,30 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, ni apsolutne koncentracije *latosterola*_{HDL} se nisu značajno razlikovale između osoba muškog (medijana: 0,91 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,74-1,16 $\mu\text{mol/L}$) i osoba ženskog pola (medijana: 1,16 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,91-0,71 $\mu\text{mol/L}$). Međutim, statistički značajne razlike u odnosu na pol su primjećene kada su u pitanju koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Tako su koncentracije *kampesterola*_{HDL} kod žena (medijana: 1,06 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,75-0,39 $\mu\text{mol/L}$) bile značajno više u odnosu na muškarce (medijana: 0,75 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,53-1,06 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, i koncentracije *β -sitosterola*_{HDL} su bile

više kod žena (medijana: 1,78 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,29-0,64 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na muškarce (medijana: 1,29 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,91-1,78 $\mu\text{mol/L}$).



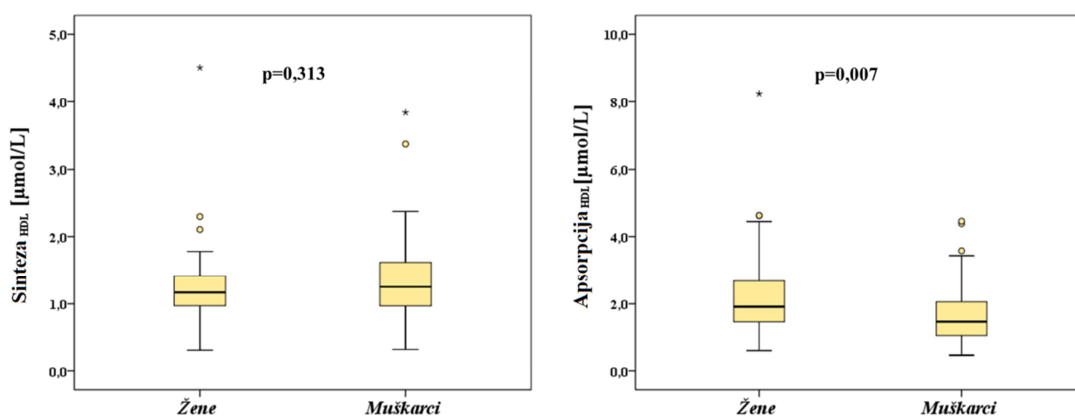
Slika 31. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji između osoba ženskog i osoba muškog pola u grupi zdravih ispitanika.

Kada je u pitanju zbirna koncentracija markera sinteze holesterola u serumu, primećeno je da se kod žena javljaju niže koncentracije ukupnih markera sinteze u serumu (medijana: 18,25 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 13,17-25,09 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na muškarce (medijana: 32,67 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 21,61-41,36 $\mu\text{mol/L}$) (slika 32). Sa druge strane, zbirna koncentracija markera apsorpcije holesterola je bila viša kod osoba ženskog pola (medijana: 16,03 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 12,51-22,55 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe muškog pola (medijana: 13,06 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 7,63-20,07 $\mu\text{mol/L}$).



Slika 32. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu između osoba muškog i osoba ženskog pola u grupi zdravih ispitanika.

Za razliku od zbirnih serumskih koncentracija markera sinteze holesterola, zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji nisu pokazale značajne razlike u odnosu na pol (medijana: 1,17 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,97-1,43 µmol/L, i medijana: 1,35 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,08-1,8 µmol/L, za žene i muškarce, redom). Sa druge strane, zbirne koncentracije kampesterola i β-sitosterola u HDL frakciji su bile značajno više kod žena (medijana: 2,16 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,69-2,9 µmol/L) u odnosu na muškarce (medijana: 1,59 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,09-2,34 µmol/L) (slika 33).



Slika 33. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji između osoba muškog i osoba ženskog pola u grupi zdravih ispitanika.

Dalje smo istražili razlike u relativnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji između muškaraca i žena u ispitivanoj zdravoj populaciji. Relativne koncentracije dezmosterola i latosterola u serumu su bile značajno više kod muškaraca u odnosu na žene, dok su relativne koncentracije

kampesterola i β -sitosterola u serumu bile značajno niže kod muškaraca u odnosu na žene. U HDL frakciji, relativne koncentracije dezmosterola i latosterola su bile značajno više kod muškaraca u odnosu na žene, dok se relativne koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji nisu razlikovale između dva pola (Tabela 21).

Tabela 21. Razlike u relativnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola u grupi zdravih ispitanika.

<i>Parametar</i>	<i>Muškarci (n=54)</i>	<i>Žene (n=49)</i>	<i>P</i>
<i>Dezmosterol/holesterol</i>	0,67(0,59-0,83)	0,52(0,42-0,6)	0,001
<i>Latosterol/holesterol</i>	5,32(3,48-7,55)	2,57(2-3,69)	0,001
<i>Kampesterol/holesterol</i>	1,09(0,74-1,62)	1,38(0,97-1,8)	0,048
<i>β-sitosterol/holesterol</i>	1,39(0,82-2,15)	1,62(1,22-2,03)	0,011
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,22(0,16-0,31)	0,15(0,12-0,21)	0,001
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h</i>	1(0,67-1,35)	0,63(0,44-0,88)	0,005
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,48(0,31-0,65)	0,56(0,36-0,75)	0,383
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,86(0,63-1,3)	0,85(0,66-1,3)	0,936

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Dezmosterol/Latosterol* je bio značajno viši kod žena u odnosu na muškarce. Sa druge strane odnos *Sinteza/Apsorpcija* je bio značajno viši kod muškaraca u odnosu na žene. Odnos *Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}* bio je značajno viši kod muškaraca u odnosu na žene. Odnos *latosterol_{HDL}/latosterol*, bio je značajno viši kod žena u odnosu na muškarce, kao i odnos *Sinteza_{HDL}/Sinteza*. Udeo svih ostalih NHS u HDL frakciji u odnosu na njihove koncentracije u serumu nisu se značajno razlikovali između polova (tabela 22).

Tabela 22. Razlike u indeksima homeostaze holesterola u serumu i HDL frakciji kod osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola u grupi zdravih ispitanika.

<i>Parametar</i>	<i>Muškarci (n=54)</i>	<i>Žene (n=49)</i>	<i>p</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,14 (0,1-0,21)	0,21 (0,15-0,27)	0,009
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	2,05 (1,2-4,14)	1,1 (0,75-1,73)	0,001
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}$	0,73 (0,61-1,68)	0,56 (0,33-0,81)	0,017
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Dezmosterol}}$	0,07 (0,05-0,1)	0,09 (0,06-0,11)	0,062
$\frac{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}}$	0,05 (0,03-0,07)	0,07 (0,05-0,09)	0,001
$\frac{\text{Kampesterol}_{\text{HDL}}}{\text{Kampesterol}}$	0,1 (0,07-0,13)	0,11 (0,08-0,14)	0,142
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{\text{HDL}}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,15 (0,11-0,21)	0,16 (0,12-0,19)	0,964
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Sinteza}}$	0,05 (0,03-0,07)	0,07 (0,05-0,09)	0,001
$\frac{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}}$	0,12 (0,1-0,18)	0,13 (0,11-0,17)	0,606
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}$	0,23 (0,15-0,30)	0,23 (0,18-0,31)	0,530

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Kada je reč o ispitivanju razlika u odnosu na prisustvo povišene telesne mase kod zdravih ispitanika, najpre smo analizirali koncentracije osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara kod osoba sa normalnom/sniženom telesnom masom ($\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$) i osoba sa povišenom telesnom masom ($\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) (tabela 23).

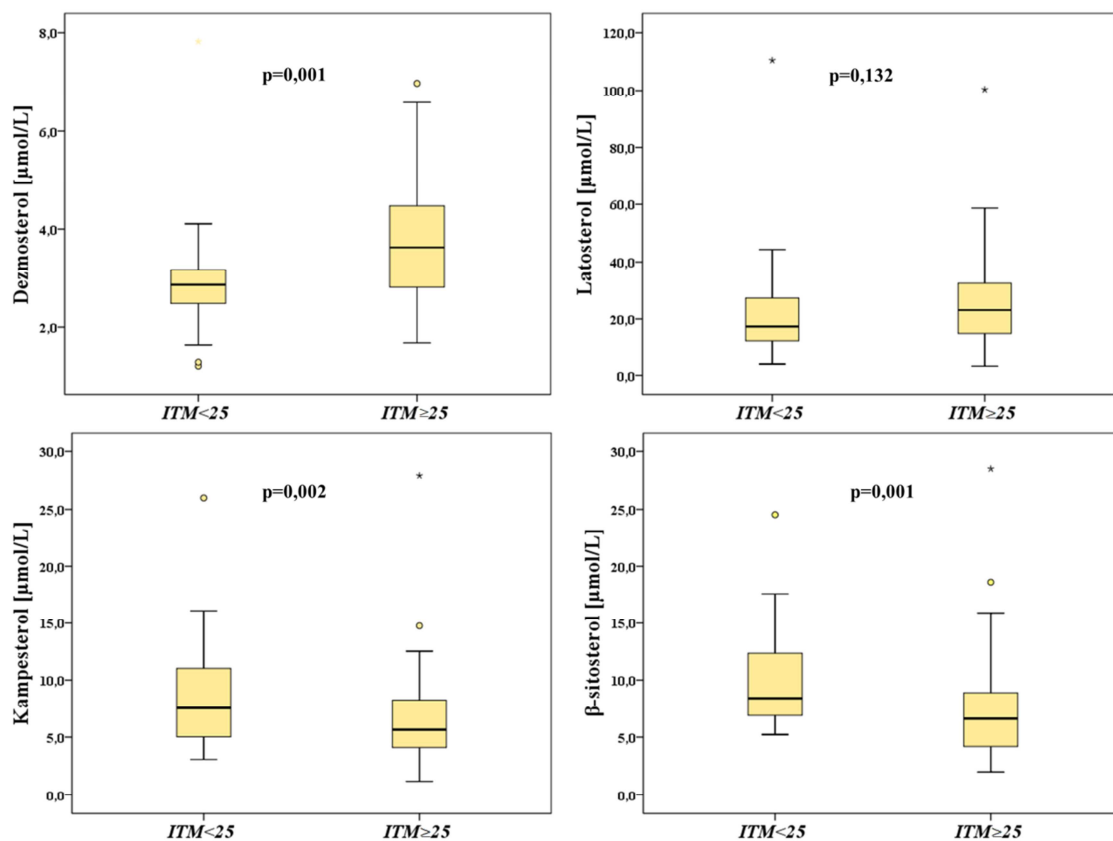
Koncentracije ukupnih proteina, albumina, UH i LDL-h u serumu se nisu razlikovale između zdravih osoba sa povišenom telesnom masom i osoba sa normalnom/sniženom telesnom masom. Sa druge strane, koncentracije TG u serumu su bile značajno više kod osoba sa povišenom telesnom masom, dok su koncentracije HDL-h u serumu bile značajno niže kod ovih ispitanika u odnosu na osobe normalne/snižene telesne mase (Tabela 23).

Tabela 23. Razlike u biohemijskim i lipidnim parametrima u odnosu na prisustvo povišene telesne mase u grupi zdravih ispitanika

<i>Parametar</i>	<i>ITM<25 kg/m²</i> (n=44)	<i>ITM≥25 kg/m²</i> (n=66)	<i>p</i>
<i>Ukupni protein (g/L)</i>	70,76 (65,32-77,58)	72,77 (68,08-76,61)	0,701
<i>Albumin (g/L)</i>	45,7 (44,2-47,9)	46,79 (45,23-49,82)	0,289
<i>Ukupan holesterol (mmol/L)</i>	5,61 (4,89-6,09)	5,9 (4,74-6,55)	0,751
<i>TG (mmol/L)</i>	1,18 (0,97-1,32)	1,51 (1,11-1,85)	0,007
<i>HDL-h (mmol/L)</i>	1,43 (1,17-1,61)	1,18 (0,97-1,44)	0,019
<i>LDL-h (mmol/L)</i>	3,61 (2,85-3,99)	3,8 (2,88-4,5)	0,370

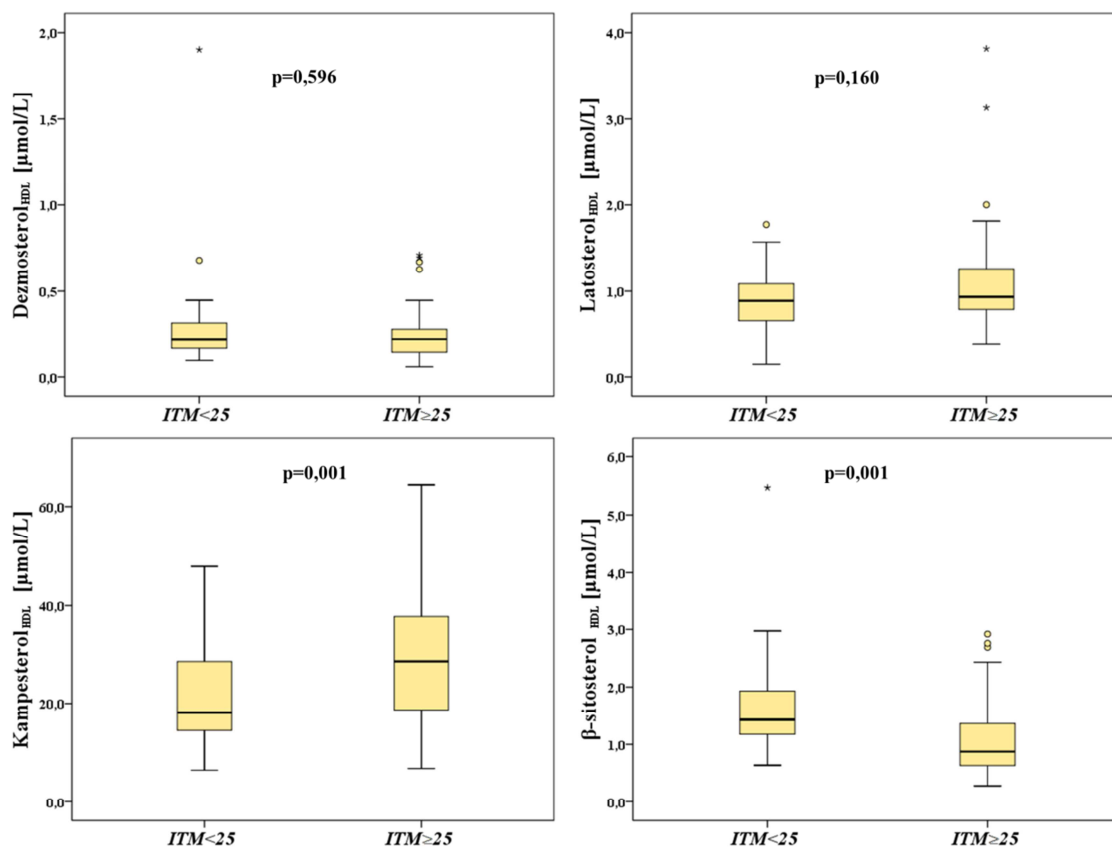
Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Na slici 34 su prikazane razlike između apsolutnih koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu, u odnosu na prisustvo povišene telesne mase kod zdravih ispitanika. Kao što se može videti, koncentracije dezmosterola u serumu su bile značajno više kod osoba sa povišenom telesnom masom (medijana: 3,61 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 3-4,46 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa normalnom/sniženom telesnom masom (medijana: 2,84 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 2,35-3,13 $\mu\text{mol/L}$). Sa druge strane, razlika u koncentracijama latosterola u serumu između osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ i osoba sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ nije bilo (medijana: 15,1 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 11,76-26,72 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 24,18 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 15,15-35,16 $\mu\text{mol/L}$, redom). Koncentracije oba markera apsorpcije su se značajno razlikovale u odnosu na prisustvo povišene telesne mase. Koncentracije kampesterola su bile više u serumu osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: 8,26 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 5,53-11,9 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: 5,82 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 4,13-8,58 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, i koncentracije β -sitosterola su bile više u serumu osoba sa niskom/normalnom telesnom masom (medijana: 10,72 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 6,94-12,4 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa povišenom telesnom masom (medijana: 6,9 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 4,24-10,01 $\mu\text{mol/L}$).



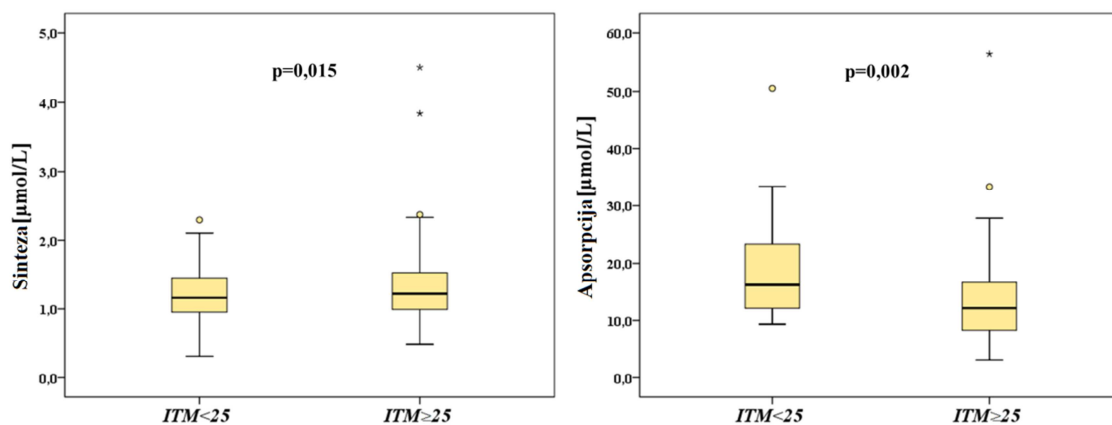
Slika 34. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu kod osoba sa povišenom telesnom masom u odnosu na osobe normalne/niske telesne mase, u grupi zdravih ispitanika.

Koncentracije *dezmosterola_{HDL}* se nisu značajno razlikovale između osoba sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 0,24 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,18-0,35 μmol/L) u odnosu na osobe sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,23 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,16-0,29 μmol/L). Takođe, značajne razlike nije bilo ni kada su u pitanju koncentracije *latosterola_{HDL}* kod osoba sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 0,89 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,69-1,12 μmol/L) u odnosu na osobe sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 1,04 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,8-1,3 μmol/L). Međutim, koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su se značajno razlikovale između dve ispitivane grupe. Tako su koncentracije *kampesterola_{HDL}* bile niže kod osoba sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 0,83 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,63-1,23 μmol/L) u odnosu na osobe sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,53 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,36-0,75 μmol/L). Takođe, osobe sa ITM < 25 kg/m² su imale više vrednosti *β-sitosterola_{HDL}* (medijana: 1,5 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,18-1,99 μmol/L) u odnosu na osobe sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,9 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,67-1,47 μmol/L) (slika 35).



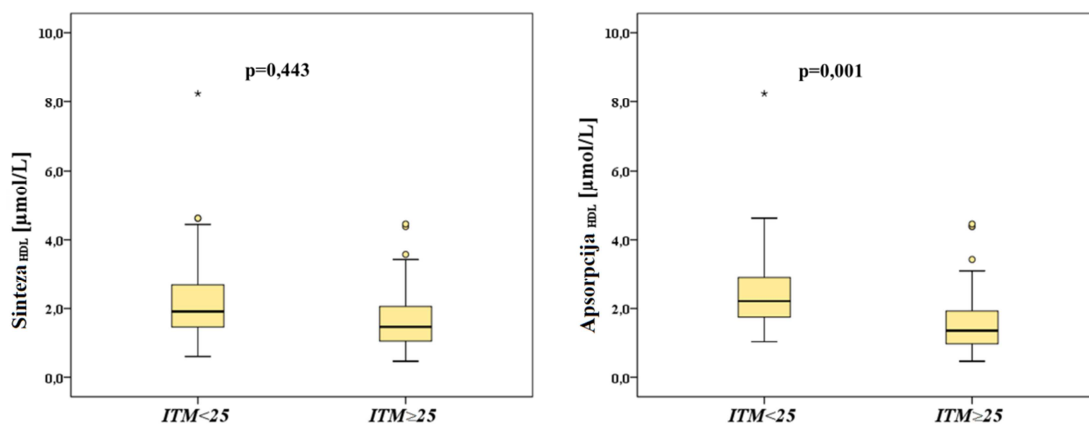
Slika 35. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod osoba sa povišenom telesnom masom u odnosu na osobe niske/normalne telesne mase, u grupi zdravih ispitanika.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu bile su značajno niže kod osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $17,83 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $14,48\text{-}29,21 \text{ } \mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $28,19 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $18,54\text{-}39,14 \text{ } \mu\text{mol/L}$). Nasuprot tome, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola bile su značajno više kod osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $18,72 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $12,42\text{-}23,93 \text{ } \mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $13,29 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $8,54\text{-}19,05 \text{ } \mu\text{mol/L}$) (slika 36).



Slika 36. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu između osoba sa povišenom telesnom masom i osoba sa normalne/niske telesne mase, u grupi zdravih ispitanika.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji se nisu razlikovale kod osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $1,16 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $0,97\text{-}1,47 \text{ } \mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $1,28 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $1,03\text{-}1,55 \text{ } \mu\text{mol/L}$). Međutim, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola bile su značajno više u HDL frakciji kod osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $2,28 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $1,85\text{-}3,23 \text{ } \mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $1,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $1,04\text{-}2,13 \text{ } \mu\text{mol/L}$) (slika 37).



Slika 37. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji između osoba sa povišenom telesnom masom i osoba sa normalne/niske telesne mase, u grupi zdravih ispitanika.

Relativne koncentracije dezmosterola u serumu su bile niže kod osoba sa sniženom telesnom masom, dok se relativne koncentracije latosterola u serumu nisu razlikovale između dve grupe. Sa druge strane, relativne koncentracije kampesterola i β -sitosterola su bile više kod osoba sa sniženom telesnom masom u odnosu na osobe povišene telesne

mase. Relativne koncentracije dezmosterola u HDL frakciji nisu se značajno razlikovale između dve ispitivane grupe. Relativne koncentracije latosterola u HDL frakciji su bile niže kod osoba sa normalnom/ sniženom telesnom masom (tabela 24).

Tabela 24. Razlike u relativnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji zdravih osoba sa povišenom telesnom masom u odnosu na zdrave osobe sa normalnom/sniženom telesnom masom.

<i>Parametar</i>	<i>ITM<25 kg/m²</i> <i>(n=40)</i>	<i>ITM≥25 kg/m²</i> <i>(n=61)</i>	<i>p</i>
<i>Dezmosterol/holesterol</i>	0,51 (0,39-0,59)	0,62 (0,57-0,71)	0,001
<i>Latosterol/holesterol</i>	3,02 (2,28-4,39)	4,37 (2,37-6,88)	0,156
<i>Kampesterol/holesterol</i>	1,65 (1,12-2,11)	1,05 (0,72-1,48)	0,002
<i>β-sitosterol/holesterol</i>	1,9 (1,27-2,22)	1,33 (0,83-1,72)	0,001
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,17 (0,12-0,22)	0,17 (0,14-0,24)	0,267
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,56 (0,42-0,8)	0,89 (0,66-1,23)	0,004
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h</i>	0,61 (0,45-0,84)	0,47 (0,3-0,62)	0,011
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h</i>	1,18 (0,81-1,5)	0,81 (0,59-1,02)	0,004

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom.

Odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu se nije razlikovao između osoba sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ i osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$. Sa druge strane, odnos *Sinteza/Apsorpcija* bio je značajno viši kod osoba sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ u odnosu na osobe sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$. Odnos *Dezmosterol_{HDL}/Dezmosterol* bio je značajno viši kod osoba $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$. Odnosi ostalih *NHS_{HDL}/NHS* nisu se značajno razlikovali između dve grupe (tabela 25).

Tabela 25. Razlike u indeksima homeostaze holesterola u serumu i HDL frakciji kod osoba sa ITM<25 kg/m² i ITM≥25 kg/m² u grupi zdravih ispitanika.

<i>Parametar</i>	<i>ITM<25 kg/m²</i> <i>(n=40)</i>	<i>ITM≥25 kg/m²</i> <i>(n=61)</i>	<i>P</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,17 (0,11-0,24)	0,15 (0,11-0,26)	0,827
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	1,16 (0,77-1,73)	1,93 (1,06-3,46)	0,001
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}_{HDL}}$	0,51 (0,31-0,69)	0,78 (0,55-1,52)	0,001
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Dezmosterol}}$	0,09 (0,08-0,12)	0,06 (0,05-0,1)	0,002
$\frac{\text{Latosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}}$	0,06 (0,04-0,08)	0,05 (0,03-0,07)	0,425
$\frac{\text{Kampesterol}_{HDL}}{\text{Kampesterol}}$	0,11 (0,09-0,14)	0,1 (0,07-0,13)	0,266
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{HDL}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,17 (0,14-0,21)	0,15 (0,11-0,18)	0,061
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Sinteza}}$	0,07 (0,05-0,09)	0,05 (0,04-0,07)	0,136
$\frac{\text{Apsorpcija}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}}$	0,14 (0,12-0,18)	0,13 (0,1-0,17)	0,131
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}_{HDL}}$	0,28 (0,20-0,37)	0,22 (0,16-0,28)	0,027

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

4.3.4 Korelaciona analiza između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara i koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola kod pacijenata sa CRC

U tabeli 26 su prikazane korelacije između koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji sa osnovnim antropometrijskim i lipidnim parametrima kod pacijenata sa CRC. Koncentracije dezmosterola u serumu pozitivno koreliraju sa ITM, koncentracijama albumina, UH, TG i LDL-h. Koncentracije latosterola pozitivno koreliraju sa koncentracijama UH, TG i LDL-h. Koncentracije kampesterola pozitivno koreliraju sa koncentracijama UH, HDL-h i LDL-h, dok koncentracije β -sitosterola pored svih ovih korelacija pokazuju i pozitivnu korelaciju sa koncentracijama TG. Kod pacijenata obolelih od CRC koncentracije svih markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji pozitivno koreliraju sa koncentracijama HDL-h.

Tabela 26. Korelacije između antropometrijskih karakteristika, osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara sa koncentracijama NHS kod pacijenata sa CRC

Parametar		Starost (god)	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
Dezmosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,155	0,295	0,162	0,394	0,471	0,267	0,163	0,396
	<i>p</i>	0,138	0,005	0,115	0,001	0,001	0,009	0,112	0,001
Latosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,214	0,050	-0,002	0,095	0,424	0,444	-0,067	0,402
	<i>p</i>	0,058	0,674	0,989	0,512	0,001	0,001	0,552	0,001
Kampesterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,079	-0,032	0,089	0,122	0,454	0,141	0,274	0,348
	<i>p</i>	0,452	0,768	0,392	0,340	0,001	0,172	0,007	0,001
β -sitosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,027	0,060	0,090	0,209	0,475	0,246	0,230	0,348
	<i>p</i>	0,800	0,579	0,383	0,099	0,001	0,016	0,024	0,001
Dezmosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,081	0,134	0,181	0,276	0,100	-0,152	0,299	0,027
	<i>p</i>	0,502	0,287	0,126	0,081	0,399	0,198	0,010	0,819
Latosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,003	0,066	0,059	0,307	0,190	0,112	0,320	0,080
	<i>p</i>	0,982	0,605	0,623	0,051	0,109	0,348	0,006	0,503
Kampesterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,040	-0,153	0,033	0,043	0,047	-0,155	0,339	-0,032
	<i>p</i>	0,743	0,224	0,781	0,790	0,695	0,189	0,003	0,791
β -sitosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,021	-0,083	0,084	0,020	0,164	0,002	0,360	0,072
	<i>p</i>	0,863	0,510	0,482	0,900	0,165	0,985	0,002	0,546

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

U tabeli 27 prikazane su korelacije između osnovnih antropometrijskih i biohemijskih parametara i indeksa homeostaze holesterola u serumu pacijenata sa CRC. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu pozitivno koreliraju sa koncentracijama UH, TG i LDL-h. Zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu pozitivno koreliraju sa koncentracijama UH, TG, HDL-h i LDL-h. Odnos *Dezmosterol/Latosterol* u serumu negativno je korelirao sa koncentracijom TG. Odnos *Sinteza/Apsorpcija* nije korelirao ni sa jednim antropometrijskim, biohemijskim i lipidnim parametrom.

Tabela 27. Korelacije između antropometrijskih karakteristika i osnovnih biokemijskih i lipidnih parametara sa indeksima homeostaze holesterola u serumu pacijenata sa CRC.

Parametar		Starost (god)	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
Sinteza (μmol/L)	ρ	-0,192	0,109	0,036	0,162	0,448	0,427	-0,067	0,430
	<i>p</i>	0,092	0,361	0,747	0,265	0,001	0,001	0,554	0,001
Apsorpcija (μmol/L)	ρ	-0,006	0,027	0,079	0,178	0,472	0,217	0,234	0,353
	<i>p</i>	0,957	0,801	0,449	0,163	0,001	0,035	0,022	0,001
<u>Dezmosterol</u> <u>Latosterol</u>	ρ	0,133	0,138	0,095	0,176	-0,037	-0,285	0,201	-0,087
	<i>p</i>	0,245	0,243	0,397	0,226	0,746	0,010	0,072	0,442
<u>Sinteza</u> <u>Apsorpcija</u>	ρ	-0,098	0,036	0,000	-0,004	-0,126	0,091	-0,208	-0,031
	<i>p</i>	0,397	0,764	0,999	0,979	0,265	0,424	0,065	0,785

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

U tabeli 28 prikazane su korelacije između osnovnih antropometrijskih i biohemijskih parametara i indeksa homeostaze holesterola u HDL frakciji. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji, pozitivno su korelirale sa koncentracijama albumina i HDL-h u serumu. Zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji pozitivno su korelirale samo sa koncentracijama HDL-h. Odnos $Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}$ nije pokazao značajne korelacije sa ispitivanim parametrima. Odnos $Dezmosterol_{HDL}/Dezmosterol$ negativno korelira sa koncentracijama UH, TG i LDL-h. Iste korelacije pokazuju i udeli pojedinačnih markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji u odnosu na njihovu koncentraciju u serumu. Odnos $Latosterol_{HDL}/Latosterol$ dodatno pozitivno korelira i sa koncentracijama HDL-h u serumu. Odnos $Sinteza_{HDL}/Sinteza$ negativno je korelirao sa koncentracijama UH, TG i LDL-h, dok je pozitivno korelirao sa vrednošću ITM i koncentracijama HDL-h. Odnos $Apsorpcija_{HDL}/Apsorpcija$ negativno korelira sa koncentracijama UH, TG i LDL-h.

Tabela 28. Korelacije između antropometrijskih karakteristika i osnovnih biokemijskih i lipidnih parametara sa indeksima homeostaze holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC

Parametar		Godine starosti (god)	ITM (kg/m ²)	Ukupni proteini (g/L)	Albumin (g/L)	UH (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-h (mmol/L)	LDL-h (mmol/L)
<i>Sinteza</i> _{HDL}	ρ	0,005	0,099	0,082	0,348	0,174	0,081	0,336	0,064
	<i>p</i>	0,968	0,436	0,494	0,026	0,144	0,498	0,004	0,593
<i>Apsorpcija</i> _{HDL}	ρ	0,030	-0,104	0,058	0,039	0,121	-0,046	0,354	0,034
	<i>p</i>	0,803	0,409	0,627	0,810	0,308	0,702	0,002	0,774
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}_{HDL}}$	ρ	0,014	0,167	0,011	0,241	0,043	0,061	-0,040	0,045
	<i>p</i>	0,909	0,187	0,928	0,128	0,721	0,610	0,736	0,706
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Dezmosterol}}$	ρ	0,202	-0,044	0,135	-0,038	-0,340	-0,367	0,152	-0,370
	<i>p</i>	0,091	0,726	0,254	0,812	0,003	0,001	0,198	0,001
$\frac{\text{Latosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}}$	ρ	0,261	-0,058	0,074	0,094	-0,288	-0,333	0,294	-0,363
	<i>p</i>	0,030	0,653	0,541	0,565	0,015	0,005	0,013	0,002
$\frac{\text{Kampesterol}_{HDL}}{\text{Kampesterol}}$	ρ	0,135	-0,112	0,021	0,118	-0,456	-0,292	0,046	-0,428
	<i>p</i>	0,265	0,379	0,863	0,461	0,001	0,013	0,703	0,001
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{HDL}}{\beta - \text{sitosterol}}$	ρ	0,008	-0,123	0,022	-0,134	-0,411	-0,270	0,097	-0,391
	<i>p</i>	0,950	0,329	0,853	0,404	0,001	0,021	0,416	0,001
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Sinteza}}$	ρ	0,259	-0,076	0,088	0,110	-0,316	-0,359	0,301	-0,389
	<i>p</i>	0,032	0,554	0,467	0,500	0,007	0,002	0,011	0,001
$\frac{\text{Apsorpcija}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}}$	ρ	0,017	-0,101	0,004	-0,061	-0,418	-0,255	0,101	-0,396
	<i>p</i>	0,887	0,427	0,975	0,705	0,001	0,031	0,399	0,001

Rezultati su dobijeni *Spearman* korelacionom analizom.

4.3.5 Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji, i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na patološke karakteristike CRC

U tabeli 29 su prikazane razlike u osnovnim antropometrijskim, biohemijskim i lipidnim parametrima između pacijenata sa karcinomom rektuma i pacijenata sa karcinomom kolona. Kod pacijenata obolelih od kancera rektuma (CA rektuma) nije bilo značajnih razlika u koncentracijama ispitivanih biohemijskih parametara u serumu u odnosu na pacijente obolele od kancera kolona (CA kolona).

