

**Sveučilište u Zagrebu**

**Medicinski fakultet**

Nina Blažević

**UČINCI ANTILIPIDNIH LIJEKOVA NA  
BUTIRILKOLINESTERAZU U BIOLOŠKOM MATERIJALU  
ŠTAKORA**

**Zagreb, 2012.**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr.sc. Vlasta Bradamante u sklopu znanstvenog projekta „Serumske esteraze, leptin, lipidi i antilipidni lijekovi“, šifra projekta: 108-0000000-0013, voditelj projekta: prof.dr.sc. Vlasta Bradamante, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.

## POPIS KRATICA

<b>A<math>\beta</math>:</b>	amiloid beta
<b>AChE:</b>	acetilkolinesteraza
<b>BuChE:</b>	butirilkoinesteraza
<b>FENO:</b>	fenofibrat
<b>HDL:</b>	lipoproteini velike gustoće (prema engl. <i>high density lipoproteins</i> )
<b>HMG-CoA:</b>	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
<b>LDL:</b>	lipoproteini male gustoće (prema engl. <i>low density lipoproteins</i> )
<b>LPL:</b>	lipoproteinska lipaza
<b>MDA:</b>	malondialdehid
<b>PPAR:</b>	peroksisomnim proliferatorom aktivirani receptor (prema engl. <i>peroxisome proliferator activated receptor</i> )
<b>ROSU :</b>	rosuvastatin
<b>SIMV:</b>	simvastatin
<b>VLDL:</b>	lipoproteini vrlo male gustoće (prema engl. <i>very low density lipoproteins</i> )

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. STATINI</b>	<b>1</b>
1.1.1. Učinci statina na lipide	1
1.1.2. Ne-lipidni učinci statina	2
1.1.3. Simvastatin	3
1.1.4. Rosuvastatin	4
<b>1.2. FIBRATI</b>	<b>4</b>
1.2.1. Učinci fibrata na lipide	4
1.2.2. Ne-lipidni učinci fibrata	4
1.2.3. Fenofibrat	5
<b>1.3. BUTIRILKOLINESTERAZA</b>	<b>5</b>
1.3.1. Fiziološka i farmakološka uloga	5
1.1.1. Butirilkolinesteraza i patološka stanja	6
1.1.2. Utjecaj antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost	6
<b>2. HIPOTEZA</b>	<b>8</b>
<b>3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	<b>10</b>
<b>4.1. ŽIVOTINJE</b>	<b>10</b>
<b>4.2. ISPITIVANE SUPSTANCIJE</b>	<b>10</b>
<b>4.3. POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA</b>	<b>10</b>
4.3.1. Kontrolne skupine životinja	10
4.3.2. Eksperimentalne skupine životinja	10
4.3.3. Primjena antilipidnih lijekova	11
4.3.4. Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala	11
<b>4.4. BIOKEMIJSKE METODE</b>	<b>11</b>
4.4.1. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u mozgu	11
4.4.2. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u plazmi	12
4.4.3. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u jetri	12
<b>4.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA</b>	<b>12</b>
<b>5. REZULTATI</b>	<b>13</b>
<b>5.1. ROSUVASTATIN – POKUS I</b>	<b>13</b>
5.1.1. Učinci rosuvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu	13
5.1.2. Učinci rosuvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri	13
<b>5.2. SIMVASTATIN – POKUS II</b>	<b>13</b>
5.2.1. Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu	13

5.2.2. Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri	13
<b>5.3. FENOFIBRAT – POKUS III</b>	<b>14</b>
5.3.1. Učinci fenofibrata na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu	14
5.3.2. Učinci fenofibrata na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri	14
<b>6. RASPRAVA</b>	<b>21</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	<b>23</b>
<b>8. ZAHVALE</b>	<b>24</b>
<b>9. POPIS LITERATURE</b>	<b>25</b>
<b>10. SAŽETAK</b>	<b>28</b>
<b>11. SUMMARY</b>	<b>29</b>

