

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena M. Janać

ISPITIVANJE KVALITATIVNIH I
KVANTITATIVNIH KARAKTERISTIKA
LIPOPROTEINA VISOKE GUSTINE I NJIHOVE
POVEZANOSTI SA MARKERIMA DISLIPIDEMIJE
I METABOLIČKOG SINDROMA

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jelena M. Janać

THE ASSESSMENT OF QUALITATIVE AND
QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF
HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS AND THEIR
ASSOCIATIONS WITH MARKERS OF
DYSLIPIDEMIA AND METABOLIC SYNDROME

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Informacije o mentorima i članovima komisije za odbranu doktorske disertacije i o datumu odbrane

Mentor: prof. dr Zorana Jelić-Ivanović, profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Mentor: prof. dr Vesna Dimitrijević-Srećković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Član komisije: prof. dr Aleksandra Zeljković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Izjave zahvalnosti

Zahvaljujem prof. dr Zorani Jelić-Ivanović na mentorstvu, stručnim savetima koji su me usmerili ka boljem razumevanju biohemije, kao i na prilici da budem deo tima na Katedri za medicinsku biohemiju tokom poslediplomskih studija. Prof. dr Vesni Dimitrijević-Srećković zahvaljujem na svim profesionalnim znanjima o metaboličkom sindromu koje je podelila sa mnom i na prijateljskom odnosu tokom naše saradnje. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandi Zeljković na profesionalnosti, prilici da učim od nje i na svim stručnim savetima. Bila mi je čast i zadovoljsvo da saradujem sa njom.

Hvala svim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju na kolegijalnosti tokom mojih poslediplomskih studija. Takođe zahvaljujem zaposlenima na odeljenju C6 u okviru Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma na pomoći prilikom sakupljanja uzoraka za ovu studiju.

Zahvaljujem svojoj porodici na strpljenju i velikoj podršci.

Ispitivanje kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika lipoproteina visoke gustine i njihove povezanosti sa markerima dislipidemije i metaboličkog sindroma

Sažetak

Metabolizam, struktura i funkcionalnost lipoproteina visoke gustine (*high-density lipoproteins*-HDL) su blisko povezani. Procenom kvalitativnih karakteristika HDL čestica se može dobiti detaljniji uvid u njihovu ateroprotektivnu aktivnost. U ovom istraživanju su ispitane karakteristike HDL čestica kod metaboličkog sindroma (MS) i pridruženih stanja koja predstavljaju faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Uvid u remodelovanje HDL čestica je omogućen određivanjem relativne zastupljenosti pojedinačnih HDL subfrakcija, aktivnosti markera remodelovanja: lecitin-holesterol-acil transferaze (*lecithin-cholesterol acyltransferase*-LCAT) i holesterol-estar transfernog proteina (*cholesteryl ester transfer protein*-CETP), kao i koncentracije CETP. Antioksidativna funkcija HDL čestica je procenjena određivanjem paraoksonazne aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1) i koncentracije PON1 i paraoksonaze 3 (PON3). Stepenn oksidativne modifikacije antiaterogenih lipoproteinskih čestica je ispitan određivanjem koncentracije oksidovanog HDL (OxHDL). Dodatno su određene koncentracije serumskog amiloida A (SAA), leptina i adiponektina. Radi potvrde prisustva nealkoholne masne bolesti jetre (*non-alcoholic fatty liver disease*-NAFLD) je izračunat indeks masne jetre (*fatty liver index*-FLI). Dodatno, karakteristike HDL čestica su ispitane kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom.

Kod ispitanika sa MS su utvrđeni: dominacija manjih HDL subfrakcija, povišena aktivnost LCAT i koncentracija CETP. U grupi ispitanika sa MS su takođe uočeni povišena koncentracija OxHDL i vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol. Analizom karakteristika HDL čestica u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS je utvrđeno remodelovanje u korist povećane zastupljenosti malih HDL subfrakcija u kategorijama ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol, hipertrigliceridemijom i povećanim obimom struka. Snižena koncentracija PON3 je uočena kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol i povećanim obimom struka. Povišene vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol su utvrđene u kategorijama ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol, hipertrigliceridemijom i povišenom glukozom našte. Aktivnost LCAT je bila značajan prediktor povišenih vrednosti FLI. Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio značajan prediktor metabolički nezdravog fenotipa u kategorijama gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Korelacionom analizom u celoj grupi ispitanika je utvrđeno da je odnos leptin/adiponektin je bio u pozitivnoj korelaciji sa relativnom zastupljenošću malih HDL čestica i negativno sa koncentracijom PON3. Aktivnost LCAT je pozitivno korelirala sa koncentracijom triglicerida, relativnom zastupljenošću malih HDL čestica i odnosom leptin/adiponektin.

U ovom istraživanju su utvrđene izmenjene kvalitativne karakteristike HDL čestica kod MS i pridruženih stanja. Dominacija manjih HDL subfrakcija i povišen stepenn oksidativne modifikacije HDL čestica su pokazatelji izmenjenih kvalitativnih odlika HDL čestica u uslovima višestrukih metaboličkih faktora rizika za KVB koji su prisutni kod MS. Dokazana je pozitivna veza između aktivnosti LCAT, kao markera remodelovanja HDL čestica, sa faktorima rizika za KVB: prisustvom MS i visokim vrednostima FLI, kao surogat markerom NAFLD. Izmenjene strukturne karakteristike HDL čestica, izražene kroz povišen stepenn oksidativne modifikacije, mogu biti dodatni pokazatelj narušenog metaboličkog zdravlja gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Sve ovo pokazuje da promenjene kvalitativne osobine antiaterogenih lipoproteina kod MS i srodnih stanja mogu biti dodatni element dislipidemije i faktor rizika za razvoj kardiometaboličkih komplikacija.

Ključne reči: lipoproteini visoke gustine; metabolički sindrom; indeks masne jetre; metabolički nezdrav fenotip; lipoproteinske subfrakcije; lecitin-holesterol-acil transferaza; holesterol-estar transferni protein; paraoksonaza 1; paraoksonaza 3

Naučna oblast: medicinske nauke- farmacija

Uža naučna oblast: medicinska biohemija

Abstract

High-density lipoproteins (HDL) metabolism, structure, and functionality are interrelated. Evaluation of HDL qualitative characteristics could give a more detailed insight into its atheroprotective activity. In this study, we evaluated HDL characteristics in subjects with metabolic syndrome (MS) and related conditions associated with higher risk for cardiovascular diseases (CVD). HDL particles remodeling was evaluated by estimating the relative proportion of each HDL subfraction, the activity of remodeling markers: lecithin–cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesteryl ester transfer protein (CETP), and CETP concentration. HDL antioxidative function was assessed through the determination of paraoxonase activity of paraoxonase 1 (PON1), as well as PON1 and paraoxonase 3 (PON3) concentrations. Oxidative modification of HDL particles was estimated as oxidatively modified HDL (OxHDL) concentration. Additionally, the concentrations of serum amyloid A (SAA), leptin and adiponectin were measured. Fatty liver index (FLI) was used as a surrogate marker for the presence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In addition, HDL characteristics were evaluated in different metabolic phenotypes in the categories of overweight and obese subjects.

Domination of smaller HDL subfractions, elevated LCAT activity, and CETP concentration, as well as increased OxHDL concentration and OxHDL/HDL-cholesterol ratio, were observed in subjects with MS. The analysis of HDL characteristics in the presence of individual MS components revealed remodeling in favor of smaller HDL subfractions in subjects with low HDL-cholesterol, hypertriglyceridemia, and elevated waist circumference. We found lower PON3 concentration in subjects with low HDL-cholesterol and elevated waist circumference. Increased OxHDL/HDL-cholesterol ratio was found in subjects with low HDL-cholesterol, hypertriglyceridemia, and elevated fasting glucose. LCAT activity was positively associated with FLI. OxHDL/HDL-cholesterol ratio was a significant predictor of the metabolically unhealthy phenotype in overweight and obese subjects. In the entire group of subjects, leptin/adiponectin ratio correlated positively with the relative proportion of small HDL particles, and negatively with PON3 concentration. LCAT activity correlated positively with triglyceride concentration, relative proportion of small HDL particles, and leptin/adiponectin ratio.

In this study, altered qualitative HDL characteristics in subjects with MS and related conditions were observed. Domination of smaller HDL subfractions and increased degree of HDL oxidative modification in subjects with MS indicate impaired HDL qualitative characteristics in the presence of multiple metabolic CVD risk factors associated with the presence of MS. LCAT activity was positively associated with the CVD risk factors: the presence of MS and elevated FLI values i.e. the presence of NAFLD. Altered HDL structural features, observed as an increased degree of HDL oxidative modification, can be an additional indicator of the metabolically unhealthy phenotype of overweight and obese subjects. Altered qualitative characteristics of antiatherogenic lipoproteins may represent additional components of dyslipidemia and cardiometabolic diseases risk factor in MS and related conditions.

Keywords: high-density lipoproteins; metabolic syndrome; fatty liver index; metabolically unhealthy phenotype; lipoprotein subfractions; lecithin–cholesterol acyltransferase; cholesteryl ester transfer protein; paraoxonase 1; paraoxonase 3

Scientific field: Medical sciences – Pharmacy

Scientific subfield: Medical biochemistry

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Metabolički sindrom.....	1
1.2.	Gojaznost i disfunkcija masnog tkiva.....	2
1.2.1.	Leptin i adiponektin.....	3
1.2.2.	Metaboličke posledice disfunkcionalnosti masnog tkiva.....	3
1.2.3.	Procena statusa gojaznosti i kardiometaboličkih poremećaja.....	4
1.2.4.	Metabolički fenotipovi gojaznosti.....	5
1.3.	NAFLD.....	5
1.4.	Aterogena dislipidemija.....	6
1.5.	HDL.....	8
1.5.1.	Karakteristike HDL čestica.....	8
1.5.1.1.	Metabolizam HDL čestica.....	8
1.5.1.2.	Kvantitativne i kvalitativne karakteristike HDL čestica.....	9
1.5.2.	Markeri remodelovanja HDL čestica.....	11
1.5.2.1.	LCAT.....	11
1.5.2.2.	CETP.....	11
1.5.2.3.	PLTP.....	12
1.5.3.	Paraoksonaze.....	13
1.5.4.	Serumski amilod A.....	14
1.5.5.	Oksidovani HDL.....	14
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	16
3.	MATERIJAL I METODE.....	17
3.1.	Ispitanici.....	17
3.2.	Uzorci.....	18
3.3.	Biohemijski parametri.....	18
3.4.	Kategorizacija ispitanika na osnovu vrednosti FLI.....	18
3.5.	VAI.....	19
3.6.	Određivanje aktivnosti LCAT i CETP.....	19
3.7.	Razdvajanje HDL i LDL subfrakcija.....	20
3.8.	Određivanje koncentracije OxHDL.....	21
3.9.	Određivanje koncentracije CETP.....	22
3.10.	Određivanje koncentracije SAA.....	23
3.11.	Određivanje koncentracije PON1.....	24
3.12.	Određivanje koncentracije PON3.....	24
3.13.	Određivanje koncentracije leptina.....	25
3.14.	Određivanje koncentracije adiponektina.....	26

3.15.	Određivanje aktivnosti PON1	26
3.16.	Određivanje koncentracije LOOH	27
3.17.	Statistička analiza	28
4.	REZULTATI	29
4.1.	Osnovne karakteristike ispitanika	29
4.2.	Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika razvrstanih prema polu	30
4.2.1.	Raspodela LDL i HDL subfrakcija kod ispitanika različitog pola	33
4.2.2.	Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika različitog pola	34
4.3.	Osnovne karakteristike ispitanika razvrstanih prema prisustvu MS	35
4.3.1.	Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo MS	37
4.3.2.	Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika razvrstanih prema prisustvu MS	38
4.4.	Razlike u markerima karakteristika HDL čestica u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS	38
4.5.	Osnovne karakteristike ispitanika razvrstanih u kategorije prema FLI	46
4.5.1.	Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija između ispitanika klasifikovanih prema FLI	49
4.5.2.	Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema FLI	50
4.5.3.	Ispitivanje nezavisnog uticaja parametara uključenih u izračunavanje FLI na aktivnost LCAT	54
4.6.	Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa različitim fenotipovima metaboličkog zdravlja....	57
4.6.1.	Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom	61
4.6.2.	Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom.....	62
4.6.3.	Markeri funkcionalnosti HDL čestica kao prediktori metabolički nezdravog fenotipa	64
4.7.	Povezanost koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa antropometrijskim parametrima, biohemijskim profilom i karakteristikama lipoproteinskih čestica gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom	66
4.8.	Povezanost markera remodelovanja i antioksidativne funkcije HDL čestica sa antropometrijskim parametrima, biohemijskim profilom i karakteristikama lipoproteinskih čestica u celoj grupi ispitanika	69
5.	DISKUSIJA	74
6.	ZAKLJUČCI.....	85

Spisak skraćenica

ABCA1 – ATP vezujući kasetni transporter A1 (*ATP-binding cassette transporter A1*)

ABCG1 – ATP vezujući kasetni transporter G1 (*ATP-binding cassette transporter G1*)

ANOVA – analiza varijanse

apo AI – apolipoprotein AI

apo AII – apolipoprotein AII

apo B – apolipoprotein B

AUC – površina ispod krive (*Area Under Curve*)

CETP – holesterol-estar transferni protein (*cholesteryl ester transfer protein*)

CRP – C-reaktivni protein

EDTA – etilendiamin-tetrasirćetna kiselina (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

FLI – indeks masne jetre (*fatty liver index*)

GGE – gradijent gel elektroforeza

GGT – gama-glutamil transferaza

HbA1c – hemoglobin A1c

HDL – lipoproteini visoke gustine (*high-density lipoproteins*)

HDLR – receptori koji preuzimaju holočestice HDL

HNE – hidroksi-nonenal

HNE-HDL – HNE modifikovane HDL čestice

HOMA IR – indeks homeostatskog modela za procenu insulinske rezistencije (*homeostasis model assessment of insulin resistance*)

ITM – indeks telesne mase

KVB – kardiovaskularne bolesti

LCAT – lecitin-holesterol-acil-transferaza (*lecithin-cholesterol acyltransferase*)

LDL – lipoproteini niske gustine (*low density lipoproteins*)

LDLR – LDL receptori

LOOH – lipidni hidroperoksidi

MS – metabolički sindrom

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (*non-alcoholic fatty liver disease*)

OxHDL – oksidovani HDL

PLTP – fosfolipid transferni protein (*phospholipid transfer protein*)

PON1 – paraoksonaza 1

PON2 – paraoksonaza 2

PON3 – paraoksonaza 3

Rf – relativne migracione daljine

ROC – *Receiver Operating Characteristics*

ROS – reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*)

SAA – serumski amilod A

SD – standardna devijacija

SR-BI – receptori hvatači klase B tip I (*scavenger receptor class B Type I*)

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

VAI – indeks visceralne gojaznosti (*visceral adiposity index*)

VLDL – lipoproteini vrlo niske gustine (*very low density lipoproteins*)

1. Uvod

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2018. godine, nezarazna oboljenja su vodeći uzrok smrtnosti (1), pri čemu su se se kao najznačajniji uzročnik mortaliteta i morbiditeta u Evropi i širom sveta izdvojile kardiovaskularne bolesti (KVB) (1, 2). Faktori rizika za razvoj KVB su višestruki, međusobno povezani i uključuju nepravilan stil života i metaboličke poremećaje. Neki od najznačajnijih faktora rizika koji doprinose povišenom riziku od nastanka KVB su pušenje, nedostatak fizičke aktivnosti, neadekvatna ishrana, prekomerna telesna masa i gojaznost, povišen krvni pritisak, poremećaji metabolizma glukoze i razvoj aterogene dislipidemije (3). Metabolički poremećaji započinju znatno ranije nego manifestna KVB i na njih moguće efikasno delovati različitim preventivnim nefarmakološkim i farmakološkim merama. Imajući u vidu da su ugljeni hidrati i lipidi najznačajnije komponente energetskog metabolizma, promene koje pogađaju metaboličke puteve u kojima učestvuju ovi biomolekuli utiču na modulaciju rizika za pojavu KVB. Energetski metabolizam predstavlja jedinstvenu celinu čije su komponente međusobno povezane i uzajamno zavisne, pa su zato klinički manifestna stanja i sindromi koji obuhvataju različite aspekte metaboličkih poremećaja od posebnog interesa za procenu rizika i preduzimanje preventivnih mera u cilju sprečavanja razvoja KVB.

1.1. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MS) je progresivno patofiziološko stanje u kome se prepliću višestruki faktori rizika za razvoj KVB i tip 2 dijabetes melitusa (4, 5). Razvoj MS počiva na disfunkcionalnosti masnog tkiva, insulinskoj rezistenciji i posledičnim metaboličkim poremećajima (4, 5). Do sada je predloženo nekoliko definicija MS. Definicija predložena od strane Američkog udruženja za bolesti srca (*American Heart Association*) i Nacionalnog instituta za srce, pluća i krv (*National Heart, Lung, and Blood Institute*) iz 2005.godine se zasniva na utvrđivanju prisustva najmanje tri od pet komponenti: abdominalne gojaznosti, povišene koncentracije glukoze našte, povišene koncentracije triglicerida, snižene koncentracije holesterola u lipoproteinima visoke gustine (*high-density lipoproteins*-HDL) i povišenog krvnog pritiska (4). Sastavni elementi ovog sindroma koji nisu uključeni u formalnu definiciju su: akumulacija malih, gustih čestica lipoproteina niske gustine (*low density lipoproteins* – LDL), endotelna disfunkcija, insulinska rezistencija, proinformatorno i protrombogeno stanje (4, 5). Utvrđivanje prisustva MS je značajno pri proširenoj proceni kardiometaboličkog zdravlja, radi pravovremene intervencije koja prevashodno podrazumeva promenu stila života, a zatim i primenu lekova sa ciljem sniženja rizika od kliničkih manifestacija aterosklerotskih bolesti i tip 2 dijabetes melitusa (4). Pored definisanja prisustva MS, značaj procene njegovih individualnih komponenti je potkrepljen rezultatima studija koje su dokumentovale važnost pojedinačnih komponenti u predikciji razvoja tip 2 dijabetes melitusa (6, 7). U skladu sa tim, na osnovu dominacije različitih faktora rizika, je prepoznata raznolikost ispoljavanja MS (8).

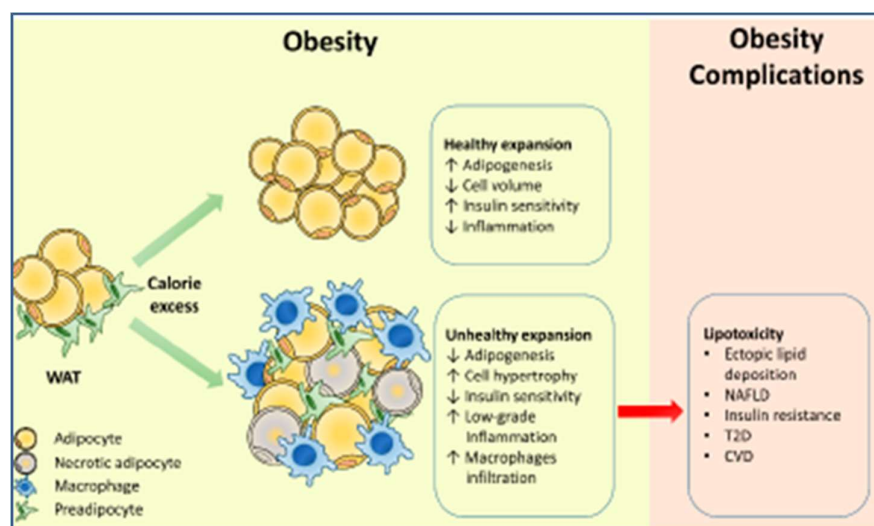
Jedan od ciljeva savremenih istraživanja u ovoj oblasti je utvrđivanje redosleda nastanka metaboličkih promena koje prethode kliničkom ispoljavanju kardiometaboličkih komplikacija. Novi modeli svrstavaju akumulaciju lipida u hepatocitima kao događaj koji prethodi razvoju ostalih metaboličkih promena (9). Deponovanje specifičnih lipida u hepatocitima i njihova intracelularna lokalizacija regulišu razvoj hepatične insulinske rezistencije (9), što posledično utiče na metabolizam glukoze i lipida (10). Zbog toga se nealkoholna masna bolest jetre (*non-*

alcoholic fatty liver disease – NAFLD) posmatra kao važan činilac MS, budući da je u vezi sa svim njegovim komponentama (11), i kao njegov mogući prethodnik (12).

Prisustvo MS i srodnih stanja je blisko povezano sa prekomernom akumulacijom lipida u organizmu koja prevashodno nastaje kao rezultat poremećaja energetskeg balansa. U tom smislu, kalorijski suficit i posledična gojaznost predstavljaju glavne precipitirajuće faktore za razvoj svih napred pomenutih komplikacija.

1.2. Gojaznost i disfunkcija masnog tkiva

Prema definiciji SZO, gojaznost karakteriše nagomilavanje masnog tkiva što može dovesti do narušavanja zdravlja (13). Patofiziološke posledice gojaznosti su u vezi sa strukturnim i funkcionalnim promenama u masnom tkivu, što uzrokuje sistemske efekte. Masa masnog tkiva zavisi od broja i veličine adipocita. Normalna funkcija adipocita pod uslovima kalorijskog suficita može biti očuvana ukoliko se ekspanzija masnog tkiva oslanja prevashodno na proces hiperplazije adipocita (14, 15). Sa druge strane, hipertrofija adipocita predstavlja osnovu disfunkcionalnosti masnog tkiva (14, 15). Povećanje veličine adipocita je praćeno akumulacijom makrofaga sa proinflamatornim fenotipom i lokalnom hipoksijom (14, 15). Na intracelularnom nivou, dolazi do poremećaja funkcije endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (*reactive oxygen species* – ROS) i razvoja insulinske rezistencije i oksidativnog stresa (16). Disfunkcionalni adipociti imaju izmenjen metabolički profil u odnosu na zdrave ćelije, što dovodi do sistemskih efekata i razvoja komplikacija gojaznosti (14-16) (slika 1).



Slika 1. Ekspanzija belog masnog tkiva u gojaznosti. Ekspanzija manifestovana kroz hipertrofiju adipocita je povezana sa razvojem metaboličkih komplikacija. Preuzeto iz: Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20: pii: E2358.

Osim sa morfološkim karakteristikama adipocita, funkcionalnost masnog tkiva je blisko povezana sa njegovom distribucijom. Rezultati Framinghamske studije su pokazali da postoji snažnija veza između zastupljenosti visceralnog masnog tkiva i nepovoljnog metaboličkog profila u poređenju sa supkutanim (17, 18). Karakteristike visceralne gojaznosti su rezistentost

na antilipolitičko delovanje insulina, infiltracija makrofaga, razvoj inflamacije niskog inteziteta i različita matrica oslobađanja adipocitokina u odnosu na supkutanu gojaznost (19, 20). Nepovoljne funkcionalne odlike visceralnih adipocita su odgovorne za razvoj metaboličkih komplikacija, u koje spada i aterogena dislipidemija (19).

1.2.1. Leptin i adiponektin

Masno tkivo sekretuje veliki broj adipocitokina koji su aktivni učesnici u regulaciji metabolizma. Poremećaj koncentracije i delovanja adipocitokina direktno dovodi do razvoja metaboličkih komplikacija u gojaznosti (21). Do sada je opisan mehanizam delovanja više vrsta adipocitokina, pri čemu su najviše izučavani leptin i adiponektin. Leptin je peptid koji se sintetiše u najvećoj meri u masnom tkivu (22). Koncentracija leptina u krvi je direktno u korelaciji sa energetske statusom osobe, odnosno sa stepenom uhranjenosti (22). Ovaj adipocitokin svoje efekte ostvaruje putem sopstvenih specifičnih receptora. U centralnom nervnom sistemu leptin utiče na energetske homeostazu i neuroendokrinu funkciju. Efekti koji se tiču energetske homeostaze se ostvaruju putem stimulacije osećaja sitosti i smanjenjem potrebe za unosom hrane, kao i kroz regulaciju potrošnje energije (22). Dodatno, leptin direktno utiče na metabolizam glukoze i lipida: poboljšava osetljivost na insulin i stimuliše preuzimanje glukoze od strane perifernih tkiva, inhibira ekspresiju gena za insulin, te stimuliše lipolizu i oksidaciju masnih kiselina u adipocitima, jetri i mišićnom tkivu (22). Kod gojaznih osoba je prisutna hiperleptinemija, u stepenu koji je proporcionalan sadržaju masnog tkiva (22, 23). Hiperleptinemija je praćena izostankom efekata ovog adipocitokina, odnosno razvija se rezistencija na leptin (22, 23). Još uvek nije sa sigurnošću utvrđena kritična tačka koja dovodi do razvoja rezistencije, ali je predloženo nekoliko mehanizama koji uključuju nemogućnost leptina da prođe kroz krvno-moždanu barijeru, ali i nedostatak dejstva leptina na ciljna tkiva, bilo zbog inhibicije leptinskog signalnog puta u neuronima, bilo zbog nishodne regulacije receptora ili poremećaja u intracelularnim signalnim putevima (23). Posledično, kod rezistencije na leptin izostaju efekti leptina na homeostazu energetskeg metabolizma (23).

Adiponektin se sintetiše isključivo u masnom tkivu (24). Deluje putem adiponektinskih receptora: AdipoR1 koji je najzastupljeniji u skeletnim mišićima i AdipoR2 koji je prevashodno ekspresiran u jetri (25). Na homeostazu glukoze utiče stimulacijom preuzimanja i korišćenja glukoze od strane skeletnih mišića i adipocita, kao i poboljšanjem insulinske osetljivosti u jetri i skeletnim mišićima (24). Povoljni efekti adiponektina na lipoproteinski profil se ispoljavaju kao povišena koncentracija HDL-holesterola i sniženje koncentracije triglicerida, usled stimulacije katabolizma lipoproteina koji su bogati trigliceridima (24). Adiponektin povoljno utiče na metabolizam HDL čestica, kroz regulaciju biogeneze i katabolizma ove klase lipoproteina (26). Antiaterogeni efekti ovog adipocitokina se ostvaruju i drugim mehanizmima, kao što su poboljšanje endotelne funkcije, antiinflamatorno dejstvo, stimulacija metaboličkih puteva koji vode ka povećanom preuzimanju holesterola iz makrofaga, kao i inhibitorni efekti na akumulaciju lipida u makrofagama i na formiranje penastih ćelija (24-26). Visceralni tip gojaznosti je udružen sa sniženom koncentracijom adiponektina i izostankom njegovih povoljnih efekata na metabolički profil (19).

1.2.2. Metaboličke posledice disfunkcionalnosti masnog tkiva

Hipertrofirani adipociti i infiltrirane makrofage su izvor citokina koji učestvuju u razvoju lokalne i sistemske inflamacije, insulinske rezistencije i endotelne disfunkcije (20). Promene u sintezi adipocitokina koje su tipične za disfunkcionalne adipocite, doprinose razvoju

inflamatornog okruženja. (16, 20). Hipertrofirani adipociti su značajan izvor ROS i imaju smanjenu antioksidativnu zaštitu. Dodatno, sistemski poremećaji koji nastaju kao posledica gojaznosti doprinose razvoju oksidativnog stresa (27, 28). Pod uslovima povećanog stvaranja slobodnih radikala dolazi do procesa lipidne peroksidacije. Lipidni hidroperoksidi (LOOH) se u seriji lančanih reakcija prevode u visoko reaktivne proizvode koji se vezuju za proteinske i lipidne strukture u organizmu i menjaju njihove osobine i metabolizam (29, 30). Disfunkcionalni adipociti imaju povišenu lipolitičku aktivnost i oslobađaju velike količine slobodnih masnih kiselina. Posledično, lipidi se deponuju u neadipoznim tkivima i narušavaju njihovu funkciju u procesu koji se označava kao „lipotoksičnost” (15).

Novonastalo nepovoljno metaboličko okruženje dovodi do sistemskih posledica. Narušena homeostaza glukoze nastaje kao posledica razvoja insulinske rezistencije u adipocitima, jetri i skeletnim mišićima i oštećenja beta ćelija pankreasa (15, 16, 31), što je povezano sa razvojem tip 2 dijabetes melitusa (32). Povišen rizik od KVB nastaje kao rezultat dislipidemije, narušene endotelne funkcije, inflamacije, i insulinske rezistencije (15, 33). NAFLD je još jedna od čestih komplikacija gojaznosti, odnosno disfunkcionalnosti masnog tkiva (15).

1.2.3. Procena statusa gojaznosti i kardiometaboličkih poremećaja

Cilj procene statusa gojaznosti jeste da se dobije uvid u stepen rizika od nastanka komplikacija koje su povezane sa ovim stanjem, uključujući i KVB. Klasifikacija gojaznosti koju je predložila SZO se zasniva na primeni indeksa telesne mase (ITM) (13). Na osnovu klasifikacije SZO, ispitanici sa $25,0 \leq \text{ITM} < 30,0$ pripadaju kategoriji osoba sa prekomernom telesnom masom, dok ispitanici sa $\text{ITM} \geq 30,0$ pripadaju kategoriji gojaznih osoba (13). Međutim, kategorizacija ispitanika na osnovu ITM ne odlikava adekvatno kardiometabolički profil (34). Da bi se procenila distribucija masnog tkiva, u rutinskoj praksi se koristi merenje obima struka (4, 5, 13). Nedostatak ovog antropometrijskog parametra je nemogućnost pouzdanog razlikovanja visceralne od supkutane gojaznosti (8, 12). Novije smernice preporučuju korišćenje naprednijih alata, kao što su *imaging* tehnike, radi uvida u regionalnu distribuciju masnog tkiva (8, 19).

Ispitivanje metaboličkog profila je od značaja za pravilnu procenu rizika od nastanka komplikacija povezanih sa gojaznošću. Definisanje prisustva MS je zasnovano na proceni prisustva centralne gojaznosti i metaboličkih poremećaja (4). Danas se za procenu metaboličkog profila koriste i različiti indeksi izvedeni iz antropometrijskih i biohemijskih parametara. Prednost ovakve procene ispitanika je mogućnost dobijanja informacija o prisustvu i stepenu različitih metaboličkih poremećaja na neinvazivan način. Jedan od takvih indeksa je indeks visceralne gojaznosti (*visceral adiposity index* – VAI) čiju je vrednost moguće izračunati pomoću polno-specifičnih matematičkih modela koje uključuju ITM, obim struka, koncentraciju triglicerida i HDL-holesterola (35). Na osnovu vrednosti VAI je moguće proceniti kategoriju disfunkcije masnog tkiva (35). Konačno, u upotrebi su različiti biomarkeri koji bi trebalo da pruže uvid u mehanizam razvoja poremećaja povezanih sa gojaznošću. Do sada su korišćeni parametri koji odlikavaju homeostazu glukoze, lipida i proteina, markeri inflamacije i funkcionalnosti masnog tkiva (36). Novi biomarkeri bi trebalo da omoguće potpunije razumevanje razvoja patofizioloških posledica gojaznosti, što bi moglo imati primenu u proceni rizika, skriningu, dijagnozi i prognozi kardiometaboličkih bolesti (36).

1.2.4. Metabolički fenotipovi gojaznosti

Gojazne i osobe sa prekomernom telesnom masom ne čine homogenu grupu u smislu razvijanja metaboličkih poremećaja. Naime, uočeno je da pojedinci imaju povoljan lipidni profil, očuvanu insulinsku osetljivost i funkciju jetre, kao i niži stepen inflamacije u odnosu na osobe iste kategorije uhranjenosti koje su razvile metaboličke poremećaje karakteristične za višak telesne mase i gojaznost (37, 38). Zbog toga je uveden koncept prema kojem se gojazne i osobe sa prekomernom telesnom masom mogu klasifikovati na nosioce metabolički zdravog ili nezdravog fenotipa.

Kod gojaznih ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom je dokazan povećan intrahepatični sadržaj triglicerida i veća debljina intime-medije karotidne arterije (39), nepovoljniji profil cirkulišućih imunskih ćelija (40), poremećaj metabolizma glukoze (41), te veći stepen oksidativnog stresa (42) i inflamacije (43) u odnosu na gojazne ispitanike sa metabolički zdravim fenotipom. Prisustvo metaboličkih abnormalnosti kod metabolički nezdravog fenotipa predstavlja osnovu povišenog rizika za nastanak KVB i tip 2 dijabetes melitusa (44, 45). Do sada nije razvijena opšteprihvaćena definicija ovog termina (37, 44, 46). U cilju pravilne identifikacije osoba koje nisu pod povišenim rizikom za razvoj KVB, Eckel i saradnici su predložili definisanje metabolički zdravog fenotipa u gojaznosti na osnovu odsustva povišenog krvnog pritiska, dislipidemije i hiperglikemije (46).

Istraživanjem mehanizama koji uslovljavaju razlike između metaboličkih fenotipova u gojaznosti je utvrđeno da je kapacitet adipogeneze jedan od najznačajnijih faktora koji određuje razvoj metaboličkih komplikacija (14-16, 47). Zdrava ekspanzija masnog tkiva, pod uslovima kalorijskog suficita, podrazumeva očuvanu sposobnost adipogeneze koja rezultuje stvaranjem novih adipocita, normalne veličine i očuvane funkcije. Nedovoljan kapacitet adipogeneze vodi ka drugačijem tipu adaptacije, odnosno dolazi do hipertrofije adipocita koja je praćena poremećajem funkcije ovih ćelija i razvojem metaboličkih komplikacija (14-16, 47). Kao dodatni faktori rizika povezani sa razvojem metabolički nezdravog fenotipa su predloženi sastav i aktivnost intestinalne mikrobiote (38), deficit vitamina D (48), stil života, starija životna dob i pušenje (49-51). Jedna od metaboličkih abnormalnosti koja može doprineti povišenom riziku od KVB kod metabolički nezdravog fenotipa je razvoj nepovoljnijeg lipidnog profila (37). Imajući u vidu da novije smernice u oblasti ispitivanja aterosklerotskih KVB naglašavaju značaj procene funkcionalnosti HDL čestica (52-54), procena kvalitativnih karakteristika HDL bi mogla da pruži dodatne informacije o mogućim mehanizmima koji prave razliku između metaboličkih fenotipova.

U prilog tome da su potrebna detaljnija ispitivanja u ovoj oblasti govore rezultati većeg broja studija koji su pokazali da metabolički zdrav fenotip nije postojana kategorija kod značajnog broja ispitanika u dužem vremenskom periodu (55-57). Da bi se razjasnila priroda metaboličkog zdravlja potrebno je definisati činioce koji stvaraju predispoziciju, odlažu ili štite gojazne osobe od razvoja metaboličkih poremećaja (46).

1.3. NAFLD

NAFLD je najčešća bolest jetre u razvijenom delu sveta. Uključuje različite patološke forme: od nealkoholne masne jetre do nealkoholnog steatohepatitisa, sa komplikacijama kao što su fibroza, ciroza i razvoj hepatocelularnog karcinoma (11). NAFLD podrazumeva prisustvo hepatične steatoze koja je dokazana histološki ili *imaging* tehnikama, pri čemu su isključeni drugi uzroci koji mogu uticati na razvoj ovakvih promena, kao što su alkoholizam,

steatogeni lekovi i nasledni poremećaji (11, 58). Iako je biopsija zlatni standard u dijagnostici NAFLD, klinički vodiči preporučuju upotrebu različitih neinvazivnih metoda u rutinskoj praksi, pri čemu se prednost daje *imaging* tehnikama, kao što je ultrazvuk (11). U evropskom kliničkom vodiču za NAFLD se kao prihvatljiva alternativa za utvrđivanje prisustva steatoze navodi upotreba validiranih serumskih biomarkera i indeksa (11), kao što je indeks masne jetre (*fatty liver index* – FLI). FLI predstavlja složeni algoritam izveden iz antropometrijskih i biohemijskih parametara (59) koji je moguće koristiti kao surogat za procenu sadržaja lipida u jetri (60).

Glavni faktori rizika za razvoj ovog oboljenja su visokokalorijska ishrana neadekvatnog sastava i nedostatak fizičke aktivnosti. NAFLD je udružena sa insulinskom rezistencijom, osim u manjem broju slučajeva u kojima je genetska osnova odgovorna za razvoj steatoze (11). Disfunkcionalnost masnog tkiva predstavlja podlogu za razvoj ovog stanja: zbog povišene lipolitičke aktivnosti hipertrofiranih adipocita raste koncentracija slobodnih masnih kiselina u portalnoj cirkulaciji, što je praćeno njihovim preuzimanjem i esterifikacijom u hepatocitima (10). Paralelno sa akumulacijom triglicerida, funkcija hepatocita se narušava usled lipotoksičnosti: razvijaju se stres endoplazmatskog retikuluma i mitohondrijalna disfunkcija što za posledicu ima povećanu produkciju ROS (10). Pored oksidativnog stresa, u jetri se razvijaju inflamacija i insulinska rezistencija (10). Hipertrofirani adipociti doprinose razvoju ovih procesa sintezom proinflamatornih citokina i promenjenim obrascem sekrecije adipocitokina. Hiperleptinemija može doprineti razvoju hepatične fibroze, kao što je pokazano na životinjskim modelima (61). Zbog sniženih koncentracija adiponektina izostaje njegovo antiinflamatorno i antifibrozo dejstvo, kao i povoljni efekti na hepatičnu insulinsku osetljivost (68). U razvoju ovih patoloških procesa učestvuju i drugi činioci, kao što su specifični nutrijenti i intestinalna mikrobiota (10, 61).