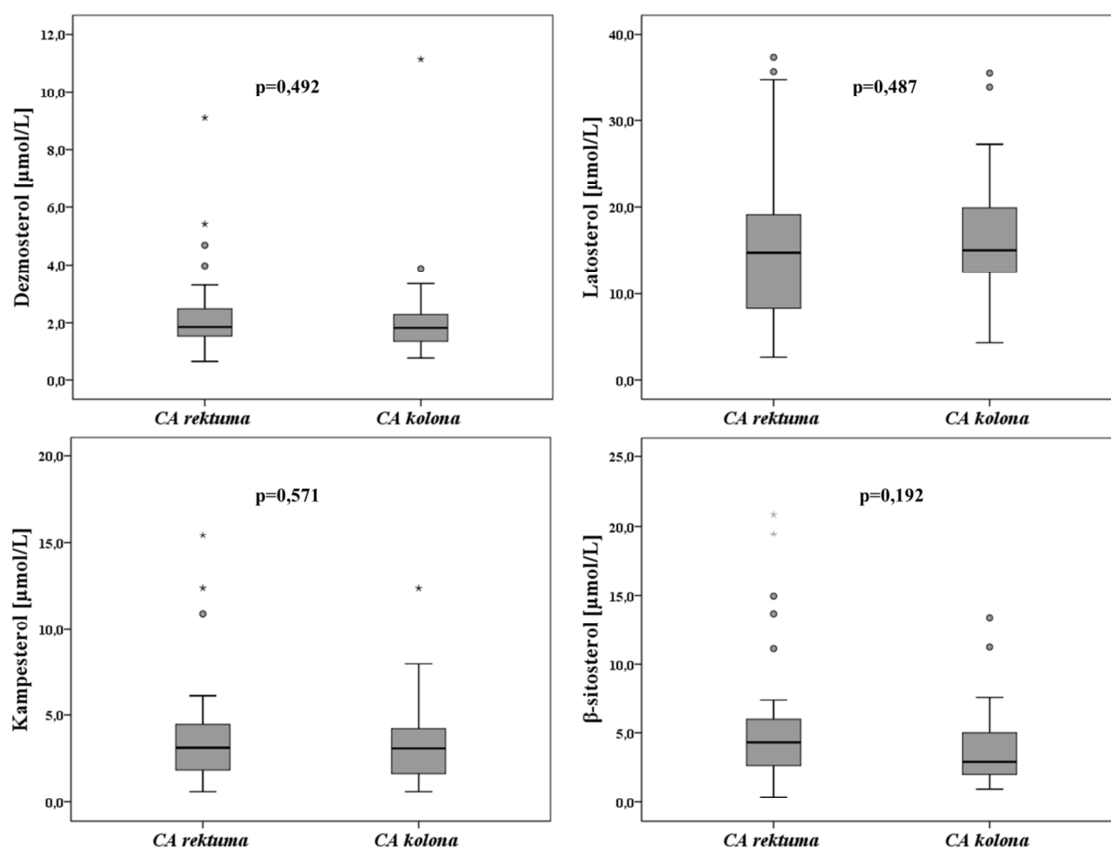
Tabela 29. Vrednosti antropometrijskih, biohemijskih i osnovnih lipidnih parametara kod pacijenata sa karcinomom rektuma i pacijenata sa karcinomom kolona

Parametar	CA rektuma (n=58)	CA kolona (n=30)	p
ITM (kg/m ²)	26,3 (23,32-28,58)	23,98 (20,89-29,07)	0,368
Ukupni protein (g/L)	63,59 (58,6-70,14)	67,65 (58,73-77,45)	0,686
Albumin (g/L)	36,30 (33,15-40,1)	42,00 (33,90-44,83)	0,507
UH (mmol/L)	4,49 (4,18-5,45)	3,32 (3,22-4,38)	0,228
TG(mmol/L)	1,31 (1,18-1,5)	1,10 (0,91-1,35)	0,826
HDL-h (mmol/L)	0,95 (0,70-1,26)	0,99 (0,76-1,41)	0,356
LDL-h (mmol/L)	3,00 (2,70-3,57)	2,06 (1,81-2,97)	0,210

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Na slici 38 su prikazane razlike u apsolutnim koncentracijama NHS u serumu u odnosu na prisustvo karcinoma rektuma ili karcinoma kolona. Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu pacijenata sa karcinomom rektuma (medijana: 1,85 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,25-2,39 $\mu\text{mol/L}$) se nisu značajno razlikovale u odnosu na koncentracije dezmosterola kod pacijenata sa karcinomom kolona (medijana: 1,75 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,08-1,97 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, statističkih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju koncentracije latosterola u serumu (medijana: 15,86 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 11,22-20,68 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 13,86 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 10,51-19,54 $\mu\text{mol/L}$, redom). Koncentracije kampesterola u serumu se nisu značajno razlikovale kod pacijenata sa kancerom raktuma (medijana: 2,81 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,74-4,5 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa kancerom kolona (medijana: 2,63 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,55-3,61 $\mu\text{mol/L}$), kao ni koncentracije β -sitosterola u

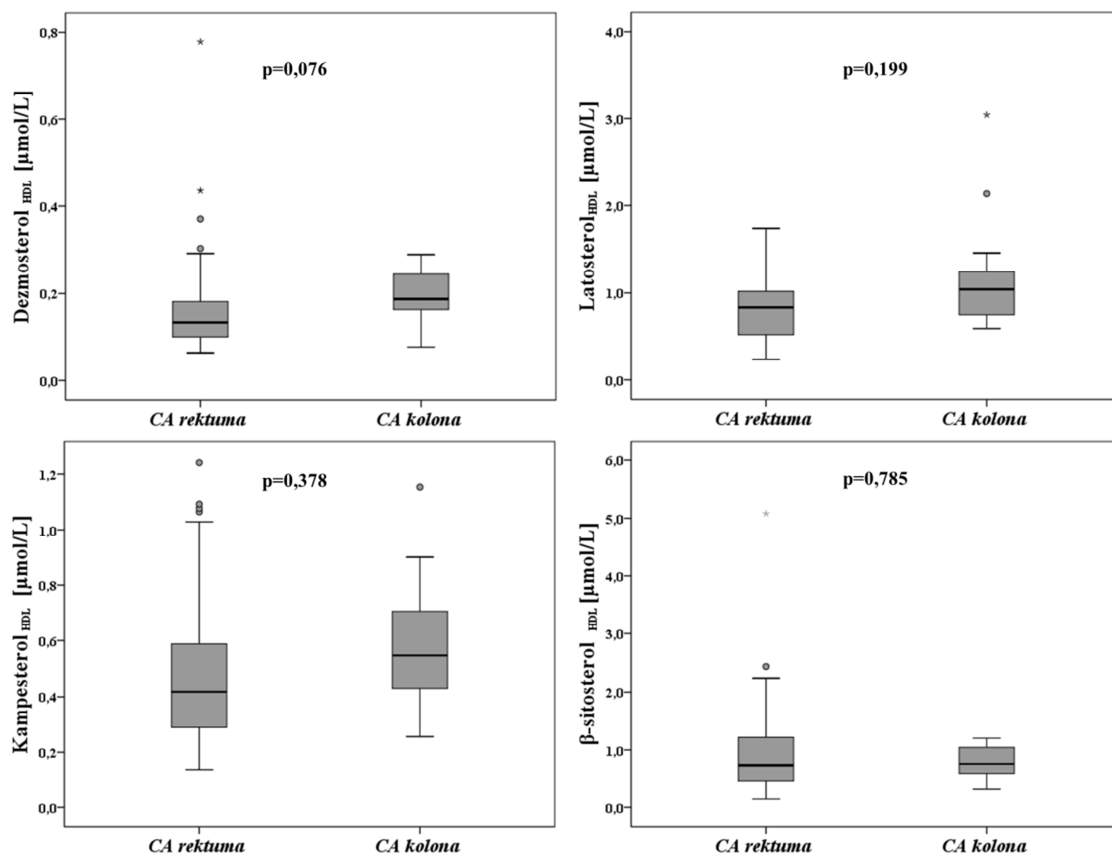
serumu (medijana: 3,48 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 2,04-4,74 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 2,17 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,42-5,59 $\mu\text{mol/L}$, za CA rektuma i CA kolona redom).



Slika 38. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona.

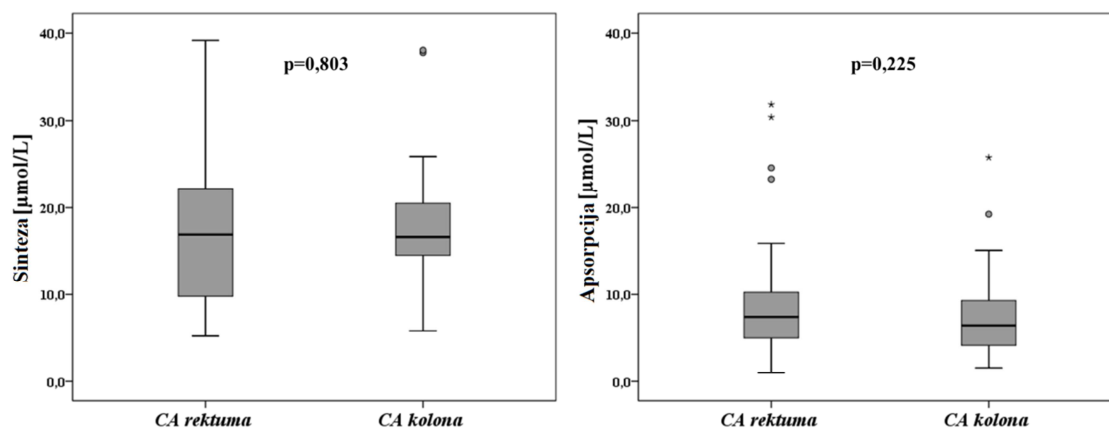
Na slici 39 su prikazane razlike u apsolutnim koncentracijama NHS u HDL frakciji u odnosu na prisustvo karcinoma rektuma ili karcinoma kolona. Apsolutne koncentracije *dezmosterola_{HDL}* kod pacijenata sa karcinomom rektuma (medijana: 0,18 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,11-0,23 $\mu\text{mol/L}$) se nisu značajno razlikovale u odnosu na koncentracije *dezmosterola_{HDL}* kod pacijenata sa karcinomom kolona (medijana: 0,23 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,12-0,25 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, statističkih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju koncentracije *latosterola_{HDL}* (medijana: 0,94 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,55-1,35 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 1,14 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,73-2,11 $\mu\text{mol/L}$, za CA rektuma i CA kolona redom). Koncentracije *kampesterola_{HDL}* se nisu značajno razlikovale kod pacijenata sa kancerom rektuma (medijana: 0,45 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,37-0,62 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa kancerom kolona (medijana: 0,53 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,36-0,92 $\mu\text{mol/L}$), kao ni koncentracije *β -sitosterola_{HDL}* (medijana: 0,74 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,56-1,5

$\mu\text{mol/L}$, i medijana: $0,91 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $0,49\text{-}2,01 \mu\text{mol/L}$, za CA rektuma i CA kolona redom).



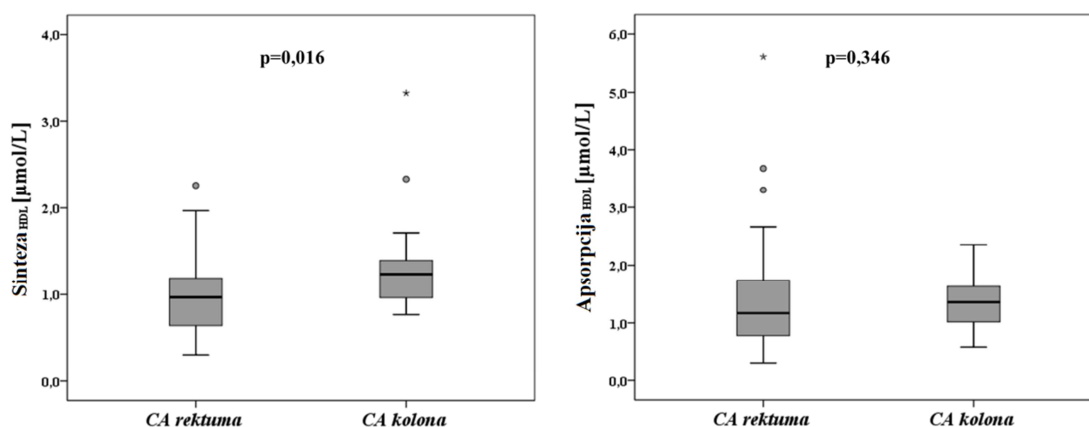
Slika 39. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona.

Na slici 40 su prikazane razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze holesterola i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu u odnosu na prisustvo karcinoma rektuma ili karcinoma kolona. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu pacijenata sa karcinomom rektuma (medijana: $18,38 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $12,66\text{-}23,25 \mu\text{mol/L}$) se nisu značajno razlikovale u odnosu na zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu kod pacijenata sa karcinomom kolona (medijana: $15,32 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $12,36\text{-}20,86 \mu\text{mol/L}$). Takođe, značajnih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu (medijana: $5,77 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $3,82\text{-}9,17 \mu\text{mol/L}$, i medijana: $4,75 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $2,99\text{-}8,85 \mu\text{mol/L}$, za CA rektuma i CA kolona, redom).



Slika 40. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona.

Na slici 41 su prikazane razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze holesterola i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji između pacijenata sa karcinomom rektuma i pacijenata sa karcinomom kolona. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa karcinomom rektuma su bile značajno niže (medijana: 0,99 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,72-1,22 μmol/L) u odnosu na zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa karcinomom kolona (medijana: 1,38 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,15-1,65 μmol/L). Međutim, statistički značajnih razlika nije bilo između ove dve grupe kada su u pitanju zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu (medijana: 1,26 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,83-1,64 μmol/L, i medijana: 1,76 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,07-2,29 μmol/L, za CA rektuma i CA kolona redom).



Slika 41. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona.

Relativne koncentracije markera sinteze, kao i markera apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa kancerom rektuma nisu se značajno razlikovale u odnosu na pacijente sa kancerom kolona. Takođe, relativne koncentracije NHS u HDL frakciji se nisu razlikovale kod ove dve grupe pacijenata (tabela 30).

Tabela 30. Relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa karcinomom kolona i pacijenata sa karcinomom rektuma.

Parametar	CA rektuma (n=57)	CA kolona (n=26)	P
<i>Dezmosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,37 (0,27-0,49)	0,48 (0,30-0,59)	0,631
<i>Latosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	3,36 (2,13-4,52)	3,97 (3,10-4,71)	0,070
<i>Kampesterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,68 (0,38-0,93)	0,68 (0,50-0,89)	0,921
<i>β-sitosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,81 (0,49-1,03)	0,62 (0,49-0,88)	0,367
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,18 (0,11-0,23)	0,23 (0,12-0,25)	0,076
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,94 (0,55-1,35)	1,14 (0,73-2,11)	0,199
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,45 (0,37-0,62)	0,53 (0,36-0,92)	0,378
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,74 (0,56-1,50)	0,91 (0,49-2,01)	0,785

Podaci su predstavljani kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Dezmosterol/Latosterol* u serumu nije se značajno razlikovao između pacijenata sa kancerom kolona i kancerom rektuma. Odnos *Sinteza/Apsorpcija* bio je značajno viši kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma. Odnos *Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}* nije se značajno razlikovao između pacijenata sa CA rektuma i CA kolona. Odnos *Dezmosterol_{HDL}/Dezmosterol*, kao i odnos *Latosterol_{HDL}/Latosterol*, odnos *Kampesterol_{HDL}/Kampesterol* i odnos *β-sitosterol_{HDL}/β-sitosterola* nisu se značajno razlikovali kod pacijenata sa kancerom kolona i pacijenata sa kancerom rektuma (tabela 31).

Tabela 31. Indeksi homeostaze holestrola kod pacijenata sa karcinomom rektuma i pacijenata sa karcinomom kolona.

Parametar	CA rektuma (n=57)	CA kolona (n=26)	p
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,11 (0,07-0,19)	0,13 (0,07-0,18)	0,360
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	1,99 (1,39-3,40)	3,32 (1,78-4,38)	0,046
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}_{HDL}}$	0,77 (0,56-1,05)	1 (0,66-1,12)	0,204
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Dezmosterol}}$	0,10 (0,08-0,13)	0,07 (0,05-0,11)	0,089
$\frac{\text{Latosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}}$	0,06 (0,04-0,08)	0,09 (0,06-0,14)	0,169
$\frac{\text{Kampesterol}_{HDL}}{\text{Kampesterol}}$	0,17 (0,12-0,27)	0,29 (0,2-0,41)	0,094
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{HDL}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,22 (0,17-0,44)	0,47 (0,21-0,59)	0,429
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Sinteza}}$	0,07 (0,06-0,09)	0,06 (0,04-0,07)	0,114
$\frac{\text{Apsorpcija}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}}$	0,18 (0,12-0,34)	0,22 (0,14-0,36)	0,258
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}_{HDL}}$	0,19 (0,14-0,30)	0,17 (0,15-0,28)	0,951

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

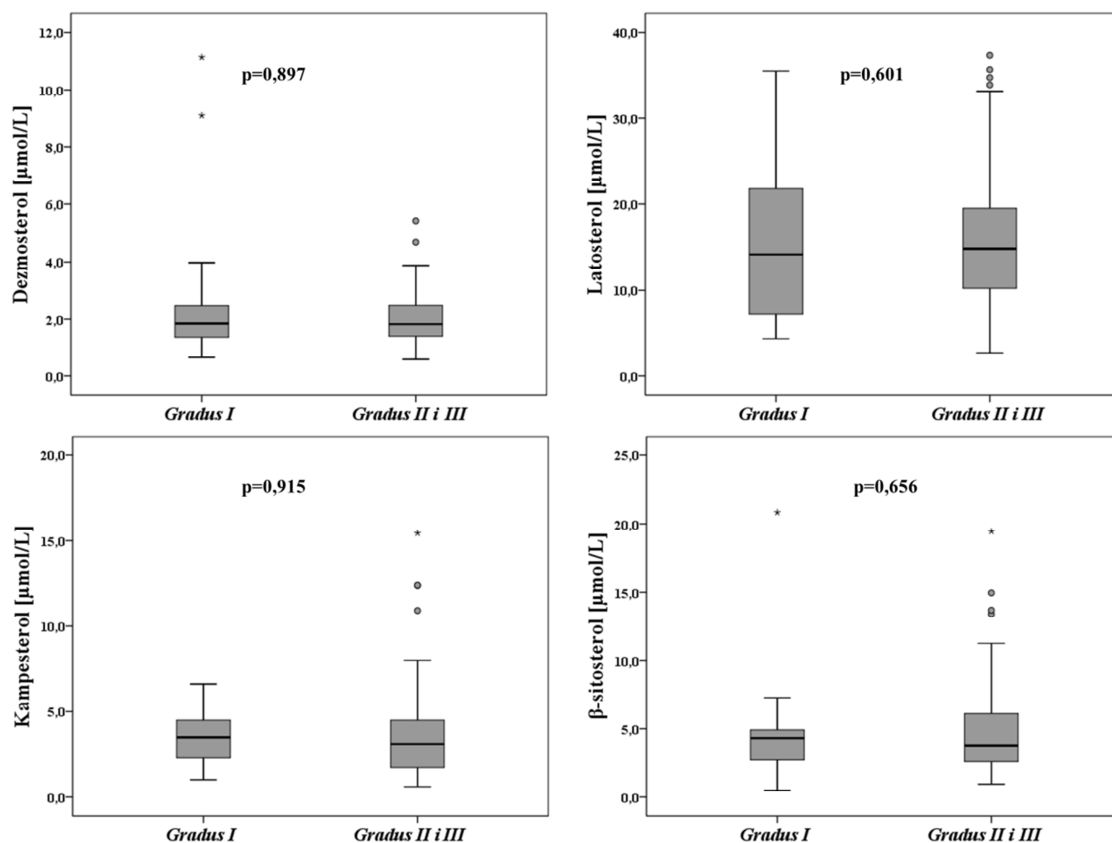
Dodatno, ispitivali smo razlike između pacijenata obolelih od CRC gradusa I i pacijenata sa CRC gradusa II i III i nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima ITM, koncentraciji ukupnih proteina, albumina, UH, HDL-h i LDL-h u serumu. Ove dve grupe pacijenata su se jedino razlikovale na osnovu koncentracija TG u serumu. Naime, koncentracije TG su bile značajno više u grupi pacijenata sa CRC visokog gradusa (tabela 32).

Tabela 32. Vrednosti antropometrijskih parametara i koncentracije biohemijskih i lipidnih parametara kod pacijenata sa gradusom I i pacijenata sa gradusom II i III kolorektalnog karcinoma.

<i>Parametar</i>	<i>Gradus I (n=30)</i>	<i>Gradus II i III (n=68)</i>	<i>p</i>
<i>ITM (kg/m²)</i>	26,3 (23,3-28,41)	26,22 (23,88-28,5)	0,845
<i>Ukupni protein (g/L)</i>	61,21 (57,18-69,88)	65,01 (58,6-72,48)	0,854
<i>Albumin (g/L)</i>	38,60 (32,90-41,60)	38,70 (33,98-42,30)	0,961
<i>UH (mmol/L)</i>	4,34 (4,09-4,85)	4,33 (3,50-5,27)	0,378
<i>TG (mmol/L)</i>	1,16 (0,98-1,43)	1,30 (1,07-1,42)	0,030
<i>HDL-h (mmol/L)</i>	1,01 (0,92-1,31)	0,84 (0,64-1,11)	0,228
<i>LDL-h (mmol/L)</i>	2,75 (2,46-3,11)	2,95 (2,12-3,47)	0,336

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

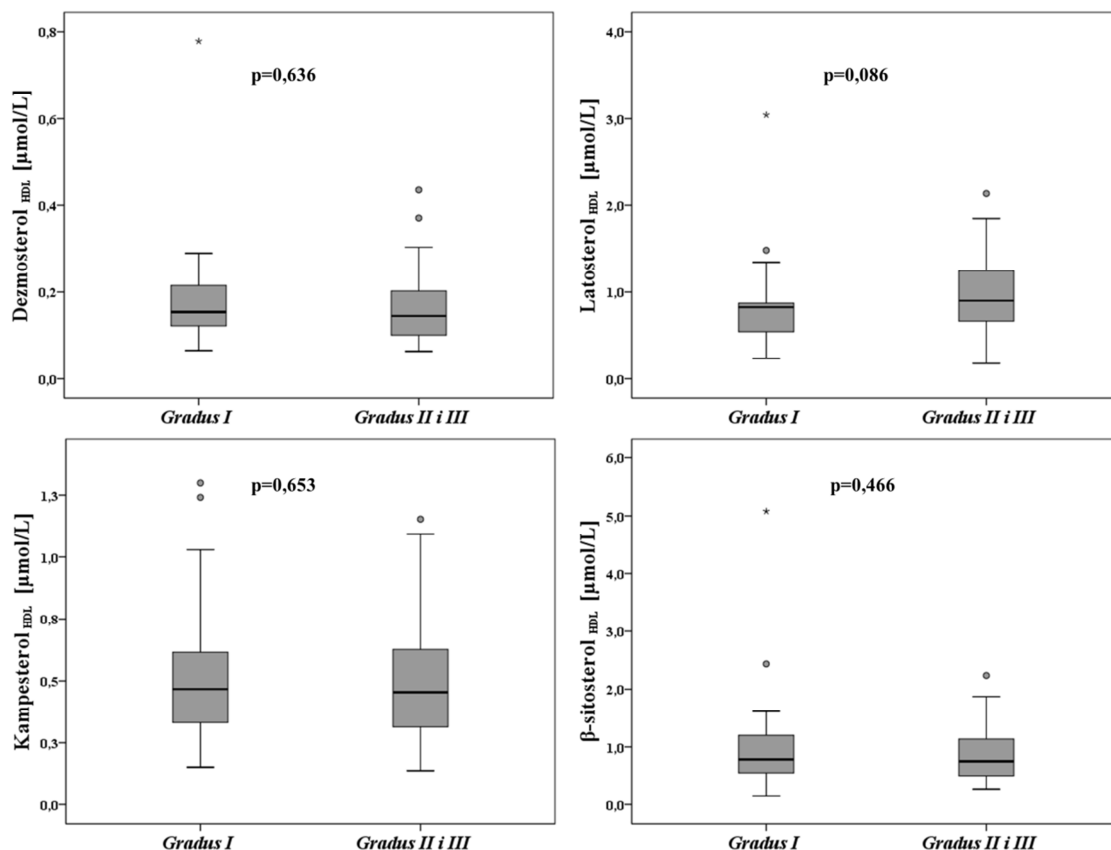
Na slici 42 su prikazane razlike u apsolutnim koncentracijama NHS u serumu u odnosu na gradus CRC. Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu pacijenata sa gradusom I (medijana: 1,86 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,64-2,25 $\mu\text{mol/L}$) se nisu značajno razlikovale u odnosu na koncentracije dezmosterola kod pacijenata kod pacijenata koji boluju od CRC gradusa II i III (medijana: 1,77 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,21-2,43 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, statističkih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju koncentracije latosterola u serumu (medijana: 11,79 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 7,25-20,78 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 16,75 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 11,11-20,02 $\mu\text{mol/L}$, za gradus I, i gradus II i III, redom). Koncentracije kampesterola i β -sitosterola u serumu se nisu značajno razlikovale kod pacijenata sa gradusom I (medijana: 2,81 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,87-4,5 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 3 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 2,31-4,71 $\mu\text{mol/L}$, za kampesterol i β -sitosterol, redom) u odnosu na pacijenate sa gradusom II i III CRC (medijana: 2,63 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,48-4,29 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 2,94 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,72-5,78 $\mu\text{mol/L}$, za kampesterol i β -sitosterol, redom).



Slika 42. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu kod pacijenata sa gradusom I u odnosu na pacijenate sa gradusom II i III CRC.

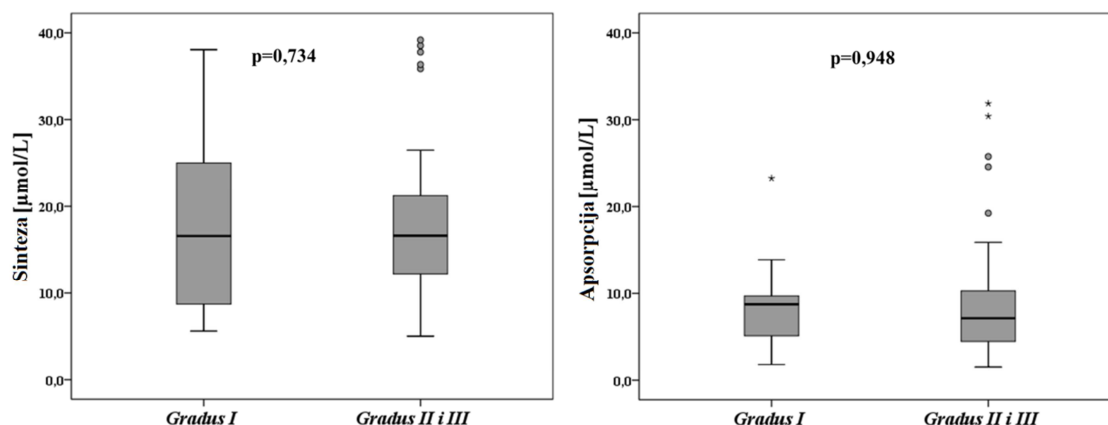
Na slici 43 su prikazane razlike u apsolutnim koncentracijama NHS u HDL frakciji u odnosu na prisustvo gradusa I ili gradusa II i III. Apsolutne koncentracije *dezmosterola_{HDL}* kod pacijenata sa gradusom I (medijana: 0,17 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,13-0,23 $\mu\text{mol/L}$) se nisu značajno razlikovale u odnosu na koncentracije *dezmosterola_{HDL}* kod pacijenata sa ostalim gradusima (medijana: 0,15 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,1-0,24 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, statistički značajnih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju koncentracije *latosterola_{HDL}* kod pacijenata sa gradusom I (medijana: 0,84 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,58-0,89 $\mu\text{mol/L}$) i pacijenata sa gradusima II i III (medijana: 1,02 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,68-1,28 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracije *kampesterola_{HDL}* kod pacijenata sa gradusom I (medijana: 0,48 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,35-0,65 $\mu\text{mol/L}$) se takođe nisu razlikovale u odnosu na koncentracije *kampesterola_{HDL}* kod pacijenata sa ostalim gradusima (medijana: 0,48 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,30-0,63 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracije *β -sitosterola_{HDL}* kod pacijenata sa gradusom I (medijana: 0,85 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,6-2,44 $\mu\text{mol/L}$) i

pacijenata sa ostalim gradusima (medijana: 0,78 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,39-1,12 $\mu\text{mol/L}$) se nisu razlikovale.



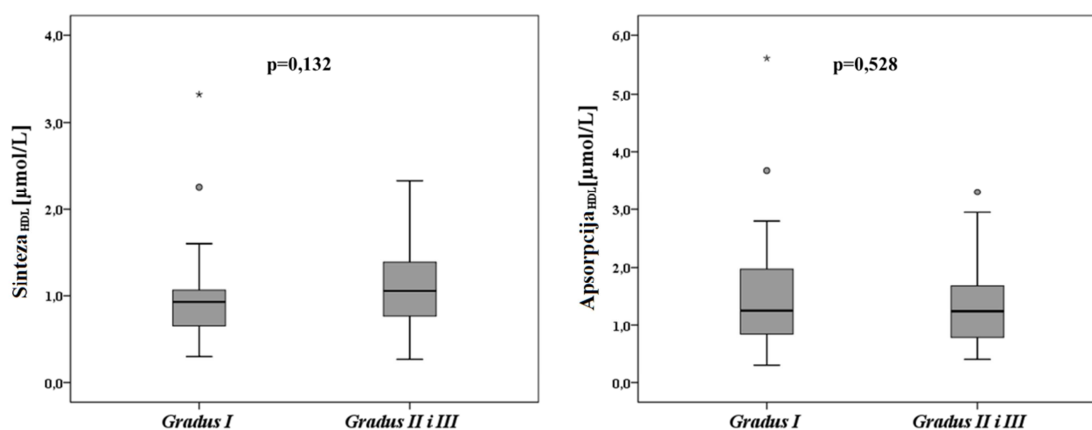
Slika 43. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa gradusom I u odnosu na pacijenate sa gradusom II i III CRC.

Što se zbirnih koncentracija NHS u serumu tiče, nije bilo značajnih razlika u odnosu na gradus I i ostale graduse CRC. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu nisu se značajno razlikovale u odnosu na prisustvo različitih gradusa CRC (medijana: 13,28 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 9,24-23,48 $\mu\text{mol/L}$, i medijana: 18,03 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 13,13-22,71 $\mu\text{mol/L}$, za gradus I i gradus II i III, redom). Takođe, značajnih razlika nije bilo između pacijenata sa gradusom I (medijana: 5,77 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 4,55-9,15 $\mu\text{mol/L}$) i pacijenata sa gradusima II i III (medijana: 5,41 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 3,23-9,53 $\mu\text{mol/L}$) ni kada su u pitanju zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu (slika 44).



Slika 44. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze holesterola i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu kod pacijenata sa gradusom I u odnosu na pacijente sa gradusom II i III CRC.

Zbirne koncentracije markera sinteze se nisu značajno razlikovale između pacijenata sa gradusom I (medijana: 1,0 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,74-1,07 µmol/L) i pacijenata sa gradusom II i III (medijana: 1,14 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,79-1,54 µmol/L). Takođe, zbirne koncentracije markera apsorpcije holestrola u HDL frakciji nisu se značajno razlikovale između pacijenata sa gradusom I (medijana: 1,26 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,00-3,68 µmol/L) i pacijenata sa gradusom II i III (medijana: 1,3 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,73-1,66 µmol/L) (slika 45).



Slika 45. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze holesterola i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola

Relativne koncentracije dezmosterola, latosterola, kampesterola i β-sitosterola u serumu pacijenata sa CRC niskog gradusa, nisu se značajno razlikovale u odnosu na pacijente sa CRC visokog gradusa. Takođe, značajnih razlika nije bilo ni kada su u pitanju relativne koncentracije svih ispitivanih NHS u HDL frakciji (tabela 33).

Tabela 33. Relativne koncentracije NHS i NHS_{HDL} kod pacijenata sa CRC gradusa I i gradusa II i III.

Parametar	Gradus I (n=30)	Gradus II i III (n=64)	P
<i>Dezmosterol/holesterol (mmol/mol)</i>	0,42 (0,37-0,63)	0,38 (0,28-0,53)	1,000
<i>Latosterol/holesterol (mmol/mol)</i>	3,05 (1,64-4,13)	3,79 (2,46-4,87)	0,519
<i>Kampesterol/holesterol (mmol/mol)</i>	0,68 (0,48-0,93)	0,69 (0,32-0,96)	0,785
<i>β-sitosterol/holesterol (mmol/mol)</i>	0,62 (0,56-1,05)	0,74 (0,41-1,17)	0,728
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h (mmol/mol)</i>	0,18 (0,10-0,23)	0,19 (0,12-0,25)	0,846
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h (mmol/mol)</i>	0,70 (0,57-0,94)	1,27 (0,58-1,59)	0,066
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h (mmol/mol)</i>	0,45 (0,31-0,67)	0,47 (0,37-0,65)	0,790
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h (mmol/mol)</i>	0,81 (0,51-1,87)	0,74 (0,62-1,23)	0,991

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Dezmosterol/Latosterol* u serumu nije se značajno razlikovao između pacijenata sa gradusom I i pacijenata sa gradusima II i III. Razlike nije bilo ni u odnosu *Sinteza/Apsorpcija*. Takođe, razlika nije bilo ni u pomenutom odnosu u HDL frakciji. Odnosi *NHS_{HDL}/NHS* takođe se nisu razlikovali između dve grupe pacijenata sa CRC. Sa druge strane odnos *Dezmosterol_{HDL}/Latosterol_{HDL}* je bio značajno viši kod pacijenata sa gradusom I u odnosu na pacijente sa gradusima II i III (tabela 34).