## 1. UVOD

U plazmi se nalaze slobodni i esterificirani kolesterol (ili esteri kolesterola), triacilgliceroli i fosfolipidi. Budući da su lipidi netopljivi u vodi, u plazmi se prenose putem lipoproteina. U plazmi čovjeka lipoproteini male gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) su glavni prijenosnici kolesterola i estera kolesterola, a omogućuju i njihov unos u različita tkiva. Pri uklanjanju viška kolesterola iz tkiva glavnu ulogu imaju lipoproteini velike gustoće (engl. *high density lipoproteins*, HDL). Najvažniji prijenosnici triacilglicerola u ljudskoj plazmi su hilomikroni, lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoproteins*, VLDL). U plazmi štakora glavni prijenosnici kolesterola i estera kolesterola su HDL čestice, koje također prenose i najveći dio triacilglicerola (Beltowski i sur.-2002). Hiperlipoproteinemije su skupina poremećaja lipida odnosno lipoproteina, i označuju povećanu koncentraciju pojedinih lipoproteina u krvi. Posljedica su ubrzane sinteze ili usporene razgradnje lipoproteinskih čestica (Daniels i sur.-2001).

### 1.1. STATINI

Statini su vrlo učinkoviti lijekovi u liječenju onih hiperlipoproteinemija u kojima prevladava poremećeni metabolizam kolesterola. Najvažniji povoljni učinak statina je značajno smanjenje kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Beltowski i sur.-2002). Statini su strukturni analozi HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) i inhibiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktazu (HMG-CoA-reduktazu), koja je ključni enzim u sintezi mevalonata i endogenog kolesterola (Katzung i sur.-2011.; Beltowski i sur.-2002). Prvi prototip statina ispitan na ljudima bio je mevastatin, dok je lovastatin bio prvi statin odobren za terapijsku primjenu u ljudi. Ostali u kliničkoj primjeni poznati statini su simvastatin (SIMV), atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin (ROSU), te fluvastatin. Poznato je da mevalonat koji nastaje iz HMG-CoA pod djelovanjem HMG-CoA reduktaze nije samo prethodnik kolesterola nego i steroidnih izoprenoidnih spojeva poput ubikvinona i dolikola. Statini inhibicijom stvaranja izoprenoida također mogu inhibirati proteine upalne kaskade (poput Rho, Ras i Rac- kinaze) i tako utjecati na reakcije važne u patogenezi ateroskleroze (Fabijanić-2010).

Sukladno sa zajedničkim molekularnim mehanizmima statina, u daljnjem tekstu biti će prikazani lipidni i ne-lipidni učinci ove skupine lijekova, te farmakokinetičke osobitosti SIMV i ROSU korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog znanstvenog rada.

#### 1.1.1. Učinci statina na lipide

Statini preko inhibicije HMG-CoA-reduktaze smanjuju sintezu kolesterola u jetri s posljedično povećanom sintezom LDL receptora, povećanom frakcijskom brzinom katabolizma LDL i jetrenom ekstrakcijom prethodnika LDL (tj. VLDL) iz krvi, što rezultira njihovim glavnim biokemijskim učinkom - sniženjem koncentracije LDL u plazmi (Katzung i sur.-2011). Statini također povećavaju HDL kolesterol i umjereno smanjuju trigliceride u plazmi (Rang i sur.-2006).

Učinci statina na lipide, kako to unatrag nekoliko godina pokazuju neklinička i klinička istraživanja mogu biti posredovani i aktivacijom specifičnih peroksisomnim proliferatorom aktiviranih receptora (engl. *peroxisome proliferator activated receptor*, PPAR). PPAR receptori su transkripcijski faktori koji se ubrajaju u superobitelj nuklearnih hormonskih receptora. Njihova glavna uloga je regulacija enzima putem transkripcije, kao i drugih proteina koji su bitni u očuvanju energetske homeostaze u organizmu. Na taj način sudjeluju u regulaciji metabolizma lipida u jetri, srcu, bubrezima i mišićima (Yano i sur.-2007). Kako su aktivirani različitim ligandima, od endogenih liganda značajne su masne kiseline, a od egzogenih antilipidni lijekovi (Rang i sur.-2006).