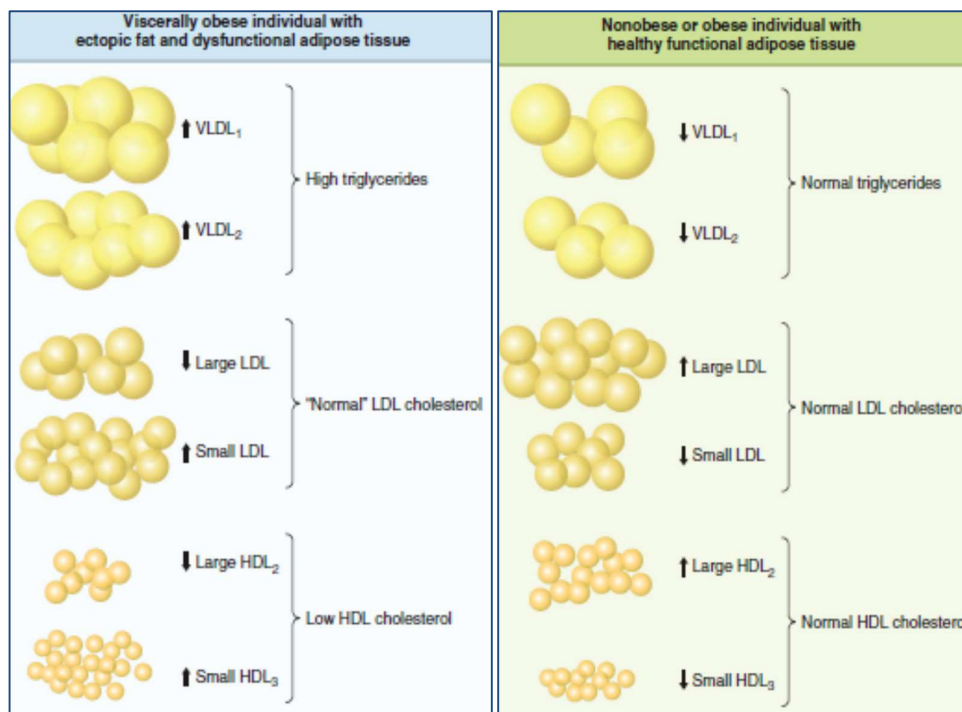
Budući da je jetra centralni regulatorni organ u metabolizmu ugljenih hidrata i lipida, posledice ovih procesa se ispoljavaju kroz izmenjeni biohemijski profil. Zbog hepatične insulinske rezistencije, razvija se hiperglikemija i kompezatorna hiperinsulinemija (10). Kao odgovor na akumulaciju triglicerida, povećava se hepatična sekrecija lipoproteina vrlo niske gustine (*very low density lipoproteins* – VLDL). Zbog uticaja insulinske rezistencije na metabolizam lipoproteina, kao i zbog razmene sadržaja između lipoproteina u cirkulaciji, razvija se aterogena dislipidemija (10). Sa razvojem metaboličkih poremećaja dolazi do porasta rizika od KVB i tip 2 dijabetes melitusa (11). Snižena koncentracija HDL-holesterola je jedna od komponenata aterogenog lipidnog profila kod NAFLD (10). Novije smernice u oblasti ispitivanja svojstava HDL čestica preporučuju procenu kvalitativnih karakteristika HDL radi sveobuhvatnijeg uvida u ateroprotektivne osobine ove klase lipoproteina (54). S obzirom na to da se deo konstituenata odgovornih za funkcionalnost i metabolizam HDL čestica sintetiše u jetri, ispitivanje kvalitativnih karakteristika ovog lipoproteina kod NAFLD bi moglo da pruži značajne informacije o antiaterogenim svojstvima HDL čestica u ovoj kategoriji ispitanika.

1.4. Aterogena dislipidemija

Jedan od karakterističnih metaboličkih poremećaja koji prati gojaznost je i razvoj aterogene dislipidemije (4). Disfunkcionalnost masnog tkiva i pridruženi poremećaji direktno utiču na metabolizam lipoproteina (19, 21, 62). Aterogena dislipidemija karakteristična za disfunkcionalnost masnog tkiva se manifestuje kao hipertrigliceridemija, snižena koncentracija HDL-holesterola i prisustvo malih, gustih LDL čestica (slika 2). Hipertrigliceridemija je osnovna manifestacija poremećaja metabolizma lipoproteina i nastaje kao posledica:

- povišene lipolitičke aktivnosti disfunkcionalnog masnog tkiva i povećanog priliva slobodnih masnih kiselina u jetru. Sintetisani trigliceridi se deponuju intracelularno ili ugrađuju u velike VLDL čestice koje se sekretuju u cirkulaciju (19, 21).
- snižene aktivnosti lipoproteinske lipaze, enzima koji hidrolizuje trigliceride, u uslovima insulinske rezistencije (19, 21).

Kao rezultat ovih promena u metabolizmu, dolazi do porasta koncentracije VLDL čestica i ostataka hilomikrona u cirkulaciji (19, 62). Lipoproteini bogati trigliceridima razmenjuju trigliceride u zamenu za estre holesterola iz LDL i HDL posredstvom holesterol-estar transfernog proteina (*cholesteryl ester transfer protein* – CETP) (19, 62). LDL i HDL izmenjenog sadržaja su supstrati hepatične lipaze, koja hidrolizuje trigliceride u ovim lipoproteinima, zbog čega se smanjuje veličina ovih čestica (19, 62). Takođe, ostaci hilomikrona i VLDL čestica imaju proaterogeni potencijal (19, 62). Novonastale promene u metabolizmu lipoproteina i nastanak aterogene dislipidemije predstavljaju osnovu za razvoj aterosklerotskih promena i KVB.



Slika 2. Lipoproteinski profil osoba sa funkcionalnim i disfunkcionalnim masnim tkivom. Preuzeto iz: Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93:359-404.

Povišen stepen aterogenosti malih, gustih LDL počiva na njihovim izmenjenim karakteristikama u odnosu na veće čestice. Zbog svoje veličine lakše prodiru u intimu arterija od većih čestica (62, 63). Promena konformacije apolipoproteina B (apo B) na malim, gustim LDL ima za posledicu snižen afinitet za LDL receptor (62). Zbog produženog poluzivota u cirkulaciji, smanjenog sadržaja antioksidanasa i površinske orijentacije polinezasićenih masnih kiselina, male, guste LDL čestice su podložne oksidativnim modifikacijama (62, 63). LDL čestice izmenjenih fizičko-hemijskih karakteristika imaju visok afinitet za *scavenger* receptore na makrofagama, što vodi ka transformisanju ovih ćelija u penaste i doprinosi razvoju

aterosklerotskih promena (62, 63). Oksidovani LDL učestvuje u razvoju ateroskleroze i drugim mehanizmima: uključen je u razvoj endotelne disfunkcije, oslobađanje inflamatornih citokina i nastanak oksidativnog stresa (62). Ukupno, disfunkcija masnog tkiva ima složen uticaj na metabolizam i karakteristike lipoproteinskih čestica, što rezultuje razvojem aterogene dislipidemije koja doprinosi povišenom riziku od razvoja aterosklerotskih KVB.

1.5. HDL

Antiaterogena svojstva HDL čestica se pripisuju pre svega njihovoj sposobnosti da učestvuju u reverznom transportu holesterola, procesu u kome preuzimaju holesterol iz perifernih ćelija i makrofaga u intimi arterija i transportuju ga do jetre, gde se konvertuje u žučne kiseline i delom izlučuje iz organizma (64). Pored toga, HDL čestice ostvaruju ateroprotektivno delovanje i drugim mehanizmima koji uključuju antioksidativnu, antiinflamatornu, citoprotektivnu, vazodilatatornu, antitrombotičku i antiinfektivnu funkciju (64). Ovaj lipoprotein privlači sve veću pažnju u kontekstu kardiometaboličkih poremećaja, s obzirom da njegov kompleksan sastav trpi mnogobrojne promene u nepovoljnom metaboličkom okruženju, što kao posledicu ima smanjen funkcionalni kapacitet. Gubitkom funkcionalnih svojstava, HDL čestice nisu više sposobne za vršenje kardioprotektivnih uloga čime se osnovni metabolički poremećaj dalje pogoršava i na taj način se formira začarani krug koji ubrzava razvoj KVB.

1.5.1. Karakteristike HDL čestica

HDL čestice su sfernog ili diskoidalnog oblika i imaju najveći sadržaj proteina, u poređenju sa drugim klasama lipoproteina (64). Najznačajniji strukturni proteini su apolipoproteini AI (apo AI) i AII (apo AII) (64). U sastav HDL čestica ulaze i različiti enzimi: lecitin-holesterol-acil-transferaza (*lecithin-cholesterol acyltransferase* – LCAT), paraoksonaze, fosfolipaza A2 udružena sa lipoproteinima i glutation selenoperoksidaza (20). Analizom proteoma i lipidoma HDL čestica, identifikovano je više desetina različitih proteina i više od 200 vrsta lipida (64). Dodatno, mikroRNK koji ulaze u sastav HDL su predložene kao nova klasa biomarkera KVB zbog uticaja na metabolizam samih HDL, ali i uticaja na ekspresiju gena u različitim tipovima ćelija (64, 65).

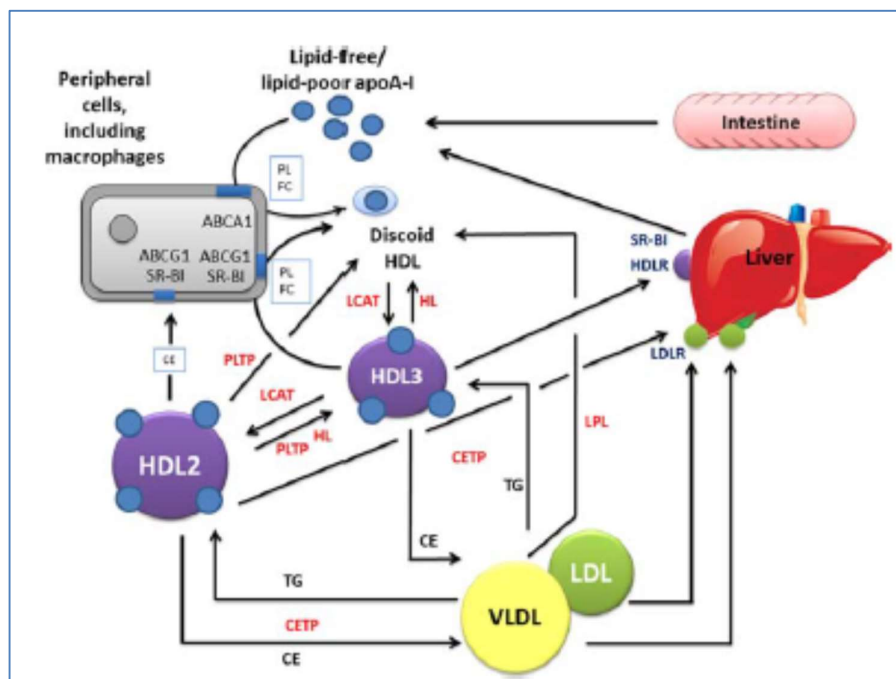
Heterogenost HDL čestica ogleda se i u različitoj veličini cirkulišućih subpopulacija. Diskoidne HDL čestice imaju prečnik ≤ 8 nm, sačinjene su prevashodno od apo AI i sadrže malu količinu lipida (slobodnog holesterola i fosfolipida, sadržaj lipida je $\leq 30\%$) (64). Sferne HDL su veće i imaju hidrofobno jezgro sačinjeno od estara holesterola i triglicerida (64).

1.5.1.1. Metabolizam HDL čestica

Nascentni prekursori HDL čestica siromašni lipidima se sintetišu u jetri i intestinumu. Ove čestice preuzimaju slobodan holesterol i fosfolipide posredstvom ATP vezujućeg kasetnog transportera A1 (*ATP-binding cassette transporter A1* – ABCA1) koji se nalazi na membranama perifernih ćelija, pri čemu se konvertuju u diskoidne HDL (64). Sazrevanje HDL čestica je takođe omogućeno preuzimanjem površinskih komponenti lipoproteina bogatih trigliceridima koji se oslobađaju u toku procesa hidrolize triglicerida delovanjem lipoproteinske lipaze (66). Tokom ovog procesa se smanjuje veličina lipoproteina koji podležu hidrolizi i višak površinskih komponenti (slobodni holesterol, fosfolipidi, apolipoproteini) se inkorporira u

HDL čestice (64, 66). Slobodni holesterol u diskoidnim HDL česticama se esterifikuje posredstvom LCAT (54). Estri holesterola zbog nepolarosti se pomeraju ka jezgri čestice, što omogućava rast diskoidnih HDL do HDL 3 i velikih sfernih HDL 2 (64). U daljem remodelovanju površinskih komponenti HDL posreduje fosfolipid transferni protein (*phospholipid transfer protein* – PLTP) (64). HDL 2 i HDL 3 imaju sposobnost preuzimanja holesterola: jednosmernim ATP-zavisnim procesom posredstvom ATP vezujućeg kasetnog transportera G1 (*ATP-binding cassette transporter G1* – ABCG1) i posredstvom receptora hvatača klase B tip I (*scavenger receptor class B Type I* – SR-BI), koji je ATP-nezavisan (64).

HDL 2 se mogu konvertovati u male HDL 3 kroz nekoliko metaboličkih puteva: CETP posredovanim transferom estara holesterola sa HDL na lipoproteine koji sadrže apo B, selektivnim preuzimanjem estara holesterola iz HDL čestica putem SR-BI receptora u jetri i steroidogenim organima i putem hidrolize triglicerida i fosfolipida na HDL česticama posredstvom hepatične i endotelne lipaze (64). Lipidi iz HDL čestica podležu katabolizmu prevashodno u jetri. U ćelije jetre dospevaju na nekoliko načina: putem SR-BI receptora, CETP posredovanim prenosom na VLDL i LDL čestice i uklanjanjem LDL čestica iz cirkulacije vezivanjem za specifične LDL receptore (LDLR) ili putem receptora koji preuzima holočestice HDL (HDLR) (64). Šema metabolizma HDL čestica je prikazana na slici 3.

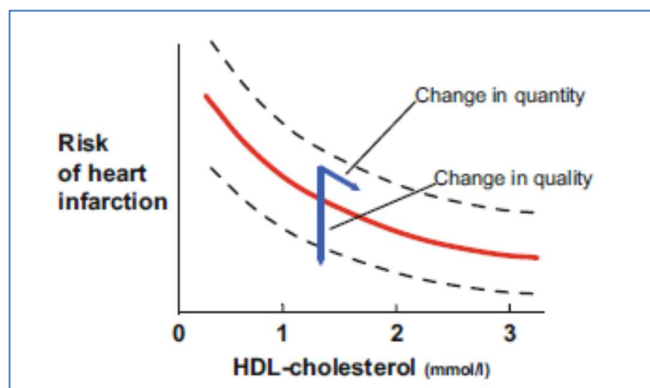


Slika 3. Remodelovanje i metabolizam HDL čestica u cirkulaciji. Preuzeto iz: Rached FH, Chapman MJ, Kontush A. HDL particle subpopulations: Focus on biological function. Biofactors. 2015;41:67-77.

1.5.1.2. Kvantitativne i kvalitativne karakteristike HDL čestica

Klinički vodiči svrstavaju nisku koncentraciju HDL-holesterola u faktore rizika za razvoj KVB (67). Detaljnija istraživanja u ovoj oblasti su dovela u pitanje pristup po kome je za procenu kardiovaskularnog rizika dovoljan uvid samo u koncentraciju HDL-holesterola, bez procene funkcionalnih karakteristika HDL čestica (68). Budući da se proteom, lipidom i metabolizam HDL menja kod različitih poremećaja, ispitivanje kvalitativnih svojstava HDL

čestica bi trebalo da omogućiti bolji uvid u ateroprotektivnu funkciju ove klase lipoproteina (slika 4) (54).



Slika 4. Povezanost koncentracije HDL-holesterola i rizika od infarkta miokarda. Crvena linija predstavlja prosečan rizik od infarkta miokarda u zavisnosti od koncentracije HDL-holesterola. Dosadašnji terapijski pristupi su imali za cilj povišenje koncentracije HDL-holesterola (strelica usmerena nadole udesno). Novija shvatanja ukazuju na značaj promene kvaliteta HDL čestica (strelica usmerena nadole). Preuzeto iz Savolainen MJ. Epidemiology: disease associations and modulators of HDL-related biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:259-283.

Razlike u biološkoj aktivnosti subpopulacija HDL čestica počivaju na raznovrsnosti njihovih fizičkih i hemijskih karakteristika. Da bi se dobio uvid u heterogenost HDL populacije koriste se različite metode koje imaju za cilj procenu fizičko-hemijskih osobina, sastava i funkcionalnih karakteristika.

Ultracentrifugiranje se smatra zlatnim standardom u domenu razdvajanja HDL subfrakcija. Dve glavne subpopulacije se razdvajaju ovom metodom: velike, lipidima bogate HDL 2 (gustina: 1,063-1,125 g/mL) i manje, gušće HDL 3 čestice bogatije proteinima (gustina: 1,125-1,210 g/mL). Nedenaturišućom gradijent gel elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (GGE) se postiže separacija HDL u 5 subfrakcija: HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c, od najveće ka najmanjoj. Ekvivalentno razdvajanje se postiže izopikničkim ultracentrifugiranjem u gradijentu gustine. Na agaroznom gelu, HDL čestice migriraju na osnovu razlike u površinskom naelektrisanju i obliku i razdvajaju se u 2 frakcije: α , sferne čestice koje čine najveći udeo cirkulišućih HDL i pre β čestice, koje čine nascentne i HDL čestice siromašne lipidima. Kombinacijom GGE i elektroforeze na agarozu se postiže dvodimenzionalna separacija HDL u 12 različitih subfrakcija. Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija omogućava određivanje koncentracije velikih, intermedijernih i malih HDL čestica. Heterogenost populacije HDL čestica se može proceniti korišćenjem različitih imunoloških tehnika koje uključuju korišćenje antitela specifično usmerenih protiv određenih proteinskih komponenti, što omogućava razdvajanje lipoproteinskih subfrakcija na osnovu proteinskog sastava (64, 69).

Pod normalnim metaboličkim uslovima, biološka aktivnost HDL se oslanja pre svega na aktivnost malih subfrakcija (64). Male HDL subfrakcije koje postaju dominantne kod različitih metaboličkih poremećaja, uključujući i poremećaje koji se javljaju u sklopu disfunkcionalnosti masnog tkiva, imaju izmenjen proteom, lipidom i funkcionalnost u odnosu na male HDL čestice kod zdravih osoba (70-72). Analiza zastupljenosti subfrakcija HDL predstavlja jedan od osnovnih alata u kvalitativnoj proceni HDL (54). Kao sledeći korak u

ispitivanju karakteristika HDL čestica je na raspolaganju široka paleta parametara koji omogućavaju uvid u sastav, metabolizam i funkcionalna svojstva HDL (54). Zajedno, ove analize bi trebalo da omoguće uvid u povezanost strukture, metabolizma i funkcije HDL čestica.

1.5.2. Markeri remodelovanja HDL čestica

1.5.2.1. *LCAT*

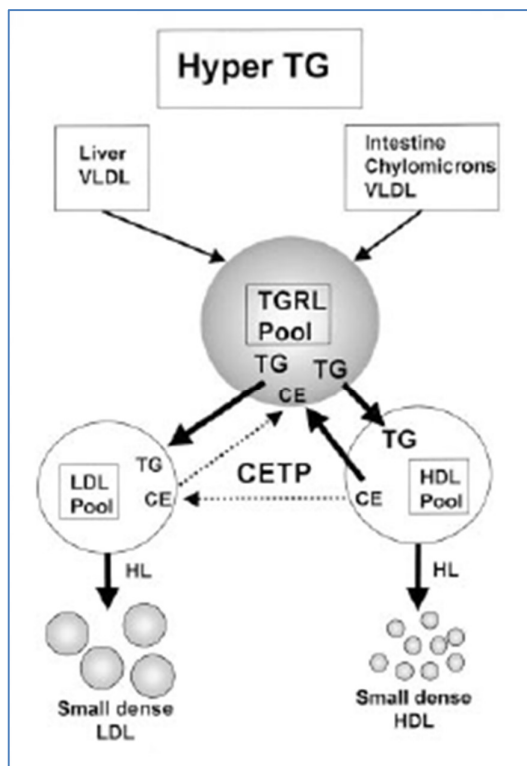
LCAT se kod ljudi sintetiše prevashodno u jetri, a u manjoj meri u testisima i mozgu (73). U cirkulaciji se vezuje za lipoproteine, pre svega za HDL čestice. Najznačajniji aktivator *LCAT* je apo AI. *LCAT* katalizuje reakciju transfera masne kiseline sa sn-2 pozicije fosfatidilholina (lecitina) na slobodnu hidroksilnu grupu holesterola. Sinteza estara holesterola u cirkulaciji se odvija prevashodno putem ove reakcije. *LCAT* omogućava rast i remodelovanje HDL obogaćivanjem njihovog jezgra estrima holesterola, pri čemu je aktivnost ovog enzima u inverznom odnosu sa veličinom HDL čestica (73).

Uprkos značajnoj ulozi *LCAT* u metabolizmu antiaterogenog HDL, postoje brojni dokazi koji ne samo da koji dovode u pitanje ateroprotektivnu funkciju *LCAT*, već karakterišu ovaj enzim kao proaterogeni činilac (73-75). Povišena aktivnost *LCAT* je dokazana kod ispitanika sa MS (76, 77) i u korelaciji je sa debljinom intime medije karotidne arterije (76). Detaljnija istraživanja u oblasti metabolizma lipoproteina su pokazala vezu između povišene aktivnosti *LCAT* i dominacije malih LDL čestica (78, 79). Studije na životinjskim modelima su pokazale povezanost *LCAT* sa nelipidnim faktorima rizika, kao što su insulinska rezistencija, razvoj gojaznosti i hepatični metabolizam triglicerida (75). Osim toga, iz rezultata prospektivnih studija koje su se bavile ispitivanjem povezanosti *LCAT* i koronarnih događaja je proisteklo pitanje polno specifičnih razlika u efektima *LCAT* (80, 81). Naime, aktivnost i koncentracija *LCAT* su bili u pozitivnoj vezi sa razvojem koronarne srčane bolesti kod žena (80, 81), dok kod muškaraca ta veza nije bila statistički značajna (80), ili je u drugoj studiji čak imala suprotan trend (81). Takođe, povišena aktivnost *LCAT* je bila pozitivan prediktor razvoja tip 2 dijabetes melitusa samo kod muškaraca (82). Razlike između polova u povezanosti *LCAT* sa metaboličkim efektima su pokazane i na životinjskom modelima (83). Ipak, tačna priroda veze između *LCAT* i različitih lipidnih i nelipidnih faktora rizika za KVB i moguće polno specifične razlike u ovim efektima kod ljudi još uvek nisu rasvetljene.

1.5.2.2. *CETP*

CETP je hidrofobni glikoprotein koji se sintetiše pre svega u jetri. Posreduje u dvosmernom transportu estara holesterola i triglicerida između lipoproteina (84, 85). Estri holesterola koji su preneti sa HDL na VLDL i LDL čestice mogu biti preuzeti putem specifičnih receptora u jetri, što predstavlja jedan od puteva reverznog transporta holesterola. Proaterogeni efekti *CETP* se ispoljavaju u stanjima koja su praćena hipertrigliceridemijom. U uslovima hipertrigliceridemije dolazi do *CETP* posredovanog remodelovanja HDL i LDL čestica, pri čemu ove lipoproteinske čestice stiču nepovoljne karakteristike. Trigliceridima obogaćene lipoproteinske čestice su supstrati hepatične lipaze koja hidrolizuje trigliceride, pri čemu kao proizvodi nastaju male HDL i LDL čestice (84). Nepovoljni efekti *CETP* posredovanog remodelovanja lipoproteina se ispoljavaju kao aterogena trijada: hipertrigliceridemija, niska koncentracija HDL-holesterola i prisustvo malih, gustih LDL čestica (84, 85). Efekti aktivnosti *CETP* kod stanja sa povišenom koncentracijom triglicerida su prikazani na slici 5.

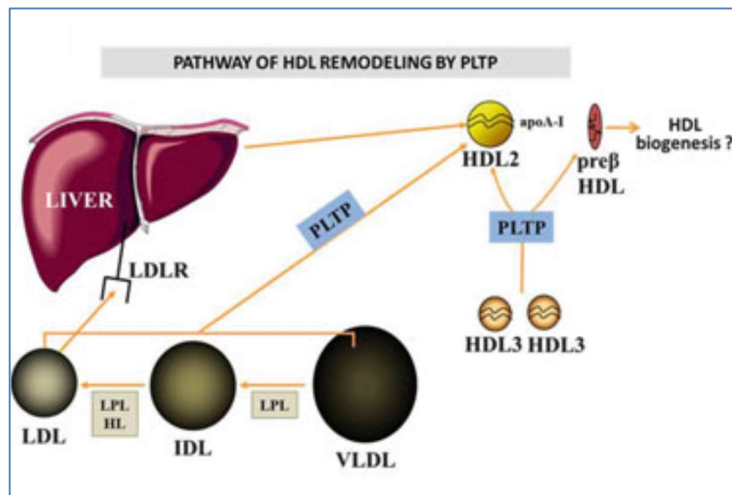
Obogaćivanje HDL čestica trigliceridima ima posledice i na funkcionalnost ove klase lipoproteina, pre svega u smislu poremećaja reverznog transporta holesterola (71) i narušene antioksidativne (70) i antiapoptotske aktivnosti (72). Noviji farmakološki pristupi koji imaju za cilj uticaj na metabolizam i karakteristike HDL čestica uključuju razvoj CETP inhibitora (86).



Slika 5. Efekti CETP kod stanja sa povišenom koncentracijom triglicerida. Preuzeto i adaptirano iz: Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:160-167.

1.5.2.3. PLTP

PLTP se sintetiše u različitim tkivima u organizmu, pri čemu su jetra i masno tkivo najznačajnija mesta ekspresije (87). Osnovna funkcija PLTP je posredovanje u transferu fosfolipida sa lipoproteina bogatih trigliceridima na HDL. Fosfolipidi se oslobađaju tokom lipolize lipoproteina koji sadrže apo B. Priliv fosfolipida omogućava širenje omotača HDL čestica što u sadejstvu sa obogaćivanjem jezgra estrima holesterola u reakciji koju katalizuje LCAT, omogućava sazrevanje HDL. Dodatno, PLTP učestvuje u procesu fuzije HDL 3, pri čemu nastaju lipoproteinske čestice većih dimenzija i lipidima siromašan diskoidni HDL (slika 6) (87, 88). Uloga PLTP u remodelovanju HDL čestica je prikazana na slici 6. PLTP ima uticaj i na druge procese u metabolizmu lipoproteina, kao što je inkorporacija triglicerida u velike VLDL čestice u jetri (87). Uprkos značajnom broju sprovedenih studija, još uvek nije tačno utvrđena uloga PLTP kod različitih kardiometaboličkih poremećaja (87).



Slika 6. Uloga PLTP u remodelovanju HDL čestica. Preuzeto iz: Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, Chroni A. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:53-111.

1.5.3. Paraoksonaze

Humane paraoksonaze su laktonaze za čiju aktivnost je neophodan kalcijum. Paraoksonaze 1 i 3 (PON1, PON3) su cirkulišući izoenzimi, dok je paraoksonaza 2 (PON2) lokalizovana intracelularno. PON1 i PON3 dele nekoliko zajedničkih karakteristika: u najvećoj meri se sintetišu u jetri, u plazmi se transportuju u sklopu HDL i zahtevaju jon kalcijuma za ispoljavanje katalitičke aktivnosti. Vezivanje paraoksonaza u kompleks sa HDL omogućavaju površinski fosfolipidi HDL i hidrofobna sekvenca u molekulima PON (89).

Aktivnost PON1 predstavlja temelj antioksidativne funkcije HDL. Naziv ovog enzima potiče od sposobnosti hidrolize otrovnog metabolita parationa, paraoksona. Ovaj enzim hidrolizuje širok spektar supstrata različite strukture, kao što su laktoni (uključujući i farmakološki aktivne supstance-statine), arilestri, tiolaktoni, ili organofosfatni pesticidi (90, 91). Između aktivnosti PON1 i rizika od razvoja KVB postoji inverzna povezanost (90, 92). Pored zaštite LDL čestica od oksidativnih modifikacija, kao mogući mehanizmi antioksidativnog delovanja PON1 su predloženi sprečavanje nastanka ROS, ograničavanje delovanja ROS i hidroliza oksidovanih lipida (89). Uprkos velikom broju studija, još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno da li je snižena aktivnost PON1 uzrok ili posledica različitih metaboličkih poremećaja (90). Jedno od ograničenja utvrđivanja tačne uloge PON1 kod kardiometaboličkih poremećaja je to što se aktivnost PON1 može odrediti različitim metodama, odnosno pomoću različitih supstrata (određivanje npr. paraoksonazne, arilesterazne, ili laktonazne aktivnosti PON1). Različite metode određivanja aktivnosti PON1 imaju specifične dijagnostičke karakteristike i nisu jednako osetljive kod svih patoloških stanja i metaboličkih poremećaja (93). Do sada nije ustanovljen definitivni supstrat koji bi se univerzalno koristio u istraživanjima, što otežava poređenje rezultata (90).

PON3 je poslednji otkriveni član iz familije paraoksonaza. Za razliku od PON1, nema sposobnost hidrolize organosfosfata, ali poseduje laktonaznu aktivnost (91). Podaci o fiziološkim funkcijama PON3 su oskudni. Jedna od prvih studija koja se bavila ovom temom je utvrdila da PON3 ima ulogu u antioksidativnoj zaštiti i pokazala da PON3 efkasnije štiti LDL čestice od oksidacije u poređenju sa PON1 (94). U pogledu metaboličkih poremećaja povezanih

sa gojaznošću su značajni rezultati studije sprovedene na miševima u kojoj je pokazano da je deficit PON3 povezan sa poremećajem funkcije mitohondrija, hepatičnom inflamacijom i proaterogenim lipoproteinskim profilom (95). Kod zdravih ispitanika, PON3 se prevashodno nalazi na HDL 3 česticama (96). Ipak, PON3 je nedovoljno istražena u različitim bolestima kod ljudi i do sada sprovedena istraživanja nisu dala konzistentne rezultate u smislu univerzalnog smera promene koncentracije PON3 kod bolesti sa povišenim stepenom oksidativnog stresa (91).

1.5.4. Serumski amilod A

Reakcija akutne faze predstavlja sistemski odgovor usmeren protiv infektivnih agenasa i drugih uzročnika oštećenja i povreda u sklopu koga dolazi do metaboličkih i fizioloških promena (97). Jedan od mehanizama za ponovno uspostavljanje homeostaze u sklopu reakcije akutne faze je promena obima sinteze različitih proteina u jetri (97). Serumski amiloid A (SAA) je pozitivan reaktant akutne faze čija se sinteza u jetri povećava i do 1000 puta u inflamaciji. U cirkulaciji se vezuje u kompleks sa HDL česticama, prevashodno sa HDL 3, istiskujući glavni apolipoprotein, apo AI (98, 99). SAA ima ulogu u kontroli i razvoju reakcije akutne faze, koja uključuje modulaciju imunskog odgovora, uticaj na sekreciju različitih citokina, antibakterijsko delovanje i modifikaciju metabolizma lipida (99).

Osim kod stanja akutne inflamacije, koncentracija SAA je povišena i kod stanja praćenih hroničnom inflamacijom. Dokumentovana je pozitivna veza između i serumske koncentracije SAA i ITM (100, 101). Takođe, pokazano je da se koncentracija SAA snižava paralelno sa smanjenjem telesne mase i fizičkom aktivnošću (100-102). Za razliku od C-reaktivnog proteina (CRP), koji je takođe reaktant akutne faze koji se sintetiše u jetri (97), SAA se značajno eksprimira i u adipocitima (98, 99, 103). Poitou i saradnici su ovaj parametar predložili kao pokazatelj inflamacije u gojaznosti (102). Uloga SAA u razvoju aterosklerotskih komplikacija obuhvata višestruke mehanizme kao što su stimulacija hemotakse monocita i neutrofila, stimulacija produkcije proinflamatornih citokina, kao i posredan uticaj na stabilnost aterosklerotskog plaka (103). Proaterogeni efekti SAA se ostvaruju i kroz modulaciju funkcije HDL. Inkorporacija SAA u HDL smanjuje kapacitet preuzimanja holesterola (104) i antiinflamatornu (105) funkciju ovih lipoproteinskih čestica. Sa druge strane, rezultati studije koju su sprovedeli Sato i saradnici ukazuje na suprotan efekat kompleksa SAA-HDL, odnosno povećanu sposobnost zaštite LDL od posledica oksidativnog stresa (106). Jasna veza između SAA i funkcionalnih karakteristika HDL još uvek nije ustanovljena.

1.5.5. Oksidovani HDL

Pod uslovima povećanog stvaranja slobodnih radikala dolazi do procesa lipidne peroksidacije i serije lančanih reakcija u kojima kao proizvodi nastaju reaktivni aldehidi različite dužine (malondialdehid, hidroksi-heksenal, hidroksi-nonenal – HNE) koji se vezuju za proteinske i lipidne strukture u organizmu i menjaju njihove osobine (29, 30). Na taj način se menjaju struktura i fizičko-hemijske karakteristike lipoproteinskih čestica. Oksidativna modifikacija LDL čestica doprinosi porastu njihovog proaterogenog potencijala (63). Interakcija između oksidativnog stresa i HDL je složena, budući da ima dvosmeran karakter. HDL čestice se aktivno suprotstavljaju oksidativnom stresu zahvaljujući antioksidativnom delovanju enzima i apolipoproteina koji ulaze u njihov sastav (64, 91). Dodatno, na osnovu rezultata studija koje su se bavile ispitivanjem uloge lipoproteina u transportu proizvoda lipidne oksidacije, predložena je uloga HDL u reverznom transportu proizvoda oksidacije lipida do

jetre, paralelno sa procesom reverznog transporta holesterola (107). Sa druge strane, komponente HDL mogu biti modifikovane kao posledica oksidativnog stresa što utiče na funkcionalne karakteristike ovih lipoproteina. Spektar različitih oksidativnih modifikacija apo AI je povezan sa smanjenjem kapaciteta preuzimanja holesterola od strane HDL (108, 109). Oksidativna modifikacija HDL čestica dovodi do gubitka sposobnosti vazorelaksacije (110), narušavanja antiapoptotske i antiinflamatorne aktivnosti (111) i do sticanja novih, proinflamatornih svojstava (111).

Studija koju su sprovedli Marin i saradnici je utvrdila povišen stepen oksidacije HDL čestica kod ispitanika sa tip 2 dijabetes melitusom (112). Rezultati prospektivne studije koju su sprovedli Miki i saradnici ukazuje na povezanost sporije progresije kalcifikacije koronarne arterije i sniženja koncentracije oksidovanog HDL (OxHDL) kod ispitanika sa hiperholesterolemijom koji su na terapiji statinima (113), što predstavlja direktnu povezanost između OxHDL i rizika od nastanka KVB. Pored toga, Peterson i saradnici su predložili OxHDL kao jedan od biohemijskih markera povišenog rizika od KVB gojaznih osoba (114). U navedenoj studiji (114) je utvrđena pozitivna veza koncentracije OxHDL sa brojem cirkulišućih endotelnih ćelija, koje su korišćene kao marker rane vaskularne disfunkcije. Stoga je OxHDL predložen kao marker rizika za KVB, što bi trebalo da bude ispitano u prospektivnim studijama (114). Imajući u vidu varijacije u stepenu rizika za nastanak KVB kod metabolički zdravog i nezdravog fenotipa gojaznih i osoba sa povećanom telesnom masom, trebalo bi istražiti promene koncentracije OxHDL kao predloženog markera povišenog rizika za KVB kod ispitanika sa različitim metaboličkim fenotipom.

HDL čestice sadrže brojne proteinske i lipidne konstituente koji mogu podleći modifikacijama u uslovima oksidativnog stresa. U studijama koje su se bavile ispitivanjem OxHDL su određivane različite forme HDL koje nastaju kao posledica oksidativne modifikacije ove klase lipoproteina. Shao i saradnici su, u jednoj od retkih studija koja je paralelno procenjivala efekte različitih oksidativnih modifikacija na funkciju HDL, utvrdili da ne ispoljavaju sve oksidativne modifikacije isti efekat na ispitivane funkcije HDL (115). Stoga postoji potreba za daljim istraživanjem povezanosti različitih formi OxHDL sa metaboličkim poremećajima.