Tabela 34. Indeksi homeostaze holesterola kod pacijenata sa CRC gradusa I i gradusa II i III.

Parametar	Gradus I (n=30)	Gradus II i III (n=64)	p
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,15 (0,1-0,28)	0,12 (0,07-0,18)	0,407
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	2,46 (1,14-3,70)	2,50 (1,54-4,11)	0,428
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}$	0,62 (0,35-0,94)	0,91 (0,65-1,35)	0,075
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Dezmosterol}}$	0,08 (0,06-0,11)	0,09 (0,07-0,12)	0,325
$\frac{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}}$	0,06 (0,04-0,12)	0,06 (0,04-0,08)	0,520
$\frac{\text{Kampesterol}_{\text{HDL}}}{\text{Kampesterol}}$	0,17 (0,12-0,27)	0,18 (0,13-0,30)	0,896
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{\text{HDL}}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,22 (0,17-0,5)	0,22 (0,16-0,45)	0,331
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Sinteza}}$	0,06 (0,04-0,08)	0,07 (0,04-0,11)	0,436
$\frac{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}}$	0,20 (0,14-0,36)	0,17 (0,13-0,36)	0,528
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}$	0,24 (0,19-0,31)	0,17 (0,14-0,26)	0,037

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

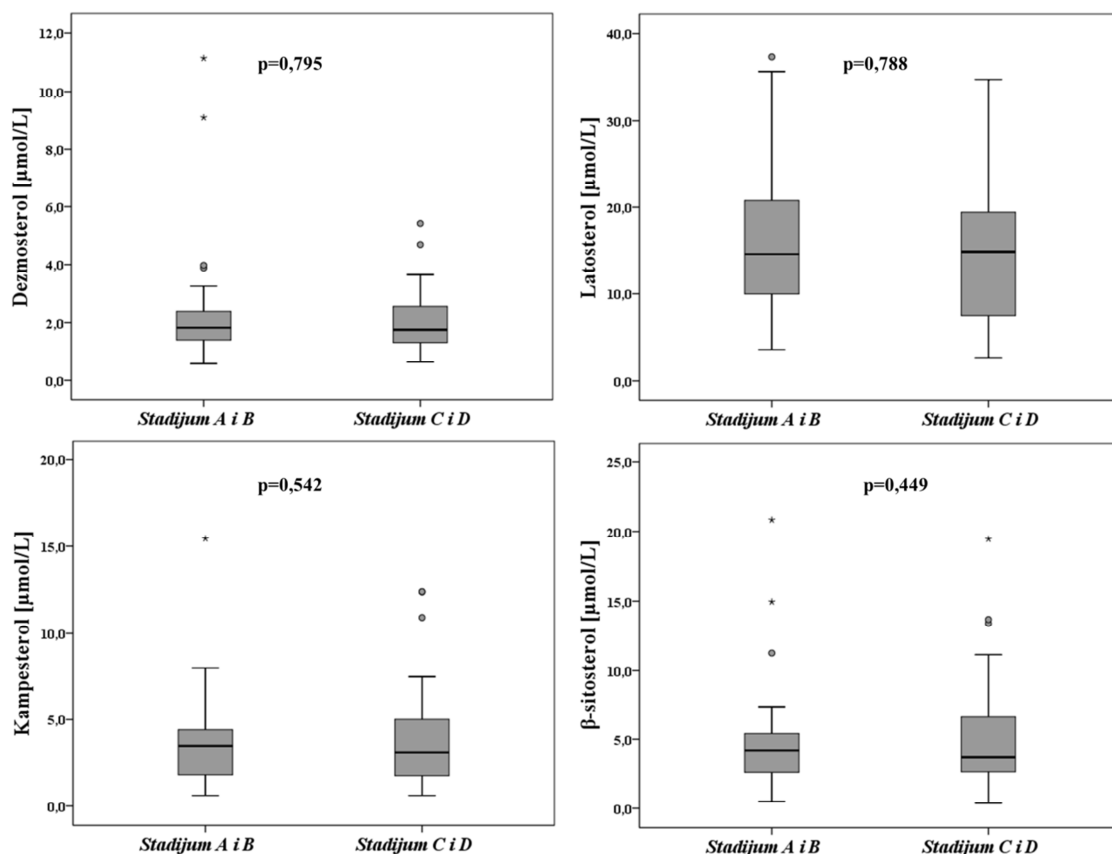
Kada smo analizirali razlike između stadijuma oboljenja i antropometrijskih parametara kao i koncentracija biohemijskih i lipidnih parametara, primetili smo da su pacijenti sa A i B stadijumom CRC imali značajno više vrednosti ITM u odnosu na pacijente sa C i D stadijumom odboljenja. Svi ostali ispitivani biohemijski parametri se nisu razlikovali između ove dve grupe (tabela 35).

Tabela 35. Vrednosti antropometrijskih parametara i koncentracije biohemijskih i lipidnih parametara kod pacijenata sa stadijumom A i B i pacijenata sa stadijumom C i D CRC.

<i>Parametar</i>	<i>Stadijum A i B (n=58)</i>	<i>Stadijum C i D (n=42)</i>	<i>p</i>
<i>ITM (kg/m²)</i>	27,78 (24,43-29,64)	25,25 (21,72-27,05)	0,012
<i>Ukupni protein (g/L)</i>	63,3 (59,6-71,33)	65,61 (57,90-71,60)	0,374
<i>Albumin (g/L)</i>	38,6 (33,95-41,8)	38,6 (32,30-42,40)	0,844
<i>UH (mmol/L)</i>	4,31 (3,67-5,16)	4,42 (4,09-4,85)	0,537
<i>TG (mmol/L)</i>	1,30 (1,05-1,5)	1,23 (0,90-1,35)	0,738
<i>HDL-h (mmol/L)</i>	0,97 (0,76-1,31)	0,92 (0,66-1,01)	0,987
<i>LDL-h (mmol/L)</i>	2,89 (2,25-3,32)	2,87 (2,20-3,32)	0,501

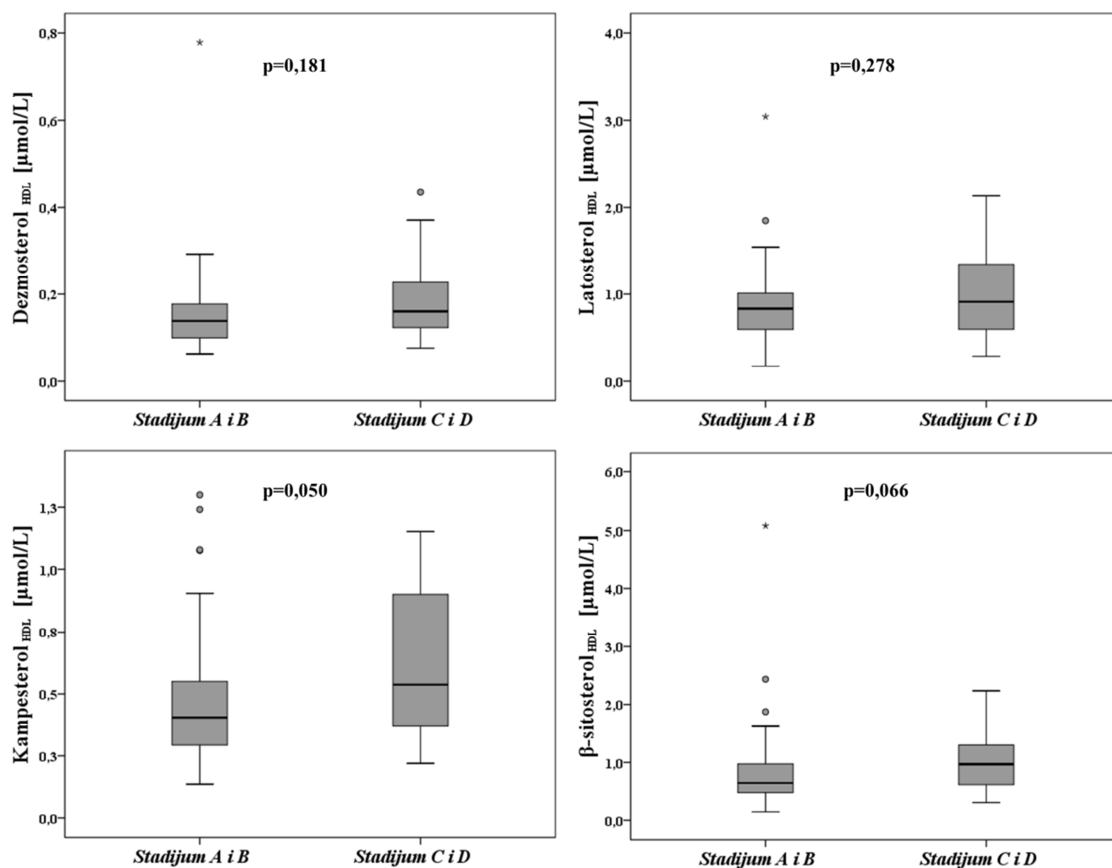
Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Dalje, analizirali smo razlike u serumskim koncentracijama NHS u odnosu na različite stadijume CRC. Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu se nisu značajno razlikovale između stadijuma A i B (medijana: 1,86 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,43-2,48 $\mu\text{mol/L}$) i stadijuma C i D (medijana: 1,76 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,16-1,99 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, ni koncentracije latosterola u serumu se nisu razlikovale između pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 15,86 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 11,71-21,3 $\mu\text{mol/L}$) i stadijumima C i D (medijana: 14,65 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 6,39-19,91 $\mu\text{mol/L}$). Što se markera apsorpcije tiče, nije bilo značajnih razlika u serumskim koncentracijama kampesterola kod pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 2,81 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,56-4,5 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D (medijana: 3,09 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,75-3,83 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracije β -sitosterola se takođe nisu razlikovale kod pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 3,22 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,75-4,74 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D (medijana: 2,85 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,91-6,57 $\mu\text{mol/L}$) (slika 46).



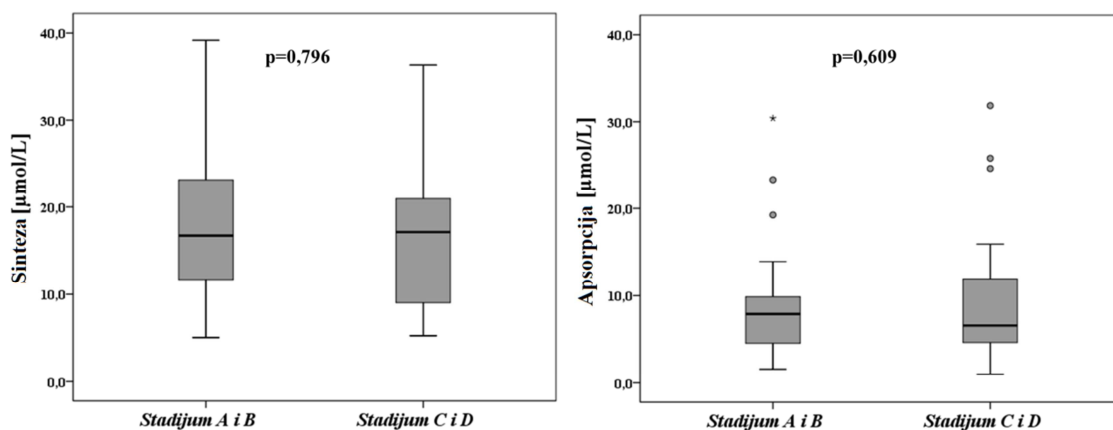
Slika 46. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu kod pacijenata sa stadijumima A i B u odnosu na pacijenate sa stadijumima C i D CRC.

Apsolutne koncentracije *dezmosterola*_{HDL} se nisu značajno razlikovale između stadijuma A i B (medijana: 0,16 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,1-0,22 $\mu\text{mol/L}$) i stadijuma C i D (medijana: 0,17 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,13-0,26 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, ni koncentracije *latosterola*_{HDL} se nisu razlikovale između pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 0,84 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,63-1,17 $\mu\text{mol/L}$) i stadijumima C i D (medijana: 0,92 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,58-1,42 $\mu\text{mol/L}$). Što se markera apsorpcije tiče, primećene su niže koncentracije *kampesterola*_{HDL} kod pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 0,44 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,29-0,57 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D (medijana: 0,55 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,42-0,91 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracije *β -sitosterola*_{HDL} se nisu razlikovale između pacijenata sa stadijumima C i D (medijana: 0,78 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,42-0,99 $\mu\text{mol/L}$) i pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 1,05 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,65-1,21 $\mu\text{mol/L}$) (slika 47).



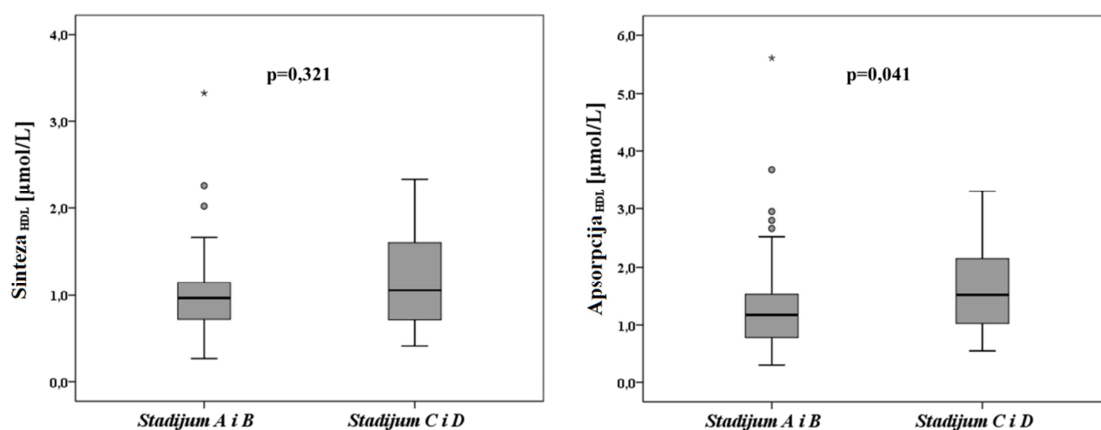
Slika 47. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa stadijumima A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D kolorektalnog karcinoma.

Što se zbirnih koncentracija NHS u serumu tiče, nije bilo značajnih razlika u odnosu na stadijume CRC. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu se nisu značajno razlikovale između stadijuma A i B (medijana: 18,77 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 13,04-23,31 $\mu\text{mol/L}$) i stadijuma C i D (medijana: 15,58 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 7,55-21,41 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, značajnih razlika nije bilo između ove dve grupe ni kada su u pitanju zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa stadijumima A i B (medijana: 5,77 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 3,2-9,17 $\mu\text{mol/L}$) i pacijenata sa stadijumima C i D (medijana: 5,43 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 4,07-9,65 $\mu\text{mol/L}$) (slika 48).



Slika 48. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa stadijumima A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL se nisu značajno razlikovale između stadijuma A i B (medijana: 1,0 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,8-1,29 µmol/L) i stadijuma C i D (medijana: 1,06 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,74-1,72 µmol/L). Sa druge strane, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su bile više kod pacijenata sa stadijumima C i D (medijana: 1,59 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,1-2,15 µmol/L) u odnosu na pacijente sa stadijumima A i B (medijana: 1,2 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,74-1,62 µmol/L) (slika 49).



Slika 49. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji pacijenata sa stadijumima A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D.

Relativne koncentracije dezmosterola, latosterola, kamepsterola i β-sitosterola u serumu pacijenata sa A i B stadijumom CRC nisu se značajno razlikovali od pacijenata sa C i D stadijumom ove bolesti. Takođe, i relativne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji nisu pokazale značajnu razliku u odnosu na stadijum oboljenja, dok su

relativne koncentracije markera apsorpcije holesterola bile značajno više kod pacijenata u C i D stadijumima CRC u odnosu na pacijente u A i B stadijumima bolesti (tabela 36).

Tabela 36. Relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa stadijumom A i B i pacijenata sa stadijumom C i D kolorektalnog karcinoma.

<i>Parametar</i>	<i>Stadijum A i B</i> (<i>n=56</i>)	<i>Stadijum C i D</i> (<i>n=40</i>)	<i>P</i>
<i>Dezmosterol/holesterol</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,45 (0,33-0,54)	0,36 (0,28-0,54)	0,894
<i>Latosterol/holesterol</i> (<i>mmol/mol</i>)	3,77 (2,65-4,75)	3,24 (1,55-4,71)	0,947
<i>Kampesterol/holesterol</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,68 (0,45-0,91)	0,70 (0,44-0,98)	0,652
<i>β-sitosterol/holesterol</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,75 (0,49-1,03)	0,73 (0,58-1,25)	0,528
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,14 (0,11-0,21)	0,20 (0,14-0,35)	0,204
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,78 (0,59-1,21)	1,16 (0,57-1,61)	0,561
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,43 (0,35-0,53)	0,64 (0,42-1,01)	0,039
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h</i> (<i>mmol/mol</i>)	0,66 (0,51-1,01)	1,13 (0,70-1,51)	0,030

Podaci su predstavljani kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Dezmosterol/Latosterol* i *Dezmosterol_{HDL}/Latosterol_{HDL}* nisu se značajno razlikovali u odnosu na stadijum oboljenja. Takođe ni odnosi *Sinteza/Apsorpcija* i *Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}* nisu se značajno razlikovali između pacijenata sa stadijumima A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D. Pored toga, ni odnosi *NHS_{HDL}/NHS* nisu se značajno razlikovali kod pacijenata sa B stadijumom CRC i pacijenata sa C i D stadijumom bolesti (tabela 37).

Tabela 37. Indeksi homeostaze holestrola kod pacijenata sa CRC stadijuma A i B i stadijuma C i D.

<i>Parametar</i>	<i>Stadijum A i B (n=56)</i>	<i>Stadijum C i D (n=40)</i>	<i>P</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,13 (0,08-0,21)	0,16 (0,07-0,19)	0,781
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	2,80 (1,47-3,34)	2,41 (1,42-3,77)	0,622
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}_{HDL}}$	0,85 (0,47-1,33)	0,82 (0,58-0,94)	0,494
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Dezmosterol}}$	0,08 (0,07-0,12)	0,12 (0,08-0,14)	0,086
$\frac{\text{Latosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}}$	0,05 (0,04-0,08)	0,07 (0,05-0,15)	0,132
$\frac{\text{Kampesterol}_{HDL}}{\text{Kampesterol}}$	0,15 (0,12-0,28)	0,25 (0,17-0,28)	0,193
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{HDL}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,21 (0,17-0,42)	0,27 (0,16-0,49)	0,246
$\frac{\text{Sinteza}_{HDL}}{\text{Sinteza}}$	0,06 (0,04-0,07)	0,07 (0,05-0,11)	0,112
$\frac{\text{Apsorpcija}_{HDL}}{\text{Apsorpcija}}$	0,18 (0,12-0,33)	0,25 (0,14-0,70)	0,129
$\frac{\text{Dezmosterol}_{HDL}}{\text{Latosterol}_{HDL}}$	0,2 (0,15-0,3)	0,18 (0,16-0,28)	0,955

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

4.3.6 Ispitivanje razlika između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na pol i ITM pacijenata sa CRC

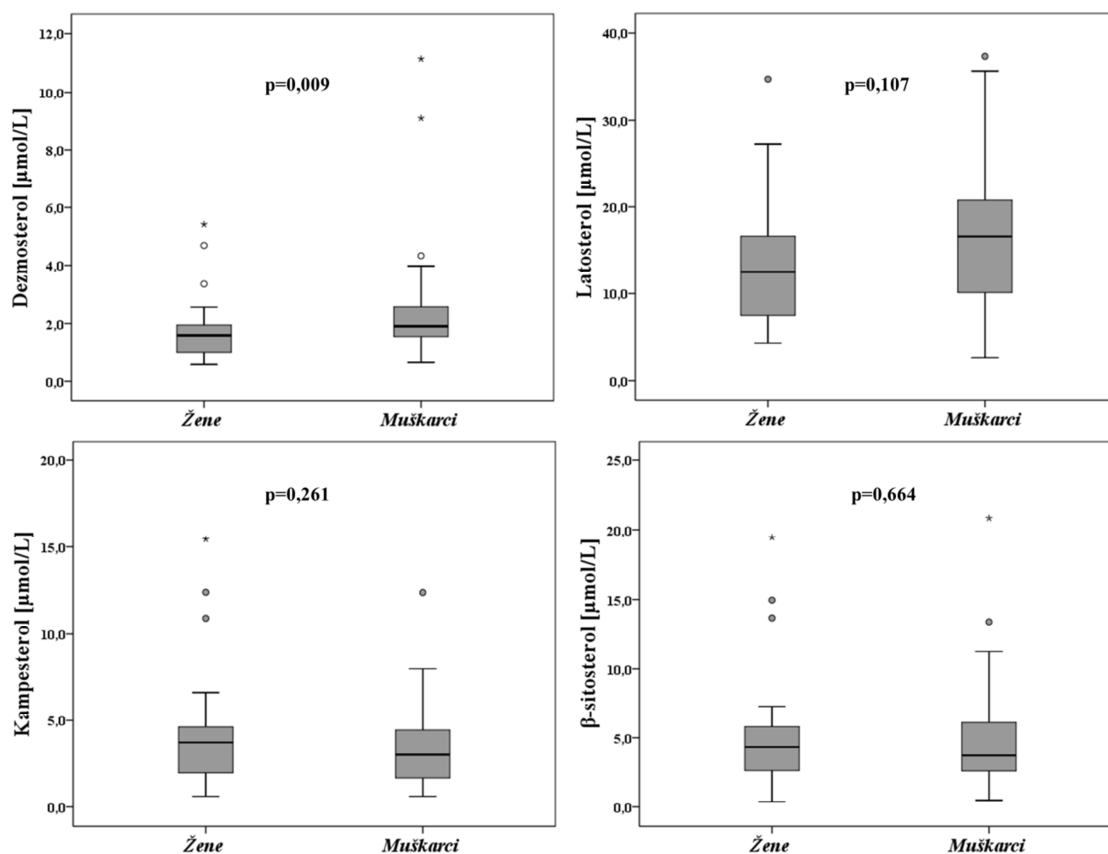
U grupi ispitanika obolelih od CRC, uočena je značajna razlika u vrednostima ITM i koncentracijama HDL-h u odnosu na pol. Naime, kod muškaraca su zapaženi viši ITM, ali niže koncentracije HDL-h u odnosu na žene. Razlika u koncentracijama ukupnih proteina, albumina, UH i LDL-h i TG u odnosu na pol nije bilo (tabela 38).

Tabela 38. Vrednosti antropometrijskih parametara i koncentracije biohemijskih i lipidnih parametara u odnosu na pol pacijenata sa CRC.

Parametar	Žene (n=34)	Muškarci (n=67)	P
ITM (kg/m ²)	22,76(21,03-27,62)	26,3(25,25-29,54)	0,001
Ukupni protein (g/L)	59,4(54,57-69,8)	65,9(61,21-72,77)	0,206
Albumin (g/L)	36(32,2-41,25)	38,8(34,50-42,00)	0,077
UH (mmol/L)	4,21(4,11-5,15)	4,34(3,31-4,85)	0,626
TG (mmol/L)	1,3(1,04-1,37)	1,19(1,04-1,62)	0,92
HDL-h (mmol/L)	0,95(0,85-1,16)	0,89(0,66-1,21)	0,037
LDL-h (mmol/L)	2,75(2,37-3,25)	3,05(2,03-3,32)	0,442

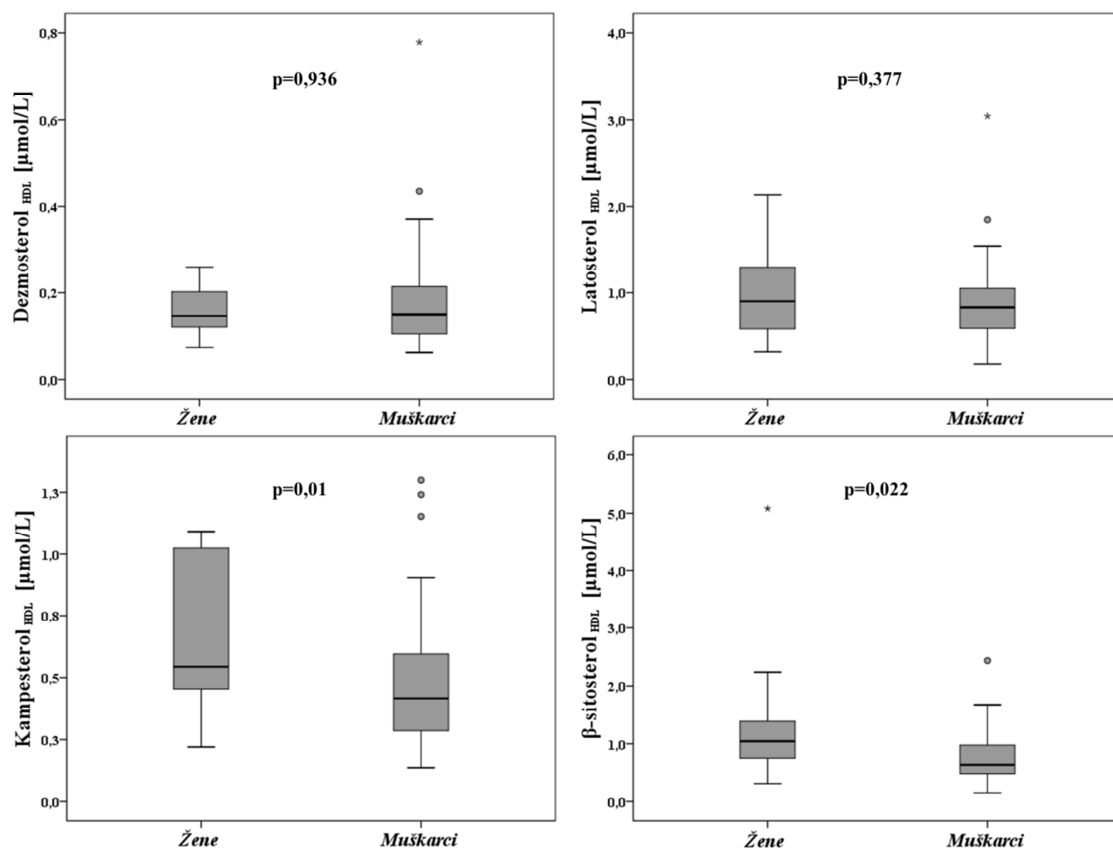
Podaci su predstavljani kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu su se značajno razlikovale u odnosu na pol pacijenata obolelih od CRC. Naime, koncentracije dezmosterola u serumu su bile više kod muškaraca (medijana: 1,88 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,54-2,55 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na žene (medijana: 1,61 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,0-1,9 $\mu\text{mol/L}$). Sa druge strane, razlika u koncentracijama latosterola u serumu između muškaraca (medijana: 18,05 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 11,64-20,78 $\mu\text{mol/L}$) i žena (medijana: 12,5 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 8,27-16,63 $\mu\text{mol/L}$) nije bilo. Takođe, statistički značajna razlika nije zabeležena ni kada su u pitanju apsolutne koncentracije kampesterola kod muškaraca u odnosu na žene. Koncentracije kampesterola u serumu se nisu razlikovale između osoba muškog (medijana: 2,02 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,53-4,5 $\mu\text{mol/L}$) i ženskog pola (medijana: 3,11 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 2,37-4,49 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracije β -sitosterola u serumu se nisu razlikovale između osoba muškog (medijana: 3 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 1,7-4,71 $\mu\text{mol/L}$) i ženskog pola (medijana: 3,59; interkvartilni raspon: 2,32-5,66 $\mu\text{mol/L}$) (slika 50).



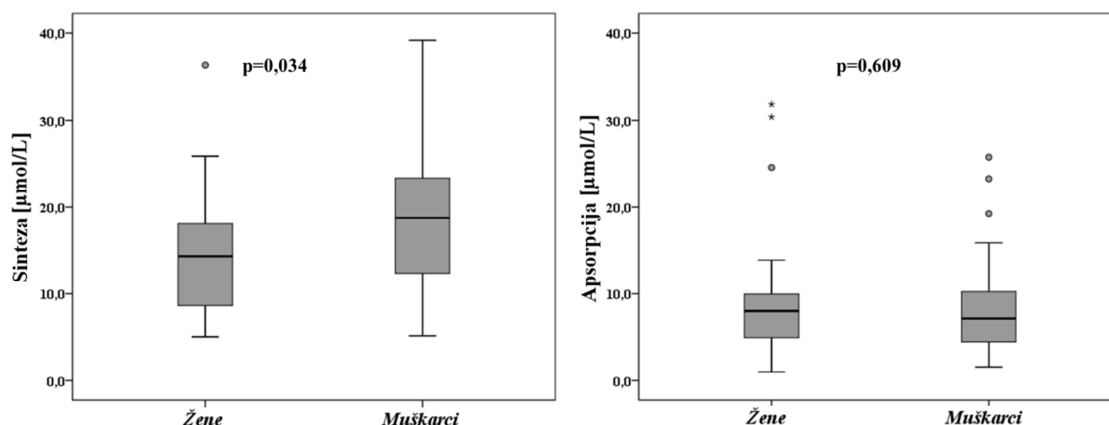
Slika 50. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu kod pacijenata sa CRC u odnosu na pol.

Koncentracije *dezmosterola*_{HDL} se nisu značajno razlikovale kod osoba muškog pola (medijana: 0,19 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,11-0,3 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe ženskog pola (medijana: 0,14 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,1-0,2 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, razlika u koncentracijama *latosterola*_{HDL} između muškaraca (medijana: 0,32 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,21-0,43 $\mu\text{mol/L}$) i žena (medijana: 0,25 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,2-0,3 $\mu\text{mol/L}$) nije bilo. Koncentracije *kampesterola*_{HDL} su bile niže kod muškaraca (medijana: 0,84 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,67-1,27 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na žene (medijana: 0,91 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,58-1,19 $\mu\text{mol/L}$). Takođe, koncentracije *β -sitosterola*_{HDL} su bile više kod osoba ženskog pola (medijana: 0,55 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,42-0,85 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe muškog pola (medijana: 0,44 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,29-0,61 $\mu\text{mol/L}$) (slika 51).



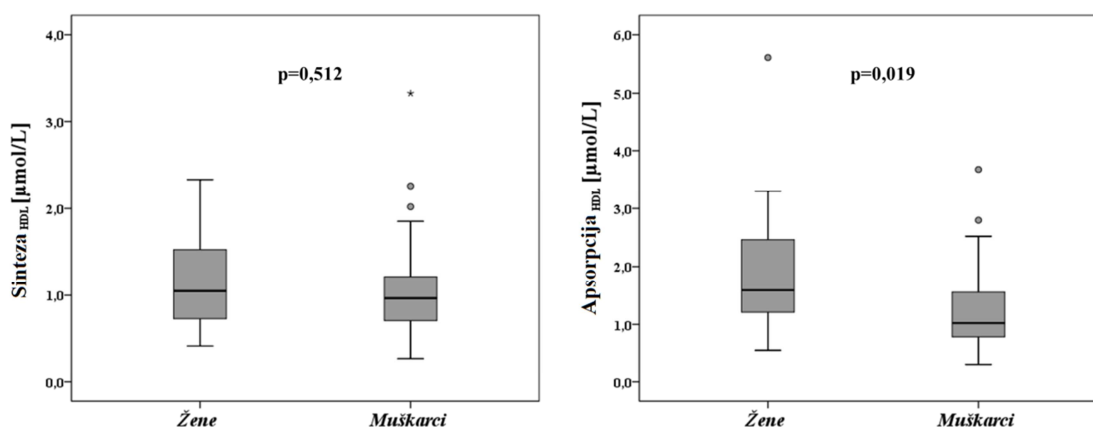
Slika 51. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC u odnosu na pol.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu su bile značajno više kod muškaraca (medijana: 1,07 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,55-1,5 $\mu\text{mol/L}$) koji boluju od CRC u odnosu na žene (medijana: 0,74 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 0,55-1,49 $\mu\text{mol/L}$). Sa druge strane, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu nisu se značajno razlikovale kod osoba muškog pola (medijana: 14,96 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 9,8-17,61 $\mu\text{mol/L}$) u odnosu na osobe ženskog pola (medijana: 19,32 $\mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: 13,28-23,35 $\mu\text{mol/L}$) (slika 52).



Slika 52. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa CRC u odnosu na pol.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji se nisu razlikovale između osoba muškog (medijana: 1,87 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,21-2,6 µmol/L) i osoba ženskog pola (medijana: 3,07 µmol/L; interkvartilni raspon: 1,58-4,58 µmol/L) obolelih od CRC, dok su zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji bile značajno više kod žena (medijana: 1,06 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,82-1,4 µmol/L) u odnosu na muškarce (medijana: 1,04 µmol/L; interkvartilni raspon: 0,69-1,34 µmol/L) (slika 53).