#### 1.1.2. Ne-lipidni učinci statina

Ne-lipidni učinci statina nazivaju se još i pleiotropni učinci (pleiotropni- izvedenica iz grčkih riječi *pleio* – mnogo i *trepein* – utjecaj), a obuhvaćaju učinke statina na endotelnu disfunkciju, upalnu reakciju, stabilnost plaka i trombogenezu. Svi su ti učinci važni za modifikaciju ateroskleroze, kardiovaskularnih bolesti, a prema novim saznanjima i nekih bolesti središnjeg živčanog sustava (Fabijanić-2010). Dokazani povoljni ne-lipidni učinci statina su: smanjena sklonost agregacije trombocita, antitrombotsko djelovanje, pojačana fibrinoliza, povećana neovaskularizacija ishemičkog tkiva, imunosupresija (Rang i sur.-2006; Katzung i sur.-2011). U prilog antikoagulacijskog djelovanja statina, studija Glynn i suradnika je pokazala kako je rosuvastatin dan u dozi od 20 mg dnevno kroz dvije godine smanjio za 43% venska tromboembolijska događanja u odnosu na placebo (Glynn i sur.-2009).

Uz sniženje plazmatskog kolesterola, statini imaju korisne učinke na brojne druge procese uključene u aterogenezu, poput žilne upalne reakcije, migracije i proliferacije glatkih mišića krvnih žila, vazorelaksacije ovisne o endotelu i oksidativnog stresa (Koh-2000). U prilog povoljnom učinku statina u aterosklerozi govore rezultati istraživanja na hiperkolesterolemičnim muškarcima, koji su primali SIMV u dozi od 20 mg na dan kroz 12 tjedana. Lijek je značajno smanjio koncentraciju IL-2 u perifernoj venskoj krvi. Kako se ateroskleroza smatra upalnom bolešću (Ross-1999), statini putem svog protuupalnog djelovanja sudjeluju u zaštiti žilnih stijenki i prevenciji akutnih vaskularnih epizoda. Iz toga proizlazi kako IL-2 može biti pokazatelj smanjene upalne aktivnosti za vrijeme terapije statinima (Zubelewicz-Szkodzińska-2004).

O učincima statina na metabolizam kolesterola u mozgu postoje brojni literaturni podaci. Neki od njih ukazuju na protektivni učinak lijekova koji smanjuju kolesterol na razvoj demencije, vjerojatno kroz modulaciju sinteze kolesterola u mozgu. Cibickova i sur. (2008) su u svojem istraživanju pokazali kako su SIMV i atorvastatin, oba lipofilna lijeka, snizila sintezu kolesterola u mozgu štakora, ne izazivajući promjene u plazmatskom kolesterolu, što podupire ideju njihovog lokalnog učinka u mozgu (Cibickova i sur.-2008). U drugom istraživanju (2009), u kojem se u štakora ispitivao učinak SIMV, atorvastatina i hrane bogate kolesterolom na patofiziološke mehanizme u Alzheimerovoj bolesti je dokazano suprotno, tj. da su oba statina smanjila kolesterol u plazmi, ali bez učinka na ukupni kolesterol u mozgu (Cibickova i sur.-2009). U mozgu je međutim izmjerena značajna redukcija sinteze latosterola i kolesterola, ali bez promjena u aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE), koncentraciji amiloida beta (A $\beta$ ) i HMG-CoA-reduktazi. Rezultati oba pokusa (Cibickova i sur.-2008; Cibickova i sur.-2009) pokazuju da u mozgu postoje za sada još uvijek nerazjašnjeni

međusobni odnosi između statina i sinteze kolesterola s jedne strane, te nerazjašnjeni međusobni odnosi između A $\beta$ , aktivnosti AChE i aktivnosti HMG-CoA-reduktaze s druge strane.