2. Ciljevi istraživanja

KVB su najznačajniji uzročnik mortaliteta i morbiditeta širom sveta. U cilju primarne prevencije ovih bolesti intenzivno se proučavaju mehanizmi delovanja međusobno povezanih činilaca, kao što su prisustvo MS, NAFLD i disfunkcionalnosti masnog tkiva. Integracija svih dosadašnjih znanja jasno je ukazala na potrebu za razvojem novih biomarkera koji bi bili adekvatan pokazatelj višestrukih metaboličkih faktora rizika. Snižena koncentracija HDL-holesterola je jedan od tipičnih poremećaja koji je zajednički za većinu stanja sa povišenim rizikom za razvoj KVB. Osim rutinskog određivanja koncentracije HDL-holesterola, novije smernice u oblasti ispitivanja nastanka KVB naglašavaju značaj procene funkcionalnosti HDL čestica. Naime, kvalitativne osobine ovog lipoproteina se smatraju jednako značajnim, ili čak značajnijim od kvantitativnih. Na osnovu svega navedenog, ispitivanje kvalitativnih karakteristika HDL čestica kod MS i pridruženih stanja, kao što je NAFLD, bi moglo da pruži sveobuhvatniji uvid u funkcionalna svojstva ovih čestica kod stanja sa povišenim rizikom od KVB. Takođe, ispitivanje svojstava HDL čestica bi moglo da pruži doprinos u rasvetljavanju razlika koje postoje između različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Imajući u vidu sve navedeno, u ovom istraživanju bavili smo se ispitivanjem kvantitativnih i kvalitativnih karakteristika HDL čestica i njihove povezanosti sa markerima izmenjenog metaboličkog statusa u grupi ispitanika sa povećanom telesnom masom i pridruženim stanjima. U tom smislu, ciljevi ovog istraživanja su:

- Ispitati markere kvalitativnih karakteristika HDL čestica i modulatore njihove strukture kod ispitanika sa MS.
- Istražiti markere kvalitativnih karakteristika HDL čestica i modulatore njihove strukture kod ispitanika razvrstanih u kategorije prema FLI.
- Ispitati razlike u navedenim parametrima kod ispitanika sa metabolički zdravim i nezdravim fenotipom gojaznosti.
- Ispitati povezanost koncentracije OxHDL sa koncentracijom HDL-holesterola kao i sa raspodelom HDL subfrakcija. Istražiti vezu OxHDL sa malim, gustim LDL, kao česticama koje su podložne oksidativnim promenama.
- Ispitati povezanost aktivnosti i masene koncentracije CETP sa markerima dislipidemije, kao i sa raspodelom subfrakcija HDL.
- Istražiti povezanost aktivnosti LCAT sa markerima dislipidemije, komponentama MS i subfrakcijama HDL.
- Istražiti povezanost koncentracije i aktivnosti PON1 i koncentracije PON3 sa markerima dislipidemije, komponentama MS i subfrakcijama HDL.
- Ispitati povezanost koncentracije SAA sa koncentracijom HDL-holesterola, raspodelom subfrakcija HDL i drugim pokazateljima kvalitativnih osobina HDL čestica.
- Istražiti povezanost koncentracije leptina i adiponektina sa koncentracijom HDL-holesterola, raspodelom HDL subfrakcija i drugim pokazateljima kvalitativnih osobina HDL čestica.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

U ovoj studiji su učestvovali pacijenti Kabineta za ishranu i prevenciju metaboličkih poremećaja u sklopu Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma (Klinički centar Srbije). Inicijalno je uključen 201 ispitanik. Uz pomoć adekvatno obučene osobe, učesnici su popunili upitnik koji je sadržao pitanja u vezi sa životnim navikama, vrednostima krvnog pritiska, medikamentoznom terapijom i porodičnom anamnezom. Visina i težina su izmerene u sklopu standardne uobičajene procene pacijenata pri lekarskom pregledu. ITM je izračunat na osnovu formule $ITM = (\text{telesna masa (kg)} / \text{visina}^2 \text{ (m)})$ (13). Obim struka je izmeren između ilijačne kosti i donje ivice rebara pomoću nerastegljive trake za merenje.

Osnovna grupa ispitanika kod koje su ispitane karakteristike HDL čestica kod MS i NAFLD, kao stanja koje je direktno povezano sa prisustvom MS, je formirana tako što su na samom početku su iz studije isključeni ispitanici sa aterosklerotskim KVB (N=15), dijagnozom tip 2 dijabetes melitusa (N=19), na terapiji statinima, fibratima ili nikotinskom kiselinom (N=18), kao i oni kod kojih su nedostajali podaci za izračunavanje FLI (N=19). Na kraju je preostalo 130 učesnika u studiji. Ni kod jednog ispitanika u medicinskom kartonu nije zabeležena infektivna bolest jetre.

Komponente MS su definisane prema kriterijumima (4):

- povišena koncentracija triglicerida (≥ 1.7 mmol/L)
- snižena koncentracija HDL-holesterola (muškarci $< 1,03$ mmol/L, žene $< 1,3$ mmol/L)
- povišen krvni pritisak (≥ 130 mm Hg sistolni krvni pritisak i/ili ≥ 85 mm Hg dijastolni krvni pritisak ili primena antihipertenzivne terapije)
- povišena koncentracija glukoze ($\geq 5,6$ mmol/L)
- povećan obim struka (≥ 102 cm za muškarce, ≥ 88 cm za žene)

Prisustvo MS je definisano kao prisustvo 3 ili više gorenavedenih komponenti (4).

Dodatne analize karakteristika HDL čestica su urađene u podgrupama gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Podgrupa je formirana tako što su iz grupe od 130 učesnika u studiji isključeni ispitanici sa $ITM < 25,0$, kao i oni kod kojih nisu bili dostupni podaci potrebni za definiciju metaboličkih fenotipova u kategorijama gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Metabolički fenotip je procenjen kod 115 gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Prekomerna telena masa i gojaznost su definisani na osnovu ITM (13):

- $25,0 \geq ITM > 30,0$ – prekomerna telesna masa
- $ITM \geq 30,0$ – gojaznost

Metabolički zdrav fenotip je definisan na osnovu odsustva navedenih metaboličkih faktora rizika (54), odnosno komponenti MS, izuzev obima struka (4). Metabolički nezdrav fenotip je definisan na osnovu prisustva ≥ 1 komponente MS, izuzev obima struka.

Ispitanici su potpisali informisani pristanak pre učešća u istraživanju. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (broj: 1230/8) i Etičkog komiteta

Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj: 726/2). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima Helsinške deklaracije.

3.2. Uzorci

Venska krv je uzorkovana nakon noćnog gladovanja u epruvetu za odvajanje seruma i epruvetu sa etilendiamin-tetrasirćetnom kiselinom (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) kao antikoagulansom za dobijanje plazme. Rutinske biohemijske analize su izvršene u svežim uzorcima seruma. Hemoglobin A1c (HbA1c) je određen iz pune venske krvi sa EDTA. Posebni uzorci seruma ili plazme su odvojeni i zamrznuti na -80°C i odmrznuti neposredno pre izvođenja specifičnih analiza. Jedanput odmrznuti uzorci više nisu zamrzavani. Odmrznuti uzorci su upotrebljeni za određivanje analita uz pomoć ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) testova, određivanje lipoproteinskih subfrakcija, određivanje koncentracije LOOH i aktivnosti LCAT, CETP i PON1.

3.3. Biohemijski parametri

Koncentracija glukoze, ukupnog i HDL-holesterola, triglicerida i aktivnost gama-glutamil transferaze (GGT) su određene standardnim laboratorijskim metodama. Koncentracija LDL-holesterola je izračunata uz pomoć Friedwald-ove formule: LDL-holesterol, mmol/L = ukupan holesterol – trigliceridi/2,2 – HDL-holesterol (116). Kod ispitanika sa koncentracijom triglicerida iznad 4,5 mmol/L, koncentracija LDL-holesterola je određena direktno metodom. Koncentracije CRP i HbA1c su određene imunoturbidimetrijskim metodama. Biohemijske analize su izvršene uz upotrebu reagenasa Cobas na analizatoru Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Koncentracija insulina je izmerena metodom radioimunoeseja (INEP, Srbija) na analizatoru LKB-Wallac-CliniGamma 1272 (Wallac Oy, Finska). Vrednosti indeksa homeostatskog modela za procenu insulinske rezistencije (*homeostasis model assessment of insulin resistance* – HOMA IR) su izračunate putem formule $\text{HOMA IR} = [\text{koncentracija glukoze (mmol/L)} \times \text{koncentracija insulina (mIU/L)}] / 22,5$ (117).

3.4. Kategorizacija ispitanika na osnovu vrednosti FLI

Vrednosti FLI su izračunate prema formuli (59):

$$\text{FLI} = \left(e^{0,953 \times \log_e (\text{trigliceridi} \times 88,5) + 0,139 \times \text{ITM} + 0,718 \times \log_e (\text{GGT}) + 0,053 \times \text{obim struka} - 15,745} \right) / \left(1 + e^{0,953 \times \log_e (\text{trigliceridi} \times 88,5) + 0,139 \times \text{ITM} + 0,718 \times \log_e (\text{GGT}) + 0,053 \times \text{obim struka} - 15,745} \right) \times 100$$

Koncentracija triglicerida je bila izražena u mg/dL u originalnoj jednačini. Radi prevođenja mmol/L u mg/dL, vrednosti izražene u mmol/L su pomnožene sa faktorom 88,5.

Učesnici su klasifikovani u tri grupe na osnovu vrednosti FLI: $\text{FLI} < 30$, $\text{FLI} = 30-59$ i $\text{FLI} \geq 60$. Na osnovu poređenja sa ultrazvučnim nalazom, vrednosti $\text{FLI} < 30$ su predložene za isključivanje (osetljivost 87%, specifičnost 64%), a vrednosti $\text{FLI} \geq 60$ (osetljivost 61%, specifičnost 86%) za utvrđivanje prisustva steatoze jetre (59).

3.5. VAI

Vrednosti VAI su izračunate na osnovu posebnih formula za oba pola (35):

Žene: $VAI = (\text{obim struka} / [36,58 + (1,89 \times ITM)]) \times (\text{trigliceridi} / 0,81) \times (1,52 / \text{HDL-holesterol})$

Muškarci: $VAI = (\text{obim struka} / [39,68 + (1,88 \times ITM)]) \times (\text{trigliceridi} / 1,03) \times (1,31 / \text{HDL-holesterol})$

Na osnovu vrednosti VAI je izvršena dodatna klasifikacija ispitanika pri ispitivanju metaboličkih fenotipova. Ispitanici su klasifikovani u tri grupe na osnovu stepena disfunkcije masnog tkiva, kao što je navedeno u tabeli 1 (35):

Tabela 1. Starosno specifične granične vrednosti VAI za klasifikaciju ispitanika na osnovu stepena disfunkcije masnog tkiva

Starost (godine)	Bez disfunkcije masnog tkiva	Blaga do umerena disfunkcija masnog tkiva	Teška disfunkcija masnog tkiva
<30	≤2,52	2,53-2,73	>2,73
≥30 do <42	≤2,23	2,24-3,12	>3,12
≥42 do <52	≤1,92	1,93-2,77	>2,77
≥52 do <66	≤1,93	1,94-3,25	>3,25
≥66	≤2,00	2,01-3,17	>3,17

3.6. Određivanje aktivnosti LCAT i CETP

Aktivnosti LCAT i CETP su određene u uzorcima EDTA plazme. Korišćena je metoda koja podrazumeva određivanje koncentracije slobodnog i ukupnog holesterola u plazmi i frakciji koja sadrži samo HDL (118, 119), a koja je dobijena precipitacijom lipoproteina koji sadrže apo B. Uzorci su inkubirani 2 sata na 37°C. Merenja su obavljena pre i nakon inkubacionog perioda.

Tokom inkubacije uzorka, LCAT katalizuje nastanak estara holesterola što je praćeno ekvimolarnim sniženjem koncentracije slobodnog holesterola. Stoga se aktivnost LCAT može proceniti praćenjem brzine sniženja koncentracije slobodnog holesterola u toku perioda inkubacije (118, 119):

$LCAT (\mu\text{mol/L/h}) = (C_{\text{slobodnog holesterola u plazmi pre inkubacije}} - C_{\text{slobodnog holesterola u plazmi nakon inkubacije}}) / 2\text{h} \times 1000$

Brzina CETP posredovanog prenosa estara holesterola sa HDL na lipoproteine koji sadrže apo B (aktivnost CETP) je izračunata kao razlika između brzine nastajanja estara holesterola u ukupnoj plazmi, što je omogućeno aktivnošću LCAT, i brzine promene koncentracije estara holesterola u HDL frakciji tokom inkubacije (118, 119). Koncentracija estara holesterola je izražena kao razlika između koncentracije ukupnog i slobodnog holesterola.

$$\text{CETP } (\mu\text{mol/L/h}) = \frac{((C_{\text{slobodnog holesterola u plazmi pre inkubacije}} - C_{\text{slobodnog holesterola u plazmi nakon inkubacije}}) - ((C_{\text{ukupnog holesterola u HDL-frakciji holesterola nakon inkubacije}} - C_{\text{slobodnog holesterola u HDL-frakciji nakon inkubacije}}) - (C_{\text{ukupnog holesterola u HDL-frakciji pre inkubacije}} - C_{\text{slobodnog holesterola u HDL-frakciji pre inkubacije}}))}{2\text{h} \times 1000}$$

Konverzioni faktor x 1000 je upotrebljen u obe jednačine radi prevođenja mmol/L u $\mu\text{mol/L}$. Sve analize su izvedene u triplicatu. Koncentracije slobodnog holesterola u plazmi, slobodnog i ukupnog holesterola u HDL sloju su određene na aparatu I Lab 300 (Instrumentation Laboratory S.p.A. Italija) uz upotrebu reagenasa proizvođača Biosystems (Španija).

3.7. Razdvajanje HDL i LDL subfrakcija

HDL i LDL subfrakcije su razdvojene metodom vertikalne elektroforeze na nedenturisućem poliakrilamidnom gradijentu gelu. Poliakrilamidni gradijenti gelovi (3-31%) su izliveni u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju, prema ranije opisanoj adaptiranoj metodi (120, 121) koju su originalno uveli Rainwater i saradnici (122). Monomerni rastvori (3% i 31% rastvori akrilamida) su pripremani rastvaranjem akrilamida i metilen-bis-akrilamida u Tris puferu (pH=8,3). U 31% rastvor monomera akrilamida je dodat 70% rastvor glicerola, radi povećanja gustine. Degazirani rastvori monomera su čuvani u frižideru na +4°C do korišćenja.

Gelovi su izliveni u komori Sistem Hoefler SE 675 (Amersham Pharmacia Biotech, Austrija) koja omogućava formiranje četiri gela, dimenzija 16 x 18 cm i debljine 1,5 mm. Rastvori monomera se ubacuju u komoru za izlivanje pomoću dve peristaltičke pumpe Masterflex L/S (Cole Parmer Instrumental Company, Sjedinjene Američke Države) čiji je rad kontrolisan softverom Masterflex Linkable Instrument Control Software (WinLIN) istog proizvođača. Neposredno pre izlivanja gelova, u monomerne rastvore akrilamida su dodati amonijum-persulfat i tetrametilen-diamid koji započinju hemijsku polimerizaciju. Pre ulaska u komoru, monomeri se mešaju u određenim odnosima za svaki pojedinačni segment gela, prema definisanom programu za rad pumpi. Na taj način se postiže formiranje gradijenta koncentracija poliakrilamida u opsegu 3-31%. Nakon izlivanja 13 segmenata gela, radom pumpi prema posebnom protokolu se uvodi 70% rastvor glicerola u komoru. Po završetku izlivanja gelova, na gornju površinu kalupa se nanosi Tris pufer (pH=8,3), kako bi se sprečio kontakt vazduha sa gelom tokom polimerizacije. Polimerizacija gelova se odvija na sobnoj temperaturi tokom noći. Polimerizovani gelovi se vade iz komore za izlivanje, ispiraju destilovanom vodom i koriste odmah ili se čuvaju u destilovanoj vodi na +4°C u frižideru do korišćenja.

Vertikalna elektroforeza se izvodi pri konstantnom naponu u kadi Hoefler SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech, Austrija), na 4°C, u Tris puferu (pH=8,35). Nakon 50-minutne aktivacije gelova na 290V, u odgovarajuće trake na gelu se nanose standardi i uzorci EDTA plazme. Standardi i uzorci ispitanika su pre nanošenja na gel pomešani sa rastvorom bromfenol-plavog i saharoze kako bi se uzorak obojio i dobio veću gustinu, čime se olakšava nanošenje na gel. Na gel se nanose dve vrste standarda:

- Visokomolekularni proteinski standardi (GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech, Austrija) koji sadrže proteine poznatog dijametra. Standard je rekonstituisan prema uputstvu proizvođača.
- Standardizovana humana plazma sa definisanim dominantnim LDL dijametrom.

Protokol elektroforeze se dalje odvija kroz sledeće faze: 60 V tokom 13 minuta, 170 V tokom 20 minuta, 300 V tokom 20h. Nakon jednog sata od početka treće faze protokola se nanose karboksilovane polistirenske mikrosfere dijametra 40 nm (Duke Scientific Corporation, Sjedinjene Američke Države) na traku sa proteinskim standardima na svakom gelu. Nakon završene elektroforeze, gel se seče tako da se traka sa proteinskim standardima odvoji od ostatka gela. Oba dela se fiksiraju u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline. Traka sa proteinskim standardima se boji sa 0,75% Coomassie brilliant blue G-250. Drugi deo gela sa ispitivanim uzorcima se nakon fiksiranja ispira u 45% rastvoru etanola, a zatim preliva toplim rastvorom boje Sudan black B u 45% etanolu u kojoj gelovi ostaju preko noći. Nakon odbojavanja odgovarajućim smešama, gelovi i proteinski standardi se čuvaju u posudama sa destilovanom vodom kako bi se povratio njihov originalni oblik i veličina.

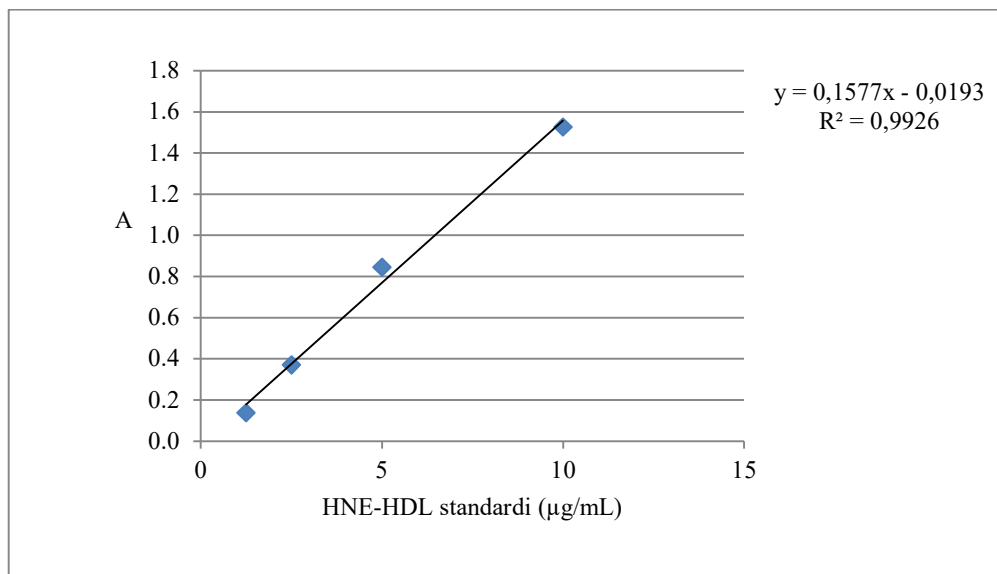
Svaki gel je skeniran u transmisivnom modu uz korišćenje Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Austrija) i Magic Scan software (version 4.6;1999; UMAX Data Systems, Inc). Kalibracija je zasnovana na inverznom odnosu poznatih prečnika standarda i njihovih relativnih migracionih daljina (Rf). Rf vrednosti su izračunate u odnosu na albumin, komponentu visokomolekularnog proteinskog standarda koja prelazi najduži put. Za svaki gel su konstruisane dve kalibracione krive koje omogućavaju analizu LDL i HDL subfrakcija. Kalibracija u LDL regiji je izvršena uz upotrebu mikrosfera, standardizovanog LDL dijametra i tireoglobulina. Za konstrukciju kalibracione krive u HDL regionu su korišćeni tireoglobulin, feritin, laktat dehidrogenaza i albumin (120).

Na svakom gelu su određeni regioni u kojima se nalaze pojedinačne HDL i LDL subfrakcije (120, 121). Na osnovu najistaknutijeg pika u denzitometrijskom zapisu je određen dominantni dijemetar čestica u LDL i HDL regionu. Površine ispod denzitometrijskog pika koja odgovaraju pojedinačnim subfrakcijama su korišćene za izračunavanje relativnog udela svake subfrakcije. Zastupljenost malih, gustih LDL čestica je izračunata sabiranjem relativnih udela LDL III i LDL IV subfrakcija. Zastupljenost malih HDL čestica je izračunata sabiranjem relativnih udela HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c subfrakcija.

3.8. Određivanje koncentracije OxHDL

Koncentracija OxHDL je određena komercijalnim testom-Human Oxidized HDL ELISA Kit: HNE-HDL Quantitation (Cell Biolabs, Sjedinjene Američke Države). Koncentracija HNE modifikovanih HDL čestica u uzorku je određena po principu sendvič imunotesta.

Standardna kriva (slika 7) je izrađena korišćenjem komercijalnog HNE-HDL standarda koji je sastavni deo reagensasa za izvođenje ELISA Human Oxidized HDL ELISA Kit: HNE-HDL Quantitation (Cell Biolabs, Sjedinjene Američke Države). HNE-HDL standardi različitih koncentracija su dobijeni razblaženjem osnovnog HNE-HDL standarda (5 µg/mL) prema uputstvu proizvođača.

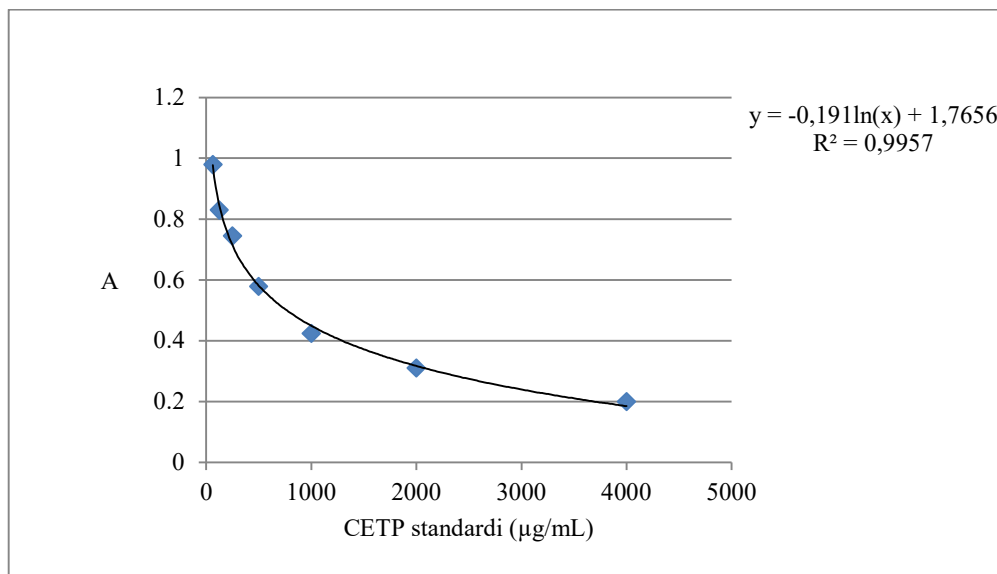


Slika 7. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije HNE modifikovanih HDL čestica

3.9. Određivanje koncentracije CETP

Koncentracija CETP je određena komercijalnim testom *Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) ELISA Kit* (Cell Biolabs, Sjedinjene Američke Države). Test je zasnovan na kompetitivnom principu u kome se CETP imobilizovan na ELISA ploči i CETP iz uzoraka takmiče za vezivanje za anti-CETP antitela. Koncentracija CETP je određena kod 46 ispitanika zbog tehničkih ograničenja metode.

Standardna kriva (slika 8) je konstruisana korišćenjem komercijalnog CETP standarda koji je sastavni deo reagensasa za izvođenje *Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) ELISA Kit* (Cell Biolabs, Sjedinjene Američke Države). CETP standardi različitih koncentracija su dobijeni razblaženjem osnovnog CETP standarda (0,8 µg/mL) prema uputstvu proizvođača.

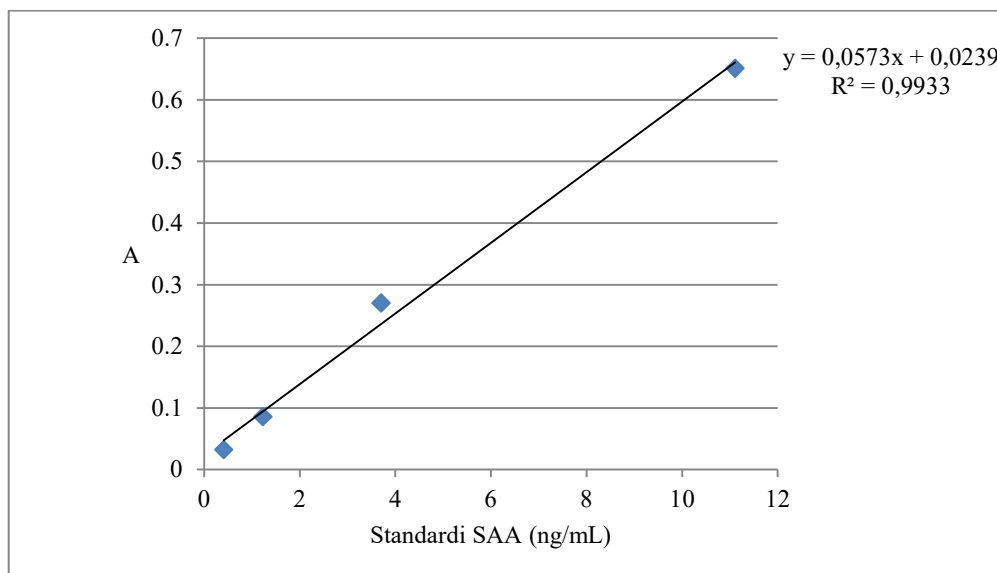


Slika 8. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije CETP

3.10. Određivanje koncentracije SAA

Koncentracija SAA je određena komercijalnim testom Human SAA ELISA Kit, (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo) koji je zasnovan na principu sendvič imunoeseja.

Rekombinantni humani SAA standard je rekonstituisan prema uputstvu proizvođača (300 ng/mL). Razblaživanjem primarnog standarda je dobijena serija sekundarnih standarda korišćena za izradu kalibracione krive (slika 9).

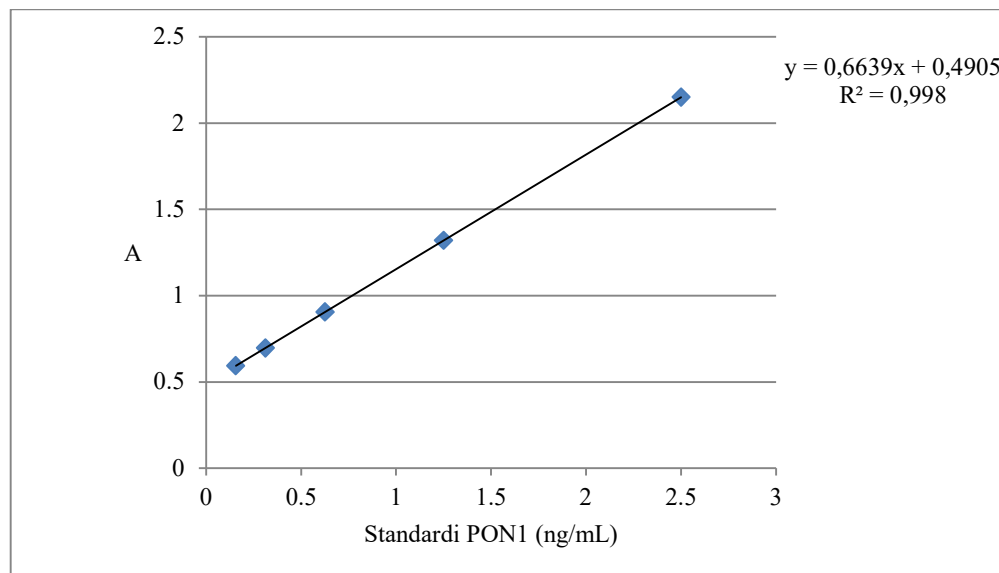


Slika 9. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije SAA

3.11. Određivanje koncentracije PON1

Koncentracija PON1 je određena komercijalnim testom ELISA (*Human Total PON1*, R&D Systems, Sjedinjene Američke Države). Test je zasnovan na principu sendvič imunoeseja.

Osnovni PON1 standard je rekonstituisan i zatim razblažen kako bi se dobila serija standarda različitih koncentracija. Procedure su urađene na osnovu upustva proizvođača. Standardna kriva za određivanje koncentracije PON1 je prikazana na slici 10.

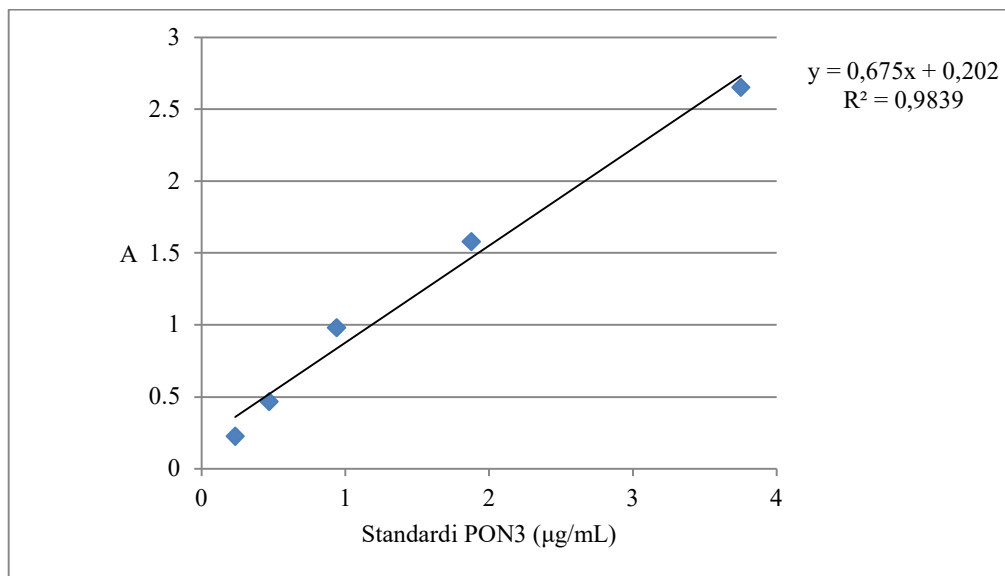


Slika 10. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije PON1

3.12. Određivanje koncentracije PON3

Koncentracija PON3 je određena komercijalnim testom ELISA (*Human Total PON3*, R&D Systems, Sjedinjene Američke Države) koji je zasnovan na principu sendvič imunoeseja.

Za izradu standarne krive (slika 11) je korišćen rekombinantni humani PON3 standard koja je rekonstituisan i razblažen prema upustvu proizvođača.

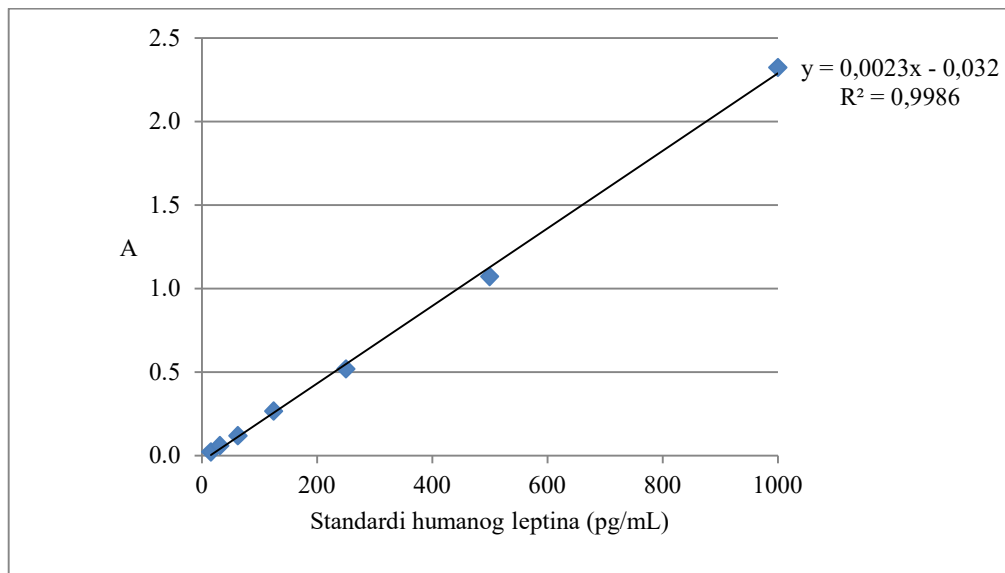


Slika 11. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije PON3

3.13. Određivanje koncentracije leptina

Koncentracija leptina je određena po principu sendvič imunoeseja komercijalnim testom *Human Leptin Immunoassay* (R&D Systems, Sjedinjene Američke Države).

Primarni standard humanog leptina je rekonstituisan (1000 pg/mL) i zatim razblažen prema uputvu proizvođača. Serija standarda humanog leptina je korišćena za izradu standardne krive (slika 12).

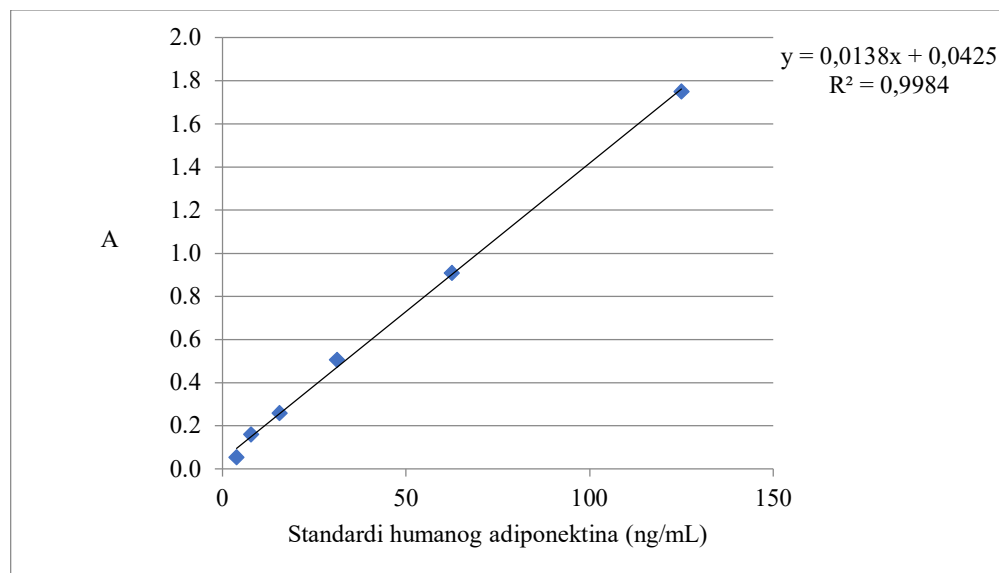


Slika 12. Standardna kriva za određivanje koncentracije leptina

3.14. Određivanje koncentracije adiponektina

Koncentracija ukupnog adiponektina u uzorcima plazme je određena komercijalnim testom ELISA (Quantikine *Human Total Adiponectin Immunoassay*, R&D Systems, Sjedinjene Američke Države). Koncentracija ukupnog adiponektina u uzorcima je određena po principu sendvič imunoeseja.

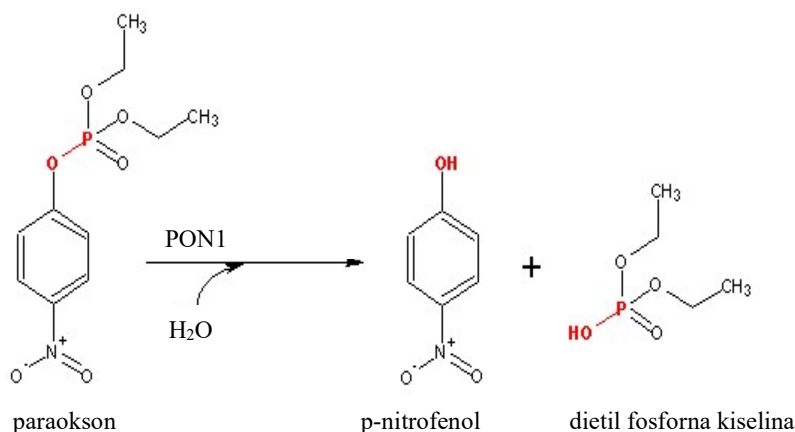
Standardna kriva (slika 13) je konstruisana uz korišćenje serije standarda koji su dobijeni razblaživanjem osnovnog standarda humanog adiponektina (250 ng/mL), koji je rekonstituisan i zatim razblažen prema uputstvu proizvođača.