Slika 53. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC u odnosu na pol.

Relativne koncentracije dezmosterola u serumu su bile više kod osoba ženskog pola, dok su relativne koncentracije kampesterola u HDL frakciji bile više kod muškaraca. Relativne koncentracije svih ostalih NHS u serumu i HDL frakciji nisu se značajno razlikovale između dve grupe (tabela 39).

Tabela 39. Relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa CRC muškog i ženskog pola.

Parametar	Žene (n=32)	Muškarci (n=64)	p
<i>Dezmosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,93 (0,66-1,2)	0,78 (0,48-1,15)	0,005
<i>Latosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,35 (0,26-0,44)	0,49 (0,34-0,56)	0,138
<i>Kampesterol/holesterol</i> (mmol/mol)	2,96 (1,76-4,17)	3,81 (3,05-4,8)	0,217
<i>β-sitosterol/holesterol</i> (mmol/mol)	0,82 (0,6-1,04)	0,56 (0,43-0,9)	0,535
<i>Dezmosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,81 (0,57-1,27)	0,66 (0,46-1,02)	0,241
<i>Latosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,14 (0,1-0,19)	0,21 (0,13-0,35)	0,721
<i>Kampesterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,82 (0,56-1,49)	1,01 (0,62-1,41)	0,024
<i>β-sitosterol_{HDL}/HDL-h</i> (mmol/mol)	0,56 (0,39-0,99)	0,45 (0,36-0,6)	0,174

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Odnos *Dezmosterol/Latosterol* i *Dezmosterol_{HDL}/Latosterol_{HDL}* nije se značajno razlikovao kod muškaraca obolelih od CRC u odnosu na žene obolele od CRC. Pored toga, ni odnosi *Sinteza/Apsorpcija* i *Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}* nisu se značajno razlikovali između polova. Odnos *Dezmosterol_{HDL}/Dezmosterol* bio je, uz graničnu statističku značajnost, viši kod žena obolelih od CRC u odnosu na muškarce kao i odnos *Sinteza_{HDL}/Sinteza*, dok razlika u ostalim indeksima *NHS_{HDL}/NHS* nije bilo (tabela 40).

Tabela 40. Indeksi homeostaze holesterola kod pacijenata sa CRC u odnosu na pol.

<i>Parametar</i>	<i>Žene</i> (<i>n</i> =32)	<i>Muškarci</i> (<i>n</i> =64)	<i>P</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,27 (0,17-0,48)	0,22 (0,17-0,46)	0,628
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	2,09 (1,26-3,28)	2,81 (1,57-4,40)	0,126
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}$	0,64 (0,35-0,81)	0,69 (0,41-1,04)	0,086
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Dezmosterol}}$	0,85 (0,58-1,24)	0,69 (0,41-0,93)	0,054
$\frac{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}}$	0,10 (0,07-0,13)	0,10 (0,07-0,14)	0,062
$\frac{\text{Kampesterol}_{\text{HDL}}}{\text{Kampesterol}}$	0,07 (0,05-0,14)	0,06 (0,04-0,08)	0,240
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{\text{HDL}}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,18 (0,13-0,27)	0,17 (0,12-0,28)	0,307
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Sinteza}}$	0,07 (0,05-0,14)	0,06 (0,04-0,07)	0,055
$\frac{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}}$	0,23 (0,15-0,37)	0,18 (0,12-0,36)	0,187
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}$	0,16 (0,07-0,2)	0,13 (0,1-0,22)	0,299

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

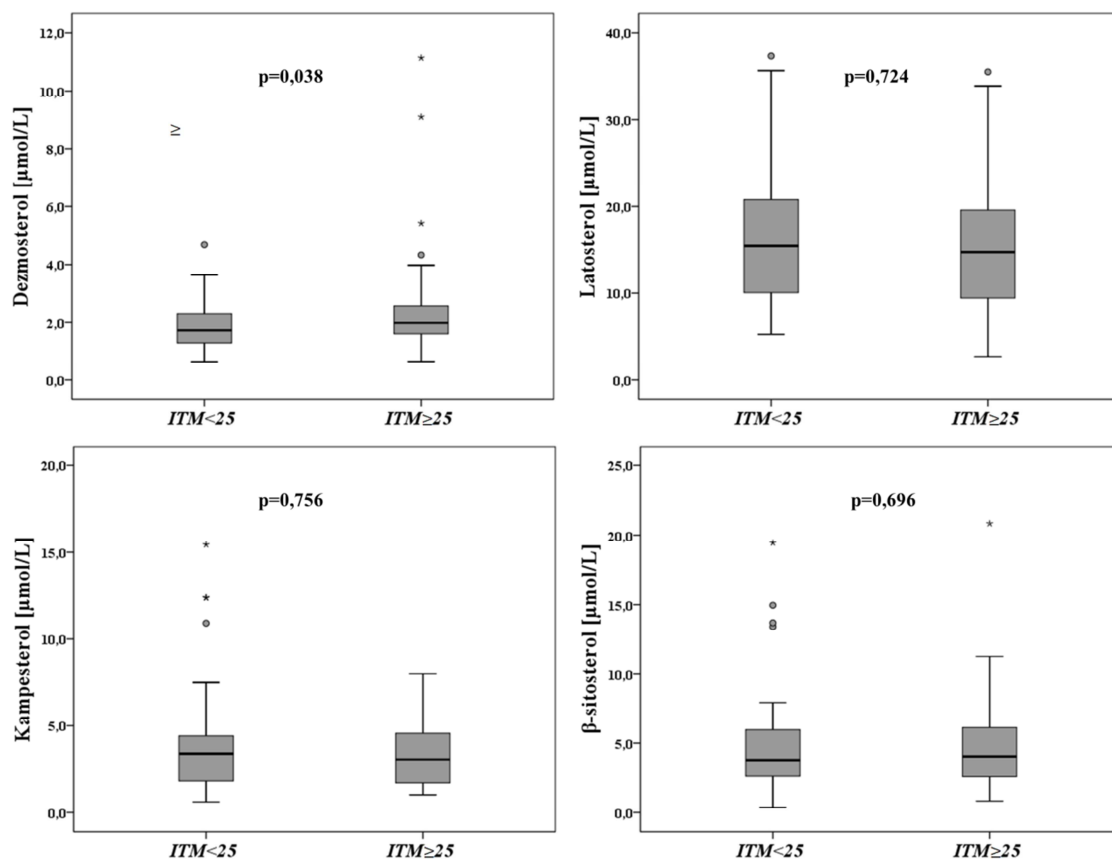
U grupi pacijenata obolelih od CRC, primetili smo značajno više vrednosti albumina kod osoba sa vrednostima $\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, u odnosu na pacijente sa vrednostima $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$. Razlika u koncentracijama ukupnih proteina, UH, TG i HDL-h i LDL-h u serumu između dve grupe nije bilo (tabela 41).

Tabela 41. Vrednosti antropometrijskih parametara i koncentracije biohemijskih i lipidnih parametara kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

Parametar	ITM < 25 kg/m ² (n=47)	ITM ≥ 25 kg/m ² (n=45)	p
Ukupni protein (g/L)	60,91 (54,51-72,92)	65,01 (59,8-71,3)	0,365
Albumin (g/L)	35,85 (31,7-43,18)	38,75 (34,88-41,65)	0,034
UH (mmol/L)	4,19 (3,32-4,75)	4,43 (4,10-5,30)	0,422
TG (mmol/L)	1,16 (0,92-1,29)	1,35 (1,08-1,61)	0,215
HDL-h (mmol/L)	0,93 (0,73-1,00)	0,98 (0,74-1,29)	0,110
LDL-h (mmol/L)	2,81 (2,05-3,17)	2,95 (2,32-3,54)	0,487

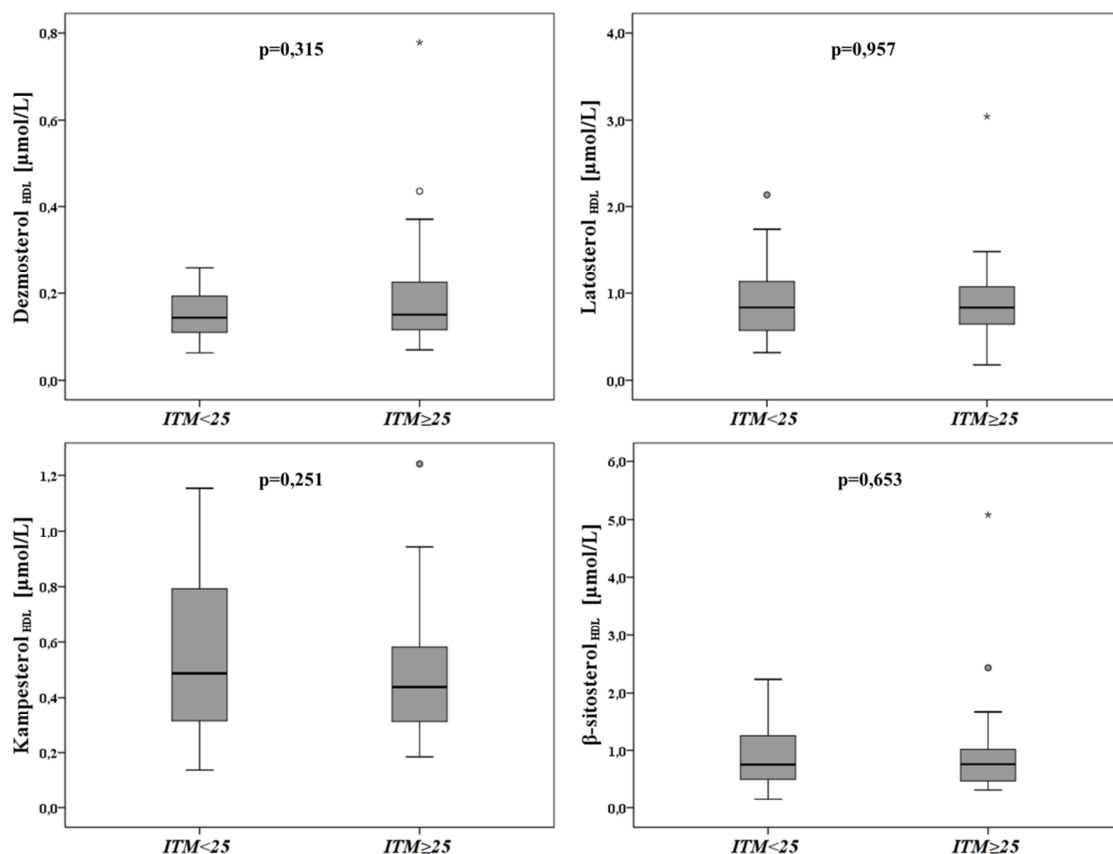
Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Dalje, ispitivali smo razlike između apsolutnih koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa CRC u odnosu na prisustvo povišene telesne mase. Koncentracije dezmosterola u serumu su bile značajno više kod osoba sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 1,88 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,58-2,45 μmol/L) u odnosu na osobe sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 1,55 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,99-1,88 μmol/L). Koncentracije latosterola u serumu se nisu razlikovale kod osoba sa povišenim ITM (medijana: 15,48 μmol/L; interkvartilni raspon: 9,05-20,99 μmol/L) u odnosu na osobe normalnog/sniženog ITM (medijana: 13,58 μmol/L; interkvartilni raspon: 10,51-19,54 μmol/L). Takođe, nije bilo razlika u koncentraciji kampesterola u serumu pacijenata sa povišenim vrednostima ITM (medijana: 2,93 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,58-4,53 μmol/L) u odnosu na pacijente sa normalnim/snižanim vrednostima ITM (medijana: 2,96 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,94-3,83 μmol/L). Analogno, ni koncentracije β-sitosterola u serumu osoba sa CRC koji su imali ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 3,79 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,72-5,82 μmol/L) nisu se razlikovale u odnosu na osobe sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 2,68 μmol/L; interkvartilni raspon: 2,09-3,74 μmol/L) (slika 54).



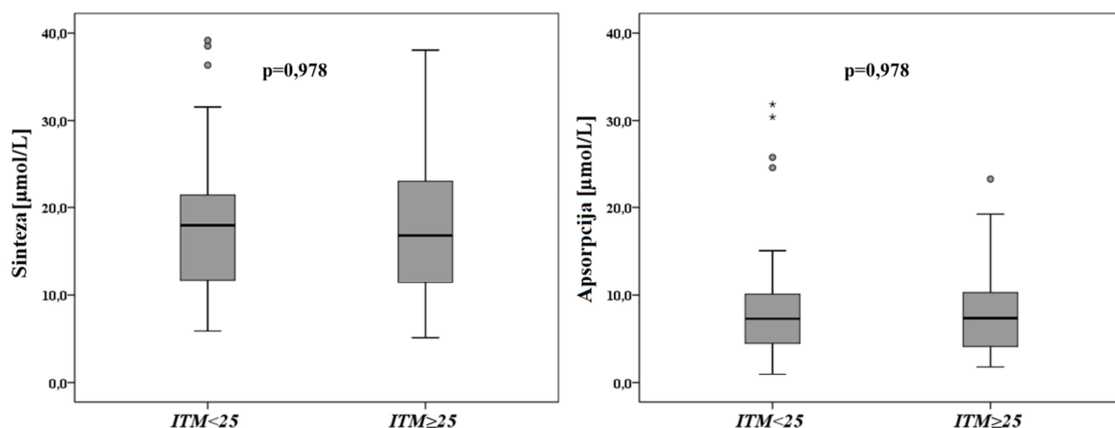
Slika 54. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

U HDL frakciji koncentracije dezmosterola se nisu razlikovale između osoba sa povišenim ITM (medijana: 0,18 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,11-0,29 μmol/L) i osoba sa sniženim/normalnim ITM (medijana: 0,16 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,09-0,2 μmol/L). Takođe, ni koncentracije *latosterola*_{HDL} nisu se razlikovale između pacijenata sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,85 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,61-1,24 μmol/L) i pacijenata sa ITM < 25 kg/m² (medijana: 0,91 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,62-1,26 μmol/L). Koncentracije *kampesterola*_{HDL} takođe nisu razlikovale između pacijenata sa ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,45 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,32-0,57 μmol/L) i ITM < 25 kg/m² (0,67 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,38-1,00 μmol/L), kao ni koncentracije *β-sitosterola*_{HDL} (za ITM ≥ 25 kg/m² (medijana: 0,72 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,52-1,24 μmol/L) i za ITM < 25 kg/m² (medijana: 1,1 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,62-1,82 μmol/L)) (slika 55).



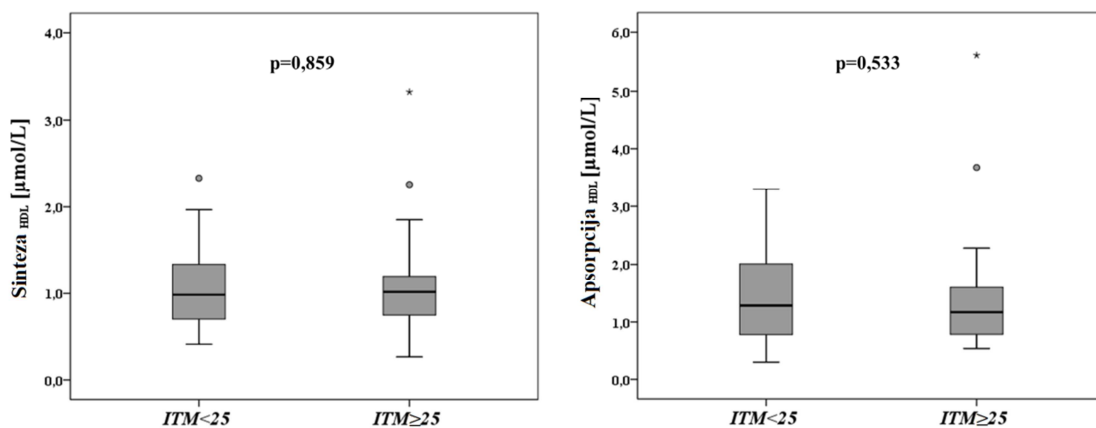
Slika 55. Razlike u apsolutnim koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu nisu se značajno razlikovale kod pacijenata sa CRC i $\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $17,8 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $10,91\text{-}23,3 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $15,27 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $12,24\text{-}20,86 \mu\text{mol/L}$). Takođe, zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu nisu se značajno razlikovale kod osoba sa $\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $6,68 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $3,23\text{-}9,59 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na pacijente sa $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$ (medijana: $5,43 \mu\text{mol/L}$; interkvartilni raspon: $4,19\text{-}7,56 \mu\text{mol/L}$). (slika 56).



Slika 56. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji nisu se značajno razlikovale kod pacijenata sa CRC povišene telesne mase (medijana: 1,06 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,75-1,44 μmol/L) u odnosu na pacijente snižene/normalne telesne mase (medijana: 1,02 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,83-1,36 μmol/L), kao ni zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata povišene telesne mase (medijana: 1,23 μmol/L; interkvartilni raspon: 0,81-1,66 μmol/L) u odnosu na pacijente snižene/normalne telesne mase (medijana: 1,39 μmol/L; interkvartilni raspon: 1,13-2,29 μmol/L) (slika 57).



Slika 57. Razlike u zbirnim koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

Kod pacijenata sa CRC, nije bilo razlike u odnosu na prisustvo povišene telesne mase kada su u pitanju relativne koncentracije NHS u serumu. Takođe, ni relativne koncentracije dezmosterola, latosterola i β-sitosterola u HDL frakciji se nisu razlikovale između grupe sa povišenim ITM i pacijenata sa normalnim/snižanim vrednostima ITM.

Jedino su relativne koncentracije kampesterola u HDL bile značajno više kod pacijenata sa normalnom/sniženom telesnom masom (tabela 42).

Tabela 42. Relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji kod pacijenata sa CRC sa ITM<25 i ITM≥25.

Parametar	ITM<25 kg/m ² (n=45)	ITM≥25 kg/m ² (n=42)	p
Dezmosterol/holesterol (mmol/mol)	0,32 (0,25-0,49)	0,44 (0,34-0,54)	0,129
Latosterol/holesterol (mmol/mol)	3,72 (2,43-4,78)	3,3 (2,08-4,57)	0,396
Kampesterol/holesterol (mmol/mol)	0,75 (0,5-0,92)	0,69 (0,35-0,96)	0,442
β-sitosterol/holesterol (mmol/mol)	0,63 (0,58-0,86)	0,82 (0,46-1,2)	0,994
Dezmosterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	0,17 (0,1-0,23)	0,19 (0,13-0,23)	0,692
Latosterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	1,1 (0,58-1,83)	0,88 (0,58-1,28)	0,426
Kampesterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	0,67 (0,38-1)	0,45 (0,36-0,56)	0,047
β-sitosterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	1,1 (0,62-1,82)	0,72 (0,52-1,24)	0,394

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poređene *Mann-Whitney U* testom

Što se tiče indeksa homeostaze holesterola, odnos koncentracija dezmosterola i latosterola kako u serumu tako i u HDL frakciji nije se razlikovao između pacijenata sa ITM<25 kg/m² i pacijenata sa ITM≥25 kg/m². Odnosi *Sinteza/Apsorpcija* i *Sinteza_{HDL}/Apsorpcija_{HDL}* nisu se značajno razlikovali u odnosu na ITM kod pacijenata sa CRC. Takođe, ni svi ostali ispitivani indeksi nisu pokazali statistički značajnu razliku između pacijenata sa povišenom telesnom masom i pacijenata sa normalnom/sniženom telesnom masom (tabela 43).

Tabela 43. Indeksi homeostaze holestrola kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

<i>Parametar</i>	<i>ITM < 25 kg/m²</i> <i>(n=45)</i>	<i>ITM ≥ 25 kg/m²</i> <i>(n=42)</i>	<i>p</i>
$\frac{\text{Dezmosterol}}{\text{Latosterol}}$	0,11 (0,06-0,19)	0,14 (0,1-0,26)	0,179
$\frac{\text{Sinteza}}{\text{Apsorpcija}}$	2,32 (1,50-3,81)	2,81 (1,47-3,73)	0,908
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}$	0,66 (0,5-1,08)	0,87 (0,59-1,14)	0,501
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Dezmosterol}}$	0,09 (0,07-0,14)	0,10 (0,07-0,12)	0,846
$\frac{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}}$	0,06 (0,05-0,13)	0,06 (0,04-0,1)	0,741
$\frac{\text{Kampesterol}_{\text{HDL}}}{\text{Kampesterol}}$	0,23 (0,13-0,39)	0,17 (0,12-0,27)	0,475
$\frac{\beta - \text{sitosterol}_{\text{HDL}}}{\beta - \text{sitosterol}}$	0,36 (0,19-0,48)	0,2 (0,16-0,47)	0,481
$\frac{\text{Sinteza}_{\text{HDL}}}{\text{Sinteza}}$	0,06 (0,05-0,07)	0,06 (0,04-0,08)	0,730
$\frac{\text{Apsorpcija}_{\text{HDL}}}{\text{Apsorpcija}}$	0,19 (0,14-0,36)	0,17 (0,12-0,36)	0,601
$\frac{\text{Dezmosterol}_{\text{HDL}}}{\text{Latosterol}_{\text{HDL}}}$	0,16 (0,11-0,2)	0,23 (0,16-0,31)	0,350

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon). Vrednosti su poredene *Mann-Whitney U* testom

4.3.7 Korelaciona analiza apsolutnih i relativnih koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji kod zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC

U tabeli 44 su prikazane korelacije između koncentracija markera sinteze i markera apsorpcije holesterola kod zdravih osoba. Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu su negativno korelirale sa relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji, te apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Apsolutne koncentracije latosterola u serumu su negativno korelirale sa relativnim koncentracijama kampesterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji i apsolutnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije dezmosterola u serumu su negativno korelirale sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu i HDL frakciji, te apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije latosterola u serumu su negativno korelirale sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu i HDL frakciji, te apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu su negativno korelirale sa relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji, te apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Zbirne koncentracije markera sinteze holestrola u HDL frakciji su negativno korelirale sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu. Apsolutne koncentracije dezmosterola u HDL frakciji su korelirale pozitivno sa zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji kao i apsolutnim koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji. Apsolutne koncentracije latosterola u HDL frakciji su korelirale negativno sa apsolutnim i relativnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu, kao i sa zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu. Relativne koncentracije dezmosterola u HDL frakciji su pozitivno korelirale sa relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije latosterola u HDL frakciji su negativno

korelirale sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije u serumu i HDL frakciji.

Kod pacijenata su takođe analizirane korelacije između markera sinteze i markera apsorpcije holesterola (tabela 45). Apsolutne koncentracije dezmosterola u serumu su pozitivno korelirale sa apsolutnim koncentracijama β -sitosterola kao i sa zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu. Apsolutne koncentracije latosterola u serumu pokazale su graničnu negativnu značajnost u korelaciji sa relativnim koncentracijama kampesterola u serumu i značajne negativne korelacije sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije dezmosterola u serumu nisu pokazale značajne korelacije sa apsolutnim, relativnim i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji. Relativne koncentracije latosterola u serumu su pokazale značajne negativne korelacije sa relativnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu i apsolutnim koncentracijama kampesterola u HDL frakciji. Koncentracije dezmosterola u HDL frakciji su korelirale pozitivno sa apsolutnim i relativnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Koncentracije latosterola u HDL frakciji su korelirale pozitivno sa apsolutnim i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije dezmosterola u HDL frakciji pokazale su granično značajnu pozitivnu korelaciju sa apsolutnim koncentracijama β -sitosterola u HDL frakciji, kao i značajnu pozitivnu korelaciju sa relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji i zbirnim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Relativne koncentracije latosterola u HDL frakciji pokazale su značajnu negativnu korelaciju sa relativnim koncentracijama kampesterola u serumu, kao i značajnu pozitivnu korelaciju sa relativnim koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji. Zbirne koncentracije markera sinteze holesterola u serumu pokazale su negativne korelacije sa apsolutnim i relativnim koncentracijama kampesterola u HDL frakciji, dok su zbirne koncentracije markera sinteze u HDL frakciji pozitivno korelirale sa koncentracijama kampesterola i β -sitosterola u HDL frakciji.

Tabela 44. Korelacije između apsolutnih i relativnih odnosa markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji, kod zdravih ispitanika

Parametar		Kampesterol ($\mu\text{mol/L}$)	β - sitosterol ($\mu\text{mol/L}$)	Kampesterol/ holesterol (mmol/mol)	β -sitosterol/ holesterol (mmol/mol)	Apsorpcija ($\mu\text{mol/L}$)	Apsorpcija _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	Kampesterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	β -sitosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	Kampesterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	β -sitosterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)
Dezmosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,159	-0,150	-0,339	-0,310	-0,163	-0,395	-0,450	-0,355	-0,314	-0,236
	p	0,106	0,127	0,001	0,001	0,099	0,001	0,001	0,001	0,002	0,021
Latosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,178	-0,139	-0,239	-0,199	-0,135	-0,301	-0,336	-0,275	-0,071	-0,016
	p	0,086	0,182	0,020	0,055	0,196	0,004	0,001	0,009	0,506	0,881
Dezmosterol/ holesterol (mmol/mol)	ρ	-0,434	-0,413	-0,396	-0,366	-0,428	-0,542	-0,543	-0,517	-0,363	-0,325
	p	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Latosterol/ holesterol (mmol/mol)	ρ	-0,298	-0,250	-0,243	-0,196	-0,249	-0,332	-0,344	-0,310	-0,075	-0,033
	p	0,004	0,015	0,018	0,058	0,016	0,001	0,001	0,003	0,481	0,757
Sinteza ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,181	-0,140	-0,255	-0,212	-0,137	-0,317	-0,356	-0,291	-0,087	-0,025
	p	0,081	0,177	0,013	0,040	0,187	0,003	0,001	0,006	0,422	0,819
Sinteza _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,262	-0,270	-0,271	-0,276	-0,277	-0,105	-0,077	-0,102	-0,107	-0,107
	p	0,011	0,008	0,008	0,007	0,007	0,308	0,458	0,323	0,301	0,301
Dezmosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,053	-0,028	-0,066	-0,052	-0,039	0,242	0,258	0,224	0,128	0,101
	p	0,609	0,785	0,525	0,617	0,706	0,017	0,011	0,027	0,213	0,327
Latosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,315	-0,318	-0,321	-0,319	-0,328	-0,181	-0,158	-0,167	-0,188	-0,178
	p	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,078	0,125	0,104	0,067	0,082
Dezmosterol _{HDL} / HDL-h (mmol/mol)	ρ	-0,114	-0,146	-0,095	-0,142	-0,134	-0,037	-0,038	-0,042	0,257	0,252
	p	0,271	0,159	0,359	0,170	0,194	0,718	0,713	0,681	0,011	0,013
Latosterol _{HDL} / HDL-h (mmol/mol)	ρ	-0,302	-0,356	-0,317	-0,375	-0,342	-0,366	-0,369	-0,342	-0,028	-0,010
	p	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,784	0,919

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

Tabela 45. Korelacije između apsolutnih i relativnih odnosa markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji, kod pacijenata sa CRC.

Parametar		Kampesterol ($\mu\text{mol/L}$)	β - sitosterol ($\mu\text{mol/L}$)	Kampesterol/ holesterol (mmol/mol)	β -sitosterol/ holesterol (mmol/mol)	Kampesterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	β - sitosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	Kampesterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	β -sitosterol _{HDL} /HDL-h (mmol/mol)	Apsorpcija ($\mu\text{mol/L}$)	Apsorpcija _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)
Dezmosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,166	0,312	-0,036	0,153	-0,037	0,052	-0,215	-0,036	0,275	0,028
	p	0,109	0,002	0,726	0,138	0,756	0,660	0,067	0,763	0,007	0,816
Latosterol ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,031	0,075	-0,221	-0,121	-0,304	-0,153	-0,295	-0,096	0,061	-0,184
	p	0,785	0,503	0,049	0,282	0,009	0,200	0,012	0,423	0,593	0,122
Dezmosterol/ holesterol (mmol/mol)	ρ	-0,015	0,129	0,006	0,165	-0,027	0,043	-0,125	0,016	0,091	0,029
	p	0,886	0,210	0,951	0,109	0,822	0,719	0,294	0,894	0,379	0,811
Latosterol/ holesterol (mmol/mol)	ρ	-0,218	-0,170	-0,299	-0,231	-0,322	-0,212	-0,247	-0,123	-0,196	-0,229
	p	0,052	0,128	0,007	0,038	0,006	0,074	0,037	0,303	0,082	0,053
Dezmosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,078	0,174	0,043	0,160	0,473	0,497	0,257	0,293	0,107	0,510
	p	0,516	0,140	0,720	0,176	0,001	0,001	0,028	0,012	0,372	0,001
Latosterol _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,094	0,011	-0,190	-0,056	0,314	0,357	0,114	0,137	-0,054	0,341
	p	0,436	0,929	0,113	0,643	0,007	0,002	0,340	0,253	0,657	0,003
Dezmosterol _{HDL} / HDL-h (mmol/mol)	ρ	-0,101	0,018	-0,061	0,045	0,210	0,231	0,422	0,439	-0,054	0,240
	p	0,399	0,882	0,608	0,703	0,074	0,049	0,001	0,001	0,654	0,041
Latosterol _{HDL} / HDL-h (mmol/mol)	ρ	-0,208	-0,077	-0,244	-0,114	0,071	0,114	0,289	0,287	-0,141	0,093
	p	0,082	0,522	0,040	0,341	0,554	0,339	0,014	0,014	0,241	0,436
Sinteza ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	0,050	0,132	-0,212	-0,074	-0,277	-0,132	-0,281	-0,083	0,109	-0,162
	p	0,657	0,242	0,059	0,514	0,019	0,269	0,017	0,487	0,334	0,174
Sinteza _{HDL} ($\mu\text{mol/L}$)	ρ	-0,081	0,024	-0,169	-0,033	0,356	0,395	0,140	0,163	-0,043	0,385
	p	0,503	0,838	0,159	0,781	0,002	0,001	0,239	0,173	0,720	0,001

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

4.4 Procena prediktivnog potencijala markera homeostaze holesterola

U cilju sagledavanja potencijala markera homeostaze holesterola u predviđanju prisustva CRC koristili smo binarnu logističku regresionu analizu. Analizom prediktivnog potencijala svih ispitivanih markera sinteze i apsorpcije holesterola izdvojili su se dezmosterol i kampesterol kao markeri koji poseduju značajnu prediktivnu sposobnost. Snižene koncentracije dezmosterola, kao i snižene koncentracije kampesterola u serumu predstavljaju potencijalne prognostičke biomarkere razvoja CRC (tabela 46)

Tabela 46. Procena značaja markera homeostaze holesterola kao prediktora prisustva CRC.

<i>Binarna logistička regresija</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
<i>Dezmosterol ($\mu\text{mol/L}$)</i>	0,439	(0,234-0,824)	0,001
<i>Latosterol ($\mu\text{mol/L}$)</i>	0,959	(0,903-1,018)	0,167
<i>Kampesterol ($\mu\text{mol/L}$)</i>	0,469	(0,329-0,669)	0,001
<i>β-sitosterol ($\mu\text{mol/L}$)</i>	1,004	(0,967-1,043)	0,835

Podaci su analizirani binarnom logističkom regresijom. Svi parametri bili kontinuirane varijable

S obzirom da su dezmosterol i kampesterol identifikovani kao značajni prediktori CRC u univarijantnoj analizi, u nastavku smo koristili multivarijantnu binarnu logističku regresionu analizu u cilju provere nezavisnog doprinosa ovih markera predikciji bolesti.

U tabeli 47 su prikazani rezultati dobijeni u analizi prediktivnog modela koji je, osim dezmosterola, uključivao i sledeće varijable: muški pol, starije životno doba, prekomerna telesna težina, koncentracije UH i TG. Dobijeni rezultati potvrdili su nezavisan doprinos dezmosterola u predikciji CRC, čak i u modelu koji je uključivao od ranije poznate faktore rizika za CRC.

Tabela 47. Multivarijantna binarna regresiona analiza dezmosterola kao prediktora prisustva CRC

<i>Binarna logistička regresija</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
<i>Pol (m/ž)</i>	2,531	(1,052-6,090)	0,038
<i>Godine starosti (god)</i>	1,132	(1,081-1,186)	0,001
<i>ITM (kg/m²)</i>	0,841	(0,735-0,961)	0,011
<i>UH (mmol/L)</i>	0,415	(0,264-0,651)	0,001
<i>TG (mmol/L)</i>	3,675	(1,611-8,382)	0,002
<i>Dezmosterol (μmol/L)</i>	0,608	(0,427-0,864)	0,006

Podaci su analizirani binarnom logističkom regresijom. Pol je tertian kao kategorička varijabla, dok su svi ostali parametri bili kontinuirane varijable.

U tabeli 48 su prikazani rezultati dobijeni u analizi prediktivnog modela koji je, osim kampesterola, uključivao i sledeće varijable: muški pol, starije životno doba, prekomerna telesna težina, koncentracije UH i TG. Dobijeni rezultati potvrdili su nezavisan doprinos kampesterola u predikciji CRC, čak i u modelu koji je uključivao od ranije poznate faktore rizika za CRC.