Pored mogućeg djelovanja statina na moždani kolesterol dokazanog u pokusima Cibickove i sur., Sparks i sur. su pretpostavili kako sniženje kolesterola u mozgu može ići neizravnim putem, tj. da pad plazmatskog kolesterola posredno dovodi do smanjenja razine moždanog kolesterola (Sparks i sur.-2002). Stoga je za pretpostaviti kako inhibitori HMG-CoA-reduktaze mogu smanjiti rizik od Alzheimerove bolesti već samim inhibicijskim učinkom na sintezu serumskog kolesterola, budući da njegove povećane vrijednosti uzrokuju veće nakupljanje A $\beta$ , glavne komponente amiloidnih plakova u Alzheimerovoj bolesti (Dickson-1997). Prema rezultatima randomiziranog, dvostruko slijepog placebo kontroliranog pokusa, u kojem su pacijenti s blagom do umjerenom Alzheimerovom bolesti bili podijeljeni u dvije skupine, od kojih je jedna primala placebo, a druga SIMV, serumski kolesterol bio je snižen u ispitivanoj skupini, ali bez povoljnog učinka na progresiju simptoma u osoba s navedenom bolešću (Sano i sur.-2011).

Posljednja dva desetljeća često se spominje originalna kolinergička hipoteza o Alzheimerovoj bolesti, koja opisuje biokemijske i histopatološke promjene neurotransmitorskih biljega, dokazane u mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolesti postmortalno ili u biopsijama moždanog tkiva uzetog tijekom neurokirurškog zahvata (Francis-1999). Ispitivanja su povezala smanjenje kvalitete memorije i učenja, te deficit u presinaptičkoj kolinergičkoj neurotransmisiji. Kolinergičku hipotezu upotpunili su klinički podaci pacijenata kod koji je praćena promjena ponašanja tijekom terapije kolinomimetskim lijekovima. Inhibitori AChE danas su standardni lijekovi za liječenje Alzheimerove bolesti, jer povećavaju kolinergičku transmisiju (Katzung i sur.-2011).

Obzirom na eksperimentalne podatke dobivene na miševima, za pretpostaviti je kako statini (u ovom slučaju pitavastatin i SIMV) imaju važnu ulogu u oporavku memorijskih disfunkcija izazvanih demencijom zbog inhibicijskih učinaka na aktivnost AChE (Dalla i sur.-2010). U ispitivanjima Sharme i sur., u kojima su kod miševa korišteni celecoxib i streptozocin u svrhu izazivanja eksperimentalne demencije nalik Alzheimerovoj bolesti, pitavastatin je uspješno smanjio induciranu demenciju. Pretpostavlja se da pitavastatin smanjuje demenciju u miševa djelovanjem u nekoliko smjerova, uključujući neuroprotektivno i antioksidativno djelovanje, te inhibitorni učinak na povećanu aktivnost AChE zbog razvoja demencije izazvane streptozocinom i celecoxibom (Sharma i sur.-2008). U prilog povoljnom djelovanju statina kod Alzheimerove bolesti putem porasta kolinergične aktivnosti, govore i rezultati studije koju su Roensch i sur. proveli na kulturi stanica ljudskog neuroblastoma. Otkrili su kako su SIMV i ROSU, nakon inkubacije od 48 sati s navedenim stanicama, snizili aktivnost i AChE i butirilkolinesteraze (BuChE). Nakon produžene inkubacije do 72 sata, svi statini korišteni u studiji (ROSU, SIMV, lovastatin i atorvastatin) su kompletno inhibirali aktivnost AChE i BuChE (Roensch i sur.-2007). Potrebno je naglasiti da AChE potiče agregaciju A $\beta$  i sudjeluje u stvaranju amiloidnih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest (Alvarez i sur.-1997).

### 1.1.3. Simvastatin

SIMV je predlijek. Nakon primjene hidrolizira se u aktivan oblik,  $\beta$ -hidroksi kiselinu (simvastatinsku kiselinu), koja je snažan inhibitor HMG-CoA-reduktaze. SIMV i njegov aktivan metabolički oblik vežu se intenzivno za proteine plazme (95%). Vršne plazmatske koncentracije statina postižu se unutar 4 sata nakon oralne primjene, s poluvijekom eliminacije od 12 sati. Budući da lijek ima izražen efekt prvog prolaska kroz



jetru, njegova dostupnost u cirkulaciji je niska (<5%). Nakon metabolizma u jetri, 13% lijeka se izluči urinom, dok najveći dio, 60%, fecesom. Istraživanja na štakorima s radioaktivno obilježenim SIMV ukazala su na prisutnost radioaktivnosti u moždanom tkivu, što znači da lijek prolazi krvno-moždanu barijeru (Rxlist-2013). SIMV, zajedno s atorvastatinom, lovastatinom i fluvastatinom, pripada lipofilnim lijekovima (Cibickova i sur.-2008).