Slika 13. Standardna kriva za određivanje koncentracije adiponektina

3.15. Određivanje aktivnosti PON1

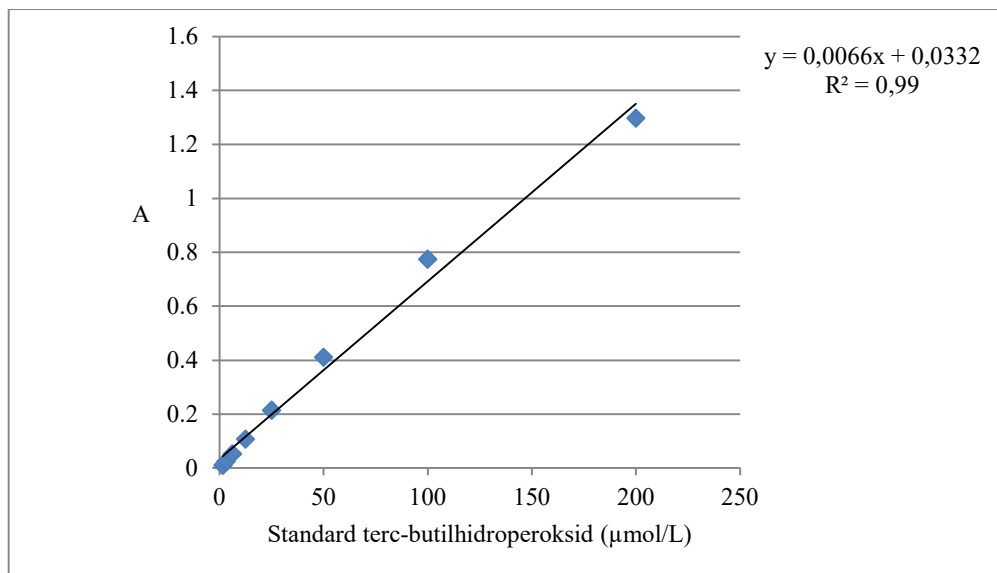
Princip: Paraoksonazna aktivnost PON1 je određena u serumu kinetičkom metodom (123) na analizatoru ILab 300. PON1 katalizuje prevođenje supstrata paraoksona u p-nitrofenol (slika 14). Reakcija se odvija u baznoj sredini (Tris pufer, pH=8,5) u kojoj se p-nitrofenol nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona koji ima apsorpcioni maksimum na $\lambda=405$ nm. Brzina nastajanja proizvoda se prati kinetički na $\lambda=405$ nm.



Slika 14. Konverzija paraoksona u p-nitrofenol koju katalizuje PON1

3.16. Određivanje koncentracije LOOH

Princip metode: Koncentracija LOOH je određena spektrofotometrijskom metodom koja je zasnovana na principu Gay-a i Gebickog (124). U kiselj sredini, LOOH iz uzoraka seruma prevode Fe^{2+} do Fe^{3+} . Nastali Fe^{3+} gradi kompleks sa ksilenol-oranžom (o-krezosulfonftalein-3,3'-bismetilimino-bisirčetna kiselina). Analiza se izvodi uz proces deproteinizacije sa perhlornom kiselinom. Intenzitet boje se meri na dve talasne dužine, 540 nm i 670 nm. Apsorbancija na 540 nm potiče od novonastalog kompleksa koji je proizvod delovanja LOOH, kao i od interferenata. Na 670 nm apsorbancija potiče od interferirajućih supstanci. Bihromatskim merenjem je omogućena eliminacija apsorbancije koja potiče od interferenata. Apsorbancija je izmerena na spektrofotometru Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Scientific Instruments, Japan). Za izradu standardne krive (slika 15) je korišćen terc-butilhidroperoksid.



Slika 15. Standardna kriva korišćena za određivanje koncentracije LOOH

3.17. Statistička analiza

Normalnost raspodele kontinuiranih podataka je proveravana Shapiro-Wilk testom. Normalno distribuirane vrednosti su prikazane kao srednja vrednost±standardna devijacija (SD) ili kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti) ukoliko je normalna distribucija postignuta nakon logaritamske transformacije. Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon). Poređenje podataka između dve grupe je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke, ili uz pomoć Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Poređenje podataka između tri grupe normalno distribuiranih podataka je urađeno uz pomoć analize varijanse (ANOVA) uz post hoc Tukey test. Poređenje između tri grupe podataka koji ne prate normalnu distribuciju je urađeno uz pomoć Kruskal-Wallis testa. Kategoričke promenljive, izražene kao frekvencije, su upoređivane uz pomoć Chi-kvadrat testa (χ^2). Korelacija između promenljivih je izražena Spirmanovim koeficijentom korelacije. Multivarijantna linearna regresiona analiza je imala za cilj da ispita parametre uključene u izračunavanje FLI kao nezavisne faktore koji menjaju aktivnost LCAT. Binarna logistička regresiona analiza je upotrebljena za procenu prediktivnih sposobnosti ispitivanih parametara. Analiza ROC krivih (*Receiver Operating Characteristics*) je korišćena radi procene dijagnostičke tačnosti parametara u definisanju metaboličkih fenotipova. Rezultati su prikazani kao površina ispod krive (*Area Under Curve* – AUC). Sposobnost parametara da vrše diskriminaciju između različitih kategorija je procenjena na osnovu sledećih kriterijuma (125):

ROC=0,5 parametar nema sposobnost diskriminacije kategorija

0,7 ≤ROC<0,8 prihvatljiva sposobnost diskriminacije

0,8 ≤ROC<0,9 odlična sposobnost diskriminacije

ROC≥0,9 izuzetna sposobnost sposobnost diskriminacije

Kao statistički značajne p vrednosti su smatrane one manje od 0,05. Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskog softvera SPSS (IBM, Sjedinjene Američke Države).

4. Rezultati

4.1. Osnovne karakteristike ispitanika

Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika su prikazane u tabeli 2. Trebalo bi napomenuti da su većinu ispitanika činile žene. Vrednosti ITM ukazuju na povećanu telesnu masu i gojaznost, a prosečne koncentracije lipidnih markera na elemente dislipidemije. Više od dve trećine ispitanika se deklariralo kao pušači. Zastupljenost pojedinačnih komponenti MS u celoj grupi ispitanika je prikazana na slici 18. Od ukupnog broja ispitanika, njih 43 je ispunjavalo kriterijume za definiciju prisustva MS, dok je 87 bilo bez MS.

Tabela 2. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika

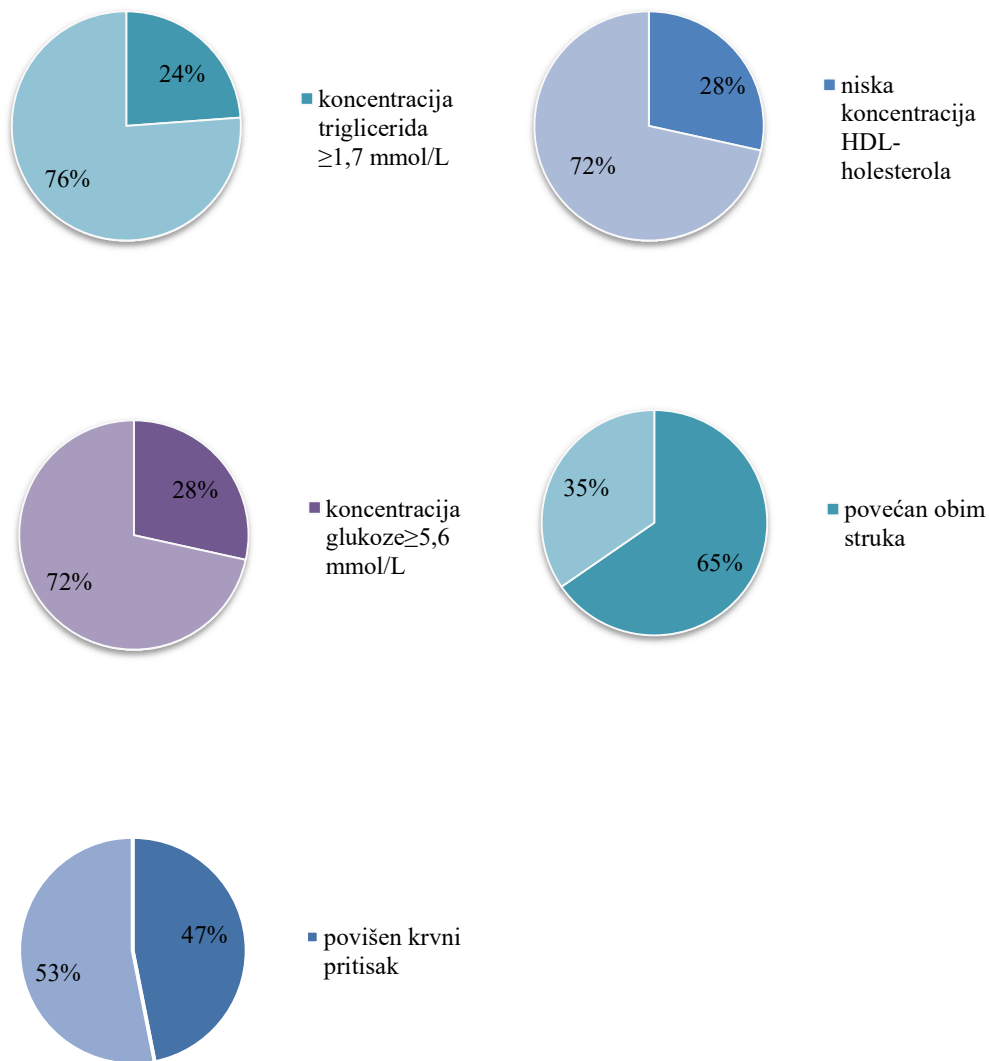
	N=130
Starost (godine) ^a	45±15
Pol (žene/muškarci) ^δ	101/29
ITM (kg/m ²) ^γ	28,7 (26,8-32,8)
Obim struka (cm) ^β	94,5 (92,3-96,8)
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	106/24
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	120 (110-130)
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	80 (70-80)
HbA1c (mmol/mol) ^γ	38 (34-40)
Glukoza (mmol/L) ^a	5,2±0,7
Ukupni holesterol (mmol/L) ^a	5,32±1,13
HDL-holesterol (mmol/L) ^a	1,44±0,39
LDL-holesterol (mmol/L) ^a	3,22±0,93
Trigliceridi (mmol/L) ^β	1,21 (1,11-1,32)

^a Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane medijana (interkvartilni raspon).

^δ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne frekvencije.



Slika 18. Zastupljenost pojedinačnih komponenti MS u celoj grupi ispitanika. Rezultati su prikazani kao relativne frekvencije.

4.2. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika razvrstanih prema polu

Analize antropometrijskih karakteristika ispitanika klasifikovanih prema polu su pokazale da se muškarci imaju veći obim struka, dok se ITM nije razlikovao između polova. Kod muškaraca je uočen viši sistolni krvni pritisak. Analiza parametara osnovnog lipidnog profila je pokazala da su muškarci imali značajno više koncentracije triglicerida i niže koncentracije HDL-holesterola u odnosu na žene. Parametri glikoregulacije se nisu razlikovali

među polovima. Kod muškaraca je primećena viša aktivnost GGT. Rezultati su prikazani u tabeli 3. Zastupljenost MS je bila ista kod oba pola (slika 19).

Tabela 3. Demografski, osnovni klinički i laboratorijski podaci kod ispitanika različitog pola

	Žene N=101	Muškarci N=29	p
Starost (godine) ^α	46±15	45±16	0,774
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	83/18	23/6	0,937
ITM (kg/m ²) ^β	29,5 (28,4-30,6)	29,6 (27,6-31,8)	0,914
Obim struka (cm) ^β	93,2 (90,7-95,9)	99,4 (95,0-104,0)	<0,05
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	120 (110-130)	130 (120-140)	<0,01
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	80 (70-80)	80 (70-80)	0,156
Ukupni holesterol (mmol/L) ^α	5,31±1,13	5,39±1,15	0,737
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,50±0,38	1,22±0,35	<0,001
LDL-holesterol (mmol/L) ^α	3,22±0,92	3,27±0,98	0,793
Trigliceridi (mmol/L) ^β	1,15 (1,05-1,27)	1,45 (1,18-1,78)	<0,05
Slobodni holesterol (mmol/L) ^α	1,49±0,38	1,54±0,31	0,568
Glukoza (mmol/L) ^α	5,2±0,7	5,3±0,7	0,286
HbA1c (mmol/mol) ^γ	37,0 (34,0-40,0)	38,0 (34,5-39,8)	0,709
Insulin (mIU/L) ^β	17 (15-18)	18 (15-22)	0,394
HOMA-IR ^β	3,6 (3,3-4,0)	4,1 (3,4-5,1)	0,214
GGT (IU/L) ^γ	15 (11-22)	27 (19-50)	<0,001

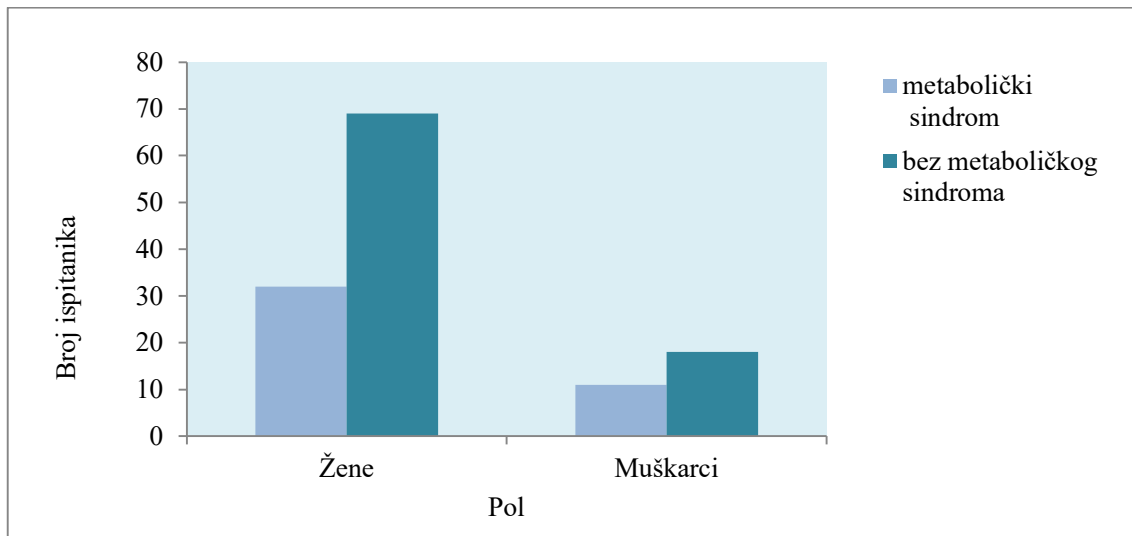
^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

^δ Kategoričke promenljive su prikazane kao apsolutne frekvencije.

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Kategoričke promenljive su upoređene uz pomoć Chi-kvadrat testa (χ^2).



Slika 19. Zastupljenost MS kod žena i muškaraca (žene: MS-32, bez MS-69; muškarci: MS-11, bez MS-18). Rezultati su prikazani kao apsolutne frekvencije ($\chi^2=0,165$, $p=0,684$).

Istraživanje razlika u koncentracijama adipocitokina je pokazalo da su žene imale više koncentracije adiponektina i leptina u odnosu na muškarce, dok se odnos leptin/adiponektin nije značajno razlikovao između polova. Markeri inflamacije i oksidativnog stresa se nisu značajno razlikovali između žena i muškaraca. Rezultati su prikazani u tabeli 4.

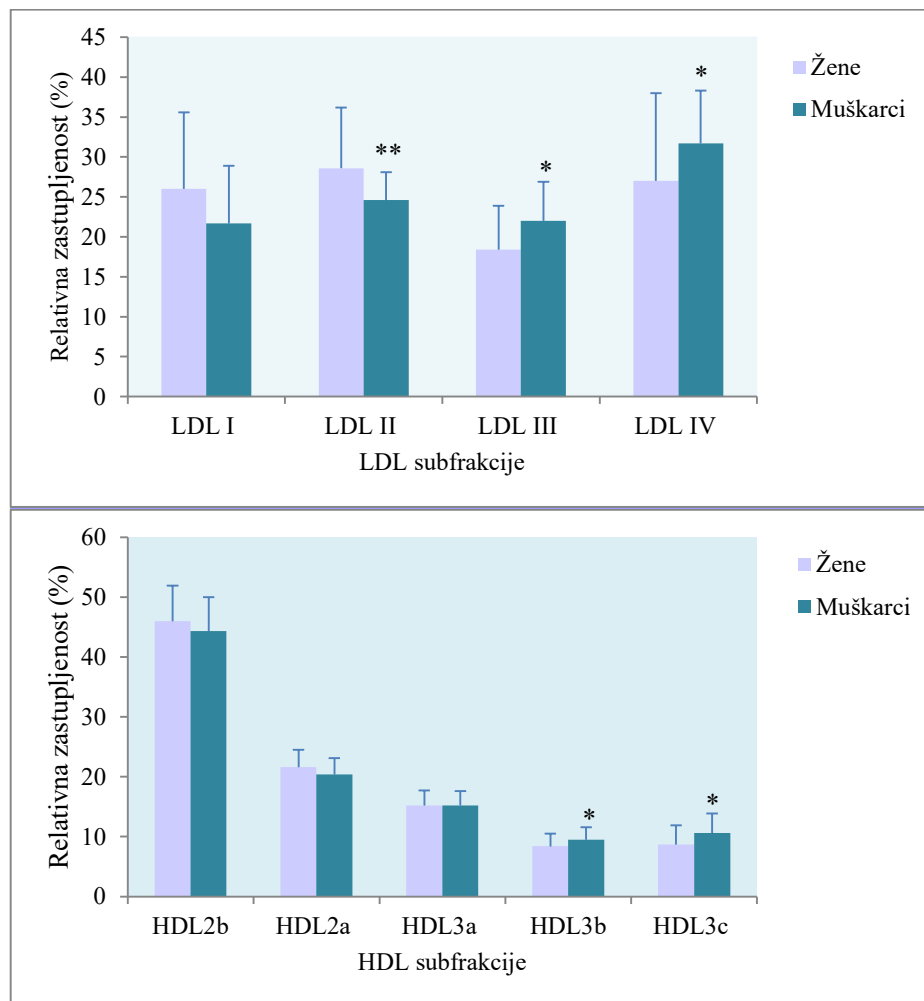
Tabela 4. Adipocitokini, markeri inflamacije i oksidativnog stresa kod ispitanika različitog pola

	Žene	Muškarci	p
Adiponektin (mg/L) ^β	6,67 (5,88-7,56)	3,52 (2,53-4,90)	<0,001
Leptin (μg/L) ^β	21,82 (18,87-25,23)	7,32 (5,71-9,39)	<0,001
Leptin/adiponektin (μg/mg) ^β	3,24 (2,55-4,12)	2,22 (1,49-3,30)	0,129
CRP (mg/L) ^β	2,07 (1,63-2,62)	1,69 (1,10-2,60)	0,411
SAA (μg/L) ^β	59,0 (56,1-62,0)	58,7 (53,6-64,3)	0,928
LOOH (μmol/L) ^β	5,29 (4,40-6,36)	6,61 (4,89-8,92)	0,228

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti). Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa.

4.2.1. Raspodela LDL i HDL subfrakcija kod ispitanika različitog pola

Analizom raspodele pojedinačnih lipoproteinskih subfrakcija kod ispitanika oba pola je utvrđena značajno veća zastupljenost manjih LDL i HDL subfrakcija kod muškaraca u odnosu na žene (slika 20, tabela 5). Nije postojala statistički značajna razlika u dominantnim dijametrima LDL i HDL čestica između polova (tabela 5).



Slika 20. Relativna zastupljenost pojedinačnih LDL i HDL subfrakcija kod žena i muškaraca. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija. Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Tabela 5. Dominantni dijametri i relativna zastupljenost malih LDL i HDL subfrakcija kod žena i muškaraca

	Žene	Muškarci	p
Dominantni LDL dijametar (nm) ^γ	27,41 (26,20-27,88)	27,28 (24,92-28,05)	0,452
Male, guste LDL (%) ^α	45,4±13,9	53,7±9,3	<0,01
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	10,10 (8,89-10,52)	8,92 (8,37-10,58)	0,165
Male HDL (%) ^α	32,3±6,1	35,3±6,1	<0,05

^α Kontinuirane normalno distribuirane promjenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.2.2. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika različitog pola

Koncentracija PON1 je bila viša kod žena, dok se aktivnost PON1 nije značajno razlikovala između polova. Pri upoređivanju markera remodelovanja HDL čestica, koncentracije PON3 i oksidativno modifikovanog HDL, kao i odnosa OxHDL/HDL-holesterol nije pronađena značajna razlika između polova (tabela 6).

Tabela 6. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema polu

	Žene	Muškarci	p
LCAT (μmol/L/h) ^β	87,0 (81,9-92,5)	94,5 (84,7-105,4)	0,203
CETP (μmol/L/h) ^γ	37,4 (0,3-93,2)	35,2 (-20,3-106,5)	0,856
CETP (mg/L) ^α	1,087±0,308	1,212±0,475	0,352
PON1 (mg/L) ^γ	2,05 (1,66-2,17)	1,56 (0,50-2,08)	<0,01
PON1 (IU/L) ^γ	289 (198-638)	256 (173-697)	0,531
PON3 (μg/L) ^α	40,4±13,9	41,1±10,8	0,877
OxHDL (μg/L) ^γ	450 (281-634)	360 (195-618)	0,218
OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol) ^γ	321 (202-458)	393 (177-451)	0,989

^α Kontinuirane normalno distribuirane promjenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.3. Osnovne karakteristike ispitanika razvrstanih prema prisustvu MS

Ispitanici sa MS su bili stariji od ispitanika bez MS, pri čemu se zastupljenost polova i pušački status nisu razlikovali između grupa. Očekivano, ispitanici sa MS su imali veći ITM i obim struka, kao i viši sistolni i dijastolni krvni pritisak. Takođe, razlika između grupa je bila značajna pri poređenju parametara lipidnog profila i markera metabolizma glukoze. U grupi sa MS je pokazana viša koncentracija ukupnog, slobodnog, LDL-holesterola i triglicerida, kao i više koncentracije glukoze, insulina i vrednosti HOMA IR. Rezultati su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Demografski, osnovni klinički i laboratorijski podaci kod ispitanika klasifikovanih prema prisustvu MS

	MS N=43	Bez MS N=87	p
Starost (godine) ^α	51±14	43±15	<0,01
Pol (muškarci/žene) ^δ	(11/32)	(18/69)	0,528
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	(32/11)	(74/13)	0,141
ITM (kg/m ²) ^γ	31,3 (28,2-35,0)	28,4 (25,6-31,4)	<0,01
Obim struka (cm) ^γ	97,5 (92,8-110,0)	92,0 (84,8-100,0)	<0,001
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	130 (120-135)	120 (110-125)	<0,001
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	80 (70-90)	80 (70-80)	<0,01
Ukupni holesterol (mmol/L) ^α	5,74±1,06	5,12±1,11	<0,01
HDL-holesterol (mmol/L) ^β	1,22 (1,11-1,33)	1,49 (1,42-1,56)	<0,001
LDL-holesterol (mmol/L) ^β	3,38 (3,15-3,64)	2,96 (2,76-3,17)	<0,01
Trigliceridi (mmol/L) ^γ	1,81 (1,27-2,53)	1,02 (0,78-1,39)	<0,001
Slobodni holesterol (mmol/L) ^α	1,59±0,35	1,46±0,37	0,062
Glukoza (mmol/L) ^γ	5,7 (5,3-6,1)	4,9 (4,6-5,2)	<0,001
HbA1c (mmol/mol) ^α	38,4±4,6	36,8±4,5	0,065
Insulin (mIU/L) ^β	22 (19-25)	15 (14-16)	<0,001
HOMA-IR ^β	5,1 (4,4-6,0)	3,2 (2,9-3,5)	<0,001
GGT (IU/L) ^γ	25 (15-37)	15 (11-21)	<0,001

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci-su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

^δ Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvencije.

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student-t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Kategoričke promenljive su upoređene uz pomoć Chi-kvadrat testa.

U grupi ispitanika sa MS su uočene više koncentracije leptina i odnosa leptin/adiponektin, kao i CRP. Takođe, koncentracija SAA je bila viša u grupi sa MS, iako bez statističke značajnosti. Koncentracija LOOH bila je viša u grupi sa MS sa p-vrednošću na granici statističke značajnosti. Rezultati su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Adipocitokini, markeri inflamacije i oksidativnog stresa kod ispitanika klasifikovanih prema prisustvu MS

	MS	Bez MS	p
Adiponektin (mg/L) ^β	4,99 (4,17-5,98)	6,26 (5,26-7,45)	0,100
Leptin (μg/L) ^β	22,61 (18,14-28,18)	14,76 (12,21-17,85)	<0,01
Leptin/adiponektin (μg/mg) ^β	4,57 (3,46-6,02)	2,37 (1,81-3,10)	<0,01
CRP (mg/L) ^β	3,49 (2,58-4,71)	1,49 (1,16-1,91)	<0,001
SAA (μg/L) ^β	60,98 (56,53 -65,80)	58,12 (55,12-61,29)	0,318
LOOH (μmol/L) ^β	6,94 (6,34-9,03)	5,04 (4,15-6,11)	0,056

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti). Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa.

4.3.1. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo MS

Analiza lipoproteinskih subfrakcija je pokazala manji dominantni dijametar LDL čestica i manju relativnu zastupljenost velikih LDL subfrakcija kod ispitanika sa MS. Takođe, u grupi ispitanika sa MS je pokazan manji relativni udeo HDL 2b, a veći udeo HDL 2a i HDL 3a subfrakcija u poređenju sa ispitanicima bez MS (tabela 9).

Tabela 9. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija u odnosu na prisustvo MS

	MS	Bez MS	p
Dominantni LDL dijametar (nm) †	26,37 (25,43-27,67)	27,52 (26,65-27,97)	<0,05
LDL I (%) †	20,1 (17,4-27,4)	23,5 (19,7-33,7)	<0,05
LDL II (%) †	26,9 (23,2-34,0)	27,2 (22,7-31,4)	0,666
LDL III (%) †	19,9 (16,1-22,8)	19,1 (15,5-21,7)	0,193
LDL IV (%) †	28,9 (19,2-37,2)	28,6 (20,6-35,9)	0,672
Male, guste LDL (%) †	50,9 (39,4-58,7)	50,3 (35,2-55,7)	0,359
Dominantni HDL dijametar (nm) †	9,17 (8,78-10,59)	10,16 (8,73-10,52)	0,401
HDL 2b (%) †	43,4 (42,1-50,0)	46,0 (42,2-49,7)	<0,05
HDL 2a (%) †	22,4 (19,9-24,7)	20,6 (19,2-22,7)	<0,05
HDL 3a (%) †	16,0 (14,1-16,8)	14,8 (13,4-16,4)	<0,05
HDL 3b (%) †	8,4 (7,5-9,8)	8,5 (6,7-10,1)	0,837
HDL 3c (%) †	9,1 (7,2-11,3)	8,8 (6,5-11,2)	0,520
Male HDL (%) †	34,2 (29,8-38,4)	32,8 (28,1-36,8)	0,281

† Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Mann-Whitney U testa.

4.3.2. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika razvrstanih prema prisustvu MS

Analiza markera kvalitativnih karakteristika HDL čestica je pokazala povišene vrednosti aktivnosti LCAT, koncentracije CETP, koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol u grupi sa MS u poređenju sa ispitanicima bez MS (tabela 10).

Tabela 10. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema prisustvu MS

	MS	Bez MS	p
LCAT ($\mu\text{mol/L/h}$) [†]	99,0 (83,2-120,1)	83,3 (65,2-101,5)	<0,01
CETP ($\mu\text{mol/L/h}$) [†]	37,3 (-0,30-101,0)	37,0 (-1,40-90,6)	0,899
CETP (mg/L) [‡]	1,226 \pm 0,364	1,011 \pm 0,290	<0,05
PON1 (mg/L) [†]	1,95 (9,73-2,12)	2,02 (1,63-2,18)	0,199
PON1 (IU/L) [†]	271 (202-561)	281 (186-719)	0,883
PON3 ($\mu\text{g/L}$) [‡]	37,5 \pm 14,2	41,8 \pm 14,2	0,253
OxHDL ($\mu\text{g/L}$) [†]	527 (402-642)	372 (199-623)	<0,05
OxHDL/HDL-holesterol ($\mu\text{g/mmol}$) [†]	409 (343-507)	247 (139-396)	<0,001

[‡] Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

[†] Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.4. Razlike u markerima karakteristika HDL čestica u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS

Dalja analiza je uključila ispitivanje koncentracije HDL-holesterol, relativne zastupljenosti HDL subfrakcija i markera kvalitativnih karakteristika HDL čestica kod ispitanika podeljenih na osnovu pojedinačnih komponenti MS.

Nakon podele ispitanika prema koncentraciji HDL-holesterol kao pojedinačne komponente MS, utvrđeno je da su kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol dominirale manje HDL subfrakcije, zajedno sa povišenom aktivnošću LCAT. Koncentracije CETP se nisu značajno razlikovale između grupa. Aktivnost CETP je bila nešto viša kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol, ali razlika nije dostigla granicu statističke značajnosti. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Raspodela HDL subfrakcija i markeri remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih u odnosu na koncentraciju HDL-holesterola

	HDL-holesterol muškarci < 1.03 mmol/L, žene < 1.3 mmol/L	HDL-holesterol muškarci ≥ 1.03 mmol/L, žene ≥ 1.3 mmol/L	p
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,06±0,15	1,59±0,34	-
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	9,09 (8,38-10,25)	10,19 (8,87-10,57)	<0,05
HDL 2b (%) ^α	42,7±4,7	46,7±5,9	<0,001
HDL 2a (%) ^α	21,7±3,1	21,2±2,9	0,340
HDL 3a (%) ^α	16,2±2,8	14,8±2,3	<0,01
HDL 3b (%) ^α	9,5±1,7	8,3±2,2	<0,01
HDL 3c (%) ^α	9,9±2,5	8,8±3,6	0,115
Male HDL (%) ^α	35,6±4,8	32,0±6,5	<0,01
LCAT (μmol/L/h) ^β	97,5 (87,8-108,2)	85,3 (80,2-90,8)	<0,05
CETP (μmol/L/h) ^γ	59,1 (18,5-116,8)	31,8 (-7,3-87,1)	0,087
CETP (mg/L) ^α	1,101±0,253	1,072±0,332	0,753

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Kod ispitanika sa hipertrigliceridemijom uočena je snižena koncentracija HDL- holesterola, kao i veća zastupljenost malih HDL čestica i povišene aktivnosti LCAT i CETP u odnosu na ispitanike sa koncentracijom triglicerida u preporučenim granicama (tabela 12).

Tabela 12. Koncentracija HDL-holesterola, raspodela HDL subfrakcija i markeri remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih u odnosu na koncentraciju triglicerida

	Trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L	Trigliceridi $< 1,7$ mmol/L	p
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,18±0,29	1,53±0,38	<0,001
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	9,16 (8,61-10,26)	10,17 (8,87-10,57)	0,123
HDL 2b (%) ^α	43,2±4,8	46,4±6,0	<0,05
HDL 2a (%) ^α	21,6±2,8	21,3±3,0	0,597
HDL 3a (%) ^α	15,8±2,5	15,0±2,5	0,134
HDL 3b (%) ^α	9,1±1,7	8,5±2,3	0,184
HDL 3c (%) ^α	10,3±3,1	8,7±3,4	<0,05
Male HDL (%) ^α	35,2±5,3	32,2±6,4	<0,05
LCAT (μmol/L/h) ^β	110,6 (100,2-122,1)	83,0 (78,4-87,8)	<0,001
CETP (μmol/L/h) ^γ	90,5 (28,8-126,0)	30,1 (-7,9-76,4)	<0,05
CETP (mg/L) ^α	1,243±0,252	1,056±0,358	0,092

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Kod ispitanika sa povišenom koncentracijom glukoze našte je nađena veća zastupljenost HDL 2a subfrakcije u odnosu na ispitanike sa normalnom koncentracijom glukoze. U kategoriji sa povišenom glukozom našte su takođe uočene nešto više vrednosti aktivnosti LCAT i koncentracije CETP pri čemu u oba slučaja p-vrednosti nisu prešle granicu statističke značajnosti (tabela 13).

Tabela 13. Koncentracija HDL-holesterola, raspodela HDL subfrakcija i markeri remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih u odnosu na koncentraciju glukoze

	Glukoza $\geq 5,6$ mmol/L	Glukoza $< 5,6$ mmol/L	p
HDL-holesterol (mmol/L) ^a	1,38 \pm 0,38	1,47 \pm 0,39	0,263
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	9,17 (8,81-10,52)	10,09 (8,72-10,53)	0,568
HDL 2b (%) ^a	44,9 \pm 5,1	45,9 \pm 6,2	0,373
HDL 2a (%) ^a	22,5 \pm 2,4	20,8 \pm 3,0	<0,01
HDL 3a (%) ^a	15,5 \pm 2,0	15,1 \pm 2,7	0,381
HDL 3b (%) ^a	8,2 \pm 1,7	8,8 \pm 2,3	0,125
HDL 3c (%) ^a	8,8 \pm 3,2	9,2 \pm 3,4	0,539
Male HDL (%) ^a	32,6 \pm 5,5	33,1 \pm 6,6	0,654
LCAT (μmol/L/h) ^β	95,6 (86,3-105,9)	86,0 (80,8-91,5)	0,074
CETP (μmol/L/h) ^γ	41,3 (11,6-97,8)	36,6 (-10,1-93,2)	0,490
CETP (mg/L) ^a	1,234 \pm 0,402	1,042 \pm 0,287	0,067

^a Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Prilikom podele ispitanika na osnovu povišenog krvnog pritiska kao komponente MS nisu uočene statistički značajne razlike u raspodeli HDL subfrakcija između dve kategorije, ali je primećen trend povećane relativne zastupljenosti manjih HDL subfrakcija (tabela 14). U kategoriji povišenog krvnog pritiska su pokazane više koncentracije CETP sa p-vrednošću na granici statističke značajnosti.

Tabela 14. Koncentracija HDL-holesterola, raspodela HDL subfrakcija i markeri remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih u odnosu na prisustvo povišenog krvnog pritiska

	Povišen krvni pritisak	Normalan krvni pritisak	p
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,41±0,43	1,47±0,35	0,429
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	9,33 (8,72-10,57)	10,16 (8,88-10,52)	0,369
HDL 2b (%) ^α	45,0±6,0	46,2±5,7	0,265
HDL 2a (%) ^α	21,6±2,9	21,1±2,9	0,429
HDL 3a (%) ^α	15,4±2,4	15,1±2,6	0,499
HDL 3b (%) ^α	8,6±2,1	8,6±2,2	0,972
HDL 3c (%) ^α	9,4±3,5	8,8±3,3	0,296
Male HDL (%) ^α	33,4±6,4	32,5±6,1	0,398
LCAT (μmol/L/h) ^β	92,5 (85,6-99,9)	85,2 (79,2-91,6)	0,125
CETP (μmol/L/h) ^γ	32,0 (-1,5-94,9)	39,2 (2,9-97,6)	0,645
CETP (mg/L) ^α	1,210±0,348	1,016±0,310	0,053

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Kod ispitanika sa povećanim obimom struka je uočena veća zastupljenost manjih HDL subfrakcija i povišena aktivnost LCAT u odnosu na ispitanike sa obimom struka u okviru preporučenih granica. Ostale varijable se nisu značajno razlikovale između grupa (tabela 15).

Tabela 15. Koncentracija HDL-holesterola, raspodela HDL subfrakcija i markeri remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih u odnosu na obim struka

	Povećan obim struka	Preporučeni obim struka	p
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,41±0,37	1,51±0,41	0,174
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	9,74 (8,72-10,50)	10,24 (8,88-10,57)	0,438
HDL 2b (%) ^α	44,6±5,4	47,7±6,4	<0,01
HDL 2a (%) ^α	21,5±3,0	21,0±2,6	0,452
HDL 3a (%) ^α	15,5±2,5	14,7±2,5	0,101
HDL 3b (%) ^α	8,8±2,1	8,3±2,2	0,290
HDL 3c (%) ^α	9,5±3,5	8,2±2,8	<0,05
Male HDL (%) ^α	33,8±6,1	31,2±6,3	<0,05
LCAT (μmol/L/h) ^β	94,2 (88,5-100,2)	78,8 (71,9-86,3)	<0,01
CETP (μmol/L/h) ^γ	35,4 (0,3-93,6)	37,0 (-9,9-106,6)	0,798
CETP (mg/L) ^α	1,110±0,355	1,105±0,278	0,966

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Analizom markera antioksidativne funkcije HDL kod ispitanika klasifikovanih na osnovu pojedinačnih komponenti MS nisu uočene značajne razlike u koncentraciji i aktivnosti PON1 između tako formiranih podgrupa ispitanika. Snižena koncentracija PON3 je utvrđena kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterola, kao i kod ispitanika sa povećanim obimom struka (tabela 16).