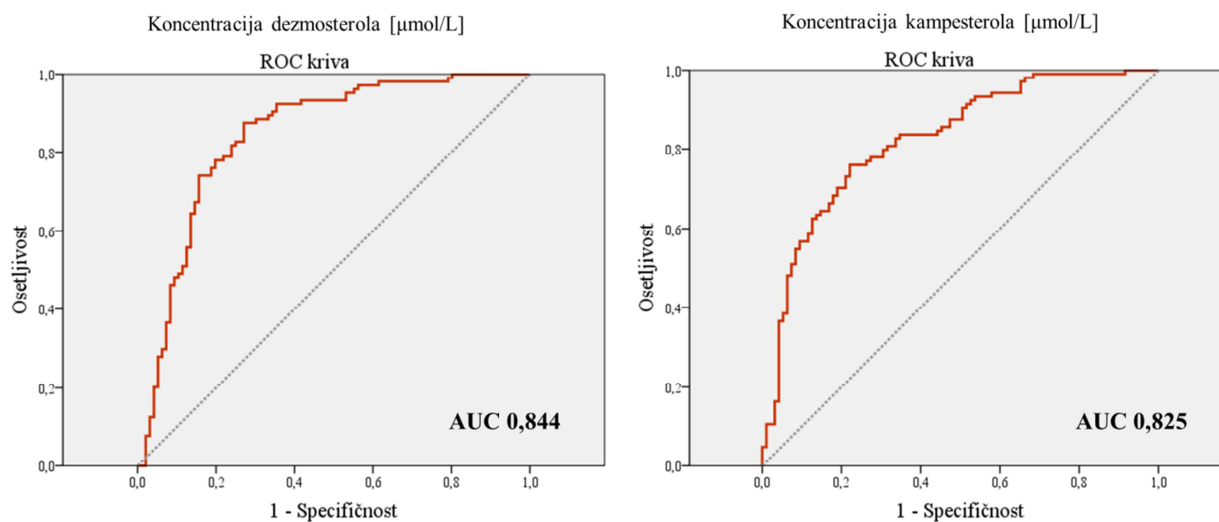
Tabela 48. Multivarijantna binarna regresiona analiza kampesterola kao prediktora prisustva CRC

<i>Binarna logistička regresija</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
<i>Pol (m/ž)</i>	1,448	0,599-3,497	0,411
<i>Godine starosti (god)</i>	1,135	1,083-1,190	0,001
<i>ITM (kg/m²)</i>	0,756	0,653-0,875	0,001
<i>UH (mmol/L)</i>	0,512	0,326-0,806	0,004
<i>Kampesterol (μmol/L)</i>	0,695	0,573-0,843	0,001
<i>TG (μmol/L)</i>	2,899	1,304-6,445	0,009

Podaci su analizirani binarnom logističkom regresijom. Pol je tretiran kao kategorička varijabla, dok su svi ostali parametri bili kontinuirane varijable.

Oba ispitivana markera sinteze i apsorpcije holesterola su zadržala svoj prediktivni potencijal, uprkos uključivanju tradicionalnih faktora rizika u ispitivane modele.

Prethodnu analizu dopunili smo ispitivanjem kliničke tačnosti određivanja dezmosterola i kampesterola korišćenjem ROC krivih. Rezultati pomenute analize su prikazani na slici 58. Za dezmosterol vrednost AUC ROC krive je bila 0,844, dok je za kampesterol bila 0,825.



Slika 58. ROC krive za dezmosterol i kampesterol

4.5 Analiza statusa vitamina D kod pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma i zdravih ispitanika

U cilju procene poremećaja statusa vitamina D kod pacijenata sa CRC, analizirali smo serumske koncentracije prekursora vitamina D 7-DHC, koncentracije metabolita vitamina D 25-hidroksiholekalciferola (25(OH)D3) i 24,25-dihidroksiholekalciferola (24,25(OH)₂D3), VDMR, kao i koncentracije VDBP.

Analiziranjem razlika u markerima statusa vitamina D između dve ispitivane grupe, utvrdili smo da su koncentracije 7-DHC niže kod pacijenata sa CRC, kao i nivoi 25(OH)D3 i VDBP. Međutim, iako je primetan trend ka nižim vrednostima koncentracija 24,25(OH)₂D3 u CRC grupi, statistički značajne razlike kada je u pitanju ovaj parametar, između kontrola i pacijenata nije bilo. Uprkos tome, koncentracije VDMR su bile smanjene kod pacijenata (tabela 49).

Tabela 49. Parametri statusa vitamin D u ispitivanim grupama

Parametar	Pacijenti sa CRC (n= 82)	Kontrole (n= 77)	p
7-DHC (μmol/L)	1.24 (0.91-1.94)	1.75 (1.23-2.56)	0.002
25(OH)D3 (ng/mL)	15.93 (12.04-22.18)	18.98 (15.85-23.75)	0.003
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	2.98 (2.54-3.62)	3.26 (2.70-4.00)	0.135
VDMR	5.12 (4.49-6.17)	5.55 (4.84-6.66)	0.016
VDBP (μg/mL)	265.66 (210.45-332.68)	300.56 (258.12-342.88)	0.030

Vrednosti su predstavljene kao medijane (interkvartilni raspon) i poređene *Mann-Whitney U*-testom

Da bi se proverio uticaj sezonskih varijacija i izloženosti UV zračenju na vrednosti markera statusa vitamina D, podelili smo pacijente i kontrole u dve podgrupe, u zavisnosti od sezone kada su uzorci krvi sakupljeni (zimski sezona od novembra do aprila, ili leto od maja do oktobra). Rezultati su prikazani u tabeli 50.

Tabela 50. Efekti sezone na status vitamin D kod pacijenata i kontrola

Parametar	CRC pacijenti		P	KG		P
	Letnja sezona (n= 48)	Zimska sezona (n= 34)		Letnja sezona (n= 23)	Zimska sezona (n= 54)	
7-DHC ($\mu\text{mol/L}$)	1.28 (0.47-2.13)	1.24 (0.91-1.93)	0.918	1.61 (1.05-2.27)	1.90 (1.39-2.79)	0.125
25(OH)D3 (ng/mL)	16.13 (12.41-22.92)	15.98 (10.61-21.66)	0.618	22.54 (16.37-31.40)	18.33 (15.04-22.28)	0.023
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	3.13 (2.61-4.26)	2.84 (2.61-3.67)	0.408	3.55 (3.04-5.38)	3.15 (2.62-3.74)	0.005
VDMR	5.12 (4.52-6.10)	5.09 (4.41-6.36)	0.925	5.53 (4.83-6.63)	5.70 (4.90-6.76)	0.738
VDBP ($\mu\text{g/mL}$)	266.94 (220.45-340.80)	260.13 (246.49-336.02)	0.797	334.28 (232.42-389.63)	296.60 (259.86-334.28)	0.352

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poređene *Mann-Whitney U*-testom.

Kao što se može uočiti u tabeli 50, nijedan od ispitivanih markera u grupi pacijenata se nije razlikovao u odnosu na period u kome je izvršeno uzorkovanje. Sa druge strane, u kontrolnoj grupi su nađene značajno veće koncentracije 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3 kod ispitanika koji su bili uključeni u studiju tokom leta, kada je veća izloženost UV zračenju.

4.6 Ispitivanje razlika između parametara statusa vitamina D u odnosu na pol i ITM kod zdravih ispitanika

U kontrolnoj grupi, nijedan od ispitivanih parametara statusa vitamina D nije se značajno razlikovao u odnosu na pol (tabela 51).

Tabela 51. Parametri statusa vitamina D kod zdravih ispitanika ženskog i muškog pola

Parametar	Žene (n=33)	Muškarci (n=43)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3,33 (2,75-3,85)	3,27 (2,7-4,24)	0,805
25(OH)D ₃ (ng/mL)	18,17 (15,84-23,02)	19,82 (15,85-28,18)	0,359
VDMR	5,23 (4,72-6,45)	5,68 (5,02-6,96)	0,105
7-DHC (μmol/L)	1,69 (1,25-2,52)	1,85 (1,22-2,53)	0,830
VDBP (μg/mL)	317,77 (284,4-361,61)	266,84 (248,24-334,28)	0,069

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene *Mann-Whitney U*-testom.

Takođe, nijedan od ispitivanih parametara statusa vitamina D nije se značajno razlikovao u odnosu na vrednost ITM u grupi zdravih ispitanika (tabela 52).

Tabela 52. Parametri statusa vitamina D kod zdravih ispitanika u odnosu na ITM.

Parametar	ITM < 25 kg/m ² (n=26)	ITM ≥ 25 kg/m ² (n=47)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3,33 (3,1-4,6)	3,24 (2,63-4)	0,095
25(OH)D ₃ (ng/mL)	20,23 (15,9-26,74)	18,45 (15,76-23,83)	0,489
VDMR	5,26 (4,74-6,35)	5,71 (5,02-6,95)	0,140
7-DHC (μmol/L)	1,65 (1,43-2,11)	2,04 (1,08-3,00)	0,174
VDBP (μg/mL)	295,21 (211,49-334,28)	297,54 (252,89-347,77)	0,809

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene *Mann-Whitney U*-testom.

4.7 Ispitivanje razlika između parametara statusa vitamina D u odnosu na patološke karakteristike CRC, pol i ITM

Koncentracije 24,25(OH)₂D₃ i 25(OH)D₃ u serumu nisu se razlikovale kod pacijenata sa kancerom kolona u odnosu na pacijente sa kancerom rektuma, dok su koncentracije 7-dehidroholesterola bile značajno niže kod pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona. Sa druge strane, koncentracije VDBP su bile značajno više u serumu pacijenata sa kancerom rektuma u odnosu na pacijente sa kancerom kolona (tabela 53).

Tabela 53. Parametri statusa vitamina D kod pacijenata sa CA kolona i CA rektuma.

Parametar	CA kolona (n=23)	CA rektuma (n=49)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	2,96 (2,54-3,76)	3,15 (2,59-3,45)	0,833
25(OH)D ₃ (ng/mL)	16,05 (12,71-21,91)	15,83 (11,84-23,19)	0,918
VDMR	4,98 (4,51-6,03)	5,21 (4,55-6,66)	0,574
7-DHC (μmol/L)	1,32 (0,93-2,05)	1,07 (0,78-1,35)	0,046
VDBP (μg/mL)	230,35 (192,9-298,43)	289,91 (243,11-372,89)	0,048

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene Mann-Whitney U-testom.

Pacijenti sa CRC visokog gradusa imali su značajno niže koncentracije 25(OH)D₃ u serumu u odnosu na pacijente sa CRC niskog gradusa. Svi ostali parametri statusa vitamina D se nisu razlikovali u odnosu na gradus CRC (tabela 54).

Tabela 54. Parametri statusa vitamina D kod pacijenata sa gradusom I i gradusom II i III.

Parametar	Gradus I (n=25)	Gradus II i III (n=54)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3 (2,75-4,19)	2,89 (2,5-3,5)	0,126
25(OH)D ₃ (ng/mL)	18,3 (14,92-25,02)	14,92 (11,83-19,33)	0,022
VDMR	5,58 (4,69-6,8)	4,95 (4,47-5,86)	0,088
7-DHC (μmol/L)	1,25 (0,94-2,06)	1,31 (0,92-1,94)	0,950
VDBP (μg/mL)	266,52 (224,81-355,45)	266,94 (197,58-315,88)	0,337

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene Mann-Whitney U-testom.

Dodatna analiza parametara statusa vitamina D kod pacijenata sa različitim gradusom tumora (tabela 55) pokazala je da se javlja smanjenje koncentracija 25(OH)D₃

uporedo sa povećanjem gradusa tumora, i da se statistička značajnost postiže između I i II gradusa. Nasuprot tome, koncentracija 24,25(OH)₂D₃ je značajno veća kod ispitanika sa II gradusom tumora i slabije diferenciranim tumorima u poređenju sa pacijentima sa dobro diferenciranim tumorima.

Tabela 55. Parametri statusa vitamin D u odnosu na gradus kolorektalnog karcinoma

Parametar	Gradus I (n=25)	Gradus II (n=46)	Gradus III (n=6)	P
7-DHC (μmol/L)	1.25 (1.06-2.14)	1.23 (0.94-1.81)	0.79 (0.79-1.81)	0.563
25(OH)D ₃ (ng/mL)	19.66 (15.74-25.06)	14.77 (10.31-19.09) ^{a**}	14.27 (11.96-18.90)	<0.050
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3.11 (2.76-4.20)	3.18 (2.50-3.45) ^{a*}	2.93 (2.61-3.86)	<0.050
VDMR	5.68 (4.66-7.18)	4.78 (3.90-5.60)	4.74 (4.46-5.20)	0.143
VDBP (μg/mL)	266.94 (223.11-361.62)	260.13 (197.57-302.90)	306.51 (208.21-366.40)	0.380

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poređene *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U post hoc* testom. a – značajno različit od gradusa I ; *p<0.050; **p<0.01.

Koncentracija VDBP u serumu je bila niža kod pacijenata koji su se nalazili u C i D stadijumima bolesti u odnosu na pacijente u B stadijumu CRC. Svi ostali ispitivani parametri statusa vitamina D nisu se razlikovali u odnosu na stadijum CRC (tabela 56).

Tabela 56. Parametri statusa vitamina D kod pacijenata sa stadijumom A i B i stadijumom C i D.

Parametar	Stadijum A i B (n=47)	Stadijum C i D (n=33)	P
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	2,96 (2,56-3,74)	3,15 (2,52-3,57)	0,934
25(OH)D ₃ (ng/mL)	16,22 (10,63-20,39)	16,05 (12,98-23,77)	0,361
VDMR	4,97 (4,4-6,16)	5,37 (4,68-6,64)	0,209
7-DHC (μmol/L)	1,27 (0,96-2,23)	1,23 (0,79-2,05)	0,467
VDBP (μg/mL)	279,49 (228,75-361,62)	220,35 (180,66-306,94)	0,010

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poređene *Mann-Whitney U*-testom.

U grupi pacijenata sa CRC, koncentracije 7-DHC, 24,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ i VDMR nisu se razlikovale kod osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola, dok je masena koncentracija VDPB bila značajno viša kod osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola (tabela 57).

Tabela 57. Parametri statusa vitamina D kod pacijenata sa CRC ženskog i muškog pola

Parametar	Žene (n=24)	Muškarci (n=58)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3,10 (2,36-3,75)	2,96 (2,59-3,6)	0,625
25(OH)D ₃ (ng/mL)	14,92 (9,53-21,99)	16,44 (12,79-22,18)	0,294
VDMR	4,87 (3,89-5,87)	5,36 (4,55-6,44)	0,189
7-DHC (μmol/L)	1,43 (0,86-2,53)	1,24 (0,92-1,82)	0,364
VDBP (μg/mL)	223,54 (177,79-298,43)	267,37 (221,83-367,79)	0,039

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene *Mann-Whitney U*-testom.

Kod pacijenata sa CRC nije bilo razlike u koncentracijama 7-dehidroholesterolu, 24,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃, VDMR i VDBP kod pacijenata sa povišenom telesnom masom u odnosu na pacijente sa normalnom/sniženom telesnom masom (tabela 58).

Tabela 58. Parametri statusa vitamina D kod pacijenata sa CRC u odnosu na ITM.

Parametar	ITM < 25 kg/m ² (n=37)	ITM ≥ 25 kg/m ² (n=38)	p
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	3 (2,5-3,59)	3,12 (2,64-3,79)	0,362
25(OH)D ₃ (ng/mL)	15,67 (11,1-21,76)	17,04 (12,79-23,65)	0,203
VDMR	4,98 (4,42-5,7)	5,47 (4,72-6,92)	0,103
7-DHC (μmol/L)	1,15 (0,86-1,84)	1,31 (0,93-2,32)	0,633
VDBP (μg/mL)	273,75 (213,11-326,3)	251,83 (202,79-335,77)	0,563

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene *Mann-Whitney U*-testom.

4.8 Ispitivanje povezanosti između parametara metabolizma holesterola i statusa vitamina D

Kada je reč o lipidnim parametrima, u kontrolnoj grupi, zabeležena je pozitivna korelacija koncentracije TG sa 7-DHC. Od markera sinteze i apsorpcije holesterola kod zdravih osoba su korelirale koncentracije 7-DHC sa koncentracijama dezmosterola i latosterola, kao i koncentracije 25(OH)D3 i vrednost VDMR sa koncentracijama latosterola (tabela 59).

Tabela 59. Korelacije između parametara statusa vitamina D i osnovnih biohemijskih, lipidnih parametara, i markera sinteze i apsorpcije holesterola kod zdravih ispitanika.

Parametar	7-DHC ($\mu\text{mol/L}$)	24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	25(OH)D3 (ng/mL)	VDMR	VDBP ($\mu\text{g/mL}$)
UH (mmol/L)	0,177	0,125	0,135	0,060	0,144
	0,125	0,283	0,245	0,607	0,280
TG (mmol/L)	0,331	0,112	0,144	0,126	-0,109
	0,003	0,336	0,214	0,277	0,414
HDL-h (mmol/L)	-0,098	-0,061	-0,123	-0,089	0,000
	0,397	0,601	0,290	0,443	0,998
LDL-h (mmol/L)	0,198	0,169	0,209	0,097	0,192
	0,086	0,143	0,070	0,406	0,148
Dezmosterol ($\mu\text{mol/L}$)	0,365	-0,008	0,130	0,196	-0,176
	0,001	0,944	0,259	0,088	0,185
Latosterol ($\mu\text{mol/L}$)	0,359	0,163	0,277	0,235	-0,246
	0,002	0,178	0,020	0,050	0,079
Kampesterol ($\mu\text{mol/L}$)	0,032	0,016	-0,009	-0,051	0,015
	0,785	0,890	0,941	0,657	0,911
β -sitosterol ($\mu\text{mol/L}$)	-0,005	0,115	0,084	-0,010	-0,046
	0,967	0,321	0,466	0,933	0,729

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

Kod pacijenata sa CRC, utvrđene su značajne pozitivne korelacije između koncentracije UH i nivoa 7-DHC, 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3. Pored toga, uočena je značajna pozitivna korelacija između LDL-h i 7-DHC i 25(OH)D3. Takođe uočena je i pozitivna korelacija između koncentracija 24,25(OH)₂D3 i koncentracija kampesterola i β -sitosterola u serumu, kao i pozitivna korelacija ova dva markera apsorpcije holesterola sa koncentracijama 25(OH)D3. Dodatno koncentracije kampesterola u serumu su pozitivno korelirale i sa VDMR indeksom (tabela 60).

Tabela 60. Korelacije između parametara statusa vitamina D i osnovnih biohemijskih, lipidnih parametara, i markera sinteze i apsorpcije holesterola kod pacijenata sa CRC.

Parametar	24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	25(OH)D ₃ (ng/mL)	VDMR	7-DHC (μmol/L)	VDBP (μg/mL)
UH (mmol/L)	0,295 0,007	0,245 0,027	0,088 0,433	0,347 0,001	-0,042 0,742
TG (mmol/L)	-0,068 0,541	-0,003 0,975	0,012 0,915	0,130 0,244	-0,112 0,376
HDL-h (mmol/L)	0,174 0,119	0,154 0,166	0,109 0,329	0,114 0,308	0,100 0,431
LDL-h (mmol/L)	0,214 0,053	0,238 0,031	0,134 0,230	0,293 0,007	-0,125 0,327
Dezmosterol (μmol/L)	0,205 0,064	0,168 0,132	0,096 0,392	0,327 0,003	0,110 0,389
Latosterol (μmol/L)	0,067 0,588	0,153 0,215	0,091 0,466	0,234 0,057	0,022 0,877
Kampesterol (μmol/L)	0,326 0,003	0,394 0,001	0,257 0,021	0,051 0,656	0,131 0,305
β-sitosterol (μmol/L)	0,290 0,009	0,322 0,003	0,175 0,119	0,119 0,289	0,043 0,735

Rezultati su dobijeni Spearman korelacionom analizom.

Da bismo dalje istražili uočene asocijacije UH sa markerima statusa vitamina D, stratifikovali smo pacijente sa CRC prema srednjim vrednostima koncentracija UH. Rezultati poređenja markera statusa vitamina D između dve grupe pacijenata sa različitim nivoima UH prikazani su u tabeli 61.

Tabela 61. Promene u parametrima statusa vitamin D u odnosu na koncentraciju UH kod pacijenata sa CRC

Parametar	UH < 4.43 mmol/L	UH > 4.43 mmol/L	p
7-DHC (μmol/L)	1.08 (0.77-1.52)	1.47 (1.01-2.33)	0.014
25(OH)D ₃ (ng/mL)	15.67 (10.07-16.68)	17.23 (12.21-24.90)	0.020
24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	2.82 (2.44-3.44)	3.36 (2.69-3.93)	0.006
VDMR	4.94 (4.50-5.58)	4.98 (4.43-6.77)	0.636
VDBP (μg/mL)	263.11 (209.07-326.94)	269.06 (210.77-343.53)	0.741

Vrednosti su prikazane kao medijane (interkvartilni raspon) i poredene Mann-Whitney U-testom.

Uočeni su značajno veći nivoi 7-DHC, 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ u grupi pacijenata sa CRC koji su imali višu koncentraciju UH. Sa druge strane, vrednosti VDMR i VDBP nisu se značajno razlikovali između ove dve grupe.

4.9 Procena prediktivnog potencijala markera statusa vitamina D

Na kraju smo ispitali potencijal korišćenja ispitivanih metabolita vitamina D i VDBP u svojstvu biomarkera za predikciju CRC (tabela 62).

Tabela 62. Procena značaja parametara statusa vitamina D kao prediktora CRC.

<i>Univarijantna logistička regresija</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
7-DHC ($\mu\text{mol/L}$)	0.926	(0.762-1.124)	0.437
25(OH)D3 (ng/mL)	0.934	(0.892-0.979)	0.004
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	0.701	(0.514-0.956)	0.025
VDMR	0.769	(0.604-0.980)	0.034
VDBP ($\mu\text{g/mL}$)	0.997	(0.993-1.001)	0.115
<i>Multivarijantna logistička regressija</i>			
<i>Model 1</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
25(OH)D3 (ng/mL)	0.943	(0.893-0.996)	0.035
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	0.714	(0.498-1.025)	0.068
VDMR	0.837	(0.613-1.144)	0.264
<i>Model 2</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
25(OH)D3 (ng/mL)	0.967	(0.912-1.025)	0.263
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	0.807	(0.558-1.168)	0.256
VDMR	0.936	(0.669-1.310)	0.701

Model 1: korekcija je učinjena za godine, pol (m/ž) i ITM.

Model 2: korekcija je učinjena za godine, pol (m/ž), ITM i UH.

Univarijantna logistička regresija pokazala je da niski nivoi 25(OH)D3, 24,25(OH)₂D3 i VDMR imaju značajan potencijal za predviđanje prisustva CRC, dok je 25(OH)D3 zadržao svoj značaj nakon korekcije u odnosu na prisustvo tradicionalnih faktora rizika (starosti, muškog pola i ITM). Međutim, nakon uključivanja koncentracije

UH u Model 2, 25(OH)D3 je izgubio svoj prediktivni potencijal. S druge strane, koncentracija UH je prepoznata kao potencijalno značajan prediktor prisustva CRC u kombinaciji sa tradicionalnim faktorima rizika i 25(OH)D3 (OR: 0.417; CI: 0.267-0.650; $p < 0,001$), 24,25(OH)₂D3 (OR: 0.409; CI: 0.262-0.637; $p < 0,001$) i VDMR (OR: 0.404; CI: 0.259-0.629; $p < 0,001$) (tabela 62).

Slična analiza je izvršena da bi se istražio potencijal parametara statusa vitamina D u predviđanju gradusa tumora. Pacijenti su stratifikovani u dve grupe: ispitanici sa niskim gradusom tumora (I gradus) i ispitanici sa visokim gradusom tumora (II i III gradus) (tabela 63).

Tabela 63. Parametri statusa vitamina D u predikciji CRC visokog gradusa

<i>Univarijantna logistička regresija</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
7-DHC ($\mu\text{mol/L}$)	1.040	(0.811-1.334)	0.756
25(OH)D3 (ng/mL)	0.911	(0.845-0.983)	<0.05
24,25(OH) ₂ D3 (ng/mL)	0.548	(0.301-0.999)	0.050
VDMR	0.734	(0.527-1.023)	0.068
VDBP $\mu\text{g/mL}$	0.997	(0.992-1.002)	0.281
<i>Multivarijantna logistička regresija</i>			
<i>Model 1</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
25(OH)D3 (ng/mL)	0.895	(0.822-0.975)	<0.050
<i>Model 2</i>			
<i>Parametar</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI (OR)</i>	<i>p</i>
25(OH)D3 (ng/mL)	0.898	(0.823-0.979)	<0.050

Model 1: korekcija je učinjena za godine, pol (m/ž) i ITM.

Model 2: korekcija je učinjena za godine, pol (m/ž), ITM i UH.

Naši rezultati (tabela 63) su pokazali da je samo 25(OH)D3 bio značajan faktor rizika za razvoj karcinoma visokog gradusa. Za razliku od prethodne analize, uočena značajnost se zadržala nakon korekcije za starost, muški pol i ITM, a čak i nakon uključivanja UH u model.

5 Diskusija

Trenutni epidemiološki podaci govore o rastućoj incidenciji oboljevanja od CRC. Ovo oboljenje predstavlja aktuelni zdravstveni problem i aktivno polje naučnih istraživanja, usmerenih ka ispitivanju metaboličkih promena koje se javljaju u CRC, te traganju za novim biomarkerima koji bi olakšali rano otkrivanje, dijagnozu i praćenje terapije ovog oboljenja. Lipidi, kao veoma zastupljena i raznorodna klasa jedinjenja esencijalna za obavljanje mnogih ćelijskih procesa, su u novije vreme predmet istraživanja u različitim oboljenjima, među njima i u CRC [195,196]. Povećana ekspresija enzima uključenih u metabolizam lipida je primećena kod mnogih karcinoma [197] i zapaženo je da korelira sa ozbiljnošću bolesti, rizikom za pojavu relapsa i rekurentnih maligniteta, kao i niskom stopom preživljavanja [198]. Danas se veliki broj studija bavi analiziranjem lipidnih profila u ćelijskim modelima kancera. Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale da hiperholesterolemija kao i ishrana bogata mastima i holesterolom mogu uticati na razvoj kancera. Poznato je da *de novo* sintetisan holesterol, ali i holesterol egzogenog porekla mogu direktno da aktiviraju onkogene i malignu transformaciju. Holesterol je i ključna komponenta ćelijskih membrana i lipidnih splavova, struktura koje imaju značajnu ulogu u razvoju kancera [131]. Pored toga on predstavlja prekursor steroidnih i ostalih biološki značajnih jedinjenja i igra ulogu u transmembranskom transportu i mnogim signalnim putevima [199]. Dodatno, pretpostavlja se da je metabolizam holesterola izmenjen u kancerskim ćelijama [200]. Povišene koncentracije holesterola unutar ćelije mogu za posledicu imati veoma ozbiljne poremećaje na nivou funkcionisanja ćelije i biti uzrok mnogih oboljenja [201]. Iz svega navedenog, metabolizam holesterola, njegova količina u ćeliji i distribucija među ćelijama, su izuzetno precizno regulisani zahvaljujući nizu veoma kompleksnih mehanizama.

Do sada je bilo mnogo pokušaja da se na što precizniji način prate procesi metabolizma holesterola i kvantifikuje njihova efikasnost, a rezultati su pokazali da je najpogodnije određivati koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu. Određivanje NHS u serumu može pružiti značajne informacije o funkcionisanju procesa biosinteze i apsorpcije holesterola, ali i o metaboličkim putevima koji su povezani sa ovim procesima. Koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu se najčešće izražavaju kao apsolutne i relativne vrednosti [201], međutim stavovi o načinu prikazivanja rezultata analize NHS i dalje su oprečni. Neke studije su pokazale da je u cilju praćenja

efekata terapije statinima korisnije posmatrati apsolutne koncentracije markera [202], ali i da su ove vrednosti manje podložne uticaju ishrane bogate biljnim sterolima [203]. Uprkos njihovom nesumnjivo velikom kliničkom potencijalu [204, 205], zapaženo je da postoji značajna varijabilnost u gotovo svim analitičkim aspektima kada je u pitanju određivanje ovih parametara [206]. Metodološke razlike u velikoj meri doprinose ukupnim varijacijama u koncentracijama NHS, čime se umanjuje mogućnost za sprovođenje opsežnih meta-analiza, te izvođenje validnih kliničkih zaključaka o korisnosti ovih biomarkera. Kako je već napomenuto, značajan napredak u razvoju analitičkih tehnologija uslovio je ekspanziju novih bazičnih naučnih disciplina, te neminovnost njihove translacije ka primenjenim naučnim oblastima. Takvu sudbinu deli i masena spektrometrija, odnosno *omike* koje su na njoj bazirane. Lipidomika, metabolomika, proteomika i genomika, kao što je već napomenuto svakodnevno nalaze sve veću primenu u medicinskoj dijagnostici. Međutim, transfer tehnologija iz naučno-istraživačkih laboratorija u kliničku praksu, prati i stalna potreba za validacijom, standardizacijom i harmonizacijom. Dias i saradnici posebno ukazuju na potrebu za validacijom preanalitičkih, analitičkih i post analitičkih varijacija i sveobuhvatnom standardizacijom metoda za analizu metabolomičkih biomarkera u kliničkoj laboratorijskoj praksi [120]. Pored toga, zaključci prvog međunarodnog istraživanja koje je pokušalo da sagleda obim varijabilnosti rezultata prilikom određivanja NHS hromatografskim metodama pokazali su da postoje „iznenađujuće visoke varijacije u koncentracijama holesterola i NHS koje su dobijene upotrebom analitičkih testova zasnovanih na hromatografskom razdvajanju“ između različitih laboratorija, te da postoji potreba za harmonizacijom analiza holesterola i NHS u serumu i plazmi [117].

Tokom razvoja i optimizacije metode izvršili smo preliminarnu validaciju u vidu procene rezultata *recovery* studija, i dobili smo nezadovoljavajuće rezultate za latosterol, kampesterol i β -sitosterol. Smatra se da neadekvatni rezultati *recovery* studija mogu da se pripišu neadekvatnom postupku ekstrakcije, ili značajnom efektu matriksa. Iako upotreba internog standarda prilikom konstruisanja kalibracione krive služi kako bi se korigovao gubitak usled procesa ekstrakcije, kao i promena u efikasnosti jonizacije, u većini slučajeva je potrebno dodatno proceniti efekat matriksa na jonizaciju. Huang i saradnici predlažu da se procena efekta matriksa uradi u kombinaciji sa *recovery* studijom kako bi se ispitala ukupna efikasnost procesa [122]. Prema smernicama FDA za validaciju bioanalitičkih metoda, kriterijumi prihvatljivosti za prinos analita nisu precizno definisani, već je

neophodno da on bude „dosledan, precizan i ponovljiv“ [194]. Prema tome, Huang i saradnici navode da prinos ekstrakcije, zajedno sa apsolutnim efektom matriksa, treba odrediti, čak i u slučajevima kada sama validacija nije obavezna [122]. U našem slučaju, *recovery* studija je pokazala problematičan prinos iz uzorka za latosterol, kampesterol i β -sitosterol. Dobijene visoke vrednosti prinosa bile su u saglasnosti sa prethodno primećenim povećanjem jonizacije, što ukazuje da problem nije bio uzrokovan samom procedurom ekstrakcije.

Poznato je da na metode zasnovane na masenoj spektrometriji često može uticati specifična interferencija usled promenljive efikasnosti jonizacije, koja je uslovljena različitim faktorima, uključujući karakteristike mobilne faze ili sastav i svojstva uzorka [122]. Pre svega, značajan analitički problem može predstavljati odabir odgovarajuće slepe probe za analizu endogenih jedinjenja. Slepu probu u širem smislu, kod metoda baziranim na masenoj spektrometriji predstavlja uzorak bez prisutnih ispitivanih analita, pripremljen na isti način kao i realan uzorak i rastvoren u istom rastvaraču i/ili mobilnoj fazi [207]. Odabir odgovarajućeg analitičkog matriksa je posebno zahtevan zadatak za osetljive metode kao što je LC-MS, gde instrument može detektovati širok raspon nepoznatih metabolita sa sličnom strukturom i time uzrokovati nezadovoljavajuće analitičke rezultate. Tako, na primer, izobarna jedinjenja često predstavljaju epimere i izomere, kao i još neotkrivene metabolite, što predstavlja veliki izazov za ciljanu analizu biomarkera [208]. Neki autori predlažu različite načine uklanjanja analita iz bioloških uzoraka, ali su ti postupci često zametni i uzrokuju dodatne troškove. Postoji mnoštvo komercijalno dostupnih kalibracionih materijala koji odgovaraju matriksu, ali sertifikovani serumski koji ne sadrže ispitivani analit su često dostupni samo za analite koji su već primenjeni u rutinskoj kliničkoj laboratorijskoj praksi, kao što su vitamin D, hormoni itd. Nasuprot njima, manje uobičajene analize i dalje ostaju bez adekvatnog kalibracionog materijala. Metoda dodavanja standarda u uzorak je ponekad zadovoljavajuća alternativa ukoliko je nedostupan kalibracioni materijal bez analita [209]. Međutim, ni ovaj princip nije idealno rešenje zbog kasnije niže osetljivosti, uzrokovane prisustvom ispitivanog analita u matriksu. Pored toga, pošto je kalibracija potrebna za svaki uzorak, ovaj pristup je praktično neprimenjiv za veliki broj rutinskih uzoraka sa širokim opsegom koncentracija.