#### 1.1.4. Rosuvastatin

ROSU je selektivni i kompetitivni inhibitor HMG-CoA-reduktaze. Za razliku od SIMV, ovdje nije toliko izražena pretvorba u aktivan metabolički oblik. Ima veliki volumen distribucije. Oko 88% lijeka vezano je reverzibilno za albumine plazme. ROSU se metabolizira vrlo malo, što je dokazano primjenom radioaktivno označenog lijeka (izlučivanje u obliku metabolita iznosilo je svega 10%). Poluvijek eliminacije lijeka je 19 sati. Nakon oralne aplikacije, ROSU i njegovi metaboliti se izlučuju primarno fecesom (90%) (Rxlist-2013).

## 1.2. FIBRATI

Fibrati su lijekovi koji su vrlo učinkoviti u liječenju hiperlipoproteinemija u kojima je dominantni poremećaj hipertriacilglicerolemija (Steals i sur.-1998). Fibrati su agonisti PPAR $\alpha$  receptora (Rang i sur.-2006).

Uz detaljniji prikaz lipidnih i ne-lipidnih učinaka fibrata, u tekstu je spomenuta i farmakokinetika fenofibrata (FENO), lijeka koji je korišten u eksperimentalnom dijelu ovog znanstvenog rada.

### 1.2.1. Učinci fibrata na lipide

Točan mehanizam djelovanja fibrata na metabolizam lipida nije poznat. Prema rezultatima novijih pokusa, mnogi od učinaka ovih spojeva na plazmatske lipide su posljedica njihove interakcije s PPAR $\alpha$  receptorima, koji su primarno izraženi u jetri glodavaca te u manjoj mjeri u bubregu, srcu i skeletnoj muskulaturi. Ti su receptori uključeni u regulaciju metabolizma lipida u jetri, srcu i skeletnim mišićima (Rang i sur.-2006). Fibrati pojačavaju transkripciju i posljedično povisuju razine lipoprotein lipaze (LPL), povećavajući na taj način hidrolizu triglicerida u hilomikronima i VLDL česticama (Katzung i sur.-2011). Njihov najvažniji učinak je porast oksidacije masnih kiselina u jetri i skeletnim mišićima. Fibrati također smanjuju stvaranje VLDL-a u jetri, povećavaju unos LDL-a u jetru i umjereno povećavaju koncentraciju HDL čestica u plazmi (Rang i sur.-2006; Steals i sur.-1998). Dio porasta HDL u plazmi je posljedica sniženja triglicerida u plazmi, sa smanjenom razmjenom triglicerida na mjesto kolesterolskih estera unutar HDL-a (Katzung i sur.-2011).

### 1.2.2. Ne-lipidni učinci fibrata

Osim povoljnog djelovanja na lipide i lipoproteine, fibrati imaju i ne-lipidne učinke, koji su neovisni o njihovom učinku na lipide, te uključuju smanjenje fibrinogena u plazmi, poboljšanje tolerancije glukoze i inhibiciju upale glatkih vaskularnih mišića (Rang i sur.-2006).

Fibrati imaju također određenu ulogu (vjerojatno negativnu) u oksidacijsko-redukcijskoj ravnoteži. Potičući proliferaciju peroksisoma u hepatocitima i povećavajući razgradnju masnih kiselina  $\beta$ -oksidacijom, istovremeno se potiče proizvodnja slobodnih radikala, kao što je vodikov peroksid  $H_2O_2$ , koji uzrokuje peroksidaciju lipida (Arnaiz i sur.-1995) i značajan porast malondialdehida (MDA), jednog od niskomolekularnih završnih produkata razgradnje primarnih i sekundarnih produkata lipidne peroksidacije. MDA se često upotrebljava kao indeks oksidativnog statusa. MDA se u zdravih aerobnih organizama proizvodi u malim količinama, te je njegova proizvodnja uravnotežena obranom od strane antioksidativnih mehanizama (Cighetti i sur.-2002).