Tabela 16. Razlike u markerima antioksidativne funkcije HDL čestica u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS.

	HDL-holesterol muškarci < 1.03 mmol/L, žene < 1.3 mmol/L	HDL-holesterol muškarci ≥ 1.03 mmol/L, žene ≥ 1.3 mmol/L	p
PON1 (mg/L) [¶]	2,05 (1,62-2,16)	1,99 (1,42-2,16)	0,917
PON1 (IU/L) [¶]	270 (194-710)	290 (194-643)	0,680
PON3 (µg/L) ^α	33,5±12,1	44,0±12,7	<0,01
	Trigliceridi ≥1,7 mmol/L	Trigliceridi <1,7 mmol/L	p
PON1 (mg/L) [¶]	1,88 (0,85-2,10)	2,01 (1,65-2,17)	0,140
PON1 (IU/L) [¶]	254 (191-688)	291 (191-607)	0,639
PON3 (µg/L) ^α	36,9±10,2	41,3±13,9	0,329
	Glukoza ≥5,6 mmol/L	Glukoza <5,6 mmol/L	p
PON1 (mg/L) [¶]	1,87 (1,38-2,12)	2,01 (1,62-2,18)	0,138
PON1 (IU/L) [¶]	271 (220-561)	281 (186-667)	0,684
PON3 (µg/L) ^α	40,3±12,7	40,6±13,7	0,951
	Povišen krvni pritisak	Normalan krvni pritisak	p
PON1 (mg/L) [¶]	1,95 (1,03-2,12)	2,03 (1,64-2,18)	0,146
PON1 (IU/L) [¶]	325 (188-561)	270 (192-728)	0,978
PON3 (µg/L) ^α	43,1±1,35	38,3±13,1	0,170
	Povećan obim struka	Preporučeni obim struka	p
PON1 (mg/L) [¶]	1,99 (1,45-2,13)	2,05 (1,46-2,20)	0,508
PON1 (IU/L) [¶]	268 (197-542)	417 (177-828)	0,215
PON3 (µg/L) ^α	37,8±13,8	45,5±11,1	<0,05

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

[¶] Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Značajna razlika u koncentraciji OxHDL je pokazana samo u grupi ispitanika podeljenih na osnovu koncentracije glukoze, pri čemu su više vrednosti dobijene kod ispitanika sa povišenom koncentracijom glukoze našte. Vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol su bile više u grupama sa sniženom koncentracijom HDL-holesterola, povišenim koncentracijama triglicerida i glukoze našte, u svakoj kategoriji posebno. U kategoriji sa povišenim krvnim pritiskom je uočena viša vrednost odnosa OxHDL/HDL-holesterol, iako bez statističke značajnosti. Svi rezultati su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Razlike u koncentraciji OxHDL i vrednostima odnosa OxHDL/HDL-holesterol u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS.

	HDL-holesterol muškarci < 1.03 mmol/L, žene < 1.3 mmol/L	HDL-holesterol muškarci ≥ 1.03 mmol/L, žene ≥ 1.3 mmol/L	p
OxHDL (µg/L) †	453 (365-627)	436 (211-650)	0,290
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol) †	432 (344-608)	255 (139-393)	<0,001
	Trigliceridi ≥ 1,7 mmol/L	Trigliceridi < 1,7 mmol/L	p
OxHDL (µg/L) †	453 (380-635)	442 (254-628)	0,529
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol) †	409 (325-476)	246 (162-430)	<0,01
	Glukoza ≥ 5,6 mmol/L	Glukoza < 5,6 mmol/L	p
OxHDL (µg/L) †	509 (384-674)	417 (211-618)	<0,01
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol) †	395 (313-590)	289 (149-432)	<0,01
	Povišen krvni pritisak	Normalan krvni pritisak	p
OxHDL (µg/L) †	464 (328-647)	417 (211-624)	0,109
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol) †	372 (216-478)	303 (157-421)	0,076
	Povećan obim struka	Preporučeni obim struka	p
OxHDL (µg/L) †	453 (272-641)	413 (250-607)	0,403
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol) †	364 (213-468)	312 (135-419)	0,156

† Vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka između dve grupe je izvršeno pomoću Mann-Whitney U testa.

4.5. Osnovne karakteristike ispitanika razvrstanih u kategorije prema FLI

Osnovne karakteristike tri grupe ispitanika klasifikovanih na osnovu vrednosti FLI su prikazane u tabeli 18. Ispitanici u $FLI < 30$ grupi su bili mlađi u odnosu na druge dve grupe. Sa povišenjem FLI se paralelno menjao i stepen gojaznosti, izražen putem ITM i obima struka. Kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ su primećene više koncentracije glukoze i HbA1c u odnosu na ispitanike sa $FLI < 30$, dok su koncentracije insulina i vrednosti HOMA IR bile više u $FLI \geq 60$ grupi u odnosu na druge dve. Koncentracije HDL-holesterola su bile najniže, a koncentracije triglicerida najviše u $FLI \geq 60$ grupi. Primećen je trend opadanja koncentracije HDL-holesterola sa porastom vrednosti FLI. Ukupni, LDL i slobodni holesterol su bili viši u $FLI \geq 60$ u poređenju sa $FLI < 30$ grupom. Sa povišenjem FLI između grupa je utvrđeno paralelno povišenje aktivnosti GGT.

Tabela 18. Demografski, osnovni klinički i laboratorijski podaci ispitanika klasifikovanih u kategorije prema FLI

	FLI<30 N=38	FLI=30-59 N=43	FLI≥60 N=49	p
Starost (godine) ^α	39±16	48±15 ^{a*}	48±14 ^{a*}	<0,05
Pol (muškarci/žene) ^δ	5/33	8/35	16/33	0,074
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	34/4	35/8	37/12	0,250
ITM (kg/m ²) ^β	24,6 (23,5-25,7)	28,9 (28,3-29,5) ^{a***}	34,6 (33,1-36,0) ^{a***, b***}	<0,001
Obim struka (cm) ^β	82 (79-85)	94 (92-95) ^{a***}	107 (104-110) ^{a***, b***}	<0,001
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^α	112±15	122±12 ^{a**}	127±12 ^{a***}	<0,001
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^α	71±9	76±10	79±9 ^{a**}	<0,01
Ukupni holesterol (mmol/L) ^α	4,87±1,17	5,38±1,00	5,63±1,11 ^{a**}	<0,01
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,62±0,44	1,50±0,33	1,25±0,30 ^{a***, b**}	<0,001
LDL-holesterol (mmol/L) ^α	2,86±0,99	3,33±0,84	3,42±0,88 ^{a*}	<0,05
Trigliceridi (mmol/L) ^β	0,80 (0,70-0,90)	1,16 (1,05-1,27) ^{a***}	1,76 (1,56-2,00) ^{a***, b***}	<0,001
Slobodni holesterol (mmol/L) ^α	1,35±0,37	1,50±0,33	1,63±0,35 ^{a**}	<0,01
Glukoza (mmol/L) ^α	4,9±0,6	5,2±0,8	5,4±0,7 ^{a**}	<0,05
HbA1c (mmol/mol) ^α	35,6±5,0	37,8±4,0	38,2±4,3 ^{a*}	<0,05
Insulin (mIU/L) ^β	14 (12-16)	16 (14-17)	22 (19-25) ^{a***, b***}	<0,001
HOMA-IR ^β	2,8 (2,4-3,2)	3,4 (3,1-3,9)	5,1 (4,4-5,8) ^{a***, b***}	<0,001
GGT (IU/L) ^β	12 (11-13)	18 (16-21) ^{a**}	27 (23-33) ^{a***, b**}	<0,001

^α Kontinuirane normalno distribuirane promjenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^δ Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvencije.

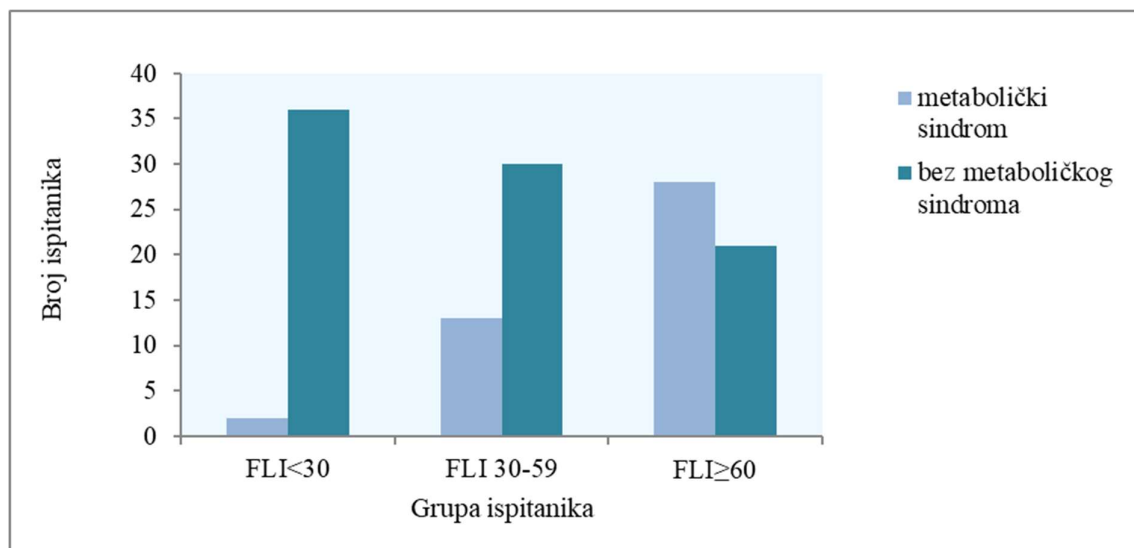
Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć analize varijanse (ANOVA) uz post hoc Tukey test za normalno distribuirane podatke i Kruskal-Wallis testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Kategoričke promjenljive su upoređene uz pomoć Chi-kvadrat testa (χ^2).

^a u poređenju sa FLI<30 grupom, ^b u poređenju sa FLI=30-59 grupom

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

MS je bio prisutan kod 2 od 38 ispitanika u FLI<30 grupi, kod 13 od 43 ispitanika u FLI=30-59 grupi i kod 28 od 49 ispitanika u FLI≥60 grupi (slika 21). Chi-kvadrat testom je

dokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti MS između kategorija FLI ($\chi^2=26,258$, $p<0,001$).



Slika 21. Zastupljenost MS kod ispitanika klasifikovanih na osnovu vrednosti FLI. Podaci su prikazani kao apsolutne frekvence.

Ispitanici sa $FLI \geq 60$ su imali značajno niže koncentracije adiponektina, više koncentracije leptina i odnosa leptin/adiponektin u odnosu na ispitanike u $FLI < 30$ grupi. Markeri inflamacije su bili povišeni kod ispitanika sa $FLI \geq 60$, dok se koncentracija LOOH nije razlikovala između FLI kategorija (tabela 19).

Tabela 19. Adipocitokini, markeri inflamacije i oksidativnog stresa ispitanika klasifikovanih prema FLI

	FLI<30	FLI=30-59	FLI≥60	p
Adiponektin (mg/L) ^β	8,43 (6,78-10,50)	5,51 (4,28-7,10) ^{a*}	4,46 (3,76-5,30) ^{a***}	<0,001
Leptin (μg/L) ^β	10,11 (7,71-13,26)	18,49 (14,63-23,37) ^{a**}	23,03 (18,31-28,95) ^{a***}	<0,001
Leptin/adiponektin (μg/mg) ^β	1,25 (0,88-1,77)	3,39 (2,41-4,75) ^{a***}	5,17 (4,01-6,68) ^{a***}	<0,001
CRP (mg/L) ^β	0,8 (0,6-1,2)	2,0 (1,5-2,7) ^{a**}	3,6 (2,7-4,8) ^{a***, b*}	<0,001
SAA (μg/L) ^α	55,4±13,6	61,9±15,9	63,3±13,8 ^{a*}	<0,05
LOOH (μmol/L) ^β	5,69 (4,32-7,52)	6,35 (4,79-8,42)	4,82 (3,68-6,30)	0,351

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

Poređenje podataka normalno distribuiranih podataka je izvršeno uz pomoć analize varijanse (ANOVA) uz post hoc Tukey test.

^a u poređenju sa $FLI < 30$ grupom, ^b u poređenju sa $FLI = 30-59$ grupom

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.5.1. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija između ispitanika klasifikovanih prema FLI

Rezultati analize raspodele LDL i HDL subfrakcija kod različitih kategorija FLI su prikazani u tabeli 20. U grupi ispitanika sa $FLI \geq 60$ je utvrđena veća relativna zastupljenost malih, gustih LDL u poređenju sa $FLI < 30$ grupom, kao i veća relativna zastupljenost malih HDL u odnosu na druge dve grupe.

Tabela 20. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija između ispitanika klasifikovanih prema FLI

	FLI<30	FLI=30-59	FLI≥60	p
Dominantni LDL dijametar (nm) ^γ	27,39 (26,58-27,83)	27,51 (26,62-27,85)	26,75 (25,55-27,93)	0,510
LDL I (%) ^α	27,9±10,7	27,8±10,1	22,2±7,0 ^{b*}	<0,05
LDL II (%) ^α	31,0±7,0	28,0±6,2	26,3±7,6 ^{a**}	<0,05
LDL III (%) ^α	16,8±4,2	18,0±4,3	20,8±6,3 ^{a*}	<0,05
LDL IV (%) ^α	24,3±10,1	26,2±11,1	30,7±9,8	0,061
Male, guste LDL (%) ^α	41,1±13,8	44,2±14,4	51,5±11,3 ^{a*}	<0,01
Dominantni HDL dijametar (nm) ^γ	10,32 (9,75-10,57)	9,72 (8,71-10,44)	9,33 (8,63-10,58)	0,107
HDL 2b (%) ^α	48,5±6,0	45,8±6,0	43,3±4,7 ^{a***}	<0,001
HDL 2a (%) ^α	20,7±2,6	22,1±3,1	21,1±2,9	0,092
HDL 3a (%) ^α	14,5±2,3	15,2±2,7	15,7±2,4	0,076
HDL 3b (%) ^α	8,3±2,4	8,2±2,1	9,2±1,9	0,059
HDL 3c (%) ^α	8,0±3,0	8,3±2,8	10,6±3,5 ^{a*, b*}	<0,001
Male HDL (%) ^α	30,8±6,2	31,7±6,0	35,6±5,6 ^{a**, b**}	<0,01

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć je izvršeno uz pomoć analize varijanse (ANOVA) uz post hoc Tukey test za normalno distribuirane podatke i Kruskal-Wallis testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

^a u poređenju sa FLI<30 grupom, ^b u poređenju sa FLI=30-59 grupom

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.5.2. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema FLI

Analizom markera remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema FLI je utvrđeno povišenje aktivnosti LCAT paralelno sa porastom FLI. Nije pronađena značajna razlika između grupa u odnosu na aktivnost CETP, ali je najviša aktivnost CETP zapažena kod ispitanika sa FLI \geq 60. Koncentracija CETP se nije razlikovala između grupa. U poređenju sa ispitanicima sa FLI $<$ 30, kod ispitanika sa FLI \geq 60 je pokazana značajno niža koncentracija PON3 i više vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol. Aktivnost i koncentracija PON1 i koncentracija OxHDL se nisu razlikovale između grupa. Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih prema FLI

	FLI $<$ 30	FLI=30-59	FLI \geq 60	p
LCAT (μ mol/L/h) ^β	73,8 (67,6-80,6)	86,2 (80,2-92,6) ^{a*}	105,1 (96,6-114,4) ^{a***, b**}	$<$ 0,001
CETP (μ mol/L/h) ^γ	39,8 (-5,8-89,2)	25,6 (-5,2-56,8)	58,3 (11,6-114,5)	0,128
CETP (mg/L) ^α	1,183 \pm 0,251	1,018 \pm 0,338	1,163 \pm 0,360	0,351
PON1 (mg/L) ^γ	2,11 (1,65-2,22)	1,98 (1,34-2,13)	1,98 (1,38-2,11)	0,202
PON1 (IU/L) ^γ	544 (168-905)	267 (200-547)	271 (197-507)	0,274
PON3 (μ g/L) ^α	44,4 \pm 12,8	42,8 \pm 12,7	34,1 \pm 12,9 ^{a*}	$<$ 0,05
OxHDL (μ g/L) ^γ	355 (200-570)	509 (266-629)	449 (333-641)	0,390
OxHDL/HDL-holesterol (μ g/mmol) ^γ	217 (126-359)	321 (176-549)	378 (256-506) ^{a**}	$<$ 0,05

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija,

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć je izvršeno uz pomoć analize varijanse (ANOVA) uz post hoc Tukey test za normalno distribuirane podatke i Kruskal-Wallis testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

^a u poređenju sa FLI $<$ 30 grupom, ^b u poređenju sa FLI=30-59 grupom

*p $<$ 0,05, **p $<$ 0,01, ***p $<$ 0,001

Prediktivni potencijal selektovanih markera kvalitativnih karakteristika HDL čestica za prisustvo NAFLD je dalje procenjen binarnom logističkom regresionom analizom. U ovu analizu uključeni su samo ispitanici u kategorijama FLI \leq 30 i FLI $>$ 60. Kategorija FLI \leq 30 je kodirana sa 0, dok je grupa FLI $>$ 60 kodirana sa 1. Analizirani su prediktivni potencijali markera kvalitativnih karakteristika HDL čestica koji su se razlikovali između FLI grupa (tabela 23), odnosno aktivnost LCAT, koncentracija PON3 i odnos OxHDL/HDL-holesterol. Modeli za multivarijantnu analizu su uključili parametre koji se tradicionalno vezuju za NAFLD, kao što su starost i pol, kao i parametre koji odlikavaju metaboličke poremećaje povezane sa NAFLD: HOMA IR kao meru insulinske rezistencije, prisustvo MS i relativni udeo malih HDL. Imajući u vidu ulogu LCAT u metabolizmu lipoproteina, za procenu aktivnosti LCAT kao prediktora povišenih vrednosti FLI su formirana dva dodatna modela koja su uključila koncentraciju

slobodnog i ukupnog holesterola u plazmi. Aktivnost LCAT je bila značajan nezavisni prediktor povišenih vrednosti FLI u svim konstruisanim modelima, koncentracija PON3 je izgubila značajnost nakon uključivanja udela malih HDL subfrakcija u model, a odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio značajan prediktor prisustva NAFLD samo u modelu koji je uključivao pol i starost. Rezultati su prikazani u tabelama 22 i 23.

Tabela 22. Procena značaja selektovanih markera kvalitativnih svojstava HDL čestica u predikciji prisustva NAFLD

	OR (95% CI)	p		OR (95% CI)	p		OR (95% CI)	p
Nekorigovani OR								
LCAT (μmol/L/h)	1,053 (1,027-1,080)	<0,001	PON3 (μg/L)	0,939 (0,887-0,993)	<0,05	OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol)	1,004 (1,001-1,007)	<0,05
Model 1								
LCAT (μmol/L/h)	1,052 (1,023-1,081)	<0,001	PON3 (μg/L)	0,925 (0,867-0,988)	<0,05	OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol)	1,004 (1,000-1,008)	<0,05
Starost (godine)	1,036 (0,998-1,076)	0,065	Starost (godine)	1,044 (0,981-1,110)	0,177	Starost (godine)	1,051 (1,004-1,101)	<0,05
Pol	0,446 (0,124-1,612)	0,218	Pol	0,172 (0,023-1,310)	0,089	Pol	0,000 (0,000-0,000)	0,998
Pušački status	3,456 (0,648-18,427)	0,147	Pušački status	7,218 (0,594-87,657)	0,121	Pušački status	3,293 (0,521-20,826)	0,205
Model 2								
LCAT (μmol/L/h)	1,039 (1,008-1,070)	<0,05	PON3 (μg/L)	0,897 (0,817-0,986)	<0,05	OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol)	1,003 (0,998-1,007)	0,215
Starost (godine)	1,034 (0,992-1,077)	0,112	Starost (godine)	1,107 (0,997-1,229)	0,057	Starost (godine)	1,058 (1,008-1,109)	<0,05
Pol	0,444 (0,097-2,018)	0,293	Pol	6,961 (0,200-241,768)	0,284	Pol	0,000 (0,000-0,000)	0,999
HOMA IR	2,396 (1,439-3,990)	<0,01	HOMA IR	3,690 (1,334-10,209)	<0,05	HOMA IR	1,541 (0,946-2,512)	0,082
Model 3								
LCAT (μmol/L/h)	1,041 (1,013-1,071)	<0,01	PON3 (μg/L)	0,930 (0,869-0,995)	<0,05	OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol)	1,002 (0,998-1,006)	0,381
Starost (godine)	1,012 (0,972-1,054)	0,563	Starost (godine)	1,032 (0,967-1,101)	0,345	Starost (godine)	1,035 (0,989-1,084)	0,138
Pol	0,384 (0,096-1,535)	0,176	Pol	0,246 (0,035-1,749)	0,161	Pol	0,000 (0,000-0,000)	0,998
MS	13,241 (2,453-71,483)	<0,01	MS	5,006 (0,739-33,922)	0,099	MS	5,983 (0,953-37,549)	0,056

Model 4

LCAT (μmol/L/h)	1,042 (1,014-1,071)	<0,01	PON3 (μg/L)	0,934 (0,866-1,006)	0,073	OxHDL/HDL- holesterol (μg/mmol)	1,004 (0,999-1,008)	0,094
Starost (godine)	1,047 (1,005-1,091)	<0,05	Starost (godine)	1,042 (0,974-1,114)	0,232	Starost (godine)	1,063 (1,009-1,121)	<0,05
Pol	0,391 (0,093-1,641)	0,200	Pol	0,449 (0,060-3,368)	0,436	Pol	0,000 (0,000-0,000)	0,998
Male HDL (%)	1,130 (1,017-1,255)	<0,05	Male HDL (%)	1,316 (1,044-1,659)	<0,05	Male HDL (%)	1,165 (1,038-1,307)	<0,01

Prikazane su p vrednosti dobijene logističkom regresionom analizom.

Model 1: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene), pušački status (kategorička promenljiva: 0-nepušač, 1-pušač).

Model 2: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene), HOMA IR (kontinuirana promenljiva).

Model 3: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene) i prisustvo MS (kategorička promenljiva: 0-bez MS, 1-MS).

Model 4: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene) i relativna zastupljenost malih HDL (kontinuirana promenljiva).

Tabela 23. Procena značaja aktivnosti LCAT u predikciji prisustva NAFLD

	OR (95% CI)	p
<i>Model 1</i>		
LCAT ($\mu\text{mol/L/h}$)	1,047 (1,019-1,075)	<0,01
Starost (godine)	1,018 (0,976-1,063)	0,406
Pol	0,433 (0,119-1,577)	0,204
Slobodni holesterol (mmol/L)	2,613 (0,382-17,890)	0,328
<i>Model 2</i>		
LCAT ($\mu\text{mol/L/h}$)	1,048 (1,021-1,076)	<0,01
Starost (godine)	1,021 (0,979-1,064)	0,333
Pol	0,431 (0,117-1,581)	0,204
Ukupni holesterol (mmol/L)	1,303 (0,733-2,315)	0,367

Prikazane su p vrednosti dobijene logističkom regresionom analizom.

Model 1: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene) i slobodan holesterol u plazmi (kontinuirana promenljiva).

Model 2: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene) i ukupan holesterol (kontinuirana promenljiva).

4.5.3. Ispitivanje nezavisnog uticaja parametara uključenih u izračunavanje FLI na aktivnost LCAT

S obzirom na to da je prethodno utvrđen nezavisni potencijal LCAT u predviđanju pojave NAFLD, u nastavku smo ispitivali koliko biomarkeri koje se koriste za izračunavanje FLI utiču na promene aktivnosti ovog enzima. Multivarijantna linearna regresiona analiza je imala za cilj da proceni nezavisan doprinos parametara uključenih u izračunavanje FLI na aktivnost LCAT. U model 1 su uključeni parametri koji se koriste za izračunavanje FLI. Model 2 je predstavljao proširenu verziju modela 1 koji je uključio serumske lipidne parametre. U modelu 1 je samo koncentracija triglicerida ostala značajno povezana sa povišenom aktivnošću LCAT. U modelu 2, pored koncentracije triglicerida, koncentracija slobodnog holesterola se izdvojila kao parametar koji nezavisno modulira aktivnost LCAT (tabela 24).

Tabela 24. Procena nezavisnog doprinosa parametara uključenih u izračunavanje FLI na promene aktivnosti LCAT

	regresioni koeficijent β (standardna greška za β)	p	korigovano R ²
<i>Model 1</i>			
ITM (kg/m ²)	0,307 (0,229)	0,182	0,291
Obim struka (cm)	-0,001 (0,318)	0,998	
Trigliceridi (mmol/L)	0,259 (0,056)	<0,01	
GGT (IU/L)	0,010 (0,043)	0,817	
<i>Model 2</i>			
ITM (kg/m ²)	0,395 (0,226)	0,083	0,330
Obim struka (cm)	-0,222 (0,324)	0,494	
Trigliceridi (mmol/L)	0,141 (0,069)	<0,05	
GGT (IU/L)	0,019 (0,042)	0,656	
HDL-holesterol (mmol/L)	-0,050 (0,035)	0,157	
LDL-holesterol (mmol/L)	-0,011 (0,018)	0,565	
Slobodni holesterol (mmol/L)	0,136 (0,056)	<0,05	
Starost (godine)	0,000 (0,001)	0,916	

Aktivnost LCAT, ITM, obim struka, koncentracija triglicerida, GGT aktivnost i vrednosti HOMA IR su logaritamski transformisane.

Multivarijantna linearna regresiona analiza

Model 1: parametri uključeni u izračunavanje FLI.

Model 2: parametri uključeni u izračunavanje FLI, lipidni parametri i starost.

Multivarijantna linearna regresija kod ispitanika podeljenih prema polu je potvrdila da je koncentracija triglicerida jedini nezavisni prediktor aktivnosti LCAT kod oba pola kada se posmatraju parametri uključeni u izračunavanje FLI. U proširenom modelu, koncentracija triglicerida je bila jedini značajan prediktor aktivnosti LCAT kod muškaraca. Kod žena je koncentracija slobodnog holesterola ostala nezavisno povezana sa aktivnošću LCAT (tabela 25).

Tabela 25. Procena nezavisnog doprinosa parametara uključenih u izračunavanje FLI na promene aktivnosti LCAT kod ispitanika različitog pola

	Žene			Muškarci		
	regresioni koeficijent β (standardna greška za β)	p	korigovano R ²	regresioni koeficijent β (standardna greška za β)	p	korigovano R ²
<i>Model 1</i>						
ITM (kg/m ²)	0,227 (0,284)	0,426	0,249	0,854 (0,597)	0,168	0,459
Obim struka (cm)	0,085 (0,375)	0,821		-0,844 (1,042)	0,427	
Trigliceridi (mmol/L)	0,256 (0,065)	<0,01		0,302 (0,126)	<0,05	
GGT (IU/L)	0,023 (0,053)	0,670		-0,070 (0,101)	0,494	
<i>Model 2</i>						
ITM (kg/m ²)	1,544 (0,469)	0,354	0,318	1,124 (0,690)	0,124	0,399
Obim struka (cm)	-0,66 (0,367)	0,857		-1,050 (1,250)	0,414	
Trigliceridi (mmol/L)	0,102 (0,079)	0,203		0,480 (0,158)	<0,05	
GGT (IU/L)	0,045 (0,051)	0,385		-0,116 (0,108)	0,298	
HDL-holesterol (mmol/L)	-0,075 (0,041)	0,072		0,110 (0,085)	0,218	
LDL-holesterol (mmol/L)	0,000 (0,022)	0,998		-0,017 (0,038)	0,651	
Slobodni holesterol (mmol/L)	0,155 (0,063)	<0,05		0,069 (0,136)	0,507	
Starost (godine)	-0,001 (0,001)	0,543		0,001 (0,002)	0,362	

Aktivnost LCAT, ITM, obim struka, koncentracija triglicerida, GGT aktivnost i vrednosti HOMA IR su logaritamski transformisane.

Multivarijantna regresiona analiza

Model 1: parametri uključeni u izračunavanje FLI.

Model 2: parametri uključeni u izračunavanje FLI, lipidni parametri i starost.

4.6. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa različitim fenotipovima metaboličkog zdravlja

Demografski i klinički podaci ispitanika podjeljenih prema metaboličkom fenotipu su prikazani u tabelama 26 i 27. U grupi ispitanika sa prekomernom telesnom masom, metabolički zdravi ispitanici su bili mlađi od ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom, dok kod gojaznih osoba nije bilo značajne razlike u starosti između dve podgrupe. Iako se ITM nije razlikovao između fenotipova u obe grupe, ispitanici sa metabolički nezdravim fenotipom su imali veći obim struka i više vrednosti VAI. Koncentracije glukoze i triglicerida su bile značajno više kod ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom u obe grupe. Koncentracije HDL-holesterola su bile niže kod gojaznih ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom, dok u grupi ispitanika sa prekomernom telesnom masom ova razlika nije bila statistički značajna. Koncentracije ukupnog i LDL-holesterola se nisu razlikovale između fenotipova. Nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji adipocitokina, markerima inflamacije i oksidativnog stresa između metaboličkih fenotipova (tabele 28 i 29).

Tabela 26. Demografski, osnovni klinički i laboratorijski podaci kod različitih metaboličkih fenotipova ispitanika sa prekomernom telesnom masom

Ispitanici sa prekomernom telesnom masom			
	Metabolički nezdrav fenotip N=38	Metabolički zdrav fenotip N=18	p
Starost (godine) ^α	48±15	38±16	<0,05
Pol (muškarci/žene) ^δ	8/30	3/15	0,979
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	29/9	17/1	0,200
ITM (kg/m ²) ^γ	28,1 (26,8-28,7)	28,1 (25,6-28,4)	0,425
Obim struka (cm) ^α	93±6	87±7	<0,01
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	128 (120-130)	110 (107-120)	<0,001
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	80 (70-85)	70 (60-80)	<0,05
Ukupni holesterol (mmol/L) ^α	5,64±1,62	5,28±1,13	0,403
HDL-holesterol (mmol/L) ^α	1,44±0,41	1,61±0,38	0,135
LDL-holesterol (mmol/L) ^α	3,35±0,96	3,24±0,98	0,687
Trigliceridi (mmol/L)	1,31 (1,14-1,51)	0,90 (0,77-1,05)	<0,01
Slobodni holesterol (mmol/L) ^α	1,53±0,39	1,53±0,35	0,981
Glukoza (mmol/L) ^α	5,41±0,87	4,82±0,44	<0,01
HbA1c (mmol/mol) ^α	37±4	36±6	0,188
Insulin (mIU/L) ^β	17,3 (15,3-19,6)	15,2 (13,7-17,0)	0,117
HOMA IR ^β	3,70 (2,89-4,99)	3,15 (2,71-3,84)	0,093
GGT (IU/L) ^β	19 (15-24)	15 (13-18)	0,114
VAI ^β	1,68 (1,41-2,01)	0,99 (0,81-1,22)	<0,01

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

^δ Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvencije.

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Kategoričke promenljive su upoređene uz pomoć Chi-kvadrat testa (χ^2).

Tabela 27. Demografski, osnovni klinički i laboratorijski podaci kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih ispitanika

	Gojazni ispitanici		p
	Metabolički nezdrav fenotip N=43	Metabolički zdrav fenotip N=16	
Starost (godine) ^α	47±14	46±14	0,733
Pol (muškarci/žene) ^δ	11/32	3/13	0,838
Pušački status (nepušači/pušači) ^δ	35/8	13/3	1,000
ITM (kg/m ²) ^γ	33,9 (31,6-41,8)	33,6 (30,0-35,1)	0,189
Obim struka (cm) ^α	109±15	100±7	<0,01
Sistolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	130 (120-135)	120 (116-120)	<0,01
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) ^γ	80 (70-90)	78 (70-80)	0,061
Ukupni kolesterol (mmol/L) ^α	5,41±1,00	5,34±0,67	0,798
HDL-kolesterol (mmol/L) ^α	1,23±0,29	1,54±0,27	<0,001
LDL-kolesterol (mmol/L) ^α	3,32±0,81	3,27±0,69	0,839
Trigliceridi (mmol/L) ^β	1,64 (1,42-1,90)	1,11 (0,93-1,34)	<0,01
Slobodni kolesterol (mmol/L) ^α	1,54±0,33	1,54±0,27	0,985
Glukoza (mmol/L) ^α	5,50±0,82	4,74±0,46	<0,01
HbA1c (mmol/mol) ^α	38±4	39±2	0,821
Insulin (mIU/L) ^β	21,4 (18,7-24,4)	16,2 (13,3-19,9)	<0,05
HOMA IR ^β	4,70 (3,55-6,97)	3,48 (2,68-3,86)	<0,05
GGT (IU/L) ^β	24 (19-29)	19 (15-25)	0,238
VAI ^β	2,40 (2,00-2,87)	1,31 (1,09-1,58)	<0,001

^α Kontinuirane normalno distribuirane promjenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

^δ Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvencije.

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti. Kategoričke promjenljive su upoređene uz pomoć Chi-kvadrat testa (χ^2).

Tabela 28. Adipocitokini, markeri inflamacije i oksidativnog stresa kod različitih metaboličkih fenotipova ispitanika sa prekomernom telesnom masom

Ispitanici sa prekomernom telesnom masom			
	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	P
Adiponektin (mg/L) ^β	5,81 (4,60-7,34)	5,54 (3,46-8,86)	0,831
Leptin (μg/L) ^β	16,38 (12,77-21,00)	12,56 (9,44-16,71)	0,197
Leptin/adiponektin (μg/mg) ^β	2,96 (2,19-4,00)	2,08 (1,47-2,94)	0,158
CRP (mg/L) ^β	2,20 (1,07-4,02)	1,60 (0,47-3,17)	0,188
SAA (μg/L) ^α	63,3±14,8	66,0±13,9	0,532
LOOH (μmol/L) ^γ	5,25 (2,48-7,60)	4,74 (2,11-6,08)	0,383

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

Tabela 29. Adipocitokini, markeri inflamacije i oksidativnog stresa kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih ispitanika

Gojazni ispitanici			
	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	P
Adiponektin (mg/L) ^β	5,16 (4,39-6,08)	4,72 (2,13-10,43)	0,804
Leptin (μg/L) ^β	26,67 (21,20-33,57)	25,61 (18,17-36,11)	0,837
Leptin/adiponektin (μg/mg) ^β	4,82 (3,55-6,56)	5,66 (1,99-16,12)	0,744
CRP (mg/L) ^β	4,37 (1,80-8,20)	2,70 (1,92-4,27)	0,102
SAA (μg/L) ^α	60,8±11,0	62,4±11,5	0,633
LOOH (μmol/L) ^γ	6,24 (2,64-9,04)	5,17 (1,71-10,18)	0,664

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.6.1. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom

Iako nije bilo konzistentnih razlika u distribuciji, kod metabolički nezdravog fenotipa su dominirale manje LDL i HDL čestice u poređenju sa profilom metabolički zdravih ispitanika. Rezultati su prikazani u tabeli 30.

Tabela 30. Razlike u raspodeli LDL i HDL subfrakcija kod različitih metaboličkih fenotipova-gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom

	Ispitanici sa prekomernom telesnom masom			Gojazni ispitanici		
	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	p	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	p
Dominantni LDL dijametar (nm) [†]	27,39 (25,98-27,78)	27,48 (27,32-28,00)	0,355	27,10 (25,49-27,85)	27,91 (27,05-28,30)	<0,05
LDL I (%) ^α	24,7±10,5	36,4±8,1	<0,05	23,5±8,1	24,7±6,4	0,630
LDL II (%) ^α	28,1±6,9	29,9±4,2	0,479	25,3±5,8	27,3±8,0	0,420
LDL III (%) ^α	19,2±4,9	14,5±3,1	<0,05	20,1±6,7	19,2±2,6	0,645
LDL IV (%) ^α	28,0±11,0	19,2±9,0	<0,05	29,1±10,4	30,8±8,5	0,611
Male, guste LDL (%) ^α	47,1±14,2	33,7±11,9	<0,05	49,2±13,0	50,0±10,2	0,850
Dominantni HDL dijametar (nm) [†]	8,94 (8,64-10,28)	10,48 (9,21-10,67)	<0,05	9,16 (8,62-10,43)	10,04 (9,33-10,55)	0,246
HDL 2b (%) ^α	45,2±6,7	48,6±6,5	0,084	43,3±4,7	45,6±4,8	0,116
HDL 2a (%) ^α	22,0±3,3	21,0±3,5	0,316	21,1±3,0	22,2±2,5	0,218
HDL 3a (%) ^α	15,5±2,8	14,0±2,5	0,054	16,0±2,5	14,5±2,2	<0,05
HDL 3b (%) ^α	8,4±2,3	7,9±2,7	0,489	9,3±1,8	8,6±1,8	0,244
HDL 3c (%) ^α	8,8±3,5	7,9±3,5	0,315	10,2±3,3	9,0±3,0	0,228
Male HDL (%) ^α	32,8±7,2	29,7±6,5	0,135	35,6±5,5	32,2±4,4	<0,05

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

[†] Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.6.2. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom

Dalje su analizirani markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova u kategorijama ispitanika sa prekomernom telesnom masom i gojaznih. Kod ispitanika sa prekomernom telesnom masom, povišena koncentracija OxHDL je uočena kod metabolički nezdravog fenotipa. Kod gojaznih ispitanika, nije pronađena značajna razlika u koncentraciji OxHDL između metaboličkih fenotipova, iako je koncentracija OxHDL bila povišena kod metabolički nezdravog fenotipa. Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio viši kod ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom u obe grupe. Markeri remodelovanja HDL-subfrakcija i antioksidativne funkcije se nisu značajno razlikovali između fenotipova (tabela 31).