Oba ova pristupa, metoda kalibracije sa podudarnim matriksom i metoda standardnog dodatka, uzrokuju gubitak osetljivosti [209]. Iako se čini da se efekti matriksa ne mogu u potpunosti izbeći tokom LC-MS analize, postoji stalna potreba za razvojem

optimalnih analitičkih uslova koji bi osigurali pouzdanu kvantifikaciju. Imajući sve ovo u vidu, mi smo odlučili da koristimo *in-house* pripremljen surogat matriks, koji sadrži jedinjenja koja su u značajnoj količini prisutna u humanom serumu. Na ovaj način bi mogli da se zadovolje analitički zahtevi za pouzdanom kvantifikacijom NHS u serumu i HDL serumskoj frakciji i obezbede validni rezultati koji bi se mogli koristiti u kliničkim studijama. Odlučili smo se za testiranje holesterola, smeše proteina i holesterola, i proteina. Ovakav pristup je motivisan činjenicom da holesterol predstavlja dominantan sterol u humanoj plazmi. Naime, koncentracija holesterola je do 1000 puta veća u serumu u odnosu na NHS. Ovo predstavlja izazov za hromatografsko razdvajanje ciljnih NHS, ali može biti i prepreka za optimalnu kvantifikaciju [210]. Pored holesterola, smatrali smo da eventualni ostaci nakon precipitacije proteina mogu biti potencijalni uzrok neadekvatne jonizacije, s obzirom da prisustvo velikih molekula u okruženju u kome se nalazi ispitivani analit može izazvati interferencije na nivou jonizacije. Iz tog razloga smo, tokom razvoja naše metode, ispitivali BSA kao mogući surogat matriks. Osim toga, poznato je da se BSA često koristi kao surogat matriks za imunohemijske analize, a neki autori su ga koristili čak i za LC-MS metode [211]. Rezultati naše uporedne analize surogat matriksa (tabela 6) su pokazali da BSA nije poboljšao prinos kada se koristio kao zamena za matriks, dok bi smeša BSA + CHL mogla biti korišćena u tu svrhu. Sa druge strane, nesumnjivo je da je metanolni rastvor holesterola, kada se koristio kao surogat matriks, obezbedio značajno poboljšanje prinosa latosterola, kampesterola i β -sitosterola. Na kraju, CHL je i izabran u odnosu na BSA + CHL smešu zbog toga što holesterol prisutan u lipidnom ekstraktu bez sumnje dominantno doprinosi efektu matriksa. Dodatno, metanolni rastvor CHL je po svom sastavu manje kompleksan u odnosu na BSA + CHL smešu, te je u manjoj meri moguća retencija nečistoća u koloni i aparatu. Sledeći korak je bio prilagođavanje optimalne koncentracije CHL koja bi se koristila za kvantifikaciju naših uzoraka. Iz tog razloga, pripremili smo višestruka razblaženja metanolnog rastvora holesterola, da bismo obuhvatili kako fiziološke, tako i patološke koncentracije koje se očekuju u humanom serumu. Optimalni rezultati su postignuti sa rastvorom koncentracije 5 mmol/L CHL kada je u pitanju bila analiza NHS u serumu. Pošto je holesterol daleko manje zastupljen u HDL frakciji, koncentracija holesterola za konstrukciju kalibracione krive je optimizovana na 2,5 mmol/L (tabela 7). Kao što je dokazano ranijim istraživanjima i visok odnos koncentracije holesterola i sterola predstavlja specifičnu interferenciju u analizi sterola i oksisterola. Kvantifikacija latosterola, kampesterola i β -sitosterola, čiji su pikovi na hromatogramu (slika 24) u neposrednoj blizini holesterola, bila je pod velikim uticajem

holesterola, dok su desmosterol i 7-DHC bili lišeni ovog efekta zahvaljujući optimalnom trajanju analize, odnosno adekvatnim hromatografskim uslovima koji su omogućili potpuno eluiranje holesterola sa kolone. U ovoj studiji potvrdili smo da postoji efekat matriksa tokom analiziranja NHS i da je uzrokovan prisustvom i koncentracijom holesterola. U skladu s tim, ovaj je problem potrebno rešiti prilikom izrade kalibracionih krivih, tako što će se kalibracioni matriks prilagoditi očekivanim koncentracijama holesterola u analiziranim uzorcima. Poznato je da razdvajanje nekih pikova NHS od dominantnog pika holesterola može predstavljati veliki izazov. Slično hromatografsko ponašanje uočeno između holesterola i latosterola (slika 23) je posledica malih razlika u strukturi. Ovi analiti predstavljaju izobarske pikove i njihovi molekularni joni imaju isti odnos mase i naelektrisanja od 369 m/z (tabela 2). Kampesterol i β -sitosterol se pojavljuju prilikom hromatografskog eluiranja nakon holesterola (slika 24), te oba trpe interferenciju signala od strane dominantnog holesterola. Na kraju, odlučili smo se za izradu dve kalibracione krive - jedne za kvantifikaciju analita na koje ne utiče holesterol, i druge za analite u čijem određivanju interferira holesterol.

Različite analitičke i istraživačke potrebe, raznovrsnost raspoloživih tehnika pripreme uzoraka, različite metode i uslovi hromatografskih razdvajanja, kao i nedostatak referentnih analitičkih metoda i materijala, mogu dovesti do konstantne neusklađenosti između rezultata dobijenih u različitim laboratorijama. Trenutno, jedina raspoloživa metoda provere za većinu laboratorija je interna validacija analitičkih protokola i doslednost u njihovoj primeni [115]. Naša metoda je u potpunosti validirana u skladu sa trenutnim FDA bioanalitičkim smernicama [194]. Svi parametri validacije postigli su zadovoljavajuće vrednosti za određivanje koncentracija NHS u HDL frakciji i serumu (tabele 8, 9 i 10).

U ovom istraživanju ispitivan je metodološki aspekt kvantifikacije pomenutih NHS u HDL frakciji seruma, te optimizovan analitički protokol za obe analize prema smernicama FDA. Metoda je verifikovana u realnim uzorcima seruma dobijenim od zdravih ispitanika, a prosečne koncentracije NHS su određene u serumu i serumskoj HDL frakciji (tabela 7). Naša hipoteza je da određivanje NHS u HDL frakciji može pružiti informacije o efluksu holesterola iz ekstrahepatičnih ćelija i enterocita. Iako postoje metode koje se bave efluksom holesterola i sterola i koje se zasnivaju na radioaktivnom obeležavanju holesterola i NHS [111], i *in vitro* eksperimentima [212], nastojali smo da razvijemo metodu koja bi bila praktičnija u smislu primene u kliničkim studijama, a koja bi

mogla da pruži dodatne informacije o interakciji između sinteze i apsorpcije holesterola i metabolizma lipoproteina. Vang i saradnici su uočili da ABCG1 i ABCG4 transporteri promovišu ćelijski efluks holesterola i drugih sterola, kao i da pokazuju ćelijsku i tkivnu specifičnost. Ustanovljeno je da ABCG1 i ABCG4 transporteri promovišu efluks holesterola, dezmosterola, a najverovatnije i drugih prekursora biosinteze holesterola na HDL česticu u mozgu [213]. Karuna i sar. su koristili sličnu metodologiju za procenu koncentracija 27-hidroksiholesterola (27-OHC) u HDL frakciji seruma [214]. Iz svega navedenog se nameće pretpostavka da bi ovaj pristup mogao da pruži detaljnije informacije o metabolizmu HDL, te da su dalja ispitivanja u tom pravcu i klinička evaluacija ove metodologije potrebni.

Nakon uspešnog uspostavljanja i validacije metoda za određivanje markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i u serumskoj HDL frakciji, pristupili smo analizi ovih parametara u grupi zdravih ispitanika i kod pacijenata sa CRC. Iako su NHS prepoznati kao klinički korisni biomarkeri homeostaze holesterola u velikom broju studija koje su se bavile prvenstveno kardiovaskularnim bolestima [201-204], ograničen je broj studija koje su analizirale i evaluirale ove markere u malignim bolestima.

Kod ispitivanih pacijenata smo najpre analizirali koncentracije tradicionalnih biohemijskih parametara i primetili smo značajnu razliku u koncentracijama UH, HDL-h i LDL-h, u odnosu na zdravu populaciju. Svi pomenuti parametri su bili niži kod pacijenata u odnosu na kontrole (tabela 14). Razlike u nivoima TG u serumu nije bilo. Prisustvo generalizovane hipoholesterolemije kod ovih pacijenata ukazalo je na moguće postojanje poremećaja metabolizma holesterola, te smo se dalje fokusirali na ispitivanje efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije. Naše istraživanje je pokazalo da postoje statistički značajne razlike između pacijenata sa dijagnostikovanim CRC i zdravih ispitanika kada su u pitanju koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola (slika 26). Apsolutne i relativne serumske koncentracije markera sinteze značajno su bile snižene kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (slika 26). Iako se hiperholesterolemija dovodi u vezu sa povećanim rizikom za nastanak CRC [39], postoje značajna odstupanja u opservacijama veze između ova dva stanja. Naime, pretpostavlja se i da se hipoholesterolemija javlja kao subklinički simptom pojave CRC [127]. U svakom slučaju, izvesno je da se, kada je u pitanju veza između koncentracije lipida u serumu i nastanka CRC, u osnovi nalazi složen metabolički mehanizam [73]. Kao što smo već pomenuli, sinteza holesterola se odvija u svim tkivima budući da sve ćelije zahtevaju prisustvo holesterola kako bi normalno funkcionisale. Sve

ćelije sadrže određenu količinu konstitutivnog holesterola, prisutnog u ćelijskim membranama, ali i aktivnog, slobodnog holesterola koji unutar ćelije funkcioniše kao signalni molekul [140]. Zahtevi pojedinačnih tkiva zavise od njihovih potreba, kako za aktivnim tako i konstitutivnim holesterolom. Odnos između ova dva pula holesterola je dinamičan i razlikuje se u odnosu na vrstu tkiva [215]. U skladu sa tim, snižene koncentracije markera sinteze holesterola, odnosno prekursora holesterola u cirkulaciji pacijenata sa CRC, uočene u našoj studiji, mogu da ukazuju na njegovo povećano iskorišćavanje unutar same maligne ćelije, usled povećanih potreba za sintezom holesterola. Pored toga, primećeno je i značajno sniženje apsolutnih (slika 26) i relativnih koncentracija markera apsorpcije (tabela 15) holesterola u serumu pacijenata sa CRC, što dodatno potvrđuje našu hipotezu. Naime, moguće je da su svi raspoloživi izvori holesterola u stanju maligne proliferacije angažovani i dostupni rastućem tkivu kancera u cilju održavanja njegove proliferacije. Dodatno, naši rezultati upućuju na to da je regulatorni mehanizam homeostaze holesterola u ovoj bolesti u velikoj meri disfunkcionalan i usmeren ka podsticanju maligne transformacije. Smatramo da je u osnovi ovog procesa mehanizam održavanja tkiva koja poseduju povećane potrebe za holesterolom. Poznato je naime, da se sličan mehanizam odvija i prilikom fetalnog razvoja, kada osim endogene sinteze holesterola u ćelijama novorođenčeta, paralelno dolazi i do povećane apsorpcije maternalnih zaliha holesterola kako bi se odvijao nesmetan razvoj ploda. Naime, u periodu gestacije zapaženi su različiti obrasci distribucije holesterola. Zaključak ovih studija je da plod koristi sav dostupan holesterol tokom razvoja kako bi ostao vitalan. U slučaju snižene endogene sinteze od strane ploda, povećano je preuzimanje maternalnog holesterola kroz placentu, dok je u slučaju hipoholesterolemije kod majke u ranoj trudnoći sinteza holesterola kod fetusa povećana [216]. Kod samih trudnica sreću se normalna, povišena i snižena koncentracija holesterola, dok je kod ploda nivo holesterola uslovljen aktuelnim potrebama i sposobnošću njegove sinteze. Ovaj podatak govori o novouspostavljenoj homeostazi holesterola između organizma majke i ploda. Naime, pretpostavka je da se homeostaza holesterola u organizmu majke narušava kako bi se obezbedile potrebe fetusa za holesterolom. Analogno tome, naši rezultati sugerišu da bi se prethodno opisani model mogao ekstrapolirati na odnos organizma pacijenta i visokoproliferativnog kancerskog tkiva, što bi svakako trebalo proveriti u daljim istraživanjima.

Istraživanjem odnosa između markera sinteze i apsorpcije holesterola moguće je proceniti nivo očuvanosti homeostaze holesterola. Kod zdravih osoba, analiza korelacija

između markera sinteze i markera apsorpcije holesterola, dovela je do zaključka da je u ovoj ispitivanoj grupi očuvana homeostaza holesterola (tabela 44). Na ovaj zaključak upućuju uočene korelacije između apsolutnih i relativnih koncentracija markera sinteze sa apsolutnim i relativnim koncentracijama markera apsorpcije (tabela 44). Naime, zapažena je negativna korelacija između relativnih koncentracija dezmosterola i latosterola i apsolutnih i relativnih koncentracija kampesterola i β -sitosterola (tabela 44). Apsolutne koncentracije markera sinteze nisu bile u značajnoj korelaciji sa apsolutnim koncentracijama markera apsorpcije, ali je primetan trend obrnute korelacije između ovih parametara (tabela 44). Ovi podaci upućuju na to da se kod zdravih osoba sa povećanom sintezom javlja snižena apsorpcija i obrnuto, te se da zaključiti da je homeostaza holesterola očuvana. O značaju održavanja homeostaze holesterola za očuvanje optimalnog zdravstvenog stanja svedoče brojne studije [86, 204]. Poremećaji homeostaze holesterola se dovode u vezu sa razvojem gojaznosti, ateroskleroze, metaboličkog sindroma, *Diabetes mellitus*, te kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja [193].

U slučaju pacijenata sa CRC, zapažena je pozitivna korelacija između apsolutnih koncentracija dezmosterola i β -sitosterola, i negativna korelacija između relativnih vrednosti latosterola i kampesterola, i latosterola i β -sitosterola, dok su ostale asocijacije bile granične ili bez značajnosti (tabela 45). Dodatno, analizirali smo i međusobni odnos samih markera sinteze, dezmosterola i latosterola i primetili da je on snižen kod pacijenata u odnosu na kontrole (tabela 16). Iz svega navedenog se može pretpostaviti da se kod pacijenata sa CRC javlja disparitet u cirkulišućim koncentracijama markera sinteze. Čini se da koncentracije dezmosterola i latosterola u serumu pacijenata pokazuju promene u efikasnosti dva sintetska puta. Kao što smo već pomenuli, latosterol nastaje u *Kandutsch-Russelovom* biosintetskom putu [75], dok dezmosterol nastaje uzastopnim reakcijama *Blochovog* puta [74]. Dosadašnje studije su pokazale da je dominacija jednog od ova dva puta tkivno specifična, te da u jednoj vrsti tkiva dominira produkcija holesterola od lanosterola preko *Blochovog* puta, a u drugoj preko *Kandutsch-Russelovog* puta. Tako je na primer, studija Mitsche i saradnika koja se bavila određivanjem procentualnog fluksa pokazala da sinteza holesterola preko *Blochovog* biosintetskog puta varira od 8 do 97% između različitih ćelija tkiva testisa [73]. Mitsche i saradnici su istraživali i druga tkiva i došli do rezultata koji govore da je *Blochov* put dominantan u tkivima koja su bogata holesterolom, dok kod tkiva poput kože dominira modifikovani *Kandutsch-Russelov* put sinteze holesterola [73]. Iako je broj studija koje se bave proučavanjem međusobnog udela

ova dva puta holesterola nedovoljan, postoje podaci da se i prilikom progrediranja patoloških stanja ovi odnosi menjaju. Tako je na primer zanimljiv podatak da u slučaju bolesti nealkoholne masne jetre (*engl. non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) dominiraju povišene koncentracije latosterola u serumu, dok progresijom ovog oboljenja do steatohepatitisa (*engl. non-alcoholic steatohepatitis, NASH*) dolazi do promene, te koncentracije dezmosterola postaju dominantne. Objašnjenja za ovu pojavu su hipotetička i različita. Smatra se da do ove promene dolazi usled inaktivacije enzima 24-dehidroholesterol reduktaze (*engl. 24-dehydrocholesterol reductase, DHCR24*) kod NASH koji usmerava biosintezu holesterola na *Blochov* put. Druga pretpostavka je da se usled različite distribucije ova dva prekursora u različitim vrstama ćelija jetre, tokom progresivne degradacije tkiva i promena u njegovom ćelijskom sastavu, menja i profil markera sinteze u cirkulaciji [217]. Dodatno, pretpostavlja se da se u nekim tkivima deo prekursora sinteze holesterola preusmerava, umesto na sintezu holesterola, na sintezu drugih biološki aktivnih jedinjenja [73]. Ovi podaci upućuju na zaključak da prisustvo ova dva sintetska puta omogućava ćelijama da produkuju širi dijapazon jedinjenja iz zajedničkog prekursora koja poseduju različite biološke funkcije, povećavajući time efikasnost samog metabolizma [73].

Osim toga, poznato je da i mnoga jedinjenja u biosintetskom putu holesterola ispoljavaju biološke funkcije. Tako je na primer dokazano da lanosterol utiče na funkciju očnog sočiva, te da se kod pojedinaca sa mutacijama gena za lanosterol-sintazu javlja kongenitalna katarakta [218]. Dezmosterol, pored toga što reguliše metabolizam holesterola vezivanjem za SREBP, predstavlja endogeni ligand za LXR receptor [219]. Naime, regulisana akumulacija dezmosterola leži u osnovi mnogih mehanizama, poput aktivacije LXR ciljnih gena, inhibicije SREBP ciljnih gena, selektivnog reprogramiranja metabolizma masnih kiselina i supresije gena odgovornih za inflamatorni odgovor prisutnih u penastim ćelijama [220, 221]. Zanimljivo je da se ovo nagomilavanje dezmosterola dešava u makrofagama bogatim lipidima, u kojima bi sinteza holesterola trebalo da bude inhibirana mehanizmom povratne sprege. Takođe, primećeno je da se povišena sinteza dezmosterola kroz *Blochov* put manifestuje supresijom proinflamatornog fenotipa. Na taj način dezmosterol ostvaruje anti-inflamatorno dejstvo i štiti zidove krvnih sudova. Pored toga, pokazano je da se dezmosterol akumulira u ćelijama tumora nervnog tkiva [222], kao i da se nalazi u povišenim koncentracijama u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od malignih glioma [223]. Na osnovu naših rezultata, možemo

pretpostaviti da relativna dominacija cirkulišućeg latosterola u odnosu na dezmosterol kod pacijenata sa CRC, može ukazati na postojanje intenzivne sinteze holesterola u ćelijama tumora posredstvom *Kandutsch-Russellovog* biosintetskog puta. Moguće je takođe da se u uslovima maligne transformacije dezmosterol kao jedinjenje sa višestrukim funkcijama preusmeravana na supresiju proinflamatornih signala. Ovu hipotezu je svakako potrebno dodatno potvrditi daljim studijama i istražiti funkcije dezmosterola kod ovih pacijenata.

Pored analize ukupnih markera sinteze i apsorpcije holesterola, pristupili smo i analizi NHS u HDL frakciji, kako bismo pokušali da bliže definišemo primećene promene u metabolizmu holesterola. Naime, iako su procesi sinteze i apsorpcije ključni za održavanje homeostaze holesterola, veliki značaj u ovoj regulaciji imaju i lipoproteinske čestice. Dosadašnje studije su pokazale da se tokom kancerogeneze najčešće dešavaju promene u koncentracijama HDL-h [224]. Naše istraživanje je pokazalo da su koncentracije HDL-h kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike snižene (tabela 14), kao i apsolutne koncentracije svih ispitivanih NHS u HDL frakciji (slika 27). Ovaj rezultat je očekivan, s obzirom na to da su i Ketomaki i saradnici pokazali da promene koncentracija NHS u lipoproteinima prate promene njihovih koncentracija u serumu [225]. Korelaciona analiza između apsolutnih koncentracija markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji je pokazala da postoji pozitivna korelacija između koncentracija dezmosterola i markera apsorpcije u HDL frakciji kod zdravih ispitanika (tabela 44). Sa druge strane, kod pacijenata sa CRC su oba markera sinteze korelirala pozitivno sa oba markera apsorpcije u HDL frakciji (tabela 45). Efluks prekursora sinteze holesterola na HDL česticu iz perifernih tkiva je mehanizam koji postaje predmet istraživanja. Pretpostavlja se da je uzrok ovog efluksa najviše zaštita ćelije od citotoksičnog efekta prekursora sinteze holesterola. Naime, poznato je da prekomerna količina lanosterola u ćelijama izaziva citotoksičnost [212]. Tako, povećano prisustvo različitih prekursora holesterola u ćeliji, uzrokovano inhibicijom enzima distalnih reakcija biosinteze holesterola, dovodi do pojave različitih urođenih malformacija [226]. Stoga, za ćeliju je ključan mehanizam sprečavanja nagomilavanja prekursora holesterola. Pokazano je da se nakon biosinteze u endoplazmatskom retikulumu, značajne količine prekursorskih sterola transportuju do plazma membrane [227, 228]. Oni potom bivaju vraćeni u endoplazmatski retikulum (retrogradnim transportom pomoću lipidnih splavova, ili specifičnih transportera za NHS (*StAR*, engl. *steroidogenic acute regulatory protein*)), gde se demetiluju i konvertuju u holesterol [227]. Uprkos tome, HDL sadrži detektabilnu količinu različitih

prekursora sinteze holesterola. Poznato je da se iz ekstrahepatičnih tkiva dezmosterol i latosterol transportuju na HDL čestice, dok se prekursori holesterola sintetisanog u jetri transportuju LDL česticama [212]. Yamauchi i saradnici su pokazali [212] da ABCA1 poseduje veći afinitet prema holesterolu koji je sintetisan u ćeliji, u odnosu na holesterol koji se do ćelije doprema posredstvom LDL.

Iz svega navedenog, izvodi se pretpostavka da je poremećaj lipidnog profila kod pacijenata sa CRC uzrokovan pre svega povećanim potrebama malignih ćelija za holesterolom. Iz tog razloga imamo snižene vrednosti UH u serumu (tabela 14). Takođe, koncentracije HDL-h kao i koncentracije albumina su snižene kod pacijenata sa CRC (tabela 14), moguće, usled snižene sintetske funkcije jetre kod ovih pacijenata. Naime, usled smanjene sintetske funkcije jetre, javlja se smanjena produkcija mnogih proteina, pa i ApoAI, koji čini glavnu proteinsku komponentu HDL čestice [224]. Uprkos tome što je koncentracija HDL-h niža kod pacijenata, uočeno je da je udeo svakog pojedinačnog NHS u HDL česticama u odnosu na ukupne koncentracije pojedinačnih HNS u serumu veći kod pacijenata u odnosu na kontrole (tabela 16). Ovaj rezultat može ukazati na to da su, uprkos tome što su nivoi HDL-h kao i koncentracije NHS u HDL frakciji sniženi kod pacijenata, prisutne HDL čestice bogatije NHS kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike. Pretpostavljamo da su kod zdravih osoba udeli prekursora sinteze u HDL čestici u odnosu na ukupne koncentracije prekursora sinteze u cirkulaciji niži kada se porede sa pacijentima sa CRC (tabela 16), jer se kod pacijenta u većoj meri prekursori holesterola distribuiraju u HDL čestice iz perifernih tkiva. S obzirom na to da su i udeli markera apsorpcije u HDL frakciji u odnosu na njihovu koncentraciju u serumu viši kod pacijenata sa CRC (tabela 16), moguće je da se kod pacijenata javlja i povišena apsorpcija holesterola i fitosterola posredstvom HDL čestica. Naša pretpostavka je da opisani mehanizam uzrokuje mobilizaciju holesterola iz svih dostupnih izvora, ali i njegovo usmeravanje ka malignim ćelijama. Naime, poznato je da ćelije kancera ekspimiraju SR-B1 receptore na svojoj površini koji omogućavaju vezivanje HDL čestice i preuzimanje holesterola iz HDL čestice u maligne ćelije [157]. Ovim mehanizmom ćelije kancera preuzimaju apsorbovani holesterol iz HDL čestica. Sve navedeno može ukazati na to da se snižene koncentracije holesterola u serumu, javljaju usled povećanog preuzimanja holesterola iz cirkulacije od strane maligne ćelije. Organizam na ove niske koncentracije holesterola u cirkulaciji odgovara aktiviranjem negativne povratne sprege [229], te dolazi do povišene sinteze holesterola u svim perifernim tkivima, kao i povećane apsorpcije holesterola u

enterocitima. Povećana sinteza holesterola u perifernim tkivima uzrokuje povećan efluks prekursora sinteze holesterola na HDL, dok povećana apsorpcija holesterola uzrokuje takođe povećan efluks fitosterola na HDL čestice.

Kako bismo produbili naše hipoteze o statusu homeostaze holesterola kod obolelih od CRC, analizirali smo biomarkere homeostaze holesterola u odnosu na patološke karakteristike CRC. Ustanovili smo da je zbirni indeks sinteze u HDL frakciji (slika 41), kao i odnos zbirnih koncentracija markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu (tabela 31) viši kod pacijenata obolelih od karcinoma kolona. Iz dobijenih razlika se može pretpostaviti da je proces sinteze holesterola intenzivniji kod pacijenata sa kancerom kolona u odnosu na pacijente sa kancerom rektuma. Dosadašnje studije su pokazale da između ova dva patološka stanja postoje značajne razlike, kako u invazivnosti kancera tako i u obrascima metastaziranja, što uslovljava različite pristupe lečenju i prognoze ishoda. Poznato je da se tkiva kolona i rektuma međusobno razlikuju anatomske, morfološke i etiološke [231]. Smatra se da bi bolje razumevanje fundamentalnih razlika između kancera kolona i rektuma, moglo da poboljša dijagnostičku tačnost, lečenje i negu pacijenata. U tom smislu, i dalja istraživanja metaboličkih razlika između ove dve vrste tkiva su neophodna.

Takođe, nakon podele pacijenata prema stepenu diferencijacije ćelija kancera na dve grupe (pacijente sa dobro diferenciranim ćelijama kancera - gradus I; te pacijente sa slabo diferenciranim ćelijama kancera - gradus II i III), dobili smo značajne razlike u vrednostima odnosa koncentracija dezmosterola i latosterola u HDL frakciji (tabela 34). Kod pacijenata sa kancerom višeg gradusa ovaj odnos je bio niži (tabela 34). Studija Rodriguez i saradnika je pokazala da dezmosterol može u potpunosti zameniti holesterol u procesima ćelijske diferencijacije i održavanja vijabilnosti ćelija. Autori smatraju da efekti dezmosterola na SREBP i LXR signalne puteve mogu biti ključni za održavanje homeostaze lipida u ćelijama i tkivima sa visokim koncentracijama dezmosterola, poput spermatozoida, astrocita i mozdanog tkiva u razvoju [232]. Naša je pretpostavka da odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u HDL frakciji oslikava zastupljenost različitih puteva sinteze holesterola u perifernim tkivima. Pošto je moguće da u slučaju CRC, maligne ćelije u većoj meri preuzimaju holesterol iz HDL čestica, te se u većoj meri vrši i efluks prekursora sinteze holesterola sa ovih ćelija na HDL čestice, možemo postaviti hipotezu da odnos koncentracija dezmosterola i latosterola na HDL čestici oslikava stanje u malignim ćelijama. Kako je naša studija već pokazala da je odnos koncentracija

dezmosterola i latosterola u HDL frakciji niži kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrole, i ako se zna da su ćelije kancera I gradusa približno diferencirane u istoj meri kao i nemaligne ćelije, može se pretpostaviti da dominacija dezmosterola u odnosu na latosterol u ćelijama potpomaže diferencijaciju ćelija. Ovu hipotezu je potrebno dodatno potvrditi daljim studijama.

Takođe, kada smo posmatrali markere sinteze i apsorpcije holesterola u odnosu na stadijume CRC, primetili smo da se kod pacijenata sa stadijumima A i B CRC javljaju niže relativne koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D (tabela 36). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa pretpostavkom da u toku progresije kancera dolazi do angažovanja svih dostupnih izvora holesterola u cilju obezbeđivanja količine neophodne za proliferaciju ćelija.

Smatra se da osobe sa povišenim indeksom telesne mase češće oboljevaju od CRC. Epidemiološke studije su pokazale da je gojaznost povezana sa nastankom najmanje 12 različitih vrsta kancera, među kojima je i CRC [233]. Međutim, iako gojaznost predstavlja već ustanovljen faktor rizika za razvoj CRC, veza između ova dva stanja je vrlo kompleksna. Obzirom na sam dizajn studije, mi nismo mogli da ustanovimo u kojoj meri gojaznost predstavlja značajan etiološki faktor rizika za razvoj CRC, ali smo uočili da između novodijagnostikovanih osoba sa CRC i zdravih osoba nije bilo značajnih razlika u vrednostima ITM (tabela 14). Dok neke studije pokazuju da gojaznost predstavlja negativan prognostički parametar u ranom stadijumu bolesti, smatra se da kod osoba sa dijagnostikovanim CRC povišena telesna masa ili gojaznost mogu biti korisni. U prilog tome govori i skorašnja studija koja je pokazala da ITM u vreme dijagnostikovanja bolesti predstavlja značajan prediktor preživljavanja pacijenata sa CRC [234]. U našoj studiji, markeri sinteze holesterola kod zdravih osoba pozitivno koreliraju sa ITM, što ukazuje na vezu između gojaznosti i procesa sinteze holesterola (tabela 17). Kod pacijenata sa CRC, međutim, bila je prisutna jedino pozitivna korelacija između koncentracija dezmosterola i ITM (tabela 26).

U cilju dalje analize, podelili smo pacijente i kontrolnu grupu na osobe sa povišenim ITM ($>25 \text{ kg/m}^2$) i one sa normalnim, odnosno sniženim ITM ($<25 \text{ kg/m}^2$). Kod pacijenata sa povišenim ITM uočene su značajno više koncentracije albumina u serumu u odnosu na pacijente sa višim ITM $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (tabela 41). Niže koncentracije proteina i albumina kod pacijenata mogu se pripisati smanjenom sintetskom kapacitetu jetre, kao i povećanom iskorišćavanju proteina usled povećanih potreba za diferencijacijom i

proliferacijom malignog tkiva, te izgradnjom novih ćelijskih struktura u svim stadijumima bolesti [235]. Kod onkoloških pacijenata često su prisutni kaheksija i *muscle waste* sindrom. Iako su uzroci nastanka ovih poremećaja još uvek nerazjašnjeni, pretpostavka je da se u njihovoj osnovi nalaze povećana degradacija i snižena sinteza proteina, odnosno negativni balans azota, ali i promene u energetsom metabolizmu, pre svega disfunkciji mitohondrija, te povećanje bazalnog metabolizma [235].

Što se markera sinteze i apsorpcije tiče, jedino je dezmosterol pokazao statistički značajnu razliku kod pacijenata u odnosu na prisustvo prekomerne telesne težine (slika 54). Apsolutne koncentracije dezmosterola su bile povišene kod osoba sa vrednostima $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (slika 54). Međutim, kako je isti odnos pronađen i u zdravoj populaciji (slika 34), može se pretpostaviti da je ovaj rezultat posledica samog prisustva gojaznosti, a ne CRC. U prilog tome govore i rezultati drugih studija u kojima je pronađena pozitivna korelacija između koncentracija dezmosterola i latosterola sa ITM [236], kao i nalazi da je dezmosterol povišen kod osoba kod kojih je prisutna gojaznost, insulinska rezistencija ili metabolički sindrom [237]. Dodatno, dok kod pacijenata nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na vrednost ITM (tabela 58), kod zdravih osoba je zapaženo da je dezmosterol dominantno prisutan u HDL česticama u odnosu na njegovu ukupnu koncentraciju u serumu, kod osoba koje nemaju povišenu telesnu masu u odnosu na osobe sa povišenom telesnom masom (tabela 25). Studija Simonen i saradnika je pokazala da je udeo latosterola u HDL česticama niži kod osoba sa normalnom telesnom masom [238] u odnosu na gojazne osobe. U pomenutoj studiji nisu bile analizirane koncentracije dezmosterola u serumu i lipoproteinskim frakcijama, ali zaključak navodi na to da postoje razlike u distribuciji markera sinteze između različitih lipoproteinskih čestica u prisustvu gojaznosti. Prisustvo povećane koncentracije dezmosterola u HDL čestici se može objasniti povišenom koncentracijom HDL-h u plazmi osoba sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$, što je u saglasnosti sa dosadašnjim znanjima o funkcionalnosti HDL i njegovom statusu kod gojaznih osoba. Naime, kod osoba sa $ITM < 25$ dominiraju HDL čestice bogatije NHS i holesterolom, koje u manjoj meri sadrže trigliceride u odnosu na HDL čestice kod gojaznih osoba [239]. Dodatno, ako se uzme u obzir da dezmosterol poseduje anti-inflamatorna svojstva, koja su za sada pokazana isključivo u slučaju penastih ćelija [220], može se pretpostaviti da prisustvo dezmosterola u HDL čestici može imati povoljne efekte na zdravstveno stanje organizma. Ove hipoteze potrebno je dalje potvrditi i razraditi u

budućim studijama, te istražiti potencijal određivanja koncentracija dezmosterola u HDL frakciji kao markera funkcionalnosti HDL čestice.