Tabela 31. Markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom

	Ispitanici sa prekomernom telesnom masom			Gojazni ispitanici		
	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	P	Metabolički nezdrav fenotip	Metabolički zdrav fenotip	P
LCAT (μmol/L/h) ^β	87,4 (80,5-94,9)	81,6 (64,5-103,1)	0,561	102,2 (93,0-112,3)	95,2 (83,9-108,0)	0,413
CETP (μmol/L/h) ^γ	35,2 (10,6-91,0)	22,4 (-54,8-139,0)	0,256	61,5 (2,75-114,8)	28,3 (0,25-93,2)	0,259
CETP (mg/L) ^α	1,124±0,279	0,997±0,207	0,328	1,114±0,316	0,962±0,474	0,371
PON1 (mg/L) ^γ	1,98 (1,62-2,14)	2,10 (1,08-2,20)	0,693	2,00 (1,03-2,11)	2,07 (1,71-2,21)	0,170
PON1 (IU/L) ^γ	349 (233-544)	283 (158-920)	0,925	268 (178-698)	276 (207-526)	0,604
PON3 (μg/L) ^α	46,6±13,2	44,1±12,9	0,629	32,5±11,1	38,9±14,2	0,290
OxHDL (μg/L) ^α	548±221	325±251	<0,01	461±216	423±265	0,601
OxHDL/HDL-holesterol (μg/mmol) ^α	393±190	205±153	<0,01	380±159	256±164	<0,05

^α Kontinuirane normalno distribuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±standardna devijacija.

^β Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost (95% interval pouzdanosti).

^γ Asimetrično distribuirane vrednosti su prikazane kao medijana (interkvartilni raspon).

Poređenje podataka je izvršeno uz pomoć Student t-testa za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney U testa za asimetrično distribuirane vrednosti.

4.6.3. Markeri funkcionalnosti HDL čestica kao prediktori metabolički nezdravog fenotipa

Prediktivni kapacitet OxHDL, HDL-holesterola i odnosa OxHDL/HDL-holesterol za predviđanje prisustva metabolički nezdravog fenotipa je procenjen binarnom logističkom regresionom analizom. Analiza je urađena za svaki selektovani parametar pojedinačno. Metabolički zdrav fenotip je kodiran sa 0, dok je metabolički nezdrav fenotip kodiran sa 1. Model 1 je uključio demografske karakteristike (starost, pol) i status pušenja. U model 2 su dodatno bili uključeni HOMA IR, CRP i GGT. U model 3 je uključena vrednost VAI, kao indeksa disfunkcije masnog tkiva. Odnos OxHDL/HDL-holesterol je ostao pozitivan prediktor metabolički nezdravog fenotipa u svim modelima (tabela 32).

Tabela 32. Prediktivni potencijal koncentracije HDL-holesterola, OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol za predviđanje pojave metabolički nezdravog fenotipa

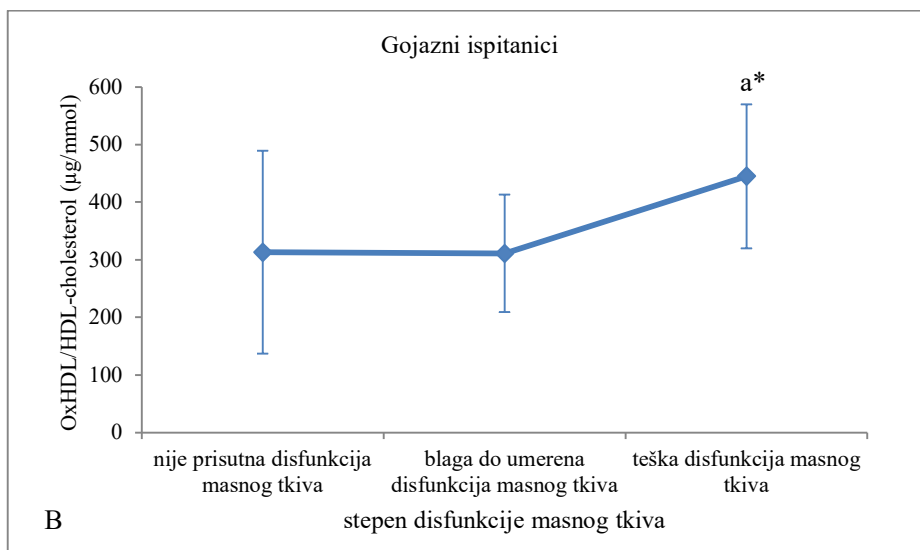
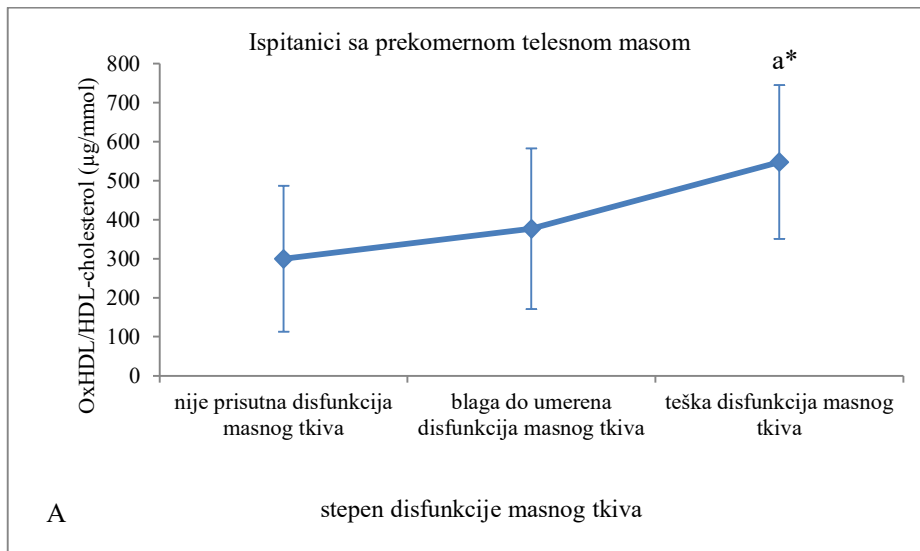
	Ispitanici sa prekomernom telesnom masom		Gojazni ispitanici	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<i>Nekorigovani OR</i>				
HDL-holesterol (mmol/L)	0,344 (0,083-1,424)	0,141	0,023 (0,002-0,269)	<0,05
OxHDL (µg/L)	1,004 (1,001-1,007)	<0,01	1,001 (0,998-1,004)	0,594
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	1,007 (1,002-1,011)	<0,01	1,005 (1,000-1,009)	<0,05
<i>Model 1</i>				
HDL-holesterol (mmol/L)	0,083 (0,009-0,803)	<0,05	0,012 (0,001-0,197)	<0,01
OxHDL (µg/L)	1,004 (1,001-1,008)	<0,01	1,002 (0,999-1,005)	0,285
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	1,008 (1,003—1,014)	<0,01	1,006 (1,001-1,011)	<0,05
<i>Model 2</i>				
HDL-holesterol (mmol/L)	0,110 (0,011-1,071)	0,057	0,006 (0,000-0,286)	<0,05
OxHDL (µg/L)	1,004 (1,000-1,008)	<0,05	1,002 (0,998-1,005)	0,416
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	1,008 (1,002-1,015)	<0,05	1,006 (1,000-1,012)	<0,05
<i>Model 3</i>				
HDL-holesterol (mmol/L)	1,269 (0,053-30,219)	0,883	0,087 (0,003-2,203)	0,139
OxHDL (µg/L)	1,005 (1,001-1,009)	<0,05	1,003 (0,999-1,007)	0,115
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	1,009 (1,001-1,016)	<0,05	1,007 (1,000-1,013)	<0,05

Logistička regresiona analiza

Model 1: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene) i pušački status (kategorička promenljiva: 0-nepušač, 1-pušač)

Model 2: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene), pušački status (kategorička promenljiva: 0-nepušač, 1-pušač), HOMA IR, CRP i GGT aktivnost (kontinuirane promenljive)

Model 3: starost (kontinuirana promenljiva), pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene), pušački status (kategorička promenljiva: 0-nepušač, 1-pušač) i VAI (kontinuirana promenljiva)



Slika 22. Promene odnosa OxHDL/HDL u odnosu na stepen disfunkcije masnog tkiva koja je procenjena na osnovu vrednosti VAI. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±standardna devijacija.

^au poređenju sa grupom bez disfunkcije masnog tkiva, *p<0,05

Prilikom kategorizacije ispitanika na osnovu stepena disfunkcije masnog tkiva (koja je procenjena izračunavanjem VAI), pokazano je da su ispitanici sa teškom disfunkcijom masnog tkiva imali više vrednosti odnosa OxHDL/HDL-cholesterol u poređenju sa ispitanicima kod kojih nije bila prisutna disfunkcija masnog tkiva (slika 22).

ROC analiza je imala za cilj da istraži dijagnostičku tačnost OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-cholesterol kao markera za razlikovanje metabolički nezdravog od metabolički zdravog fenotipa gojaznosti. Takođe, u istom smislu su analizirani obim struka i VAI, kao i koncentracija HDL-cholesterola. U tabeli 33 su prikazane površine ispod ROC krive za svaki parametar pojedinačno, kao i za model 1 koji je pored svakog od pomenutih parametara pojedinačno uključivao i starost, pol i pušački status. U grupi ispitanika sa prekomernom telesnom masom, najveća površina ispod krive je utvrđena za odnos OxHDL/HDL-cholesterol u modelu 1, a kod gojaznih ispitanika, HDL-cholesterol u modelu 1. Obe pomenute vrednosti

AUC spadaju u kategoriju odlične dijagnostičke tačnosti. Takođe je utvrđeno da AUC za odnos OxHDL/HDL-holesterol u modelu 1 u grupi gojaznih ispitanika spada u kategoriju prihvatljive dijagnostičke tačnosti. Rezultati su prikazani u tabeli 33.

Tabela 33. Klinička tačnost ispitivanih parametara u detekciji metaboličkih fenotipova gojaznosti

Parametar	Ispitanici sa prekomernom telesnom masom		Gojazni ispitanici	
	AUC (95% CI)	p	AUC (95% CI)	p
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	0,790 (0,658-0,921)	<0,01	0,690 (0,524-857)	<0,05
OxHDL (µg/L)	0,756 (0,604-0,908)	<0,01	0,529 (0,323-0,735)	0,754
HDL-holesterol (mmol/L)	0,634 (0,486-0,782)	0,108	0,785 (0,661-0,908)	<0,01
Obim struka (cm)	0,700 (0,552-0,849)	<0,05	0,695 (0,558-0,849)	<0,05
VAI	0,790 (0,670-0,910)	<0,001	0,797 (0,682-0,911)	<0,001
<i>Model 1</i>				
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	0,881 (0,783-0,979)	<0,001	0,765 (0,623-0,908)	<0,01
OxHDL (µg/L)	0,854 (0,746-0,961)	<0,001	0,644 (0,474-0,813)	0,122
HDL-holesterol (mmol/L)	0,772 (0,641-0,903)	<0,01	0,812 (0,702-0,923)	<0,001
Obim struka (cm)	0,783 (0,656-0,910)	<0,01	0,700 (0,563-0,837)	<0,05
VAI	0,802 (0,681-0,923)	<0,001	0,805 (0,693-0,917)	<0,001

Model 1: starost, pol (kategorička promenljiva: 0-muškarci, 1-žene), i pušački status (kategorička promenljiva: 0-nepušač, 1-pušač)

4.7. Povezanost koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa antropometrijskim parametrima, biohemijskim profilom i karakteristikama lipoproteinskih čestica gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom

U nastavku istraživanja je analizirana povezanost koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa antropometrijskim parametrima, biohemijskim profilom i karakteristikama lipoproteinskih čestica u objedinjenoj grupi koja je obuhvatala sve ispitanike sa ITM \geq 25,0.

Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio u pozitivnoj korelaciji sa obimom struka, dok je koncentracija OxHDL značajno korelirala samo sa starošću ispitanika (tabela 34). Odnos OxHDL/HDL-holesterol je takođe pozitivno korelirao sa koncentracijom glukoze i insulina i vrednostima HOMA IR, kao i koncentracijom LOOH. Koncentracija triglicerida je bila u pozitivnoj vezi sa OxHDL/HDL-holesterol odnosom. Rezultati su prikazani u tabeli 35.

Tabela 34. Korelacije koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa demografskim, antropometrijskim i osnovnim kliničkim podacima

	Starost (godine)	Status pušenja	ITM (kg/m ²)	Obim struka (cm)	Sistolni krvni pritisak (mm Hg)	Dijastolni krvni pritisak (mm Hg)
OxHDL (µg/L)	0,226*	0,036	0,020	0,042	0,066	0,099
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	0,113	0,086	0,174	0,210*	0,130	0,171

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05

Tabela 35. Korelacije koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa laboratorijskim markerima kardiometaboličkog statusa

	Glukoza (mmol/L)	HbA1c (mmol/mol)	Insulin (mIU/L)	HOMA IR
OxHDL (µg/L)	0,144	0,119	0,155	0,152
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	0,241*	0,115	0,213*	0,214*
	Ukupan holesterol (mmol/L)	HDL- holesterol (mmol/L)	LDL- holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
OxHDL (µg/L)	-0,015	0,146	-0,047	-0,010
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	-0,160	-0,310**	-0,130	0,198*
	Slobodan holesterol (mmol/L)	GGT (IU/L)	CRP (mg/L)	LOOH (µmol/L)
OxHDL (µg/L)	-0,044	0,053	0,071	0,165
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	-0,155	0,126	0,116	0,258*

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05, **p<0,01

Koncentracija OxHDL je pozitivno korelirala sa relativnim udelom HDL 2a i negativno sa zastupljenošću HDL 3c. Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio u negativnoj korelaciji sa zastupljenošću HDL 2b i u pozitivnoj korelaciji sa udelom HDL 2a i HDL 3a subfrakcija. OxHDL i odnos OxHDL/HDL-holesterol nisu značajno korelirali ni sa jednom od pojedinačnih LDL subfrakcija. Rezultati su prikazani u tabeli 36.

Tabela 36. Korelacije koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol sa LDL i HDL subfrakcijama

	LDL subfrakcije					
	Dominantni LDL dijametar (nm)	LDL I (%)	LDL II (%)	LDL III (%)	LDL IV (%)	Male, guste LDL (%)
OxHDL (µg/L)	0,001	-0,074	0,124	-0,059	-0,014	-0,057
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	-0,185	-0,186	0,105	0,054	0,008	0,026

	HDL subfrakcije						
	Dominantni HDL dijametar (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)	Male HDL (%)
OxHDL (µg/L)	0,019	-0,017	0,373**	0,211*	-0,182	-0,264**	-0,121
OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)	0,136	-0,199*	0,303**	0,301**	0,046	-0,091	0,078

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05, **p<0,01

OxHDL i odnos OxHDL/HDL-holesterol nisu značajno korelirali sa koncentracijama adiponektina, leptina i SAA (tabela 37).

Tabela 37. Korelacije koncentracije adiponektina, leptina i SAA sa koncentracijom OxHDL i odnosom OxHDL/HDL-holesterol

	OxHDL (µg/L)	OxHDL/HDL-holesterol (µg/mmol)
Adiponektin (mg/L)	-0,039	-0,147
Leptin (µg/L)	0,122	0,151
Leptin/adiponektin (µg/mg)	0,075	0,169
SAA (µg/L)	0,125	0,129

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije

4.8. Povezanost markera remodelovanja i antioksidativne funkcije HDL čestica sa antropometrijskim parametrima, biohemijskim profilom i karakteristikama lipoproteinskih čestica u celoj grupi ispitanika

Ispitivanje povezanosti markera remodelovanja i antioksidativne funkcije HDL čestica sa ostalim ispitivanim demografskim, kliničkim i biohemijskim parametrima je urađeno korelacionom analizom u celoj grupi ispitanika, bez obzira na ITM, kako bi se procenile asocijacije navedenih markera na većem uzorku.

U celoj grupi ispitanika, aktivnost LCAT je pozitivno korelirala sa antropometrijskim merama, ITM i obimom struka (tabela 38). Posmatrajući parametre metabolizma glukoze, aktivnost LCAT je značajno korelirala sa koncentracijom HbA1c i insulina, kao i sa vrednostima HOMA IR (tabela 39). Svi ispitivani parametri lipidnog profila su pozitivno korelirali sa aktivnošću LCAT, osim koncentracije HDL-holesterola koja je bila u negativnoj korelaciji sa aktivnošću ovog enzima (tabela 39). Koncentracija CETP je bila u negativnoj korelaciji sa vrednostima dijastolnog krvnog pritiska i pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnog holesterola i LOOH (tabele 38 i 39).

Tabela 38. Korelacije markera remodelovanja HDL čestica sa demografskim, antropometrijskim i osnovnim kliničkim podacima ispitanika

	Starost (godine)	Status pušenja	ITM (kg/m ²)	Obim struka (cm)	Sistolni krvni pritisak (mm Hg)	Dijastolni krvni pritisak (mm Hg)
LCAT (μ mol/L/h)	0,169	-0,015	0,392***	0,367***	0,111	0,097
CETP (μ mol/L/h)	-0,049	0,116	0,091	0,016	0,014	0,065
CETP (mg/L)	0,278	0,086	-0,061	-0,077	-0,047	-0,293*

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Tabela 39. Korelacije markera remodelovanja HDL čestica sa laboratorijskim markerima kardiometaboličkog statusa

	Glukoza (mmol/L)	HbA1c (mmol/mol)	Insulin (mIU/L)	HOMA IR
LCAT (μmol/L/h)	0,102	0,262**	0,253**	0,308**
CETP (μmol/L/h)	0,040	0,054	0,013	0,066
CETP (mg/L)	0,131	0,159	-0,044	0,059
	Ukupan holesterol (mmol/L)	HDL-holesterol (mmol/L)	LDL-holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
LCAT (μmol/L/h)	0,309**	-0,196*	0,272**	0,530***
CETP (μmol/L/h)	-0,008	-0,113	-0,027	0,127
CETP (mg/L)	0,310*	0,061	0,274	0,099
	Slobodan holesterol (mmol/L)	GGT (IU/L)	CRP (mg/L)	LOOH (μmol/L)
LCAT (μmol/L/h)	0,382***	0,274**	0,174	-0,026
CETP (μmol/L/h)	0,026	-0,094	0,051	0,088
CETP (mg/L)	0,193	-0,035	0,035	0,430**

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Aktivnost LCAT je negativno korelirala sa relativnim udelom LDL II i HDL 2b subfrakcija, dok je detektovana značajna pozitivna korelacija sa zastupljenošću HDL 3c i malih HDL čestica. Aktivnost CETP nije bila u značajnoj korelaciji sa zastupljenošću ni jedne LDL i HDL subfrakcije. Koncentracija CETP je bila u pozitivnoj vezi sa zastupljenošću LDL II subfrakcije. Rezultati su prikazani u tabeli 40.

Tabela 40. Korelacije markera remodelovanja HDL čestica sa LDL i HDL subfrakcijama

	LDL subfrakcije						
	Dominantni LDL dijametar (nm)	LDL I (%)	LDL II (%)	LDL III (%)	LDL IV (%)	Male, guste LDL (%)	
LCAT (μmol/L/h)	0,086	-0,076	-0,256*	0,045	0,175	0,162	
CETP (μmol/L/h)	0,107	0,188	-0,011	-0,041	-0,138	-0,109	
CETP (mg/L)	-0,192	-0,059	0,316*	0,025	-0,256	-0,175	
	HDL subfrakcije						
	Dominantni HDL dijametar (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)	Male HDL (%)
LCAT (μmol/L/h)	0,002	-0,214*	0,018	0,057	0,153	0,226*	0,212*
CETP (μmol/L/h)	0,066	0,086	-0,001	-0,066	-0,032	-0,075	-0,058
CETP (mg/L)	0,241	0,198	0,067	-0,147	-0,236	-0,204	-0,226

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05

Aktivnost LCAT je negativno korelirala sa koncentracijom adiponektina i pozitivno sa koncentracijom leptina i odnosom leptin/adiponektin. Aktivnost i koncentracija CETP nisu značajno korelirali sa koncentracijama adiponektina i leptina, niti sa koncentracijom SAA (tabela 41).

Tabela 41. Korelacije koncentracije leptina, adiponektina i SAA sa markerima remodelovanja HDL čestica

	LCAT ($\mu\text{mol/L/h}$)	CETP ($\mu\text{mol/L/h}$)	CETP (mg/L)
Adiponektin (mg/L)	-0,229*	0,040	-0,060
Leptin ($\mu\text{g/L}$)	0,233*	-0,048	-0,141
Leptin/adiponektin ($\mu\text{g/mg}$)	0,315**	-0,044	0,009
SAA ($\mu\text{g/L}$)	0,120	-0,057	-0,145

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Aktivnost PON1 je bila u negativnoj korelaciji sa obimom struka (tabela 42). Koncentracija PON1 je bila u značajnoj negativnoj korelaciji samo sa koncentracijom LOOH (tabela 43). Koncentracija PON3 je negativno korelirala sa ITM i obimom struka (tabela 42). Kada su u pitanju parametri lipidnog profila, uočena je pozitivna korelacija koncentracije PON3 sa koncentracijama ukupnog, LDL i HDL-holesterola, a negativna veza sa koncentracijom triglicerida (tabela 43).

Tabela 42. Korelacije markera antioksidativne funkcije HDL čestica sa demografskim, antropometrijskim i osnovnim kliničkim podacima ispitanika

	Starost (godine)	Status pušenja	ITM (kg/m^2)	Obim struka (cm)	Sistolni krvni pritisak (mm Hg)	Dijastolni krvni pritisak (mm Hg)
PON1 (mg/L)	0,031	-0,175	-0,080	-0,138	-0,073	0,116
PON1 (IU/L)	-0,128	-0,14	-0,089	-0,185*	-0,014	0,027
PON3 ($\mu\text{g/L}$)	0,216	-0,137	-0,381**	-0,280*	0,028	0,000

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Tabela 43. Korelacije markera antioksidativne funkcije HDL čestica sa laboratorijskim markerima kardiometaboličkog statusa

	Glukoza (mmol/L)	HbA1c (mmol/mol)	Insulin (mIU/L)	HOMA IR
PON1 (mg/L)	-0,162	-0,095	-0,010	-0,097
PON1 (IU/L)	0,036	0,028	0,078	0,072
PON3 (µg/L)	-0,041	0,111	-0,176	-0,198
	Ukupan holesterol (mmol/L)	HDL-holesterol (mmol/L)	LDL-holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)
PON1 (mg/L)	-0,110	0,136	-0,136	-0,142
PON1 (IU/L)	-0,021	0,037	-0,048	-0,009
PON3 (µg/L)	0,306*	0,482**	0,266*	-0,256*
	Slobodan holesterol (mmol/L)	GGT (IU/L)	CRP (mg/L)	LOOH (µmol/L)
PON1 (mg/L)	-0,129	-0,172	0,004	-0,298**
PON1 (IU/L)	-0,032	-0,104	-0,113	-0,040
PON3 (µg/L)	0,185	-0,135	0,004	-0,204

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; *p<0,05, **p<0,01

Koncentracija PON3 pozitivno korelirala sa relativnom zastupljenošću HDL 2b i negativno sa relativnim udelom HDL 3b, HDL 3c i malih HDL subfrakcija. Aktivnost PON1 i koncentracija PON3 su bili u negativnoj vezi sa relativnom zastupljenošću LDL III subfrakcije. Rezultati korelacione analize između parametara antioksidativne funkcije HDL i lipoproteinskih subfrakcija su prikazani u tabeli 44.

Tabela 44. Korelacije markera antioksidativne funkcije HDL čestica sa LDL i HDL subfrakcijama

	LDL subfrakcije							Male, guste LDL (%)	
	Dominantni LDL dijametar (nm)	LDL I (%)	LDL II (%)	LDL III (%)	LDL IV (%)				
PON1 (mg/L)	-0,048	-0,178	0,042	-0,055	0,117			-0,048	
PON1 (IU/L)	0,008	0,093	0,184	-0,235*	-0,099			0,008	
PON3 (µg/L)	-0,034	0,173	0,157	-0,302*	-0,101			-0,034	
	HDL subfrakcije							Male HDL (%)	
	Dominantni HDL dijametar (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)			
PON1 (mg/L)	0,020	0,109	-0,081	-0,018	-0,052	0,025			-0,036
PON1 (IU/L)	-0,018	-0,102	0,161	0,125	0,025	-0,045			0,044
PON3 (µg/L)	0,101	0,257*	0,241	0,012	-0,380**	-0,345**			-0,313*

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije *p<0,05, **p<0,01

Analiza povezanosti markera antioksidativne funkcije HDL čestica sa adipocitokinima i SAA je pokazala značajnu negativnu korelaciju koncentracije PON3 sa odnosom leptin/adiponektin. Koncentracija i aktivnost PON1 nisu bili u značajnoj vezi sa koncentracijama ispitivanih adipocitokina, niti sa koncentracijom SAA (tabela 45).

Tabela 45. Korelacije koncentracije adiponektina, leptina i SAA sa markerima antioksidativne funkcije HDL čestica

	PON1 (mg/L)	PON1 (IU/L)	PON3 (µg/L)
Adiponektin (mg/L)	0,049	-0,024	0,182
Leptin (µg/L)	0,021	-0,017	-0,247
Leptin/adiponektin (µg/mg)	-0,046	-0,033	-0,305*
SAA (µg/L)	0,006	0,043	0,054

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije *p<0,05

Radi utvrđivanja povezanosti koncentracije leptina, adiponektina i SAA sa karakteristikama HDL čestica, na kraju je istražena povezanost pomenutih parametara sa relativnom zastupljenošću HDL subfrakcija i koncentracijom HDL-holesterola. Koncentracija leptina je bila u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2b, dok je pronađena pozitivna veza sa procentualnim udelom manjih HDL 2a. Koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa zastupljenošću manjih HDL subfrakcija (HDL 3a, HDL 3b, HDL 3c, male HDL) i u pozitivnoj korelaciji sa zastupljenošću HDL 2b subfrakcije. Koncentracija SAA je značajno korelirala samo sa relativnim udelom HDL 2a. Svi rezultati su prikazani u tabeli 46.

Tabela 46. Korelacije koncentracije adiponektina, leptina i SAA sa koncentracijom HDL-holesterola, dominantnim dijametrom HDL čestica i zastupljenošću pojedinačnih HDL subfrakcija

	HDL-holesterol (mmol/L)	Dominantni HDL dijametar (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)	Male HDL (%)
Adiponektin (mg/L)	0,368**	0,036	0,351**	-0,030	-0,226*	-0,277*	-0,264**	-0,325**
Leptin (µg/L)	0,022	-0,021	-0,192*	0,217*	0,175	0,033	0,012	0,067
Leptin/adiponektin (µg/mg)	-0,216*	-0,018	-0,313**	0,129	0,259**	0,132	0,146	0,224*
SAA (µg/L)	-0,102	-0,014	-0,172	0,242*	0,107	0,067	-0,096	0,048

Rezultati su prikazani kao Spearman-ov koeficijent korelacije; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

5. Diskusija

Poremećaji energetskeg metabolizma koji obuhvataju izmene homeostaze ugljenih hidrata i lipida predstavljaju osnovu za razvoj aterosklerotskih promena i doprinose povišenom riziku od KVB. Metabolizam lipida u organizmu se suštinski reflektuje kroz procese u kojima učestvuju lipoproteinske čestice. Nakon opsežnih istraživanja kvalitativnih i kvantitativnih svojstava LDL čestica u kontekstu prevencije razvoja KVB, u novije vreme se veća pažnja poklanja svojstvima antiaterogenih lipoproteina, odnosno svojstvima HDL čestica. Budući da HDL čestice ostvaruju ateroprotektivno delovanje višestrukim mehanizmima, ispitivanje njihovih kvalitativnih svojstava pod nepovoljnim metaboličkim uslovima može pružiti uvid u nove pravce koji vode ka povišenom riziku od KVB. Alati za procenu karakteristika HDL čestica, između ostalog, uključuju ispitivanje markera remodelovanja i raspodele HDL subfrakcija, kao i funkcionalnih svojstava ovog lipoproteina (54). Rezultati ispitivanja kvalitativnih svojstava HDL čestica bi mogli imati značaj u prevenciji razvoja KVB i unapređenju terapijskih mogućnosti.

Ovo istraživanje je sprovedeno sa ciljem procene karakteristika HDL čestica kod ispitanika sa povećanom telesnom masom i povezanim stanjima kao što je MS i slične metaboličke komplikacije. Gojaznost je jedan od faktora rizika za razvoj KVB. Metaboličke promene povezane sa gojaznošću, odnosno disfunkcijom masnog tkiva, direktno vode razvoju aterogene dislipidemije i predstavljaju osnovu za razvoj MS. Aktuelna ispitivanja u oblasti gojaznosti uključuju procenu metaboličkih fenotipova kako bi se rasvetlila prava priroda metaboličkog zdravlja. U skladu sa tim, ovoj studiji su analizirane karakteristike HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Osim toga, NAFLD je blisko povezana sa razvojem MS (10, 11) i njegov mogući prethodnik (12). Stoga su u ovoj studiji ispitivane karakteristike HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih na osnovu vrednosti FLI (59).

U celoj grupi ispitanika su dominirale žene (tabela 2), što bi se moglo pripisati većoj spremnosti žena da potraže savet lekara zbog zdravstvenih problema (126). U našoj studiji nije uočena razlika u starosnoj dobi ispitanika različitog pola (tabela 3). Povišena aktivnost GGT kod muškaraca (tabela 3) je u skladu sa prethodnim podacima o različitoj distribuciji aktivnosti ovog enzima kod muškaraca i žena, na osnovu čega su formirane polno specifične referentne vrednosti (127). Odnos leptin/adiponektin ranije predložen kao marker disfunkcionalnosti masnog tkiva (128), kao i zastupljenost MS se nisu razlikovali između polova (tabela 4, slika 19). Ovi rezultati su u skladu podacima velikih epidemioloških studija prema kojima je MS podjednako zastupljen kod oba pola (129).

Metabolizam lipoproteinskih čestica se razlikuje kod muškaraca i žena, delimično zbog uticaja polnih hormona (130). Zbog toga, žene u reproduktivnom periodu imaju povoljniji lipidni profil od muškaraca (130). Menopauza utiče na metabolizam lipoproteina, zbog čega dolazi do promene lipidnog profila u smislu porasta koncentracije ukupnog i LDL-holesterola i koncentracije triglicerida (131). U našoj studiji su parametri lipidnog profila bili povoljniji kod žena (tabela 3). Pored toga su uočene razlike u remodelovanju lipoproteinskih čestica, odnosno povećana zastupljenost manjih LDL i HDL čestica kod muškaraca (slika 20, tabela 5), što je i ranije dokumentovano (132). Nepovoljnije karakteristike lipoproteinskih čestica mogu biti jedan od faktora koji doprinose povišenoj učestalosti KVB kod muškaraca (133).

U našoj studiji je utvrđeno da se razlike u svojstvima antiaterogenih lipoproteina između polova ne svode samo na različite koncentracije HDL-holesterola, već da obuhvataju strukturne

i funkcionalne osobine HDL čestica. Pored niže koncentracije HDL-holesterola (tabela 3) i povećane zastupljenosti manjih HDL subfrakcija (slika 20, tabela 5), kod muškaraca je uočena niža koncentracija PON1 (tabela 6), što može biti pokazatelj kompromitovane antioksidativne aktivnosti HDL čestica. Cheng i saradnici su utvrdili polno specifičnu regulaciju ekspresije PON1 gena na životinjskim modelima, pri čemu je povećana ekspresija PON1 bila prisutna kod ženskog pola (134). Trebalo bi istaći da do sada sprovedena ispitivanja aktivnosti PON1 kod muškaraca i žena nisu dala konzistentne rezultate. Trentini i saradnici su utvrdili da je arilesterazna i laktonazna aktivnost PON1 viša kod žena (135). U našoj studiji nije uočena razlika u paraoksonaznoj aktivnosti PON1 između polova (tabela 6), što je u saglasnosti sa rezultatima studije koju su sprovedli Sumegová i saradnici (136). Nepovoljnije osobine antiaterogenih lipoproteina kod muškaraca uočene u našoj studiji su u skladu sa podacima o postojanju razlika u kvalitativnim svojstvima lipoproteina između polova. Međutim, bez obzira na značajan broj sprovedenih studija, polje polno specifičnih razlika u metabolizmu i svojstvima lipoproteina još uvek nije u potpunosti istraženo.

Osnovni cilj naše studije je bio ispitivanje karakteristika HDL čestica kod MS, stanja koje je usko povezano sa brojnim lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za KVB. Nepovoljnije antropometrijske mere (povećan obim struka i ITM) su bile praćene višim vrednostima HOMA-IR, višim koncentracijama leptina i odnosa leptin/adiponektin u grupi sa MS (tabele 7 i 8), što govori o direktnoj povezanosti gojaznosti, insulinske rezistencije i disfunkcije masnog tkiva kod MS. U grupi sa MS su dobijene značajno više koncentracije CRP, kao i nešto više koncentracije SAA, iako bez statističke značajnosti (tabela 8), što je u skladu sa podacima o inflamaciji kao sastavnom delu MS (4). Pod uslovima nepovoljnog metaboličkog okruženja koje je prisutno kod MS dolazi i do promene metabolizma i svojstava lipoproteina. Pored toga što je kod ispitanika sa MS očekivano utvrđen nepovoljniji lipidni profil u odnosu na grupu bez MS (tabela 7), u grupi sa MS je uočena dominacija manjih LDL i HDL čestica (tabela 9) koja je bila praćena povišenom koncentracijom CETP (tabela 10). Pod nepovoljnim metaboličkim uslovima je CETP-posredovano remodelovanje lipoproteina intezivnije, pri čemu kao rezultat ovih procesa nastaju manje HDL i LDL čestice (84). Prisustvo manjih LDL čestica sa povišenim proaterogenim potencijalom (63) je jedna od karakteristika MS, iako nije uključena u formalnu definiciju MS (4). Remodelovanje lipoproteina kod MS je povezano sa promenom njihovog sastava i funkcionalnosti. HDL čestice obogaćene trigliceridima kod MS imaju narušenu antioksidativnu aktivnost u pogledu zaštite LDL čestica od oksidativne modifikacije (70). U našem istraživanju nisu pronađene razlike u markerima antioksidativne funkcije HDL u kategorijama sa i bez MS (tabela 10). Iako je snižena aktivnost PON1 uočena u različitim stanjima sa povećanim rizikom za KVB, do sada sprovedena ispitivanja nisu dala konačni zaključak o promenama serumske paraoksonazne aktivnosti PON1 kod MS (137, 138). Sa druge strane, nije dovoljno ispitana povezanost PON3 sa različitim metaboličkim poremećajima. U prethodno pomenutoj studiji (70) nije utvrđena razlika u arilesteraznoj aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL subfrakcijama između kategorija sa i bez MS, na osnovu čega su Hansel i saradnici zaključili da PON1 nije činilac koji doprinosi sniženoj antioksidativnoj aktivnosti HDL čestica kod MS (70). Rezultati našeg istraživanja ukazuju na to da nepovoljni metabolički uslovi prisutni kod MS nisu u značajnoj meri uticali na PON1 i PON3.

Pored dominacije manjih HDL čestica, u našoj studiji su uočene strukturne promene ovih antiaterogenih lipoproteina kod ispitanika sa MS. Određivanje koncentracije OxHDL je izvedeno sa ciljem dobijanja uvida u stepen strukturnih promena HDL koje nastaju pod uslovima oksidativnog stresa koje mogu da nepovoljno utiču na funkcionalna svojstva antiaterogenih lipoproteina (108-111). U našem istraživanju su utvrđene povišene vrednosti

koncentracije OxHDL i odnosa OxHDL/HDL-holesterol kod ispitanika sa MS (tabela 10). Jedan od mehanizama ostvarivanja antioksidativne funkcije HDL čestica je zasnovan na sposobnosti preuzimanja LOOH i njihove neutralizacije delovanjem apolipoproteina i enzima koji ulaze u sastav antiaterogenih čestica (89). U prethodno spomenutoj studiji (70), Hansel i saradnici su smanjenu sposobnost hidrolize LOOH od strane HDL čestica predložili kao jedan od mogućih mehanizama odgovornih za narušavanje antioksidativne funkcije HDL čestica kod MS (70). U slučaju zasićenosti kapaciteta mehanizama za neutralizaciju LOOH u HDL česticama, u njima može doći do nagomilavanja LOOH (89). LOOH se u seriji lančanih reakcija prevode u visokoreaktivne proizvode (29, 30) koji su sposobni da modifikuju strukturu HDL čestica. Stoga, stepen oksidativne modifikacije antiaterogenih lipoproteina može biti rezultat interakcije sistemskog oksidativnog stresa i antioksidativnih mehanizama, uključujući i one sadržane u samim HDL. Dodatno, oksidativna modifikacija HDL dovodi do narušavanja ateroprotektivnih funkcija ove klase lipoproteina: smanjenja kapaciteta preuzimanja holesterola (108, 109), gubitka sposobnosti vazorelaksacije (110) i narušavanja antiapoptotske i antiinflamatorne aktivnosti (111). Dominacija manjih subfrakcija i povišen stepen oksidativne modifikacije HDL čestica utvrđeni u našoj studiji govore o složenim izmenama kvalitativnih svojstava antiaterogenih lipoproteina kod MS, koje mogu doprineti povišenom riziku od KVB.

Radi produbljivanja istraživanja i detaljnijeg utvrđivanja povezanosti svojstava HDL čestica sa MS, analizirane su karakteristike HDL čestica kod pojedinačnih komponenti MS. Rezultati naše studije ukazuju na izmenjena kvalitativna svojstva HDL čestica kod pojedinačnih komponenti MS. Kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterola su uočeni pokazatelji nepovoljnijih strukturnih i funkcionalnih svojstava ove klase lipoproteina: akumulacija manjih HDL subfrakcija (tabela 11), povišene vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterola (tabela 17) i snižena koncentracija PON3 (tabela 16). Remodelovanje u korist manjih HDL subklasa je uočeno i kod ispitanika sa hipertrigliceridemijom (tabela 12). Kod ispitanika sa povišenom koncentracijom triglicerida u našoj studiji su takođe uočene strukturne promene HDL čestica preko porasta odnosa OxHDL/HDL-holesterol (tabela 17). U studiji koju su sproveli Ceriello i saradnici je utvrđena povezanost postprandijalne hipertrigliceridemije i porasta koncentracije nitrotirozina kao markera produkcije peroksinitritnog anjona koji ima sposobnost oksidacije i nitracije brojnih struktura i jedinjenja u organizmu (139), uključujući i lipide (140). Povišen stepen oksidativne modifikacije HDL čestica kod naših ispitanika sa hipertrigliceridemijom u skladu je sa ovim nalazima (139) i može barem delom da se pripíše metaboličkim promenama nastalim usled povišene koncentracije triglicerida.

Prilikom podele ispitanika na osnovu koncentracije glukoze naše kao komponente MS, u ovoj studiji nisu utvrđene razlike u koncentraciji HDL-holesterola, ali su uočeni pokazatelji promene remodelovanja HDL čestica pod uslovima izmenjenog metabolizma glukoze, odnosno veći relativni udeo HDL 2a subfrakcija u kategoriji sa povišenom glukozom naše (tabela 13). Izmenjen metabolizam glukoze ima uticaj na remodelovanje HDL čestica u korist dominacije manjih HDL subfrakcija (141). Osim CETP, na remodelovanje HDL čestica utiču i drugi faktori u cirkulaciji, kao što je hepatična lipaza koja hidrolizuje trigliceride u HDL 2 česticama i smanjuje njihovu veličinu (64). Povišena aktivnost hepatične lipaze kod insulinske rezistencije doprinosi povećanoj zastupljenosti manjih HDL subklasa (142), što govori o povezanosti promena metabolizma glukoze i remodelovanja HDL čestica. U našoj studiji je dodatno uočen povišen stepen oksidativne modifikacije HDL čestica kroz povišenu koncentraciju OxHDL i vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol u grupi ispitanika sa povišenom glukozom naše (tabela 17), što ukazuje na složene strukturne promene antiaterogenih lipoproteinskih čestica pod uslovima izmenjenog metabolizma glukoze. Promene u metabolizmu glukoze su praćene povišenim stepenom oksidativnog stresa (140, 143). U studiji koju su sproveli Marin i saradnici

je utvrđena povišena koncentracija oksidativno modifikovanih HDL čestica kod ispitanika sa tip 2 dijabetes melitusom (112). Trebalo bi imati u vidu da značajan broj podataka ukazuje na aktivnu ulogu antiaterogenih lipoproteina u održavanju homeostaze glukoze putem pozitivnog uticaja na sekreciju insulina, osetljivost perifernih ćelija na delovanje insulina i na preuzimanje glukoze od strane mišićnih ćelija (144, 145). S obzirom na to da su struktura i funkcija HDL čestica međusobno povezane, strukturne modifikacije HDL mogu ukazivati na smanjenu funkcionalnost, pa time i na snižen kapacitet ovih lipoproteinskih čestica za ostvarivanje povoljnih efekata na metabolizam glukoze. Takođe, ovi rezultati potvrđuju tezu da se samo određivanjem koncentracije HDL-holesterola ne dobija sveobuhvatni uvid u strukturne i funkcionalne osobine ove klase lipoproteina koje su značajne za njihovu ateroprotektivnu aktivnost.

Povišen krvni pritisak je jedna od komponenti MS, blisko povezana sa brojnim metaboličkim poremećajima. U našem istraživanju nisu utvrđene značajne promene karakteristika HDL čestica u kategoriji sa povišenim krvnim pritiskom kao komponentom MS (tabele 14, 16 i 17). Rezultati prethodno sprovedenih studija govore u prilog izmenjenog metabolizma i svojstava antiaterogenih lipoproteina pod uslovima hipertenzije, kao što je povećana zastupljenost manjih HDL čestica (146), ali i i podatak da je snižena koncentracija CETP povezana sa manjom prevalencom hipertenzije (147). Takođe je utvrđeno da je sniženje krvnog pritiska pod dejstvom aerobnog treninga kod osoba sa hipertenzijom bilo povezano sa sniženjem koncentracije LOOH u HDL česticama (148). S obzirom na to da je cilj naše studije bio utvrđivanje karakteristika HDL čestica kod MS i srodnih stanja, u našoj studiji je povišen krvni pritisak definisan na osnovu kriterijuma za utvrđivanje prisustva MS (4), koja se razlikuje od definicije hipertenzije koja je korišćena u pomenutim istraživanjima (146-148), što može da bude razlog neslaganja dobijenih rezultata sa pomenutim studijama.

Merenje obima struka je jednostavan klinički alat koji ukazuje na visceralni tip gojaznosti i pridružene metaboličke poremećaje koji predstavljaju faktore rizika za KVB. Rezultati naše studije ukazuju na izmenjene strukturne karakteristike i funkcionalnost antiaterogenih lipoproteina kod centralne gojaznosti. Iako nije uočena razlika u koncentraciji HDL-holesterola između kategorija sa normalnim i povećanim obimom struka (tabela 15), kod ispitanika sa povećanim obimom struka bile su zastupljenije male HDL čestice (tabela 15) što je u skladu sa rezultatima Rosenbauma i saradnika (149). Kao što je već rečeno, hepatična lipaza remodeluje HDL čestice i smanjuje njihovu veličinu (64). Povećan obim struka je često pokazatelj višestrukih metaboličkih promena i udružen je sa povišenim stepenom insulinske rezistencije, odnosno stanja kod koga se može očekivati povišena aktivnost hepatične lipaze (142), čime se može objasniti akumulacija manjih HDL čestica u odsustvu razlike u aktivnosti CETP (tabela 15). Snižena koncentracija PON3 kod ispitanika sa povećanim obimom struka (tabela 16) ukazuje na poremećaj antioksidativne aktivnosti HDL čestica. Izmenjene strukturne i funkcionalne osobine antiaterogenih lipoproteina kod ispitanika sa centralnom gojaznošću mogu biti dodatni element metaboličkih promena koji doprinose povišenom riziku od KVB.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na to da se dislipidemija kod MS se ne manifestuje samo kroz kvantitativne promene osnovnog lipidnog profila, već i kroz kvalitativne promene sastava lipoproteinskih čestica. Osim dobro poznatih osnovnih odlika MS, kod ovog stanja su prisutni dodatni metabolički poremećaji, kao što su insulinska rezistencija, proinflamatorno stanje (4) i oksidativni stres (70). Zbog istovremenog prisustva više različitih metaboličkih poremećaja kod MS, mogu se očekivati efekti njihovog složenog delovanja na metabolizam i svojstva lipoproteina. Prethodno su Ceriello i saradnici utvrdili da postprandijalna hiperglikemija i hipertrigliceridemija nezavisno, ali i kumulativno doprinose razvoju

oksidativnog stresa (139), što govori o interaktivnom delovanju metaboličkih poremećaja. Takođe, Hensen i saradnici su utvrdili da narušena antioksidativna funkcija HDL čestica kod MS nastaje kao posledica povišenog stepena oksidativnog stresa koji je rezultat hipertrigliceridemije, hiperglikemije i insulinske rezistencije (70). Stoga se može zaključiti da su kvalitativne promene HDL čestica kod MS rezultat uticaja različitih faktora rizika, odnosno združenog delovanja više komponenti MS. U našoj studiji je takođe uočeno da strukturne i funkcionalne varijacije HDL čestica nisu u svim slučajevima bile praćene promenama u koncentraciji HDL-holesterola. Kod ispitanika sa povećanim obimom struka (tabela 15) i povišenom glukozom našte (tabela 13) se koncentracija HDL-holesterola nije razlikovala u odnosu na kategoriju bez navedenog faktora rizika, ali su utvrđene izmenjene karakteristike HDL čestica. Kvalitativne osobine antiaterogenih lipoproteina, prema novijim tendencijama u istraživanju metabolizma lipida, mogu imati značajnu ulogu u ateroprotekciji. Rezultati naše studije naglašavaju potrebu da se, barem u rizičnim kategorijama sa povišenim rizikom za KVB, osim rutinskog određivanja HDL-holesterola vrši i dodatna karakterizacija ovih lipoproteinskih čestica.

Iako ima značajnu ulogu u metabolizmu i sazrevanju HDL čestica, mehanizam povezanosti LCAT sa razvojem ateroskleroze još nije rasvetljen. Calabresi i saradnici su utvrdili da niska aktivnost ovog enzima kod ispitanika sa mutacijama gena za LCAT ne doprinosi razvoju ateroskleroze (74). Sa druge strane, postoji sve više dokaza koji povezuju povišenu aktivnost LCAT sa faktorima rizika za KVB. Dullaart i saradnici su utvrdili da je aktivnost LCAT pozitivan prediktor debiljne intime medije karotidne arterije, zbog čega je aktivnost ovog enzima predložena kao marker subkliničke ateroskleroze (76). Povišena aktivnost LCAT kod ispitanika sa MS (tabela 10) je u skladu sa prethodnim izveštajima (76, 77). U našoj studiji je povišena aktivnost LCAT uočena kod ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterola, hipertrigliceridemijom, i povećanim obimom struka, dok je kod ispitanika sa povišenom glukozom našte i povišenim krvnim pritiskom aktivnost ovog enzima bila viša u poređenju sa grupom bez navedenog faktora rizika, sa p-vrednošću koja nije prešla granicu statističke značajnosti (tabele 11-15). Stoga, rezultati naše studije potvrđuju povezanost aktivnosti LCAT sa faktorima rizika za KVB.

NAFLD je blisko povezana sa razvojem MS i nalazi se u centru kompleksnog odnosa između disfunkcije masnog tkiva i sledstvenih metaboličkih promena (10, 12). U ovom istraživanju je kao surogat marker za NAFLD korišćen FLI, složeni algoritam izveden iz antropometrijskih i biohemijskih parametara (59). Najznačajniji rezultat procene markera strukture i funkcije HDL čestica kod ispitanika klasifikovanih na osnovu vrednosti FLI je pozitivna veza između aktivnosti LCAT i FLI kategorija. Utvrđen je porast aktivnosti LCAT između FLI kategorija, paralelno sa porastom vrednosti FLI (tabela 21). Aktivnost LCAT je bila značajan prediktor porasta vrednosti FLI u nekoliko konstruisanih modela koji su uključili i markere metaboličkih poremećaja tipično prisutnih kod NAFLD: HOMA IR kao meru insulinske rezistencije i prisustvo MS (tabela 22). Imajući u vidu da je kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ uočena veća relativna zastupljenost malih HDL subfrakcija u poređenju sa druge dve grupe (tabela 20), dodatno je konstruisan model koji je trebalo da uzme u obzir uticaj relativne zastupljenosti malih HDL čestica u kome je aktivnost LCAT i dalje ostala značajan prediktor povišenih vrednosti FLI (tabela 22). Aktivnost LCAT je ostala pozitivno povezana sa FLI i u modelu koji je uzeo u obzir koncentraciju slobodnog holesterola (tabela 23). Ovi rezultati govore prilog tome da je aktivnost LCAT povezana sa FLI mehanizmom koji prevazilazi uticaj dostupnosti enzimskog supstrata, odnosno koncentraciju slobodnog holesterola. Pozitivna veza između aktivnosti LCAT i visokih vrednosti FLI uočena u našem istraživanju je skladu sa rezultatima studije koju su sproveli Nass i saradnici (150). Značaj aktivnosti LCAT kod

metaboličkih poremećaja, uključujući i NAFLD, nije dovoljno istražen. Stoga, podaci o povišenoj aktivnosti LCAT kod ispitanika sa visokim vrednostima FLI pružaju značajne podatke za ovu još uvek nedovoljno istraženu oblast.

Nadalje, analizirana je povezanost aktivnosti LCAT sa svim pojedinačnim varijablama uključenim u formulu za izračunavanje FLI, kao i sa parametrima lipidnog profila, sa ciljem utvrđivanja faktora koji ostvaruju nezavisan uticaj na aktivnost ovog enzima. Uprkos značajnim korelacijama sa svim parametrima koji se koriste za izračunavanje FLI (tabele 38 i 39), samo je koncentracija triglicerida ostala nezavisno povezana sa povišenom aktivnošću LCAT (tabela 24). Murakami i saradnici su utvrdili da je koncentracija triglicerida najznačajniji faktor uticaja na brzinu esterifikacije holesterola (151). Pod uslovima hipertrigliceridemije je remodelovanje HDL čestica intenzivnije, pri čemu bi efikasnije stvaranje estara holesterola mogao da bude jedan od kompezatornih mehanizama usmeren ka poboljšanju reverznog transporta holesterola (151). Jedna od metaboličkih posledica NAFLD je povećana sekrecija VLDL čestica koje u svom sastavu sadrže veliku količinu triglicerida (10). Zbog toga, povišena aktivnost LCAT se može očekivati u sklopu lipidnog profila koji prati NAFLD. Na životinjskim modelima je pokazano da je aktivnost LCAT povezana sa promenama u deponovanju triglicerida u jetri, ali priroda i mehanizam ove veze nisu rasvetljeni (152, 153). Eventualna aktivna uloga ovog enzima u razvoju masnih promena u jetri kod ljudi još uvek nije utvđena.

Iako je mali broj istraživanja sproveden u oblasti polno specifičnih razlika u aktivnosti LCAT, postoje podaci o tome da su viša aktivnost i koncentracija LCAT pokazatelji povišenog kardiovaskularnog rizika kod žena (80, 81). Sa druge strane, kod muškaraca postoje izveštaji o inverznoj povezanosti između koncentracije LCAT i rizika od KVB (81), kao i oni koji ukazuju na to da ne postoji veza između aktivnosti LCAT i rizika od KVB (80). U okviru ovih studija (80, 81) nije razjašnjen uzrok polno specifične povezanosti LCAT i KVB, zbog čega je predloženo izvođenje polno specifičnih prospektivnih ispitivanja povezanosti LCAT sa razvojem KVB (81). U našem istraživanju, aktivnost LCAT se nije razlikovala između polova (tabela 6). Kod žena je samo slobodni holesterol bio nezavisno povezan sa aktivnošću LCAT, dok se kod muškaraca koncentracija triglicerida izdvojila kao jedina značajna promenljiva u modelu (tabela 25). Dobijeni rezultati mogu otvoriti pitanje polno specifične regulacije aktivnosti LCAT. Rezultati naše studije proširuju prethodne izveštaje o mogućoj polno specifičnoj povezanosti aktivnosti LCAT i metaboličkih poremećaja.

Analizom markera antioksidativne funkcije HDL čestica su uočene niže koncentracije PON3 kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ u poređenju sa ispitanicima sa $FLI < 30$, dok se paraoksonazna aktivnost i koncentracija PON1 nisu razlikovale između različitih kategorija FLI (tabela 21). Rao i saradnici su ispitivanjem proteoma HDL utvrdili da se koncentracija PON1 ne razlikuje između ispitanika sa normalnom jetrenom histologijom i onih sa NAFLD (154). Prethodne procene aktivnosti PON1 nisu pružile definitivan odgovor na pitanje da li se i u kom smeru menja paraoksonazna aktivnosti PON1 kod ispitanika sa NAFLD (155-157). U našem istraživanju je uočeno da višestruki nepovoljni metabolički uslovi karakteristični za povišene vrednosti FLI nisu ostvarili negativan uticaj na aktivnost PON1. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima studije koju su sprovedeli van den Berg i saradnici među ispitanicima koji su klasifikovani na osnovu vrednosti FLI u kojoj nije utvđena razlika u arilesteraznoj aktivnosti PON1, bez obzira na nižu koncentraciju HDL-holesterola kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ (158). Do sada se mali broj studija se bavio paralelnom procenom PON1 i PON3. Marsillach i saradnici su, u studiji sprovedenoj u grupi pacijenata sa autoimunim bolestima (sistemski eritemski lupus i tip 1 dijabetes melitusa), utvrdili sniženje koncentracije PON3 u HDL česticama u podgrupi ispitanika sa subkliničkom aterosklerozom (159). S druge strane, nisu utvđene razlike u

koncentraciji PON1 između kategorija sa i bez subkliničke ateroskleroze (159). U našoj studiji, koncentracija PON3 nije bila značajan prediktor povišenih vrednosti FLI samo u modelu koji je sadržao relativni udeo malih HDL čestica (tabela 22). Kao što je već rečeno, poremećaji metabolizma lipoproteina karakteristični za gojaznost i razvoj aterogene dislipidemije su praćeni akumulacijom manjih HDL subfrakcija sa smanjenim funkcionalnim kapacitetom (70-72), pa je moguće da su promene u koncentraciji PON3 povezane sa akumulacijom manjih HDL čestica kod ispitanika sa visokim vrednostima FLI. Ovi rezultati govore u prilog povezanosti strukturnih i funkcionalnih svojstava HDL čestica koji podležu promenama pod uslovima dislipidemije koja je pratilac visokih vrednosti FLI, odnosno NAFLD. Prethodno su Davidson i saradnici utvrdili da PON3 ulazi u sastav malih HDL čestica kod normolipemičnih ispitanika (96). Sa druge strane, ne postoje podaci o sadržaju PON3 u HDL subfrakcijama pod metaboličkim uslovima koji menjaju metabolizam HDL čestica i distribuciju HDL subfrakcija. Budući da je PON3 je najmanje proučavan član iz porodice paraoksonaza, dalja istraživanja bi trebalo da daju odgovor na pitanje da li je i u kojim patološkim stanjima PON3 osetljiviji pokazatelj antioksidativne funkcije HDL od PON1. Dodatno bi trebalo istražiti značaj ravnoteže između PON1 i PON3 u održavanju antioksidativne funkcije HDL.

Promenjene kvalitativne karakteristike HDL čestica kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ su se dodatno manifestovale kroz više vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol u poređenju sa ispitanicima sa $FLI < 30$ (tabela 21). Oksidativni stres je jedna od promena karakterističnih za prisustvo MS i insulinske rezistencije (27, 28, 70). Povišen stepen oksidativne modifikacije HDL čestica utvrđen u našoj studiji je pokazatelj strukturnih promena antiaterogenih lipoproteina kod ispitanika sa visokim vrednostima FLI. Odnos OxHDL/HDL-holesterol nije bio nezavisan prediktor povišenih vrednosti FLI u modelima koji su uključili HOMA IR, prisustvo MS i relativni udeo malih HDL (tabela 22), što govori u prilog tome da su ove komponente nepovoljnog metaboličkog okruženja snažnije povezane sa NAFLD.

U grupi ispitanika sa povišenim vrednostima FLI su bili prisutni metabolički poremećaji koji se uobičajeno javljaju u sklopu NAFLD: dislipidemija i poremećaj metabolizma glukoze (tabela 18). U ovoj studiji je pokazana dominacija manjih LDL i HDL čestica kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ (tabela 20), što predstavlja tipičnu promenu raspodele lipoproteinskih čestica u uslovima dislipidemije. Redistribucija lipoproteinskih subfrakcija ka manjim česticama je dokazana u prethodnim studijama sprovedenim među ispitanicima sa NAFLD (160-162). Akumulacija malih, gustih LDL i malih HDL čestica je rezultat promena metabolizma lipoproteina, koje nastaju zbog promenjenog neposrednog vaskularnog okruženja i izmenjenih aktivnosti modulatora njihovog metabolizma. U našoj grupi ispitanika je zapažen porast koncentracije triglicerida paralelno sa vrednostima FLI (tabela 18), ali nije postojala statistički značajna razlika u aktivnosti CETP između FLI grupa (tabela 21). Ipak, nešto viša aktivnost CETP je zapažena kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ (tabela 21), što može biti pokazatelj značaja CETP u remodelovanju lipoproteina kod ispitanika sa visokim vrednostima FLI. Koncentracija CETP se nije razlikovala između FLI kategorija (tabela 21). Najveći udeo CETP u cirkulaciji potiče iz Kupferovih ćelija (163), ali još uvek nisu razjašnjeni efekti različitih modulatora aktivnosti Kupferovih ćelija na produkciju CETP. Na životinjskim modelima je utvrđeno da bakterijski endotoksin lipopolisaharid aktivira Kupferove ćelije i smanjuje hepatičnu produkciju CETP (164). S obzirom na to da aktivacija Kupferovih ćelija i inflamacija posredovana aktivnošću ovih ćelija ima značajnu ulogu u razvoju NAFLD (165), sprovedena su ispitivanja uticaja patoloških promena u jetri koje se javljaju u sklopu NAFLD na hepatičnu produkciju i cirkulišuću koncentraciju CETP. Utvrđeno je da koncentracija CETP nije povezana sa sadržajem triglicerida u hepatocitima (166), kao ni sa inflamatornim promenama u jetri koje se

javljaju u sklopu NAFLD (167). Rezultati naše studije podržavaju prethodno navedene nalaze (166, 167).

Poremećaj funkcije masnog tkiva je blisko povezan sa razvojem masnih promena u jetri (61). Paralelno sa porastom vrednosti FLI su zapažene promene u antropometrijskim parametrima koje ukazuju na povišen stepen gojaznosti, kao i nepovoljniji profil ispitivanih adipokina (tabele 18 i 19). Povišene koncentracije leptina koje se javljaju u sklopu rezistencije na leptin i snižene koncentracije adiponektina doprinose razvoju NAFLD putem metaboličkih efekata, kao i direktnog uticaja na razvoj hepatične steatoze, inflamacije i fibrogeneze (61). Osim toga, u grupi ispitanika sa $FLI \geq 60$ koncentracija SAA je bila viša u odnosu na ispitanike sa $FLI < 30$ (tabela 19). Prethodno su Neuman i saradnici utvrdili da na koncentraciju markera inflamacije, među kojima je i SAA, ne utiče prisustvo NAFLD, već da je koncentracija inflamatornih markera povezana sa gojaznošću (168). Budući da se da je masno tkivo značajan izvor SAA (98, 99, 102), moguće je da porast SAA kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ (tabela 19) prati trend promene stepena gojaznosti koji postoji između FLI grupa (tabela 18).

Prekomerna telesna masa i gojaznost predstavljaju faktor rizika za razvoj KVB. Sa uvođenjem koncepta metabolički zdravog i nezdravog fenotipa gojaznosti se pojavila potreba za detaljnijom procenom parametara koji bi bili adekvatni pokazatelji metaboličkog zdravlja. Zbog toga su analizirani markeri kvalitativnih karakteristika i remodelovanja HDL čestica kod različitih metaboličkih fenotipova gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Sa porastom ITM se razvijaju metabolički poremećaji, koji uključuju promenu strukture, funkcije i metabolizma lipoproteina (62), kao i razvoj oksidativnog stresa (17, 28). Razvoj oksidativnog stresa kod gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom je povezan sa komponentama MS (169). Pored toga, veći stepen oksidativnog stresa karakterističan za metabolički nezdrav fenotip u ovim kategorijama ispitanika (42, 170). U našoj studiji su uočene više vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol kod ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom u obe ispitivane kategorije (tabela 31). Takođe je primećen trend paralelne promene koncentracije LOOH (tabele 28 i 29). Rezultati naše studije potvrđuju i proširuju prethodne izveštaje pružajući podatke o strukturnim promenama antiaterogenih lipoproteina kod metabolički nezdravog fenotipa gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom.

Iako još uvek nisu utvrđeni svi faktori koji stvaraju predizpoziciju i doprinose očuvanju metaboličkog zdravlja, poznato je da distribucija i funkcionalnost masnog tkiva značajno utiče na razvoj metaboličkih poremećaja (15, 16). U ovoj studiji je utvrđena pozitivna korelacija između odnosa OxHDL/HDL-holesterol i obima struka (tabela 34), pri čemu je obim struka bio veći kod ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom (tabele 26 i 27). Stoga je dodatno analiziran odnos OxHDL/HDL-holesterol u različitim kategorijama disfunkcije masnog tkiva, koje su dobijene na osnovu vrednosti VAI (35). Ispitanici sa teškom disfunkcijom masnog tkiva imali su više vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol u poređenju sa ispitanicima kod kojih nije bila prisutna disfunkcija masnog tkiva (slika 22), što se može pripisati većem stepenu oksidativnog stresa kod disfunkcije masnog tkiva (27, 28). U našoj studiji nisu utvrđene značajne korelacije oksidativno modifikovanog HDL sa leptinom i adiponektinom (tabela 37), što je takođe uočeno u studiji koju su sprovedli Peterson i saradnici (114). Budući da masno tkivo sekretuje široku paletu metabolički aktivnih molekula, moguće je da je povišen stepen oksidativne modifikacije HDL čestica u vezi sa promenama koncentracije drugih adipocitokina do kojih dolazi kod disfunkcije masnog tkiva.

Nadalje je ispitivan potencijal odnosa OxHDL/HDL-holesterol kao prediktora metabolički nezdravog fenotipa. Prethodno je pokazano da su povećan sadržaj lipida u jetri, poremećaj metabolizma glukoze, inflamacija, starost, pol i pušački status povezani sa

metaboličkim zdravljem (39, 41, 43, 50, 51). Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio značajan prediktor metabolički nezdravog fenotipa u svim modelima koji su uzeli u obzir uticaj prethodno pomenutih faktora (tabela 32). Prema kriterijumima za ocenu kliničke tačnosti parametara prilikom diskriminacije između različitih patofizioloških kategorija (125), odnos OxHDL/HDL-holesterol je u modelu koji je sadržao starost, pol i pušački status pokazao odličnu sposobnost diskriminacije između metabolički zdravog i nezdravog fenotipa u grupi ispitanika sa prekomernom telesnom masom, a prihvatljivu u grupi gojaznih (tabela 33). Iz toga proističe da povišen odnos OxHDL/HDL-holesterol može biti dodatni pokazatelj narušenog metaboličkog zdravlja gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Sposobnost diskriminacije metaboličkih fenotipova je potvrđena i za obim struka i VAI (tabela 33), parametre koji odslikavaju centralnu gojaznost i disfunkciju masnog tkiva i predstavljaju faktore rizika karakteristične za metabolički nezdrav fenotip (47, 50, 51). što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (171, 172).

U grupi ispitanika sa prekomernom telesnom masom, koncentracija HDL-holesterola se nije razlikovala između metaboličkih fenotipova gojaznosti (tabela 26), iako je bila jedan od kriterijuma klasifikacije za definiciju fenotipa. Slični rezultati su dobijeni i u prethodnim istraživanjima (40). Dodatno, rezultati naše studije su pokazali da ne postoji konzistentna razlika u distribuciji pojedinačnih HDL subfrakcija između metaboličkih fenotipova (tabela 30). Ipak, kod metabolički nezdravog fenotipa su dominirale manje LDL i HDL čestice u poređenju sa profilom metabolički zdravih ispitanika (tabela 30), što je u skladu sa rezultatima prethodno sprovedenih istraživanja (173). Uzrok akumulacije manjih lipoproteinskih čestica može biti viša koncentracija triglicerida kod metabolički nezdravog fenotipa (tabele 26 i 27) i intenzivnije CETP-posredovano remodelovanje lipoproteinskih čestica (84, 85). U našoj grupi ispitanika su uočene više aktivnosti CETP kod metabolički nezdravog fenotipa, iako bez statističke značajnosti, što može biti pokazatelj trenda (tabela 31). Prisustvo metabolički nezdravog fenotipa kod gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom nije bilo povezano sa promenama ispitivanih markera antioksidativne aktivnosti HDL čestica: između metaboličkih fenotipova nisu pronađene razlike u aktivnosti i koncentraciji PON1, kao ni koncentraciji PON3 (tabela 31).

U našem istraživanju nisu pronađene razlike u koncentraciji SAA, leptina i adiponektina između metaboličkih fenotipova (tabele 28 i 29). Karakteristike masnog tkiva (stepen ekspanzije i antioksidativne aktivnosti, aktivnost intracelularnih metaboličkih puteva) se razlikuju između metaboličkih fenotipova i počivaju na različitom proteomu visceralnog masnog tkiva (174). Do sada nisu izvedeni pouzdani zaključci o promenama koncentracija adipokina, kao što su leptin, adiponektin i SAA, kod različitih metaboličkih fenotipova (37, 175). Razlike između metaboličkih fenotipova nisu jasno ustanovljene, niti je koncept metaboličkog zdravlja jasno utvrđen, već je i dalje predmet savremenih istraživanja. Trebalo bi istaći da je veza između viška telesne mase i povišenog rizika od KVB čvrsto dokazana (13), tako da metabolički zdrav fenotip gojaznih i osoba sa prekomernom telesnom masom nije u svim studijama pokazao povoljne efekte u zaštiti od KVB (175, 176). Ali, sve veći broj podataka govori o prednostima metaboličkog zdravlja u gojaznosti (39-43). S tim u vezi, razumevanje mehanizama narušavanja metaboličkog zdravlja bi moglo da bude korisno u adekvatnoj proceni kardiovaskularnog rizika i razvoju novih terapijskih pristupa.

Povezanost između karakteristika HDL čestica i markera metaboličkog profila koji je karakterističan za MS i pridružena stanja ispitali smo i korelacionom analizom. Disfunkcija masnog tkiva se između ostalog manifestuje izmenjenom šemom sekretovanih adipocitokina koja između ostalog uključuje povišenu koncentraciju leptina i sniženu koncentraciju

adiponektina (19). U našoj studiji je utvrđena pozitivna korelacija između odnosa leptin/adiponektin i relativnog udela malih HDL čestica (tabela 46), što je u skladu sa podacima prema kojima kod disfunkcije masnog tkiva dolazi do remodelovanja lipoproteinskih čestica u korist dominacije manjih subfrakcija (19). Prethodno su Dullaart i saradnici utvrdili povišene aktivnosti modulatora HDL čestica, CETP i PLTP, kod gojaznih ispitanika (177). U našoj studiji nisu pronađene značajne korelacije između aktivnosti i koncentracije CETP sa ispitivanim adipocitokinima (tabela 41) niti antropometrijskim merama (tabela 38). Budući da je CETP značajan, ali ne i jedini modulator strukture HDL čestica u cirkulaciji, moguće da su vezi između disfunkcije masnog tkiva i remodelovanja HDL subklasa u našoj grupi ispitanika značajno doprineli i drugi činioci koji utiču na remodelovanje HDL, kao što je PLTP. Do sada je utvrđeno da serumska koncentracija CETP ne zavisi od gojaznosti i distribucije masnog tkiva (178). Osim genetskih determinanti (179), faktori uticaja na cirkulišuću koncentraciju CETP još uvek nisu jasno utvrđeni.

Povezanost antioksidativne funkcije HDL sa markerima metaboličkog profila ima složenu osnovu. U našoj studiji je koncentracija PON3 negativno korelirala sa odnosom leptin/adiponektin (tabela 45), ITM i obimom struka (tabela 42) što ukazuje na poremećaj antioksidativne funkcije HDL čestica kod disfunkcije masnog tkiva i gojaznosti. Sa druge strane, postoje i podaci koji ukazuju na to da ITM i koncentracija PON3 nisu u korelaciji (180). Iako je u grupi ispitanika sa MS pokazan nepovoljniji odnos leptina i adiponektina (tabela 8) što je pokazatelj disfunkcije masnog tkiva, nije pronađena razlika u koncentraciji PON3 između kategorija sa i bez MS (tabela 10). Ovakvi rezultati mogu ukazivati na to da dodatne komponente metaboličkog okruženja utiču na povezanost ovog markera antioksidativne funkcije HDL čestica i funkcije masnog tkiva. U našoj studiji nisu utvrđene značajne korelacije između karakteristika PON1 (paraoksonazne aktivnosti i koncentracije PON1) i leptina i adiponektina (tabela 45), što je u skladu sa rezultatima studije koju su sproveli Tisato i saradnici (181). Ipak, gojaznost i disfunkcija masnog tkiva imaju uticaj na aktivnost i koncentraciju PON1. Rezistin je adipocitokin čija koncentracija raste u gojaznosti i koji ima sposobnost nishodne regulacije ekspresije gena za PON1 (181). Koncentracija rezistina negativno korelira samo sa laktonaznom aktivnošću PON1 (181). Stoga bi ovu analizu bilo moguće proširiti procenom enzimske aktivnosti PON1 uz korišćenje više različitih supstrata, kao i procenom povezanosti PON1 i šire palete adipocitokina.

Imajući u vidu neusaglašene rezultate studija koje su ispitivale ulogu aktivnosti LCAT u razvoju faktora rizika za KVB, Rousset i saradnici su sugerisali da uloga LCAT u pro- ili antiaterogenim procesima zavisi od specifičnog metaboličkog konteksta ispitanika (182). U našoj studiji je korelacionom analizom utvrđena povezanost aktivnosti LCAT sa lipidnim faktorima rizika za KVB, odnosno utvrđena je pozitivna veza aktivnosti LCAT sa koncentracijom triglicerida i negativna sa relativnom zastupljenošću LDL II subfrakcija (tabele 39 i 40). Ovde izneti rezultati podržavaju prethodne nalaze prema kojima je povišena aktivnost LCAT marker aterogenih promena lipidnog profila koje uključuju povišene koncentracije triglicerida i formiranje manjih LDL čestica (78, 79). U našoj studiji je utvrđena pozitivna korelacija između aktivnosti LCAT i relativne zastupljenosti malih HDL čestica (tabela 40) što je u skladu sa podacima o najvišoj aktivnosti ovog enzima na najmanjim HDL subfrakcijama (73). O mogućoj povezanosti aktivnosti LCAT sa nelipidnim faktorima rizika govore u prilog pozitivna veza aktivnosti LCAT sa ITM i leptinom i odnosom leptin/adiponektin, dok je sa adiponektinom uočena negativna korelacija (tabele 38 i 41). Na životinjskim modelima je utvrđeno da deficit LCAT pruža zaštitu od razvoja gojaznosti (75). Budući da se brojni metabolički putevi, uključujući i metabolizam i funkcionalnost HDL čestica i njihovih modulatora, značajno razlikuju između vrsta (183), rezultati na životinjskim modelima se

moraju potvrditi kod ljudi. Dakle, pored povezanosti aktivnosti LCAT sa lipidnim faktorima rizika, rezultati naše studije ukazali su i na povezanost LCAT sa nekim nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB.

Kao što je napred pomenuto, masno tkivo predstavlja značajan izvor SAA, zbog čega je ovaj parametar predložen kao marker inflamacije u gojaznosti (102). Imajući u vidu da SAA može negativno uticati na kapacitet preuzimanja holesterola i antiinflamatornu funkciju HDL (104, 105), u našoj studiji je korelacionom analizom ispitana povezanost koncentracije SAA sa markerima remodelovanja i funkcionalnosti HDL. Koncentracija SAA nije značajno korelirala sa ispitivanim pokazateljima kvalitativnih karakteristika HDL čestica, osim sa zastupljenošću HDL 2a (tabele 37, 41, 45 i 46). Ispitivanja rađena u pojedinačnim HDL subfrakcijama su dala detaljniji uvid u moguće veze između koncentracije SAA i metabolizma HDL čestica. Rezultati dve studije (184, 185) ukazuju na povezanost markera remodelovanja HDL čestica i sadržaja SAA u malim HDL subfrakcijama. Griffiths i saradnici su pokazali da postoji pozitivna korelacija između koncentracije SAA u okviru HDL 3 subfrakcije i aktivnosti CETP u istim česticama kod ispitanika sa tip 2 dijabetes melitusom i sugerisali da bi povišene vrednosti SAA kod ovih ispitanika mogle da doprinesu remodelovanju HDL čestica (184). McEneny i saradnici su uočili izmenjena svojstva HDL 3 subfrakcije kod težih formi koronarne ishemijske bolesti srca, odnosno povišenu koncentraciju SAA i sniženje aktivnosti LCAT u okviru navedene subfrakcije (185).