Pored toga, kod zdravih ispitanika je primećena i statistički značajno viša koncentracija markera apsorpcije kod osoba koje nemaju povišen ITM u odnosu na osobe sa povišenim ITM (slika 34). Brojne studije zaključuju da konzumiranje fitosterola, kao i njihove povećane koncentracije u serumu, imaju korisan učinak na regulaciju telesne mase [240]. Takođe, u grupi zdravih ispitanika su koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji bile značajno niže kod osoba sa prekomernom telesnom masom (slika 35). Iz svega navedenog se može pretpostaviti da je u fiziološkim uslovima kod osoba prekomerne telesne mase niži udeo apsorpcije, a viši udeo sinteze u odnosu na osobe koje nemaju povišenu telesnu masu. Kod pacijenata sa CRC sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ nije bilo razlike u koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u odnosu na pacijente sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (slika 54). Jedina razlika koja je uočena kada su u pitanju markeri apsorpcije holesterola su granično značajno povišene relativne koncentracije kampesterola u HDL frakciji kod pacijenata sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ (tabela 42).

Iako vodiči za dijagnostikovanje i lečenje CRC ne prave razliku između polova, primećeno je da od ove bolesti u većoj meri oboljevaju muškarci, međutim žene često imaju viši stepen mortaliteta i lošije 5-godišnje preživljavanje. Objašnjenja variraju od socio-ekonomskih do anatomskih i hormonskih [241]. Iz ovog razloga, u našoj studiji posmatrane su razlike u koncentracijama i indeksima ispitivanih NHS prema polu kod pacijenata obolelih od CRC kao i kod zdravih ispitanika.

Kod zdravih ispitanika je uočena razlika između polova u odnosu na prisustvo sva četiri NHS u serumu (slika 30). Apsolutne koncentracije oba markera sinteze su bile povišene kod muškaraca (slika 30). Kod zdrave populacije uočena je i razlika između odnosa ukupnih koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu u odnosu na pol, te su žene u cirkulaciji imale više koncentracije dezmosterola u odnosu na latosterol (tabela 22). Apsolutne koncentracije oba markera apsorpcije bile su povišene kod žena (slika 30). Dodatno, zdrave žene su imale značajno više apsolutne koncentracije kampesterola i β -sitosterola i u HDL frakciji (slike 31 i 33). Kod pacijenata sa CRC je primećeno da muškarci imaju značajno više koncentracije dezmosterola u plazmi u odnosu na žene (slika 50). Međutim, razlika u koncentraciji dezmosterola u HDL frakciji između dva pola nije bilo (slika 51). Sa druge strane, koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su bile značajno više kod žena u odnosu na muškarce (slike 51 i 53). Ako se ovaj

rezultat uporedi sa statusom markera apsorpcije kod zdravih osoba, moguće je zaključiti da se kod pacijenata javlja isti profil distribucije markera apsorpcije prema polu kao i kod zdravih ispitanika. Bosner i saradnici su pokazali da nema razlika u apsorpciji holesterola u odnosu na pol, analizirajući direktnom metodom apsorpciju dijetarnog holesterola na nivou gastrointestinalnog trakta [242]. Međutim, njihova analiza se nije zasnivala na merenju apsorpcije fitosterola, tako da je moguće da je razlika koju smo uočili između polova isključivo vezana za apsorpciju biljnih sterola. Kako smo prethodno pokazali da i zdrave osobe sa nižim ITM, imaju više koncentracije fitosterola u HDL čestici (slika 35), moguće je da povećane koncentracije fitosterola u HDL čestici kod žena doprinose njihovom boljem kardiometaboličkom statusu.

Na kraju, analiza ROC krive je pokazala da snižene koncentracije dezmosterola poseduju veoma dobar potencijal za razdvajanje zdravih osoba i pacijenata obolelih od CRC (slika 58). Binarnom logističkom regresijom je pokazano da se prediktivni potencijal dezmosterola ne gubi ni nakon uključivanja tradicionalnih faktora rizika za razvoj CRC (starosti, muškog pola, ITM, UH, TG) (tabela 47). Dodatno i kampesterol je pokazao vrlo dobar potencijal za predikciju CRC (tabela 48). I u ovom slučaju, prediktivni potencijal se nije izgubio nakon uključivanja tradicionalnih faktora rizika za razvoj CRC (starosti, muškog pola, ITM, UH, TG). Takođe i rezultati analize ROC krive govore da niske koncentracije kampesterola u serumu poseduju veoma dobru dijagnostičku tačnost prilikom razdvajanja pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika (slika 58).

Pored ispitivanja statusa homeostaze holesterola cilj našeg istraživanja je bio da ispitamo status vitamina D kod ovih pacijenata. Naime, antikancerogeni i antiproliferativni učinak vitamina D je potvrđen brojnim studijama [177-186]. Poznato je da je hipovitaminoza vitamina D poprimila globalne razmere, te se dovodi u vezu sa nastankom mnogih oboljenja. Kvantifikacija vitamina D u kliničkim laboratorijama je postala uobičajena, i to pre svega merenje koncentracija najzastupljenijeg metabolita 25(OH)D₃ [176]. Među dostupnim metodama za određivanje statusa vitamina D svakako se izdvaja HPLC-MS/MS. Mogućnosti ove metode su velike, a selektivnost i osetljivost zadovoljavajuće [167]. U ovoj studiji je razvijena i uspešno validirana metoda za kvantifikaciju dva metabolita vitamina D: 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃. Analiziranjem ovih parametara u zdravoj populaciji i kod pacijenata obolelih od CRC pokušali smo da istražimo promene na nivou statusa vitamina D kod ovih pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike.

U našoj studiji smo pokazali da su koncentracije 7-DHC, 25(OH)D₃ i VDMR snižene kod pacijenata sa CRC. Dobro je poznato da se koncentracija vitamina D smanjuje kod pacijenata sa CRC [244]. Naši rezultati (tabela 49) su potvrdili ove nalaze. Uočili smo smanjenje koncentracija 7-DHC, 25(OH)D₃, ali nisu zabeležene razlike između pacijenata i kontrola kada je u pitanju bila koncentracija 24,25(OH)₂D₃ (tabela 49). S druge strane, VDMR je bio značajno niži kod pacijenata (tabela 49), ali takav nalaz je najverovatnije odražavao prisustvo značajnih razlika u koncentracijama 25(OH)D₃, naglašavajući tako dodatno značaj ovog metabolita vitamina D. Takođe treba napomenuti da su uočene značajno niže koncentracije VDBP kod pacijenata sa CRC u poređenju sa zdravim učesnicima (tabela 49). Takvi rezultati su bili očekivani jer se VDBP primarno sintetiše u jetri, a dobro je poznato da inflamacija povezana sa tumorom i posledična proizvodnja citokina mogu smanjiti sintezu proteina u jetri, dok sa druge strane, maligne ćelije mogu preuzimati serumske proteine [245]. Ukupno uzevši, ovi procesi dovode do smanjenja ukupnih serumskih proteina koji je zapažen i u našoj studiji (tabela 14). Metabolizam vitamina D je složen i nije ograničen samo na jetru i bubrege, već i ostala tkiva, uključujući i debelo crevo, predstavljaju aktivna mesta metabolizma vitamina D [245]. Naime, pokazano je da su i CYP27B1, enzim odgovoran za sintezu aktivnog oblika vitamina D, te CYP24A1, odgovoran za sintezu neaktivnog metabolita 24,25(OH)₂D₃, prisutni u kolonocitima i zavise od stepena diferencijacije ćelija [245]. Pošto su prethodna istraživanja potvrdila pojačanu aktivnost CYP24A1 u manje diferenciranim ćelijama CRC [245, 246], bilo bi logično očekivati povećane koncentracije 24,25(OH)₂D₃ u sistemskej cirkulaciji ovih pacijenata. Međutim, naši rezultati nisu pokazali razlike u serumskim nivoima 24,25(OH)₂D₃ između pacijenata i kontrolne grupe (tabela 49). Ipak, važno je primetiti da su dokazi u vezi sa povećanom aktivnošću CYP24A1 i nivoom 24,25(OH)₂D₃ izvedeni iz studija rađenih na maligno izmenjenom tkivu i ćelijskim kulturama, ali ne i iz analiza u serumu. Pošto su nivoi metabolita vitamina D u krvi odraz metaboličkih procesa u brojnim tkivima, ali ipak dominantno u jetri i bubrezima, uticaj izmenjenog metabolizma u ćelijama kancera možda nije dovoljan da izazove sistemske promene koncentracije određenog metabolita u serumu. S druge strane, eventualna upotreba metabolita vitamina D za predviđanje i prognozu razvoja CRC verovatno bi bila orijentisana na uzorke seruma ili plazme, što svakako ograničava potencijal određivanja 24,25(OH)₂D₃ u kliničkoj praksi.

Opšte je prihvaćeno da sezonske varijacije u izloženosti suncu predstavljaju jednu od osnovnih determinanti statusa vitamina D [159], što je potvrđeno i rezultatima u našoj grupi zdravih ispitanika (tabela 50). Međutim, kada smo analizirali metabolite vitamina D kod pacijenata sa CRC, nismo našli razlike koje bi se mogle pripisati sezonskim varijacijama u izloženosti sunčevom zračenju (tabela 50). Stoga, naši rezultati ukazuju da su niže koncentracije markera statusa vitamina D kod pacijenata sa CRC verovatnije posledice procesa povezanih sa samom bolešću, nego što su uzrokovane smanjenom izloženošću sunčevom zračenju.

Analiza statusa vitamina D kod zdravih osoba nije pokazala značajne razlike u ispitivanim parametrima statusa vitamina D kada su u pitanju pol i prisustvo povišene telesne mase (tabela 51). Sa druge strane kod pacijenata sa CRC primećene su niže vrednosti VDBP kod žena u odnosu na muškarce (tabela 57). Pretpostavlja se da žene različito odgovaraju na katabolička stanja poput kaheksije u odnosu na muškarce, zbog hormonskih razlika koje postoje između dva pola [247]. Na osnovu naših rezultata, moguće je pretpostaviti da više koncentracije VDBP koje smo zabeležili kod muškaraca mogu biti uzrokovane upravo višom koncentracijom testosterona u organizmu. Naime, zna se da je testosteron anabolički hormon koji aktivira sintezu proteina, dok efekat estrogena u stanjima kaheksije nije dovoljno ispitan [247]. Predmet aktuelnih istraživanja je i upotreba terapije testosteronom kod pacijenata sa kancerom i kaheksijom u cilju sprečavanja *muscle waste* sindroma kao i poboljšanju stope preživljavanja [248]. Iako nema podataka o uticaju testosterona na koncentracije VDBP, pokazano je da testosteron ima anabolički efekat i na proteine sintetisane u jetri (CRP, interleukini, adipocitokini) [249]. Dodatno, istraživanja Lama i saradnika su pokazala da se kod pacijenata sa kancerom prostate koji su na terapiji supresije androgena dešava povećan gubitak proteina, i njegova povećana eliminacija posredstvom povećane proizvodnje ureje [250,251]. Međutim, naši rezultati nisu pokazali razlike u koncentracijama VDBP u odnosu na vrednost ITM (tabela 58), tako da je dobijene razlike prema polu i uticaj kaheksije na pol, potrebno dodatno istražiti.

Kada smo u nastavku analizirali metabolite vitamina D u odnosu na patološke karakteristike CRC, primetili smo značajno više vrednosti 7-DHC kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma (tabela 53). Kao što smo već napomenuli ova dva karcinoma se prema svojim anatomskim i morfološkim karakteristikama mogu tretirati kao različita maligna tkiva, te se i pristup lečenju u određenoj meri razlikuje [231]. Takođe, analiza koncentracija NHS je pokazala da je odnos zbirnih koncentracija markera

sinteze holesterola i zbirnih koncentracija markera apsorpcije holesterola u serumu je bio značajno viši kod pacijenata sa CA kolona (tabela 31), što je moguće uzrokovano razlikama u metabolizmu holesterola između ove dve vrste tkiva. Kao što se može videti u tabeli 30, relativna koncentracija latosterola je bila povišena kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma, iako ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Međutim, 7-DHC, koji nastaje iz latosterola u reakciji koju katalizuje *latosterol 5-desaturaza* i predstavlja poslednji prekursor u *Kandutsch-Russelovom* putu biosinteze holesterola [75], pokazao je značajno više koncentracije kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma (tabela 53). Ovaj rezultat dodatno učvršćuje hipotezu o postojanju tkivne specifičnosti post-lanosterolskih biosintetskih puteva holesterola. Takođe, koncentracije VDBP su bile značajno niže kod pacijenata sa CA kolona (tabela 53). Prethodna studija Anica i saradnika nije pokazala razlike u koncentracijama VDBP između CA kolona i CA rektuma [252]. Međutim isti autori izneli su pretpostavku da se ćelijsko preuzimanje 25(OH)D3 vezanog za VDBP dešava posredstvom receptora na površini ćelija kolona (*megalin, kubilin i DAb2*) koji vrše endocitozu kompleksa VDBP i 25(OH)D3. Studija Jansena i saradnika je pokazala da postoji tkivna specifičnost u distribuciji *megalin-kubilin* sistema za endocitozu proteina, te da je primećen nedostatak ovih receptora u terminalnom ileumu [253]. Naša pretpostavka je da se i u tkivu kolona i rektuma može razlikovati distribucija ovih receptora te da je i efikasnost pomenutog procesa endocitoze različita između dva tkiva, što je potrebno potvrditi daljim istraživanjima.

Kada smo podelili pacijente prema gradusima CRC, uočili smo da pacijenti sa nižim gradusom imaju više vrednosti 25(OH)D3 u serumu u odnosu na pacijente sa višim gradusima (tabela 54). Dokazali smo i da se sa povećanjem gradusa CRC progresivno smanjuju nivoi serumskog 25(OH)D3 (tabela 55). Takođe, zapazili smo i značajno povećanje koncentracije 24,25(OH)₂D3 u gradusu II (Tabela 55). Nedostatak značajnih razlika između III i ostalih gradusa je najverovatnije posledica manjeg broja učesnika u ovoj grupi. Dobro je poznato da vitamin D pospešuje diferencijaciju ćelija [254], tako da je očekivan nalaz smanjene koncentracije 25(OH)D3 kod pacijenata sa slabo diferenciranim karcinomom. Još važnije, pokazano je da je nizak nivo 25(OH)D3 nezavisni prediktor prisustva CRC visokog gradusa, čak i nakon korekcije za druge faktore rizika, uključujući koncentraciju UH (tabela 63). Stoga, naši rezultati ukazuju da bi 25(OH)D3 mogao biti koristan kao potencijalni serumski marker prisustva CRC visokog gradusa, što bi trebalo

dalje istraživati u budućim studijama. Podaci o vezi između vitamina D i gradusa tumora u CRC su oskudni. Ipak, nedavno je pokazano da se ekspresija nuklearnih receptora za vitamin D postepeno smanjuje tokom progresije adenoma niskog gradusa prema adenomu visokog gradusa i CRC [255]. Naši nalazi u pogledu nivoa vitamina D u serumu se slažu sa ovim rezultatima. Takođe treba primetiti da je određivanje serumskog 25(OH)D3 jednostavan i jeftin postupak, što podrazumeva da bi vitamin D mogao da se razmatra kao lako dostupan i potencijalno koristan indikator za preliminarnu procenu prisustva CRC visokog gradusa.

Što se razlika u odnosu na stadijum CRC tiče, primetili smo značajno više vrednosti VDBP kod pacijenata sa stadijumom A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D (tabela 56). Ovaj nalaz je takođe moguće pripisati sniženoj sintetskoj funkciji jetre koja se javlja kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću [248, 249].

U cilju ispitivanja povezanosti između metabolizma holesterola i vitamina D kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika, sproveli smo korelacionu analizu između ispitivanih markera statusa vitamina D i markera sinteze i apsorpcije holesterola u svakoj od ispitivanih populacija. Kod zdravih osoba primećena je pozitivna korelacija između koncentracija latosterola u serumu i koncentracija 25(OH)D3 i VDMR (tabela 59). Kako je latosterol prekursor 7-DHC, prekursora u sintezi holesterola i vitamina D, pronađena asocijacija može ukazati na postojanje veze između ova dva metabolička puta. Povezanost sa VDMR indeksom je takođe najverovatnije uslovljena pozitivnom korelacijom između 25(OH)D3 i latosterola (tabela 59). Kod pacijenata sa CRC primećena je pozitivna korelacija između koncentracija UH u serumu i koncentracija 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D₃, kao i pozitivna korelacija između koncentracija markera apsorpcije holesterola u serumu i koncentracija 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D₃ (tabela 60). Iako se vitamin D3 produkuje u organizmu iz prekursora holesterola u koži, određena količina vitamina D može dospeti u organizam i dijetarnim unosom. Dugo se smatralo da se holekalciferol apsorbuje pasivnom difuzijom, ali skorašnje studije su zaključile da se vitamin D apsorbuje delimično i posredstvom istih transportera u enterocitima pomoću kojih se apsorbuju i holesterol i fitosteroli. Naime pokazano je da ezetimib, kao inhibitor apsorpcije holesterola smanjuje i apsorpciju dijetarnog vitamina D [254]. Međutim, značajan je i podatak da fitosteroli takođe umanjuju apsorpciju vitamina D usled kompeticije oko istih transportera na membranama enterocita [257]. Nijedan od učesnika u našim ispitivanim grupama nije bio na suplementaciji ili terapiji vitaminom D, tako da se pretpostavlja da je uticaj dijetarnog

unosa holekalciferola neznatan u odnosu na njegovu produkciju u organizmu. Dodatno, kako korelacija između markera apsorpcije holesterola i vitamina D nije zapažena kod zdravih ispitanika, već isključivo kod pacijenata obolelih od CRC, da se pretpostaviti da je uočena korelacija ipak posledica prisustva bolesti. Kao što smo već pomenuli kod pacijenata sa CRC vrednosti markera apsorpcije u serumu su sniženi (slika 26), kao i koncentracije metabolita vitamina D (tabela 49). Moguće je da se usled iskorišćavanja svih dostupnih izvora holestrola od strane malignog tkiva, javlja i deficijencija prekursora za sintezu vitamina D. U našoj studiji, serumske koncentracije 25(OH)D3 i 7-DHC bile su značajno niže kod pacijenata sa CRC (tabela 49), čime su postavljeni preduslovi za kasniju sniženu aktivnost vitamina D i smanjenu biološku funkciju u ekstrarenalnim tkivima. Paralelno sa niskim nivoima prekursora vitamina D, primetili smo i smanjenje nivoa UH, LDL-h i HDL-h (tabela 60). Ovi nalazi mogu biti od posebnog značaja, budući da, kao što smo pomenuli, vitamin D i holesterol imaju zajednički prekursor. Prethodne studije o nivoima lipida u serumu kod pacijenta obolelih od CRC nisu došle do jedinstvenog zaključka, ali rezultati poput naših su prikazani u studiji Abaze i saradnika [258]. Pored lošeg nutritivnog statusa koji se često može videti kod pacijenata sa CRC [259], što može biti jedan od razloga smanjene sinteze holesterola u jetri, nedavno je predloženo da reprogramiranje metabolizma lipida može biti odgovorno za uočeno smanjenje serumskih markera lipidnog statusa kod različitih tipova kancera [153]. Naime, pokazalo se da ćelije kancera akumuliraju i koriste holesterol [260, 261], dok se povećane potrebe zadovoljavaju ili povećanom endogenom sintezom [262], ili povećanim unosom holesterola u organizam [263]. Takva preraspodela sinteze holesterola i ćelijska akumulacija mogla bi imati značajne posledice na status vitamina D. Naime, predložena je hipoteza da je 7-DHC u centru metaboličkog raskršća između puteva sinteze holesterola i vitamina D [171]. U našem istraživanju zabeleženi su niži nivoi 7-DHC kod pacijenata sa CRC (tabela 49). Prema tome, moguće je da, u uslovima povećanog iskorišćavanja holesterola od strane malignih ćelija i posledičnog generalizovanog usmeravanja biosinteze prema holesterolu, sinteza vitamina D bude smanjena. Potvrđujući takvu pretpostavku, uočili smo jaku pozitivnu korelaciju serumskih nivoa UH i LDL-h sa 7-DHC i analiziranim metabolitima vitamina D3, ali samo u grupi pacijenata sa CRC (tabela 60). Ovi nalazi ukazuju da moguće povećano korišćenje holesterola od strane malignih ćelija uzrokuje smanjenje nivoa holesterola u serumu, što dalje može preusmeriti biosintetske puteve i time uzrokovati smanjenu sintezu vitamina D i posledično smanjenje njegove aktivnosti. Prethodno su Bogh i saradnici [169] pokazali da je nivo 25(OH)D3 nakon izlaganja

sunčevom zračenju bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom UH. U tom smislu, čak i lokalna produkcija vitamina D u koži može biti kompromitovana u uslovima smanjenog serumskog UH kod pacijenata sa CRC. Naime, zbog generalizovanog nedostatka holesterola u cirkulaciji, što je uobičajeno kod pacijenata sa CRC, može se očekivati da će putevi biosinteze u keratinocitima verovatno biti usmereni ka holesterolu, a ne ka vitaminu D. Ukupno uzevši, naši rezultati ukazuju na to da je snižen status vitamina D, koji je uobičajen nalaz kod pacijenata sa CRC, pre svega posledica poremećenog lipidnog profila. U prilog ovome govori i činjenica da, kada smo podelili pacijente sa CRC prema koncentracijama UH (tabela 61), našli smo niže vrednosti 7-DHC, 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ kod ispitanika sa niskim UH, čime smo potvrdili uticaj cirkulišućeg holesterola u svim aspektima metabolizma vitamina D.

Konačno, kada smo analizirali potencijal metabolita vitamina D za predikciju CRC (tabela 62), serumski nivoi 25(OH)D₃ su se izdvojili kao najznačajniji marker, čija se relevantnost zadržala čak i nakon korekcije za dobro poznate faktore rizika za razvoj CRC. Međutim, uključivanje koncentracije UH u projektovani model, eliminisalo je nezavisni uticaj sniženih koncentracija 25(OH)D₃ na predikciju CRC, što je u skladu sa pretpostavljenom ulogom UH u usmeravanju metabolizma vitamina D. Interesantno je da su niske koncentracije UH u serumu prepoznate kao nezavisni prediktor prisustva CRC, što potencira ulogu dislipidemije u etiopatogenezi ove bolesti. Uloga lipida u razvoju kancera je dugo bila zanemarena, ali najnovija istraživanja bacaju svetlo na ovu temu [153]. Mogući uticaj na metabolite vitamina D koje smo analizirali, može predstavljati dodatni efekat narušene homeostaze lipida tokom razvoja i progresije CRC. Dodatno, naši rezultati (tabela 62) ukazuju na to da 24,25(OH)₂D₃ nije dovoljno pouzdan marker za ove svrhe. Pored toga, iako je 24,25(OH)₂D₃, zajedno sa 7-DHC, prepoznat kao nezavisni prediktor CRC u univarijantnoj analizi, prilagođavanje prema starosti, polu i ITM anulirali su njihov prediktivni kapacitet (tabela 62), čime se potvrđuje gore navedena pretpostavka. Takođe, naši rezultati nisu pokazali značajan nezavisni doprinos VDBP u predviđanju CRC (tabela 62), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima [244, 264], te ukazuje da je uticaj VDBP tokom progresije CRC verovatno indirektan i povezan sa vitaminom D.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na zaključak da se narušavanje homeostaze holesterola javlja ne samo kod kardiometaboličkih poremećaja, već i kod malignih bolesti kao što je CRC. Kancer kao aktuelni zdravstveni problem i izazov za prevenciju i terapiju, predstavlja nedovoljno istraženo polje kada je reč o metabolizmu lipida. Naša studija je

pokazala da su svakako dalja istraživanja u ovom polju neophodna. Takođe, ukazali smo na moguću povezanost između poremećaja u metabolizmu holesterola i statusa vitamina D, te bi sponu između ova dva metabolička puta i njihov uticaj na malignu transformaciju ćelija, kao i propagaciju i progresiju maligne bolesti, bilo značajno dodatno istražiti. Dalja istraživanja svih pomenutih poremećaja stvaraju prostor za uvođenje dodatnih farmakoloških i ne-farmakoloških preventivnih i terapijskih mera kod onkoloških pacijenata.

6 Zaključci

- ❖ HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji je uspešno optimizovana i validirana u našoj laboratoriji. Prilikom validacije metode ustanovljen je značajan efekat matriksa koji potiče od holesterola prisutnog u uzorcima. U cilju eliminacije interferencije koja potiče od matriksa potrebno je konstruisati standardne krive uz dodatak holesterola kao surogat matriksa. Odgovarajuću koncentraciju holesterola za konstruisanje kalibracionih krivih je potrebno prilagoditi koncentraciji holesterola u analiziranim uzorcima.
- ❖ HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju metabolita vitamina D 25(OH)D₃ i 24,25(OH)₂D₃ je uspešno razvijena, optimizovana i validirana u našoj laboratoriji.
- ❖ Kod pacijenata sa CRC koncentracije UH, HDL-h i LDL-h su značajno niže u odnosu na zdravu populaciju. Prisustvo hipoholesterolemije kod ovih pacijenata ukazuje na postojanje poremećaja metabolizma holesterola.
- ❖ Naše istraživanje je pokazalo da su koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola značajno snižene kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Kod pacijenata sa CRC, povišen odnos koncentracija dezmosterola i latosterola može ukazati na dominaciju *Kandutsch-Russellovog* u odnosu na *Blochov* put sinteze holesterola.
- ❖ Kod pacijenata sa CRC, snižene su koncentracije svih markera sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Naši rezultati su pokazali da je udeo svakog NHS u HDL frakciji u odnosu na ukupne koncentracije pojedinačnih HNS u serumu veći kod pacijenata u odnosu na kontrole, što može ukazati na to da je kod pacijenata sa CRC veći sadržaj NHS u HDL česticama, te da se kod pacijenata sa CRC javlja potencijalno veći efluks prekursora sinteze holesterola na HDL čestice, kao i veća apsorpcija fitosterola posredstvom HDL čestica.
- ❖ Ustanovili smo da u HDL frakciji ima više markera sinteze holesterola, kao i da je odnos koncentracija markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu viši kod pacijenata obolelih od karcinoma kolona, što može ukazati na to da je proces sinteze holesterola intenzivniji kod pacijenata sa kancerom kolona u odnosu na pacijente sa kancerom rektuma.

- ❖ Kod pacijenata sa CRC gradusa I koncentracija dezmosterola u HDL frakciji je dominantnija u odnosu na koncentraciju latosterola u HDL frakciji, što ukazuje na potencijalnu ulogu dezmosterola u diferencijaciji ćelija CRC.
- ❖ Kod pacijenata sa stadijumom A i B CRC, niže su koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D, što upućuje na potencijalno intenziviranje procesa apsorpcije holesterola posredstvom HDL čestica kod pacijenata sa odmaklim stadijumima bolesti.
- ❖ Naša studija je pokazala da je u fiziološkim uslovima kod osoba sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ niži udeo apsorpcije, a viši udeo sinteze u odnosu na osobe sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$. Kod pacijenata sa CRC sa $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ nije bilo razlike u koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola u odnosu na pacijente sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Koncentracije zbirnih markera sinteze su bile povišene kod muškaraca u odnosu na žene u obe ispitivane populacije. I kod pacijenata sa CRC i kod zdravih ispitanika, koncentracije markera apsorpcije su bile više kod osoba ženskog pola u odnosu na osobe muškog pola.
- ❖ Snižene koncentracije dezmosterola, kao i snižene koncentracije kampesterola u serumu, pojedinačno predstavljaju potencijalne nezavisne prediktore za pojavu CRC i pokazuju veoma dobru dijagnostičku tačnost za razdvajanje zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC.
- ❖ Naši rezultati su pokazali da su koncentracije 7-DHC, 25(OH)D3, VDMR i VDBP snižene kod pacijenata sa CRC, dok se koncentracije 24,25(OH)₂D3 nisu razlikovale između dve ispitivane grupe.
- ❖ U grupi zdravih ispitanika, koncentracije metabolita vitamina D su se razlikovale u odnosu na sezonu, dok kod pacijenata sa CRC ove razlike nije bilo, što potvrđuje doprinos same bolesti varijacijama u statusu vitamina D.
- ❖ Kod zdravih ispitanika ispitivani parametri statusa vitamina D nisu se razlikovali u odnosu na pol, dok su kod pacijenata sa CRC koncentracije VDBP bile niže kod žena. Sa druge strane, u obe ispitivane populacije nije bilo razlika u ispitivanim parametrima u odnosu na vrednost ITM.
- ❖ Koncentracije 7-DHC su bile više, a koncentracije VDBP su bile niže kod pacijenata sa karcinomom kolona u odnosu na pacijente sa karcinomom rektuma. Pacijenti sa gradusom I imaju više koncentracije 25(OH)D3 u odnosu na pacijente sa gradusima II i III. Dodatno, pokazano je da je nizak nivo 25(OH)D3 nezavisni prediktor visokog gradusa CRC. Naši rezultati su pokazali i da pacijenti sa

stadijumom A il B CRC imaju značajno više vrednosti VDBP u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D.

- ❖ Kod pacijenata sa CRC primećena je pozitivna korelacija između koncentracija UH i markera apsorpcije holesterola u serumu sa koncentracijama 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3. Takođe, uočene su niže koncentracije 7-DHC, 25(OH)D3 i 24,25(OH)₂D3 kod ispitanika sa niskim UH, što ukazuje na to da se snižene koncentracije holesterola u cirkulaciji mogu odraziti na serumske nivoe parametara statusa vitamina D.
- ❖ Serumska koncentracija 25(OH)D3 se izdvojila kao parametar sa najznačajnijim prediktivnim potencijalom, čija se relevantnost zadržala čak i nakon korekcije za dobro poznate faktore rizika za razvoj CRC. Međutim, uključivanje koncentracije UH u prediktivni model, eliminisalo je nezavisni uticaj sniženih koncentracija 25(OH)D3 na predikciju CRC.

7 *Literatura*

1. Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, Arnold M. Global trends in colorectal cancer mortality: Projections to the year 2035. *Int J Cancer* 2019;144(12):2992-3000.
2. Zhang Q, Wang Y, Hu H, Huang R, Xie L, Liu E, Chen YG, Wang G, Wang X. Impact of socioeconomic status on survival of colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2017;8(62):106121.
3. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2008;37(1):1-24.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394-424.
5. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
6. Cappell MS. Gastric and duodenal ulcers during pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32(1):263-308.
7. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf>
8. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012;3(3):153.
9. Gonzalez R. World Health Organization (WHO) classification of colorectal carcinoma.
<https://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumorwhoclassification.html>.
Pristup Jun 4, 2019
10. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2044-58.
11. Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis* 2019;18(1):29.
12. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five

- quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123(6):1804-11.
13. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386(6625):623.
 14. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(15):8681-6.
 15. Vargas-Rondón N, Villegas V, Rondón-Lagos M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers* 2017;10(1):4.
 16. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008;135(4):1079-99.
 17. Nojadedh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J* 2018;17:159.
 18. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253(5020):661-5.
 19. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987;93(5):1009-13.
 20. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Clin Lab Med* 2005;25(1):135-77.
 21. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997;16(1):64.
 22. Jass JR. Hyperplastic polyps of the colorectum—innocent or guilty? *Dis Colon Rectum* 2001;44(2):163-6.
 23. Gao Y, Cao Y, Tan A, Liao C, Mo Z, Gao F. Glutathione S–Transferase M1 Polymorphism and Sporadic Colorectal Cancer Risk: An Updating Meta-Analysis and HuGE Review of 36 Case-Control Studies. *Ann Epidemiol* 2010;20(2):108-21.
 24. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Biomed Res Int* 2011;2011:1–19.
 25. Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY. Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol: WJG* 2005;11(6):778.

26. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
27. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310.
28. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(6):837-52.
29. Fisher ER, Sass R, Palekar A, Fisher B, Wolmark N, Contributing National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Projects Investigators. Dukes' classification revisited. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (protocol r-01). *Cancer* 1989;64(11):2354-60.
30. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, de Braud F. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74(2):106-33.
31. Boland CR, et al. Malignant tumors of the colon. In: Yamada T, Alpers D, Kaplowitz N, editors. 2015.
32. Botteri E, Støer NC, Sakshaug S, Graff-Iversen S, Vangen S, Hofvind S, De Lange T, Bagnardi V, Ursin G, Weiderpass E. Menopausal hormone therapy and colorectal cancer: a linkage between nationwide registries in Norway. *BMJ open* 2017;7(11):e017639.
33. Dulai PS, Singh S, Marquez E, Khera R, Prokop LJ, Limburg PJ, Gupta S, Murad MH. Chemoprevention of colorectal cancer in individuals with previous colorectal neoplasia: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2016;355:i6188.
34. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* 2015;148(6):1244-60.
35. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* 2013;24(6):1207-22.
36. Knaul FM, Arreola-Ornelas H, Rodriguez NM, Méndez-Carniado O, Kwete XJ, Puentes-Rosas E, Bhadelia A. Avoidable Mortality: The Core of the Global Cancer Divide. *J Glob Oncol* 2018;4:1-2.

37. Flood DM, Weiss NS, Cook LS, Emerson JC, Schwartz SM, Potter JD. Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 2000;11(5):403-11.
38. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Gene Dev.* 2012;26(9):877-90.
39. Long J, Zhang CJ, Zhu N, Du K, Yin YF, Tan X, Liao DF, Qin L. Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development. *Am J Cancer Res* 2018;8(5):778.
40. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(1):51-6.
41. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012;148(3):399-408.
42. Lim JY, Kwan HY. Roles of Lipids in Cancer. In *Lipid Metabolism* 2018 Nov 5. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/online-first/roles-of-lipids-in-cancer>. Pristup: Maj 15, 2019.
43. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* 2013;6(6):1353-63.
44. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109(9):1125-31.
45. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011;146(3):408-20.
46. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 2007;12(1):9-22.
47. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 2017;168(6):960-76.
48. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metab* 2008;8(3):224-36.
49. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol cell* 2010;39(2):171-83.

50. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(12):967.
51. Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell metab* 2011;14(4):443-51.
52. Jochem C, Leitzmann M. Obesity and Colorectal Cancer. *Recent Results Cancer Res* 2016;208:17-41.
53. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 2011;11(12):886.
54. Hursting SD, Smith SM, Lashinger LM, Harvey AE, Perkins SN. Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research. *Carcinogenesis* 2009;31(1):83-9.
55. Tang FY, Pai MH, Chiang EP. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial–mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *J Nutr Biochem* 2012;23(10):1302-13.
56. Laterza OF, Modur VR, Crimmins DL, Olander JV, Landt Y, Lee JM, Ladenson JH. Identification of novel brain biomarkers. *Clin Chem* 2006;52(9):1713-21.
57. Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 2004;4(1):78-83.
58. de Figueiredo Junior AG, Serafim PV, de Melo AA, Felipe AV, Turco EG, da Silva ID, Forones NM. Analysis of the lipid profile in patients with colorectal cancer in advanced stages. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(5):1287.
59. Yang K, Han X. Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem Sci* 2016;41(11):954-69.
60. Eisinger K, Krautbauer S, Hebel T, Schmitz G, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes. *Exp Mol Pathol* 2014;97(1):37-43.
61. Ekroos K, Jänis M, Tarasov K, Hurme R, Laaksonen R. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2010;12(4):273-81.
62. Feng L, Yang J, Liu W, Wang Q, Wang H, Shi L, Fu L, Xu Q, Wang B, Li T. Lipid Biomarkers in Acute Myocardial Infarction Before and After Percutaneous Coronary Intervention by Lipidomics Analysis. *Med Sci Monit* 2018;24:4175.
63. Kulkarni H, Mamtani M, Blangero J, Curran JE. Lipidomics in the study of hypertension in metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2017;19(1):7.

64. Gross RW, Han X. Lipidomics in diabetes and the metabolic syndrome. *Methods Enzymol* 2007;433:73-90.
65. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2011;1811(11):637-47.
66. Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2000;1529(1-3):1-8.
67. Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem Rev* 2011;111(10):6423-51.
68. Rezen T, Rozman D, Pascussi JM, Monostory K. Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2011;1814(1):146-60.
69. Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 2009;50(Supplement):S120-5.
70. Lange Y, Steck TL. Active membrane cholesterol as a physiological effector. *Chem Phys Lipids* 2016;199:74-93.
71. V.W. Rodwell, J.L. Nordstrom, J.J. Mitschelen. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv Lipid Res* 1976;14:1-74.
72. Van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;368:1-16
73. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 2015;4:e07999.
74. Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 1965;150:19–28.
75. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem* 1960;235:2256–2261.
76. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 2004;10(21):3081.
77. Howe V, Chua NK, Stevenson J, Brown AJ. The regulatory domain of squalene monooxygenase contains a re-entrant loop and senses cholesterol via a conformational change. *J Biol Chem* 2015;290(46):27533-44.
78. Parraga A, Bellolell L, Ferre-D'Amare AR, Burley SK. Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure* 1998;6(5):661-72.

79. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002;110(4):489-500.
80. Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(20):12753-8.
81. Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem* 2005;280(28):26483-90.
82. Afonso MS, Machado RM, Lavrador M, Quintao EC, Moore K, Lottenberg A. Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis. *Nutrients* 2018;10(6):760.
83. Zeng L, Liao H, Liu Y, Lee TS, Zhu M, Wang X, Stemerman MB, Zhu Y, Shyy JY. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 2004;279(47):48801-7.
84. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328(5985):1570-3.
85. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, Van Gils JM, Rayner AJ, Chang AN, Suarez Y, Fernandez-Hernando C. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2011;121(7):2921-31.
86. Zhang L, Rajbhandari P, Priest C, Sandhu J, Wu X, Temel R, Castrillo A, de Aguiar Vallim TQ, Sallam T, Tontonoz P. Inhibition of cholesterol biosynthesis through RNF145-dependent ubiquitination of SCAP. *Elife* 2017;6:e28766.
87. Cook EC, Nelson JK, Sorrentino V, Koenis D, Moeton M, Scheij S, Ottenhoff R, Bleijlevens B, Loregger A, Zelcer N. Identification of the ER-resident E3 ubiquitin ligase RNF145 as a novel LXR-regulated gene. *PloS one* 2017;12(2):e0172721.
88. Horvat S, Mcwhir J, Rozman D. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metab Rev* 2011;43(1):69-90.

89. Mok H, Von Bergmann K, Grundy SM. Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res* 1979;20(3):389-98.
90. Ikeda I. Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *J Oleo Sci* 2015;64(1):9-18.
91. Iqbal J, Al Qarni A, Hawwari A. Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption: A Disease Perspective. *Adv Biol Chem* 2017;7:60-75.
92. Cohn J, Kamili A, Wat E, Chung RW, Tandy S. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients* 2010;2(2):116-27.
93. Betters JL, Yu L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS letters* 2010;584(13):2740-7.
94. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201-4.
95. Davis HR, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279(32):33586-92.
96. Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Rudel LL. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res* 2012;53(1):95-104.
97. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290(5497):1771-5.
98. Sugizaki T, Watanabe M, Horai Y, Kaneko-Iwasaki N, Arita E, Miyazaki T, Morimoto K, Honda A, Irie J, Itoh H. The Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) inhibitor ezetimibe improves metabolic disease via decreased liver X receptor (LXR) activity in liver of obese male mice. *Endocrinology* 2014;155(8):2810-9.
99. Yu L, York J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278(18):15565-70.
100. Ahn SB, Jun DW, Jang K, Lee BH, Shin KJ. Duodenal Niemann-Pick C1-like 1 expression was negatively correlated with liver X receptor expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Intern Med* 2019;34(4):777.

101. Hui DY. The good side of cholesterol: A requirement for maintenance of intestinal integrity. *J Lipid Res* 2017;58(10):1935-6.
102. Ostlund Jr RE. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22(1):533-49.
103. Guardamagna O, Abello F, Baracco V, Federici G, Bertucci P, Mozzi A, Mannucci L, Gnasso A, Cortese C. Primary hyperlipidemias in children: effect of plant sterol supplementation on plasma lipids and markers of cholesterol synthesis and absorption. *Acta Diabetol* 2011;48(2):127-33.
104. Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, Jones PJ. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 2006;64(9):385-402.
105. Davis Jr HR, Altmann SW. Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2009;1791(7):679-83.
106. Cabral CE, Klein MR. Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol* 2017;109(5):475-82.
107. Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 1986;43(1):92-7.
108. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr* 2008;99(2):370-8.
109. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA. The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2008;197(2):883-8.
110. Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Kalimanovska-Ostic D, Djuricic I, Sobajic S, Jelic-Ivanovic Z. Can non-cholesterol sterols and lipoprotein subclasses distribution predict different patterns of cholesterol metabolism and statin therapy response? *Clin Chem Lab Med* 2017;55(3):447-57.
111. MacKay D, Jones PJ. Evaluation of methods for the determination of cholesterol absorption and synthesis in humans. *Atherosclerosis* 2011;218(2):253-62.
112. Umpleby AM. Tracing lipid metabolism: the value of stable isotopes. *J Endocrinol* 2015;226:G1-0.

113. Matthan NR, Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 2004;174(2):197-205.
114. Lütjohann D, Meese CO, Crouse JR, Von Bergmann K. Evaluation of deuterated cholesterol and deuterated sitostanol for measurement of cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res* 1993;34(6):1039-46.
115. Andrade I, Santos L, Ramos F. Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols. *Biomed Chromatogr* 2013;27(10):1234-42.
116. Kuksis A. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A* 2001;935(1-2):203-36.
117. Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S, Kerksiek A, Lövgren-Sandblom A, Geilenkeuser WJ, Ahrends R, Andrade I, Ansorena D, Astiasarán I, Baila-Rueda L. First international descriptive and interventional survey for cholesterol and non-cholesterol sterol determination by gas-and liquid-chromatography–Urgent need for harmonisation of analytical methods. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;190:115-25.
118. Mackay DS, Jones PJ, Myrie SB, Plat J, Lütjohann D. Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;957:116-22.
119. Jannetto PJ, Fitzgerald RL. Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin chem* 2016;62(1):92-8.
120. Dias DA, Koal T. Progress in metabolomics standardisation and its significance in future clinical laboratory medicine. *EJIFCC* 2016;27(4):331.
121. Greaves RF. Recent advances in the clinical application of mass spectrometry. *EJIFCC* 2016;27:264-71.
122. Huang Y, Shi R, Gee W, Bonderud R. Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. *Bioanalysis* 2012;4(3):271-9.
123. Fessler MB. The intracellular cholesterol landscape: dynamic integrator of the immune response. *Trends Immunol* 2016;37(12):819-30.
124. Platt FM, Wassif C, Colaco A, Dardis A, Lloyd-Evans E, Bembi B, Porter FD. Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014;15:173-94.
125. Simonen PP, Gylling HK, Miettinen TA. Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes care* 2002;25(9):1511-5.

126. Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO rep* 2014;15(10):1036-52.
127. Broitman SA, Cerda S. Cholesterol metabolism and colon cancer. *Prog Food Nutr Sci* 1993;17(1):1-40.
128. Motulsky AG. Genetic aspects of familial hypercholesterolemia and its diagnosis. *Arteriosclerosis* 1989;9(1 Suppl):I3-7.
129. Sansone RA. Cholesterol quandaries: Relationship to depression and the suicidal experience. *Psychiatry* 2008;5(3):22.
130. Casiglia E, Mazza A, Tikhonoff V, Scarpa R, Schiavon L, Pessina AC. Total cholesterol and mortality in the elderly. *J Intern Med* 2003;254(4):353-62.
131. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res.* 2019;9(2):219.
132. Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, Jao C, Kim Y, Liu J, Salic A. Cellular cholesterol directly activates smoothed in hedgehog signaling. *Cell* 2016;166(5):1176-87.
133. Luchetti G, Sircar R, Kong JH, Nachtergaele S, Sagner A, Byrne EF, Covey DF, Siebold C, Rohatgi R. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *Elife* 2016;5:e20304.
134. Hooper JE, Scott MP. Communicating with hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(4):306.
135. Kaneko T, Kanno C, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, Yaginuma N, Ohkoshi C, Tanaka M, Sugino T, Imura T, Hasegawa H, Chiba H. Liver X receptor reduces proliferation of human oral cancer cells by promoting cholesterol efflux via up-regulation of ABCA1 expression. *Oncotarget* 2015;6(32):33345.
136. Krycer JR, Kristiana I, Brown AJ. Cholesterol homeostasis in two commonly used human prostate cancer cell-lines, LNCaP and PC-3. *PLoS One* 2009;4(12):e8496.
137. Zahra Bathaie S, Ashrafi M, Azizian M, Tamanoi F. Mevalonate pathway and human cancers. *Curr Mol Pharmacol* 2017;10(2):77-85.
138. Chimento A, Casaburi I, Avena P, Trotta F, De Luca A, Rago V, Pezzi V, Sirianni R. Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. *Front Endocrinol* 2019; 9: 807.
139. N Apostolova S, A Toshkova R, B Momchilova A, D Tzoneva R. Statins and alkylphospholipids as new anticancer agents targeting lipid metabolism. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(12):1512-22.

140. Steck TL, Lange Y. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol.* 2010;20(11):680-7.
141. Garbarino J, Pan M, Chin HF, Lund FW, Maxfield FR, Breslow JL. STARD4 knockdown in HepG2 cells disrupts cholesterol trafficking associated with the plasma membrane, ER, and ERC. *J Lipid Res* 2012;53(12):2716-25.
142. Georgiev AG, Sullivan DP, Kersting MC, Dittman JS, Beh CT, Menon AK. Osh proteins regulate membrane sterol organization but are not required for sterol movement between the ER and PM. *Traffic* 2011;12(10):1341-55.
143. Tremblay AJ, Lamarche B, Lemelin V, Hoos L, Benjannet S, Seidah NG, Davis HR, Couture P. Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men. *J Lipid Res* 2011;52(3):558-65.
144. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS letters* 1976 Dec 31;72(2):323-6.
145. Duane WC. Effects of lovastatin and dietary cholesterol on sterol homeostasis in healthy human subjects. *J Clin Invest* 1993;92(2):911-8.
146. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013;3(3):1191-212.
147. McNamara DJ, Kolb R, Parker TS, Batwin H, Samuel P, Brown CD, Ahrens EH. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J Clin Invest* 1987;79(6):1729-39.
148. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2018 Feb 2]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Preuzeto iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
149. Antalis CJ, Buhman KK. Lipoproteins and cancer. In *Lipoproteins-Role in Health and Diseases*. 2012. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/lipoproteins-role-in-health-and-diseases/lipoproteins-and-cancer>. Preuzeto: maj 15, 2019.
150. Menard JA, Cerezo-Magana M, Belting M. Functional role of extracellular vesicles and lipoproteins in the tumour microenvironment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017;373(1737):20160480.

151. Rodriguez-Broadbent H, Law PJ, Sud A, Palin K, Tuupanen S, Gylfe A, Hänninen UA, Cajuso T, Tanskanen T, Kondelin J, Kaasinen E. Mendelian randomisation implicates hyperlipidaemia as a risk factor for colorectal cancer. *Int J Cancer* 2017;140(12):2701-8.
152. Liao F, He W, Jiang C, Yin C, Guo G, Chen X, Qiu H, Rong Y, Zhang B, Xu D, Xia L. A high LDL-C to HDL-C ratio predicts poor prognosis for initially metastatic colorectal cancer patients with elevations in LDL-C. *Onco Targets Ther* 2015;8:3135.
153. Cruz PM, Mo H, McConathy W, Sabnis NA, Lacko AG. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front Pharmacol* 2013;4:119.
154. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, Sotgia F, Lisanti MP, Frank PG. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* 2011;178(1):402-12.
155. Danilo C, Frank PG. Cholesterol and breast cancer development. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12(6):677-82.
156. Uda S, Accossu S, Spolitu S, Collu M, Angius F, Sanna F, Banni S, Vacca C, Murru E, Mulas C, Diaz G. A lipoprotein source of cholesteryl esters is essential for proliferation of CEM-CCRF lymphoblastic cell line. *Tumour Biol* 2012;33(2):443-53.
157. Rajora MA, Zheng G. Targeting SR-BI for cancer diagnostics, imaging and therapy. *Front Pharmacol* 2016;7:326.
158. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 2015;96(1):365-408.
159. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008;29(6):361-8.
160. Davey RX. Vitamin D-binding protein as it is understood in 2016: is it a critical key with which to help to solve the calcitriol conundrum? *Ann Clin Biochem* 2017;54(2):199-208.
161. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993;91(6):2552-5.

162. Mulligan GB, Licata A. Taking vitamin D with the largest meal improves absorption and results in higher serum levels of 25-hydroxyvitamin D. *J Bone Miner Res* 2010;25(4):928-30.
163. DeLuca HF, Schnoes HK. Vitamin D: recent advances. *Annu Rev Biochem* 1983;52(1):411-39.
164. Anderson PH, May BK, Morris HA. Vitamin D metabolism: new concepts and clinical implications. *Clin Biochem Rev* 2003;24(1):13.
165. Cashman KD, Hayes A, Galvin K, Merkel J, Jones G, Kaufmann M, Hoofnagle AN, Carter GD, Durazo-Arvizu RA, Sempos CT. Significance of serum 24, 25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword?. *Clinical chem* 2015;61(4):636-45.
166. Wagner D, Hanwell HE, Schnabl K, Yazdanpanah M, Kimball S, Fu L, Sidhom G, Rousseau D, Cole DE, Vieth R. The ratio of serum 24, 25-dihydroxyvitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 is predictive of 25-hydroxyvitamin D3 response to vitamin D3 supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;126(3-5):72-7.
167. van den Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S. Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14(2):159-84.
168. Wilhelm F, Mayer E, Norman AW. Biological activity assessment of the 26, 23-lactones of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 and their binding properties to chick intestinal receptor and plasma vitamin D binding protein *Arch Biochem Biophys* 1984;233(2):322-9.
169. Bogh MK, Schmedes AV, Philipsen PA, Thieden E, Wulf HC. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol* 2010;130(2):546-53.
170. Prabhu AV, Luu W, Sharpe LJ, Brown AJ. Cholesterol-mediated degradation of 7-dehydrocholesterol reductase switches the balance from cholesterol to vitamin D synthesis. *J Biol Chem* 2016;291(16):8363-73.
171. Prabhu AV, Luu W, Li D, Sharpe LJ, Brown AJ. DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production. *Prog Lipid Res* 2016;64:138-51.
172. Patwardhan VG, Khadilkar AV, Chiplonkar SA, Mughal ZM, Khadilkar VV. Varying relationship between 25-hydroxy-vitamin D, high density lipoprotein cholesterol, and serum 7-dehydrocholesterol reductase with sunlight exposure. *J Clin Lipidol* 2015;9(5):652-7.

173. Movassaghi M, Bianconi S, Feinn R, Wassif CA, Porter FD. Vitamin D levels in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A* 2017;173(10):2577-83.
174. Margolis RN, Christakos S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation: An update. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192(1):208-14.
175. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014;21(3):319-29.
176. *Encyclopedia of Endocrine Diseases, Second Edition*, editor: Ilpo Huhtaniemi. Elsevier Science Publishing Co Inc. San Diego, United States, 15 Oct 2018.
177. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):684.
178. Vallès X, Alonso MH, López-Caleya JF, Díez-Obrero V, Dierssen-Sotos T, Lope V, Molina-Barceló A, Chirlaque MD, Jiménez-Moleón JJ, Tardón GF, Castilla J. Colorectal cancer, sun exposure and dietary vitamin D and calcium intake in the MCC-Spain study. *Environ Int* 2018;121:428-34.
179. Churilla TM, Lesko SL, Brereton HD, Klem M, Donnelly PE, Peters CA. Serum vitamin D levels among patients in a clinical oncology practice compared to primary care patients in the same community: a case-control study. *BMJ open* 2011;1(2):e000397.
180. Grant WB. A review of the evidence supporting the vitamin D-cancer prevention hypothesis in 2017. *Anticancer Res* 2018;38(2):1121-36.
181. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control* 2005;16(2):83-95.
182. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30(2):113-25.
183. Lim ST, Jeon YW, Suh YJ. Association between alterations in the serum 25-hydroxyvitamin d status during follow-up and breast cancer patient prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2507-13.
184. Bauer SR, Hankinson SE, Bertone-Johnson ER, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine* 2013;92(3):123.
185. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25 (OH) D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer Suppl* 2014;110(11):2772.

186. Grant WB, Garland CF. The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res* 2006;26(4A):2687-99.
187. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, Van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Peltonen L. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet* 2010;376(9736):180-8.
188. Ng K. Vitamin D for prevention and treatment of colorectal cancer: what is the evidence? *Curr Colorectal Cancer Rep* 2014;10(3):339-45.
189. Wali RK, Baum CL, Sitrin MD, Brasitus TA. 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest* 1990;85(4):1296-303.
190. Díaz L, Díaz-Muñoz M, García-Gaytán A, Méndez I. Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. *Nutrients* 2015;7(6):5020-50.
191. Waterhouse M, Hope B, Krause L, Morrison M, Protani MM, Zakrzewski M, Neale RE. Vitamin D and the gut microbiome: a systematic review of in vivo studies. *Eur J Nutr* 2018;15:1-6.
192. Ferrer-Mayorga G, Gómez-López G, Barbáchano A, Fernández-Barral A, Peña C, Pisano DG, Cantero R, Rojo F, Muñoz A, Larriba MJ. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut* 2017;66(8):1449-62.
193. Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Arsenijevic J, Djuricic I, Sobajic S, Jelic-Ivanovic Z. Preanalytical and analytical challenges in gas chromatographic determination of cholesterol synthesis and absorption markers. *Clin Chim Acta* 2018;478:74-81.
194. Food US Drugs Administration. Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation
195. Ray U, Roy SS. Aberrant lipid metabolism in cancer cells—the role of oncolipid-activated signaling. *FEBS J* 2018;285:432-43.
196. Notarnicola M, Messa C, Caruso MG. A significant role of lipogenic enzymes in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2012;1;32:2585-90.
197. Hirsch H.A, Lliopoulos D, Joshi A, Zhang Y, Jaeger S.A, Bulyk M, Tschlis P.N, Shirley L.X, Struhl K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell* 2010;17; 348-61

198. Nagahashi M. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res* 2012;72; 726-35
199. Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:915-30.
200. Lin CJ, Lai CK, Kao MC, Wu LT, Lo UG, Lin LC, Chen YA, Lin H, Hsieh JT, Lai CH, Lin CD. Impact of cholesterol on disease progression. *Biomedicine* 2015;5.
201. Matthan NR, Resteghini N, Robertson M, Ford I, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Jukema JW, Lichtenstein AH, Schaefer EJ; PROSPER Group. Cholesterol absorption and synthesis markers in individuals with and without a CHD event during pravastatin therapy: insights from the PROSPER trial. *J Lipid Res* 2010;51:202-9
202. Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest* 2003;33:976–82
203. Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:765-9.
204. Seo HS, Choi MH. Cholesterol homeostasis in cardiovascular disease and recent advances in measuring cholesterol signatures. *J Steroid Biochem* 2015;153:72–79.
205. Lupattelli G, De Vuono S, Mannarino E. Patterns of cholesterol metabolism: pathophysiological and therapeutic implications for dyslipidemias and the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:620–27
206. Ostlund RE Jr, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:911–6.
207. Zhou W, Yang S, Wang PG. Matrix effects and application of matrix effect factor.
208. Vogeser M, C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin. Chem* 2010;1;56:1234-44.
209. Cuadros-Rodríguez L, Bagur-González MG, Sánchez-Vinas M, González-Casado A, Gómez-Sáez AM. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *J Chromatogr A* 2007;27;1158:33-46

210. McDonald JG, Smith DD, Stiles AR, Russell DW. A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma. *J Lipid Res* 2012;1;53:1399-409.
211. Jiang H, Hsu FF, Farmer MS, Peterson LR, Schaffer JE, Ory DS, Jiang X. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of very long acyl chain (C22: 0 and C24: 0) ceramides in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 2013;1;405:7357-65.
212. Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY. Methods for Monitoring ABCA1-Dependent Sterol Release. In *Cholesterol Homeostasis 2017*; 257-273). Humana Press, New York, NY.
213. Wang N, Yvan-Charvet L, Lütjohann D, Mulder M, Vanmierlo T, Kim TW, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *The FASEB J* 2008;22:1073-82
214. Karuna R, Holleboom AG, Motazacker MM, Kuivenhoven JA, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Georgopoulos S, van Eck M, van Berkel TJ, von Eckardstein A, Rentsch KM. Plasma levels of 27-hydroxycholesterol in humans and mice with monogenic disturbances of high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* 2011;1; 214:448-55.
215. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res* 2019;1;9:219-227.
216. Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr* 2005;82;6:1155–61.
217. Brown AJ, Ikonen E, Olkkonen VM. Cholesterol precursors: more than mere markers of biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol* 2014;1;25:133-9
218. Zhao L, Chen XJ, Zhu J, Xi YB, Yang X, Hu LD, Ouyang H, Patel SH, Jin X, Lin D, Wu F. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature* 2015;523:607.
219. Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 2006; 281:27816–26
220. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, Reichart D, Fox JN, Shaked I, Heudobler D, Raetz CR, Wang EW, Kelly SL, Sullards MC, Murphy RC, Merrill AH Jr, Brown HA, Dennis EA, Li AC, Ley K, Tsimikas S,

- Fahy E, Subramaniam S, Quehenberger O, Russell DW, Glass CK. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses *Cell* 2012;28;151:138-52.
221. Muse ED, Yu S, Edillor CR, Tao J, Spann NJ, Troutman TD, Seidman JS, Henke A, Roland JT, Ozeki KA, Thompson BM, McDonald JG, Bahadorani J, Tsimikas S, Grossman TR, Tremblay MS, Glass CK. Cell-specific discrimination of desmosterol and desmosterol mimetics confers selective regulation of LXR and SREBP in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115:E4680-9
222. Weiss JF, Paoletti EG, Paoletti P, Schiffer D, Fabiani A. Occurrence of desmosterol in tumors of the nervous system induced in the rat by nitrosourea derivatives. *Cancer Res* 1970;30:2107-9.
223. Irani DN. *Cerebrospinal fluid in clinical practice* e-book. Elsevier Health Sciences; 2008.
224. Muntoni S, Atzori L, Mereu R, Satta G, Macis MD, Congia M, Tedde A, Desogus A. Serum lipoproteins and cancer. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:218-25.
225. Ketomäki A, Gylling H, Siimes MA, Vuorio A, Miettinen TA. Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with and without familial hypercholesterolemia. *Pediatr. Res* 2003;53:648.
226. Porter F. D.. Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J. Clin. Invest* 2002;110: 715–724
227. Yamauchi Y, Reid PC, Sperry JB, Furukawa K, Takeya M, Chang CC, Chang TY. Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols. *J Biol Chem* 2007;282(48):34994-5004.
228. Echevarria F., Norton R., Nes W., and Lange Y. Zymosterol is located in the plasma membrane of cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem* 1990;265: 8484–89
229. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 2009;50:S15-27.
230. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123:2292-333.

231. van der Sijp MP, Bastiaannet E, Mesker WE, van der Geest LG, Breugom AJ, Steup WH, Marinelli AW, Tseng LN, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Dekker JW. Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *Int J Colorectal Dis* 2016;31:1683-91.
232. Rodríguez-Acebes S, de la Cueva P, Fernández-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasunción MA, Rawson RB, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D. Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem J* 2009;420, 305–15.
233. Cirillo F, Catellani C, Sartori C, Lazzeroni P, Amarri S, Street ME. Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play a Role?. *Int J Mol Sci* 2019;20:2922.
234. Shahjehan F, Merchea A, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Kasi PM. Body mass index and long-term outcomes in patients with colorectal cancer. *Front Oncol* 2018;8.
235. Aversa Z, Costelli P, Muscaritoli M. Cancer-induced muscle wasting: latest findings in prevention and treatment. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9:369-382
236. van Himbergen TM, Otokoza S, Matthan NR, Schaefer EJ, Buchsbaum A, Ai M, van Tits LJ, de Graaf J, Stalenhoef AF. Familial combined hyperlipidemia is associated with alterations in the cholesterol synthesis pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;1;30:113-20.
237. Simonen M, Männistö V, Leppänen J, Kaminska D, Kärjä V, Venesmaa S, Käkälä P, Kuusisto J, Gylling H, Laakso M, Pihlajamäki J. Desmosterol in human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013;58:976-82.
238. Simonen PP, Gylling H, Miettinen TA. The distribution of squalene and non-cholesterol sterols in lipoproteins in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2007;194:222-9.
239. Rashid S, Genest J. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. *Obesity* 2007;15(12):2875-88.
240. Ghaedi E, Varkaneh HK, Rahmani J, Mousavi SM, Mohammadi H, Fatahi S, Pantovic A, Darooghegi Mofrad M, Zhang Y. Possible anti-obesity effects of phytosterols and phytostanols supplementation in humans: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res* 2019;33:1246-57

241. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 2015;21:5167-75.
242. Bosner MS, Ostlund RE, Osofisan O, Grosklos J, Fritschle C, Lange LG. Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes. *Journal Lip Res* 1993;34:1047-53.
243. Dou R, Ng K, Giovannucci EL, Manson JE, Qian ZR, Ogino S. Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. *Br J Nutr* 2016;115:1643-60.
244. Andersen SW, Shu XO, Cai Q, Khankari NK, Steinwandel MD, Jurutka PW, Blot WJ, Zheng W. Total and Free Circulating Vitamin D and Vitamin D–Binding Protein in Relation to Colorectal Cancer Risk in a Prospective Study of African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26:1242-7.
245. Cross HS, Bises G, Lechner D, Manhardt T, Kállay E. The Vitamin D endocrine system of the gut--its possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:121-8.
246. Sun H, Jiang C, Cong L, Wu N, Wang X, Hao M, Liu T, Wang L, Liu Y, Cong X. CYP24A1 Inhibition Facilitates the Antiproliferative Effect of 1, 25 (OH) 2D3 Through Downregulation of the WNT/ β -Catenin Pathway and Methylation-Mediated Regulation of CYP24A1 in Colorectal Cancer Cells. *DNA Cell Biol* 2018; 37: 742-9.
247. Anderson LJ, Liu H, Garcia JM. Sex Differences in Muscle Wasting. *Adv Exp Med Biol* 2017;1043:153-97.
248. Wright TJ, Dillon EL, Durham WJ, Chamberlain A, Randolph KM, Danesi C, Horstman AM, Gilkison CR, Willis M, Richardson G, Hatch SS, Jupiter DC, McCammon S, Urban RJ, Sheffield-Moore M. A randomized trial of adjunct testosterone for cancer-related muscle loss in men and women. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018;9:482-96.
249. Kapoor D, Clarke S, Stanworth R, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2007;156:595-602.
250. Lam T, McLean M, Hayden A, Poljak A, Cheema B, Gurney H, Stone G, Bahl N, Reddy N, Shahidipour H, Birzniece V. A potent liver-mediated mechanism for loss of muscle mass during androgen deprivation therapy. *Endocr Connect* 2019;8:605-15.

251. Lam T, Poljak A, McLean M, Bahl N, Ho KK, Birzniece V. Testosterone prevents protein loss via the hepatic urea cycle in human. *Eur J Endocr* 2017;176:489-96.
252. Anic GM, Weinstein SJ, Mondul AM, Männistö S, Albanes D. Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer. *PloS one* 2014;9:e102966.
253. Jensen LL, Andersen RK, Hager H, Madsen M. Lack of megalin expression in adult human terminal ileum suggests megalin-independent cubilin/amnionless activity during vitamin B12 absorption. *Physiol Rep* 2014;2.
254. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018;50:20.
255. Šutalo N, Tomić S, Bevanda M, Dragišić V, Marijanović I, Petričević J, Mikulić I. Immunohistochemical Expression of Vitamin D Receptor in Development Stages of Colorectal Carcinoma. *Psychiatr Danub* 2017;29:855-858.
256. van Heek M, Farley C, Compton DS, et al. Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *Br J Pharmacol* 2001;134:409–417.
257. Goncalves A, Gleize B, Bott R, et al. Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption in vitro and in mice. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:S303–S311.
258. Abaza H, Ghanem A, Jmal A, Harzallah L, Rahal K, Guemira F. Changes in serum lipids in patients with colorectal cancer. *Tunis Med* 2011;89:147-50.
259. Ziętańska M, Krawczyk-Lipiec J, Kraj L, Zaucha R, Małgorzewicz S. Nutritional status assessment in colorectal cancer patients qualified to systemic treatment. *Contemp Oncol (Pozn)* 2017;21:157.
260. Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, Candeloro P, Benfante A, La Rocca R, Potze L, Marotta R, Ruffilli R, Rajamanickam VP, Malerba M. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells* 2015;33:35-44.
261. Murai T. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. *Int J Cell Biol* 2012;2012:763283.
262. Sharon C, Baranwal S, Patel NJ, Rodriguez-Agudo D, Pandak WM, Majumdar AP, Krystal G, Patel BB. Inhibition of insulin-like growth factor receptor/AKT/mammalian target of rapamycin axis targets colorectal cancer stem cells by attenuating mevalonate-isoprenoid pathway in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2015;6:15332.

263. Aguirre-Portolés C, Feliu J, Reglero G, Ramírez de Molina A. ABCA1 overexpression worsens colorectal cancer prognosis by facilitating tumour growth and caveolin-1-dependent invasiveness, and these effects can be ameliorated using the BET inhibitor apabetalone. *Mol Oncol* 2018;12:1735-52.
264. Song M, Konijeti GG, Yuan C, Ananthakrishnan AN, Ogino S, Fuchs CS, Giovannucci EL, Ng K, Chan AT. Plasma 25-hydroxyvitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study. *Cancer Prev Res* 2016;9:664-72.

Biografija autora

Sandra Vladimirov je rođena 3.10.1987. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu, a 2006. godine je upisala Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,84. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž u Centru za medicinsku biohemiju, Kliničkog Centra Srbije i položila stručni ispit za magistre farmacije - medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije 2013. godine.

Doktorske studije iz Medicinske biohemije upisala je školske 2013/2014. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2013. godine zaposlena je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“, čiji je rukovodilac Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska. Učesnik je na više međunarodnih projekata.

Kao koautor objavila je 8 radova u međunarodnim časopisima (2 rada u časopisu kategorije M21, 1 rad u časopisu kategorije M22, i 5 radova u časopisu kategorije M23). Učestvovala je sa 19 saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim i stručnim skupovima.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сандра Владимиров

Број индекса 01/13

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Испитивање биомаркера хомеостазе холестерола и
метаболизма витамина Д код пацијената са колоректалним карциномом

Ментор проф. др Весна Спасојевић-Калимановска, проф. др Александра
Зељковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 19.11.2019.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сандра Владимиров

Број индекса 01/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање биомаркера хомеостазе холестерола и метаболизма витамина Д код пацијената са колоректалним карциномом

- 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, 19.11.2019.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање биомаркера хомеостазе холестерола и метаболизма витамина Д код пацијената са колоректалним карциномом

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, 19.11.2019.

1. **Ауторство.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.