U našem istraživanju je utvrđeno da se kvalitativne karakteristike HDL čestica menjaju pod uslovima nepovoljnog metaboličkog okruženja. Kod prisustva MS i pridruženih stanja, kao što je NAFLD, su uočene izmene strukturnih karakteristika HDL, kao i promene markera remodelovanja ovog lipoproteina. Oksidativna modifikacija HDL može biti dodatni pokazatelj narušenog metaboličkog zdravlja gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Rezultati naše studije podržavaju pristup po kome je za potpuni uvid u svojstva HDL čestica, pored određivanja koncentracije HDL-holesterola, potrebno proceniti markere kvalitativnih karakteristika antiaterogenih lipoproteina. Imajući u vidu pandemijske razmere kardiometaboličkih oboljenja u savremenom svetu, kao i njihov uticaj na pojedinca, ali i na socijalne i ekonomske aspekte društva u celini, jasno je da su neophodni dodatni naponi u cilju poboljšanja primarne prevencije ovih stanja. U tom smislu, detaljna karakterizacija HDL, kao jednog od ključnih činilaca metaboličkog zdravlja, sigurno može doprineti preciznijoj proceni rizika za razvoj KVB. Osim toga, ispitivanje kvalitativnih svojstava HDL čestica vodi ka individualizovanom pristupu u dijagnostici i lečenju, što je u skladu sa generalnim tendencijama savremene medicine.

6. Zaključci

- ✓ U kategoriji ispitanika sa MS su utvrđene izmenjene kvalitativne karakteristike HDL čestica. Kod ispitanika sa MS je uočeno remodelovanje lipoproteinskih subfrakcija u pravcu povećane zastupljenosti manjih HDL i LDL subfrakcija.
- ✓ U grupi sa MS su utvrđene promene markera remodelovanja HDL čestica, odnosno povišena koncentracija CETP i aktivnost LCAT.
- ✓ Kod ispitanika sa MS je uočena povišena koncentracija OxHDL i povišene vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol.
- ✓ Analizom karakteristika HDL čestica u odnosu na prisustvo pojedinačnih komponenti MS su utvrđene strukturne i/ili funkcionalne varijacije HDL čestica u kategorijama ispitanika sa sniženom koncentracijom HDL-holesterol, hipertrigliceridemijom, povišenom glukozom našte i povećanim obimom struka.
- ✓ Kod ispitanika kategorizovanih na osnovu vrednosti FLI su uočene promene karakteristika HDL sa porastom FLI. Kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ je utvrđena niža koncentracija HDL-holesterol i povećana zastupljenost malih HDL čestica u poređenju sa druge dve kategorije sa nižim vrednostima FLI.
- ✓ Kod ispitanika sa $FLI \geq 60$ je utvrđena povišena aktivnost LCAT u poređenju sa druge dve kategorije. Aktivnost LCAT je bila značajan prediktor povišenih vrednosti FLI.
- ✓ U kategoriji ispitanika sa $FLI \geq 60$ su uočeni niža koncentracija PON3, povišene vrednosti odnosa OxHDL/HDL-holesterol i veća relativna zastupljenost malih, gustih LDL čestica u poređenju sa ispitanicima sa $FLI < 30$.
- ✓ U grupi ispitanika sa $FLI \geq 60$ koncentracija SAA je bila viša u poređenju sa ispitanicima sa $FLI < 30$.
- ✓ Koncentracija HDL-holesterol je bila niža kod metabolički nezdravog fenotipa gojaznih ispitanika, dok nije pronađena statistički značajna razlika između metaboličkih fenotipova ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Analizom HDL subfrakcija je utvrđeno remodelovanje u korist dominacije manjih HDL subfrakcija kod metabolički nezdravog fenotipa.
- ✓ Odnos OxHDL/HDL-holesterol je bio viši kod ispitanika sa metabolički nezdravim fenotipom u kategorijama gojaznih i ispitanika sa prekomernom telesnom masom. Odnos OxHDL/HDL-holesterol je pokazao dobru sposobnost diskriminacije između metaboličkih fenotipova u obe ispitivane kategorije.
- ✓ Korelacionom analizom je utvrđena povezanost markera disfunkcije masnog tkiva i karakteristika HDL čestica. Odnos leptin/adiponektin je negativno korelirao sa relativnom zastupljenošću malih HDL čestica i sa koncentracijom PON3.
- ✓ Aktivnost LCAT je bila u pozitivnoj korelaciji sa višestrukim metaboličkim faktorima rizika za KVB. Uočena je pozitivna korelacija između aktivnosti LCAT i koncentracije triglicerida, relativne zastupljenosti malih HDL čestica i odnosa leptin/adiponektin.

- ✓ Rezultatima naše studije su utvrđene promene u strukturnim karakteristikama, markerima remodelovanja i funkcionalnosti HDL čestica kod MS i srodnih stanja. Ovde izneti rezultati podržavaju detaljniju karakterizaciju HDL čestica kojom bi se omogućila procena strukturnih i funkcionalnih osobina ove klase lipoproteina pod različitim metaboličkim uslovima.

Literatura

1. World Health Organization Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels.
3. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen ML, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM, Binno S; ESC Scientific Document Group. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37:2315-2381.
4. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735-2752.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059–1062.
6. Marott SC, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Benn M. Components of the Metabolic Syndrome and Risk of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:3212-3211.
7. Dragsbæk K, Neergaard JS, Laursen JM, Hansen HB, Christiansen C, Beck-Nielsen H, Karsdal MA, Brix S, Henriksen K. Metabolic syndrome and subsequent risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in elderly women: Challenging the current definition. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e4806.
8. Sperling LS, Mechanick JI, Neeland IJ, Herrick CJ, Després JP, Ndumele CE, Vijayaraghavan K, Handelsman Y, Puckrein GA, Araneta MR, Blum QK, Collins KK, Cook S, Dhurandhar NV, Dixon DL, Egan BM, Ferdinand DP, Herman LM, Hessen SE, Jacobson TA, Pate RR, Ratner RE, Brinton EA, Forker AD, Ritzenthaler LL, Grundy SM. The CardioMetabolic Health Alliance: Working Toward a New Care Model for the Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:1050-1067.
9. Cantley JL, Yoshimura T, Camporez JP, Zhang D, Jornayvaz FR, Kumashiro N, Guebre-Egziabher F, Jurczak MJ, Kahn M, Guigni BA, Serr J, Hankin J, Murphy RC, Cline GW, Bhanot S, Manchem VP, Brown JM, Samuel VT, Shulman GI. CGI-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/ER-preventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:1869-1874.
10. Reccia I, Kumar J, Akladios C, Viridis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism*. 2017;72:94-108.
11. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO).

- EASL-EASD-EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64:1388-1402.
12. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015;47:181-190.
 13. World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894:i-xii, 1-253.
 14. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev.* 2018;98:1911-1941.
 15. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20:pii: E2358.
 16. de Ferranti S, Mozaffarian D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clin Chem.* 2008;54:945-955.
 17. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;116:39-48.
 18. Lee JJ, Pedley A, Hoffmann U, Massaro JM, Levy D, Long MT. Visceral and Intrahepatic Fat Are Associated with Cardiometabolic Risk Factors Above Other Ectopic Fat Depots: The Framingham Heart Study. *Am J Med.* 2018;131:684-692.e12.
 19. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93:359-404.
 20. Gustafson B. J Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *Atheroscler Thromb.* 2010 Apr 30;17:332-341.
 21. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism.* 2019;92:71-81.
 22. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism.* 2015;64:24-34.
 23. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism.* 2015;64:35-46.
 24. Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019;20:pii: E1190.
 25. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28:15-23.
 26. Hafiane A, Gasbarrino K, Daskalopoulou SS. The role of adiponectin in cholesterol efflux and HDL biogenesis and metabolism. *Metabolism.* 2019;100:153953.
 27. Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:908539.

28. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;16:378-400.
29. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003;24:149-159.
30. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2016;57:1976-1986.
31. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2010;10:306-315.
32. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes.* 2017;66:815-822.
33. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56:369-381.
34. Tomiyama AJ, Hunger JM, Nguyen-Cuu J, Wells C. Misclassification of cardiometabolic health when using body mass index categories in NHANES 2005–2012 *Int J Obes (Lond).* 2016;40:883-886.
35. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A; AlkaMeSy Study Group. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care.* 2010;33:920-922.
36. Aleksandrova K, Mozaffarian D, Pischon T. Addressing the Perfect Storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. *Clin Chem.* 2018;64:142-153.
37. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond).* 2011;35:971-981.
38. Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism.* 2019;92:51-60.
39. Zhang H, Ma Z, Pan L, Xu Y, Shao J, Huang Z, Chen Z, Sun Q, Liu C, Lin M, Yang S, Li X. Hepatic fat content is a determinant of metabolic phenotypes and increased carotid intima-media thickness in obese adults. *Sci Rep.* 2016;6:21894.
40. Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are Natural Killer Cells Protecting the Metabolically Healthy Obese Patient? *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:601-605.
41. Succurro E, Marini MA, Frontoni S, Hribal ML, Andreozzi F, Lauro R, Perticone F, Sesti G. Insulin secretion in metabolically obese, but normal weight, and in metabolically healthy but obese individuals. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:1881-1886.
42. Bañuls C, Rovira-Llopis S, Lopez-Domenech S, Diaz-Morales N, Blas-Garcia A, Veses S, Morillas C, Victor VM, Rocha M, Hernandez-Mijares A. Oxidative and endoplasmic reticulum stress is impaired in leukocytes from metabolically unhealthy vs healthy obese individuals. *Int J Obes (Lond).* 2017;41:1556-1563.
43. Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4145-4150.

44. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically Healthy Obesity: Facts and Fantasies. *J Clin Invest.* 2019;129:3978-3989.
45. Korduner J, Bachus E, Jujic A, Magnusson M, Nilsson PM. Metabolically healthy obesity (MHO) in the Malmö diet cancer study - Epidemiology and prospective risks. *Obes Res Clin Pract.* 2019;13:548-554.
46. Eckel N, Meidtner K, Kalle-Uhlmann T, Stefan N, Schulze M. Metabolically healthy obesity and cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23:956-966.
47. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:242-258.
48. Esteghamati A, Aryan Z, Esteghamati A, Nakhjavani M. Differences in vitamin D concentration between metabolically healthy and unhealthy obese adults: associations with inflammatory and cardiometabolic markers in 4391 subjects. *Diabetes Metab.* 2014;40:347-355.
49. Bell JA, Hamer M, van Hees VT, Singh-Manoux A, Kivimäki M, Sabia S. Healthy obesity and objective physical activity. *Am J Clin Nutr.* 2015;102:268-275.
50. Diniz Mde F, Beleigoli AM, Ribeiro AL, Vidigal PG, Bensenor IM, Lotufo PA, Duncan BB, Schmidt MI, Barreto SM. Factors associated with metabolically healthy status in obesity, overweight, and normal weight at baseline of ELSA-Brasil. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e4010.
51. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, Sowers MR. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med.* 2008;168:1617-1624.
52. Triolo M, Annema W, Dullaart RP, Tietge UJ. Assessing the functional properties of high-density lipoproteins: an emerging concept in cardiovascular research. *Biomark Med.* 2013;7:457-472.
53. Oshita T, Toh R, Nagano Y, Kuroda K, Nagasawa Y, Harada A, Murakami K, Kiriya M, Yoshikawa K, Miwa K, Kubo T, Iino T, Nagao M, Irino Y, Hara T, Shinohara M, Otake I, Shinke T, Nakajima K, Ishida T, Hirata KI. Association of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality, and coronary plaque properties: An optical coherence tomography-based observational study. *Clin Chim Acta.* 2020;503:136-144.
54. Savolainen MJ. Epidemiology: disease associations and modulators of HDL-related biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:259-283.
55. Kouvari M, Panagiotakos DB, Yannakoulia M, Georgousopoulou E, Critselis E, Chrysohoou C, Tousoulis D, Pitsavos C; ATTICA Study Investigators. Transition from metabolically benign to metabolically unhealthy obesity and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA cohort study. *Metabolism.* 2019;93:18-24.
56. Eckel N, Li Y, Kuxhaus O, Stefan N, Hu FB, Schulze MB. Transition from metabolic healthy to unhealthy phenotypes and association with cardiovascular disease risk across BMI categories in 90 257 women (the Nurses' Health Study): 30 year follow-up from a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:714-724.
57. Mongraw-Chaffin M, Foster MC, Anderson CAM, Burke GL, Haq N, Kalyani RR, Ouyang P, Sibley CT, Tracy R, Woodward M, Vaidya D. Metabolically Healthy Obesity,

- Transition to Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:1857-1865.
58. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67:328-357.
59. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
60. Kahl S, Straßburger K, Nowotny B, Livingstone R, Klüppelholz B, Keßel K, Hwang JH, Giani G, Hoffmann B, Pacini G, Gastaldelli A, Roden M. Comparison of liver fat indices for the diagnosis of hepatic steatosis and insulin resistance. *PLoS One*. 2014;14;9:e94059.
61. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65:1038-1348.
62. Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, Abate N, Aronne LJ, Brown WV, Gonzalez-Campoy JM, Jones SR, Kumar R, La Forge R, Samuel VT. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2013;7:304-383.
63. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, Berneis K, Griffin B, Zambon A, Athyros V, de Graaf J, März W, Parhofer KG, Rini GB, Spinaz GA, Tomkin GH, Tselepis AD, Wierzbicki AS, Winkler K, Florentin M, Liberopoulos E. "European Panel On Low Density Lipoprotein (LDL) Subclasses": A Statement on the Pathophysiology, Atherogenicity and Clinical Significance of LDL Subclasses. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:533-571.
64. Rached FH, Chapman MJ, Kontush A. HDL particle subpopulations: Focus on biological function. *Biofactors*. 2015;41:67-77.
65. Canfrán-Duque A, Lin CS, Goedeke L, Suárez Y, Fernández-Hernando C. Micro-RNAs and High-Density Lipoprotein Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:1076-1084.
66. Nikkilä EA, Taskinen MR, Sane T. Plasma high-density lipoprotein concentration and subfraction distribution in relation to triglyceride metabolism. *Am Heart J*. 1987;113(2 Pt 2):543-548.
67. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse Lipidski poremećaji Klinički vodič 5/11 Beograd 2012.
68. Barter P, Genest J. HDL cholesterol and ASCVD risk stratification: A debate. *Atherosclerosis*. 2019;283:7-12.
69. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:3-51.
70. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:4963-4971.

71. de Souza JA, Vindis C, Hansel B, Nègre-Salvayre A, Therond P, Serrano CV Jr, Chantepie S, Salvayre R, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis*. 2008;197:84-94.
72. lee DJ, Skeggs JW, Morton RE. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J Biol Chem*. 2001;276:4804-4811.
73. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res*. 2012;53:1783-1799.
74. Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, Conca P, Bocchi L, Candini C, Frigerio B, Amato M, Sirtori CR, Alessandrini P, Arca M, Boscutti G, Cattin L, Gesualdo L, Sampietro T, Vaudo G, Veglia F, Calandra S, Franceschini G. Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans. *Circulation*. 2009;120:628-635.
75. Ng DS. The role of lecithin:cholesterol acyltransferase in the modulation of cardiometabolic risks - a clinical update and emerging insights from animal models. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:654-659.
76. Dullaart RP, Perton F, Sluiter WJ, de Vries R, van Tol A. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4860-4866.
77. Gruppen EG, Connelly MA, Otvos JD, Bakker SJ, Dullaart RP. A novel protein glycan biomarker and LCAT activity in metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2015;45:850-859.
78. Tani S, Takahashi A, Nagao K, Hirayama A. Association of lecithin-cholesterol acyltransferase activity measured as a serum cholesterol esterification rate and low-density lipoprotein heterogeneity with cardiovascular risk: a cross-sectional study. *Heart Vessels*. 2016;31:831-840.
79. Yokoyama K, Tani S, Matsuo R, Matsumoto N. Association of lecithin-cholesterol acyltransferase activity and low-density lipoprotein heterogeneity with atherosclerotic cardiovascular disease risk: a longitudinal pilot study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018;18:224.
80. Tanaka S, Yasuda T, Ishida T, Fujioka Y, Tsujino T, Miki T, Hirata K. Increased serum cholesterol esterification rates predict coronary heart disease and sudden death in a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1098-1104.
81. Holleboom AG, Kuivenhoven JA, Vergeer M, Hovingh GK, van Miert JN, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Plasma levels of lecithin:cholesterol acyltransferase and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: a prospective case-control analysis nested in the EPIC-Norfolk population study. *J Lipid Res*. 2010;51:416-421.
82. Tanaka SI, Fujioka Y, Tsujino T, Ishida T, Hirata KI. Impact of serum cholesterol esterification rates on the development of diabetes mellitus in a general population. *Lipids Health Dis*. 2018;17:180.
83. Li L, Hossain MA, Sadat S, Hager L, Liu L, Tam L, Schroer S, Huogen L, Fantus IG, Connelly PW, Woo M, Ng DS. Lecithin cholesterol acyltransferase null mice are protected

from diet-induced obesity and insulin resistance in a gender-specific manner through multiple pathways. *J Biol Chem*. 2011;286:17809-17820.

84. Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:160-167.
85. Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res*. 2012;53:1451-1458.
86. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Kuivenhoven JA, Staels B. Emerging small molecule drugs. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:617-630.
87. Jiang XC. Phospholipid transfer protein: its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2018;59:764-771.
88. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, Chroni A. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:53-111.
89. Karlsson H, Kontush A, James RW. Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:207-228.
90. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 2015 1;567:12-21.
91. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact*. 2016;259(Pt B):51-62.
92. Martinelli N, Micaglio R, Consoli L, Guarini P, Grison E, Pizzolo F, Friso S, Trabetti E, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O, Girelli D. Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic-syndrome-related risk of coronary artery disease. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:231502.
93. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res*. 2014;10:74.
94. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000;275:33435-33442.
95. Shih DM, Yu JM, Vergnes L, Dali-Youcef N, Champion MD, Devarajan A, Zhang P, Castellani LW, Brindley DN, Jamey C, Auwerx J, Reddy ST, Ford DA, Reue K, Lusis AJ. PON3 knockout mice are susceptible to obesity, gallstone formation, and atherosclerosis. *FASEB J*. 2015;29:1185-1197.
96. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:870-876.
97. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:39-48.
98. Uhlir CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*. 1999;265:501-523.
99. Sack GH Jr. Serum amyloid A - a review. *Mol Med*. 2018;24:46.
100. Zhao Y, He X, Shi X, Huang C, Liu J, Zhou S, Heng CK. Association between serum amyloid A and obesity: a meta-analysis and systematic review. *Inflamm Res*. 2010;59:323-334.

101. Ryan AS, Ge S, Blumenthal JB, Serra MC, Prior SJ, Goldberg AP. Aerobic exercise and weight loss reduce vascular markers of inflammation and improve insulin sensitivity in obese women. *J Am Geriatr Soc.* 2014;62:607-614.
102. Poitou C, Coussieu C, Rouault C, Coupaye M, Canello R, Bedel JF, Gouillon M, Bouillot JL, Oppert JM, Basdevant A, Clément K. Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14:309-318.
103. King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22:302-307.
104. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, Heinecke JW. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 2015;56:1519-1530.
105. Tölle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res.* 2012;94:154-162.
106. Sato M, Ohkawa R, Yoshimoto A, Yano K, Ichimura N, Nishimori M, Okubo S, Yatomi Y, Tozuka M. Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Biosci Rep.* 2016;36:pii: e00369.
107. Ahotupa M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. *Free Radic Res.* 2017;51:439-447.
108. Martínez-López D, Camafeita E, Cedó L, Roldan-Montero R, Jorge I, García-Marqués F, Gómez-Serrano M, Bonzon-Kulichenko E, Blanco-Vaca F, Blanco-Colio LM, Michel JB, Escola-Gil JC, Vázquez J, Martín-Ventura JL. APOA1 oxidation is associated to dysfunctional high-density lipoproteins in human abdominal aortic aneurysm. *EBioMedicine.* 2019;43:43-53.
109. Shao B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821:490-501.
110. Perségol L, Brindisi MC, Rageot D, Pais de Barros JP, Monier S, Vergès B, Duveillard L. Oxidation-induced loss of the ability of HDL to counteract the inhibitory effect of oxidized LDL on vasorelaxation. *Heart Vessels.* 2015;30:845-849.
111. Arundhati Undurti, Ying Huang, Joseph A. Lupica, Jonathan D. Smith, Joseph A. DiDonato, Stanley L. Hazen. Modification of High Density Lipoprotein by Myeloperoxidase Generates a Pro-inflammatory Particle. *J Biol Chem.* 2009;284:30825–30835.
112. Marin MT, Dasari PS, Tryggestad JB, Aston CE, Teague AM, Short KR. Oxidized HDL and LDL in adolescents with type 2 diabetes compared to normal weight and obese peers. *J Diabetes Complications.* 2015;29:679-685.
113. Miki T, Miyoshi T, Kotani K, Kohno K, Asonuma H, Sakuragi S, Koyama Y, Nakamura K, Ito H. Decrease in oxidized high-density lipoprotein is associated with slowed progression of coronary artery calcification: Subanalysis of a prospective multicenter study. *Atherosclerosis.* 2019;283:1-6.
114. Peterson SJ, Shapiro JI, Thompson E, Singh S, Liu L, Weingarten JA, O'Hanlon K, Bialczak A, Bhesania SR, Abraham NG. Oxidized HDL, Adipokines, and Endothelial

Dysfunction: A Potential Biomarker Profile for Cardiovascular Risk in Women with Obesity. *Obesity* (Silver Spring). 2019;27:87-93.

115. Shao B, Pennathur S, Pagani I, Oda MN, Witztum JL, Oram JF, Heinecke JW. Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *J Biol Chem*. 2010;285:18473-18484.
116. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
117. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
118. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, Stanhope KL, Austrheim-Smith I, Wolfe BM, Ali M, Havel PJ. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *J Lipid Res*. 2010;51:2405-2412.
119. Fielding CJ, Havel RJ, Todd KM, Yeo KE, Schloetter MC, Weinberg V, Frost PH. Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoproteins in an ethnically diverse population of healthy young men. *J Clin Invest*. 1995;95:611-618.
120. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Topic A, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Vujovic A, Kalimanovska-Ostic D. Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clin Exp Med*. 2008;8:109-116.
121. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, Spasic S. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis*. 2010;210:548-554.
122. Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, Lowe WF, Blanche PJ, Krauss RM. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res* 1992;33:1876-1881.
123. R. Richter, C.E. Furlong Determination of paraoxonase 1 (PON1) status requires more than genotyping *Pharmacogenetics*. 1999;9:745-753.
124. Gay CA, Gebicki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem*. 2003;315:29-35.
125. Hosmer D, Lemeshow S. Assessing the fit of the model. In: Shewhart WA and Wilks SS, eds. *Applied Logistic Regression*. 2nd edn. New York, NY: John Wiley & Sons Inc; 2000.
126. Thompson AE, Anisimowicz Y, Miedema B, Hogg W, Wodchis WP, Aubrey-Bassler K. The influence of gender and other patient characteristics on health care-seeking behaviour: a QUALICOPC study. *BMC Fam Pract*. 2016;17:38.
127. Strømme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37 degrees C: part of the Nordic Reference Interval Project *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:371-384.

128. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte*. 2018;7:57-62.
129. Shin D, Kongpakpaisarn K, Bohra C. Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in the United States 2007-2014. *Int J Cardiol*. 2018;259:216-219.
130. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:885-893.
131. Ambikairajah A, Walsh E, Cherbuin N. Lipid profile differences during menopause: a review with meta-analysis. *Menopause*. 2019;26:1327-1333.
132. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalaurova I, Cupples LA, Parise H, D'Agostino RB, Wilson PW, Schaefer EJ. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. *Clin Chem*. 2004 50:1189-200.
133. Kouvari M, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Georgousopoulou E, Notara V, Tousoulis D, Pitsavos C, Attica Greeks Studies Investigators. Gender-specific, Lifestyle-related Factors and 10-year Cardiovascular Disease Risk; the ATTICA and GREECS Cohort Studies. *Curr Vasc Pharmacol*. 2019;17:401-410.
134. Cheng X, Klaassen CD. Hormonal and chemical regulation of paraoxonases in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342:688-695.
135. Trentini A, Bellini T, Bonaccorsi G, Cavicchio C, Hanau S, Passaro A, Cervellati C. Sex difference: an important issue to consider in epidemiological and clinical studies dealing with serum paraoxonase-1. *J Clin Biochem Nutr*. 2019;64:250-256.
136. Sumegová K, Blazíček P, Waczulíková I, Zitnanová I, Duracková Z. Activity of paraoxonase 1 (PON1) and its relationship to markers of lipoprotein oxidation in healthy Slovaks. *Acta Biochim Pol*. 2006;53:783-787.
137. Ferré N, Feliu A, García-Heredia A, Marsillach J, París N, Zaragoza-Jordana M, Mackness B, Mackness M, Escribano J, Closa-Monasterolo R, Joven J, Camps J. Impaired paraoxonase-1 status in obese children. Relationships with insulin resistance and metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2013;46:1830-1836.
138. Martinelli N, Micaglio R, Consoli L, Guarini P, Grison E, Pizzolo F, Friso S, Trabetti E, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O, Girelli D. Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic-syndrome-related risk of coronary artery disease. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:231502.
139. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliari L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002;106:1211-1218.
140. Rubbo H, Trostchansky A, O'Donnell VB. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys*. 2009;484:167-172.
141. Wang J, Stančáková A, Soininen P, Kangas AJ, Paananen J, Kuusisto J, Ala-Korpela M, Laakso M. Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: a population-based study of 9399 Finnish men. *J Intern Med*. 2012 ;272:562-572.
142. Vollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C. HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:405-421.

143. Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, Browne R, Schunemann H, Trevisan M. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet Med.* 2004;21:1346-1352.
144. Drew BG, Rye KA, Duffy SJ, Barter P, Kingwell BA. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8:237-245.
145. Siebel AL, Heywood SE, Kingwell BA. HDL and glucose metabolism: current evidence and therapeutic potential. *Front Pharmacol.* 2015;6:258.
146. Zhang Y, Li S, Xu RX, Guo YL, Wu NQ, Zhu CG, Gao Y, Dong Q, Liu G, Sun J, Li JJ. Distribution of High-Density Lipoprotein Subfractions and Hypertensive Status: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e1912.
147. Schechter CB, Barzilai N, Crandall JP, Atzmon G. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) genotype and reduced CETP levels associated with decreased prevalence of hypertension. *Mayo Clin Proc.* 2010;85:522-526.
148. Pagonas N, Vlatsas S, Bauer F, Seibert FS, Sasko B, Buschmann I, Ritter O, Kelesidis T, Westhoff TH. The impact of aerobic and isometric exercise on different measures of dysfunctional high-density lipoprotein in patients with hypertension. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26:1301–1309.
149. Rosenbaum D, Hansel B, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Girerd X, Giral P, Bruckert E. Waist circumference is a strong and independent determinant of the distribution of HDL subfractions in overweight patients with cardiovascular risk factors. *Diab Vasc Dis Res.* 2012;9:153-159.
150. Nass KJ, van den Berg EH, Gruppen EG, Dullaart RPF. Plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and phospholipid transfer protein activity independently associate with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest.* 2018;48:e12988.
151. Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1819-1828.
152. Karavia EA, Papachristou DJ, Kotsikogianni I, Triantafyllidou IE, Kypreos KE. Lecithin/cholesterol acyltransferase modulates diet-induced hepatic deposition of triglycerides in mice. *J Nutr Biochem.* 2013;24:567-577.
153. Song H, Zhu L, Picardo CM, Maguire G, Leung V, Connelly PW, Ng DS. Coordinated alteration of hepatic gene expression in fatty acid and triglyceride synthesis in LCAT-null mice is associated with altered PUFA metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E17-E25.
154. Rao PK, Merath K, Drigalenko E, Jadhav AYL, Komorowski RA, Goldblatt MI, Rohatgi A, Sarzynski MA, Gawrieh S, Olivier M. Proteomic characterization of high-density lipoprotein particles in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Proteomics.* 2018;15:10.
155. Torun E, Gökçe S, Ozgen İT, Aydın S, Cesur Y. Serum paraoxonase activity and oxidative stress and their relationship with obesity related metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27:667–675.

156. Hashemi M, Bahari A, Hashemzahi N, Moazeni-Roodi A, Shafieipour S, Bakhshipour A, Ghavami S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in Iranian patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Pathophysiology*. 2012;19:115-119.
157. Fadaei R, Meshkani R, Poustchi H, Fallah S, Moradi N, Panahi G, Merat S, Golmohammadi T. Association of carotid intima media thickness with atherogenic index of plasma, apo B/apo A-I ratio and paraoxonase activity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Physiol Biochem*. 2019;125:19-24.
158. van den Berg EH, Gruppen EG, James RW, Bakker SJL, Dullaart RPF. Serum paraoxonase 1 activity is paradoxically maintained in nonalcoholic fatty liver disease despite low HDL cholesterol. *J Lipid Res*. 2019;60:168-175.
159. Marsillach J, Becker JO, Vaisar T, Hahn BH, Brunzell JD, Furlong CE, de Boer IH, McMahon MA, Hoofnagle AN; DCCT/EDIC Research Group. Paraoxonase-3 is depleted from the high-density lipoproteins of autoimmune disease patients with subclinical atherosclerosis. *J Proteome Res*. 2015;14:2046-2054.
160. Kaikkonen JE, Würtz P, Suomela E, Lehtovirta M, Kangas AJ, Jula A, Mikkilä V, Viikari JS, Juonala M, Rönnemaa T, Hutri-Kähönen N, Kähönen M, Lehtimäki T, Soininen P, Ala-Korpela M, Raitakari OT. Metabolic profiling of fatty liver in young and middle-aged adults: Cross-sectional and prospective analyses of the Young Finns Study. *Hepatology*. 2017;65:491-500.
161. Siddiqui MS, Fuchs M, Idowu MO, Luketic VA, Boyett S, Sargeant C, Stravitz RT, Puri P, Matherly S, Sterling RK, Contos M, Sanyal AJ. Severity of nonalcoholic fatty liver disease and progression to cirrhosis are associated with atherogenic lipoprotein profile. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13:1000-8.e3.
162. Amor AJ, Pinyol M, Solà E, Catalan M, Cofán M, Herreras Z, Amigó N, Gilibert R, Sala-Vila A, Ros E, Ortega E. Relationship between noninvasive scores of nonalcoholic fatty liver disease and nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities: A focus on atherogenic dyslipidemia. *J Clin Lipidol*. 2017;11:551-561.e7.
163. Wang Y, van der Tuin S, Tjeerdema N, van Dam AD, Rensen SS, Hendriks T, Berbée JF, Atanasovska B, Fu J, Hoekstra M, Bekkering S, Rixen NP, Buurman WA, Greve JW, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R, Meijer OC, Smit JW, Havekes LM, van Dijk KW, Rensen PC. Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology*. 2015;62:1710-1722.
164. van der Tuin SJL, Li Z, Berbée JFP, Verkouter I, Ringnalda LE, Neele AE, van Klinken JB, Rensen SS, Fu J, de Winther MPJ, Groen AK, Rensen PCN, Willems van Dijk K, Wang Y. Lipopolysaccharide Lowers Cholesteryl Ester Transfer Protein by Activating F4/80+Clec4f+Vsig4+Ly6C- Kupffer Cell Subsets. *J Am Heart Assoc*. 2018;7:e008105.
165. Wenfeng Z, Yakun W, Di M, Jianping G, Chuanxin W, Chun H. Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2014;13:489-495.
166. van Eyk HJ, Blauw LL, Bizino MB, Wang, van Dijk KW, de Mutsert R, Smit JWA, Lamb HJ, Jazet IM, Rensen PCN. Hepatic triglyceride content does not affect circulating CETP: lessons from a liraglutide intervention trial and a population-based cohort. *Sci Rep*. 2019;9:9996.

167. Blauw LL, Li Z, Rensen SS, Greve JWM, Verhoeven A, Derks RJ, Giera M, Wang Y, Rensen PCN. Metabolic liver inflammation in obesity does not robustly decrease hepatic and circulating CETP. *Atherosclerosis*. 2018;275:149-155.
168. Neuman G, Sagi R, Shalitin S, Reif S. Serum inflammatory markers in overweight children and adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *Isr Med Assoc J*. 2010;12:410-415.
169. Morelli NR, Scavuzzi BM, Miglioranza LHDS, Lozovoy MAB, Simão ANC, Dichi I. Metabolic syndrome components are associated with oxidative stress in overweight and obese patients. *Arch Endocrinol Metab*. 2018;62:309-318.
170. Kim M, Yoo HJ, Ko J, Lee JH. Metabolically unhealthy overweight individuals have high lysophosphatide levels, phospholipase activity, and oxidative stress. *Clin Nutr*. 2020;39:1137-1145.
171. Choi M-K, Han Y-A, Roh YK. Utility of obesity indicators for metabolically healthy obesity: an observational study using the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (2009-2010). *BMC Public Health*. 2014;14:1166.
172. Kang YM, Jung CH, Cho YK, Jang JE, Hwang JY, Kim EH, Lee WJ, Park JY, Kim HK. Visceral adiposity index predicts the conversion of metabolically healthy obesity to an unhealthy phenotype. *PLoS One*. 2017;12:e0179635.
173. Phillips CM, Perry IJ. Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: does size matter? *Atherosclerosis*. 2015;242:399-406.
174. Alfadda AA, Masood A, Al-Naami MY, Chaurand P, Benabdelkamel H. A proteomics based approach reveals differential regulation of visceral adipose tissue proteins between metabolically healthy and unhealthy obese patients. *Mol Cells*. 2017;40:685-695.
175. Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Rodríguez A, Andrada P, Ramírez B, Ibáñez P, Vila N, Romero S, Margall MA, Gil MJ, Moncada R, Valentí V, Silva C, Salvador J, Frühbeck G. Increased cardiometabolic risk factors and inflammation in adipose tissue in obese subjects classified as metabolically healthy. *Diabetes Care*. 2014;37:2813-2821.
176. Brant LC, Wang N, Ojeda FM, LaValley M, Barreto SM, Benjamin EJ, Mitchell GF, Vasan RS, Palmisano JN, Münzel T, Blankenberg S, Wild PS, Zeller, Ribeiro AL, Schnabel RB, Hamburg NM. Relations of Metabolically Healthy and Unhealthy Obesity to Digital Vascular Function in Three Community-Based Cohorts: A Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:pii: e004199.
177. Dullaart RP, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K, Van Tol A. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest*. 1994;24:188-194.
178. Blauw LL, de Mutsert R, Lamb HJ3, de Roos A, Rosendaal FR, Jukema JW, Wang Y, van Dijk KW, Rensen PC. Serum CETP concentration is not associated with measures of body fat: The NEO study. *Atherosclerosis*. 2016;246:267-273.
179. Blauw LL, Li-Gao R, Noordam R, de Mutsert R, Trompet S, Berbée JFP, Wang Y, van Klinken J, Christen T, van Heemst D, Mook-Kanamori DO, Rosendaal FR, Jukema JW, Rensen PCN, Willems van Dijk K. CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) Concentration: A Genome-Wide Association Study Followed by Mendelian Randomization on Coronary Artery Disease. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11:e002034.

180. Aragonès G, Guardiola M, Barreda M, Marsillach J, Beltrán-Debón R, Rull A, Mackness B, Mackness M, Joven J, Simó JM, Camps J. Measurement of serum PON-3 concentration: method evaluation, reference values, and influence of genotypes in a population-based study. *J Lipid Res.* 2011;52:1055-1061.
181. Tisato V, Romani A, Tavanti E, Melloni E, Milani D, Bonaccorsi G, Sanz JM, Gemmati D, Passaro A, Cervellati C. Crosstalk Between Adipokines and Paraoxonase 1: A New Potential Axis Linking Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2019;8:pii: E287.
182. Rousset X, Shamburek R, Vaisman B, Amar M, Remaley AT. Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13:249-256.
183. Lee-Rueckert M, Escola-Gil JC, Kovanen PT. HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861:566-583.
184. Griffiths K, Pazderska A, Ahmed M, McGowan A, Maxwell AP, McEneny J, Gibney J, McKay GJ. Type 2 Diabetes in Young Females Results in Increased Serum Amyloid A and Changes to Features of High Density Lipoproteins in Both HDL2 and HDL3. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1314864.
185. McEneny J, McKavanagh P, York E, Nadeem N, Harbinson M, Stevenson M, Ball P, Lusk L, Trinick T, Young IS, McKay GJ, Donnelly PM. Serum- and HDL3-serum amyloid A and HDL3-LCAT activity are influenced by increased CVD-burden. *Atherosclerosis.* 2016;244:172-178.

Biografija autora

Jelena Janać je rođena 1982. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i XI beogradsku gimnaziju. Farmaceutski fakultet (smer: diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar) je upisala 2001. godine, a diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,09. Nakon diplomiranja je obavila pripravnički staž u biohemijskoj laboratoriji Klinike za urologiju i nefrologiju (Klinički centar Srbije). Položila je stručni ispit za zdravstvene radnike i saradnike 2009. godine. Radno iskustvo u biohemijskim laboratorijama je stekla u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Konzilijum i laboratoriji Doma zdravlja Clinicanova. Nakon toga je radila kao saradnik u nastavi na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta (Univerzitet u Beogradu).