Neki od ne-lipidnih učinaka fibrata mogli bi biti modulacija upalnog odgovora i stanične migracije, kao i stabilizacija aterosklerotskog plaka, za koje se pretpostavlja da su posredovani aktivacijom PPAR $\alpha$  receptora. Međutim, ekspresija navedenih receptora ustanovljena je na endotelnim stanicama arterijske stijenke, glatkim mišićnim stanicama i makrofagima, dakle na mjestima koja se ne dovode u izravnu vezu s metabolizmom lipoproteinskih čestica (Calkin i sur.-2006).

### 1.2.3. Fenofibrat

FENO je predlijek. Nakon primjene hidrolizira se pomoću esteraza u aktivan oblik, fenofibričnu kiselinu. U plazmi se ne može detektirati nepromijenjeni FENO. Dobro se apsorbira iz probavnog sustava. Vršne plazmatske koncentracije postiže unutar 4-8 sati nakon oralne primjene, s poluvijekom eliminacije od 23 sata, što omogućuje primjenu lijeka jednom dnevno. Fenofibrična kiselina se primarno konjugira s glukuronskom kiselinom, nakon čega se izlučuje u urin, što je i glavni put eliminacije lijeka (60% se ovim putem odstrani iz organizma, a 25% putem fecesa) (Rxlist-2013).

## 1.3. BUTIRILKOLINESTERAZA

### 1.3.1. Fiziološka i farmakološka uloga

BuChE (nespecifična esteraza, pseudokolinesteraza) je enzim koji se sintetizira u jetri nakon čega se izlučuje u krv. Pripada skupini kolinesteraza, odnosno serumskih esteraza. Osim u plazmi i jetri, aktivnost enzima je dokazana u drugim tkivima, poput masnog tkiva, tankog crijeva, pluća i bijele tvari mozga (Kutty-1980). Njezina fiziološka uloga nije poznata. Pretpostavlja se da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u hidrolizi butirilkolina, intermedijarnog metabolita koji nastaje tijekom metabolizma neesterificiranih masnih kiselina u jetri. Isti enzim sudjeluje i u prijenosu spore živčane provodljivosti (Kutty i Payne-1994), dok u sinapsama u središnjem živčanom sustavu razgrađuje acetilkolin. Važnost BuChE za normalnu kolinergičku funkciju dokazana je u pokusima na AChE- *knockout* miševima (Li i sur.-2000).

Značajna je farmakološka i toksikološka funkcija BuChE. Taj enzim hidrolizira farmakološke pripravke koji u svojoj strukturi sadrže estere, uključujući niz estera kolina, među kojima su acetilkolin, butiriltiokolin, propioniltiokolin. Za razliku od AChE koja najbrže hidrolizira acetilkolin, BuChE mnogo brže hidrolizira

butiriltilkolin. BuChE sudjeluje u metabolizmu kokaina, heroina, sukcinilkolina, te lijekova sličnih acetilsalicilnoj kiselini.

### 1.3.2. Butirilkolinesteraza i patološka stanja

Posljednjih se godina intenzivnije istražuje uloga BuChE u metabolizmu lipida i lipoproteina kao i njezina povezanost s metaboličkim sindromom. Dokazana je pozitivna korelacija između katalitičke aktivnosti BuChE i serumskih koncentracija triglicerida (Abbott i sur.-1993), ukupnog kolesterola i LDL kolesterola u pacijenata s hipertenzijom, pretilih pacijenata, kao i u pacijenata s hiperkolesterolemijom (Magarian i Dietz-1987; Cucuianu i sur.-1968). Isto tako postoji pozitivna korelacija između aktivnosti plazmatske BuChE i tjelesne mase, koncentracije ukupnog i LDL kolesterola, te triacilglicerola, a negativna između aktivnosti navedenog enzima i plazmatske koncentracije HDL-a (Stojanov i sur.-2011). Praćenje katalitičke aktivnosti BuChE može se koristiti kao biljeg metaboličkog sindroma, iako još uvijek nije poznato prethodi li povećana aktivnost enzima njegovom nastanku ili je njegova posljedica (Randell i sur.-2005).

Pored svoje uloge u metabolizmu lipida, promjene BuChE uočene su u bolesnika koji imaju različite neoplazme, poput karcinoma pluća i novotvorine stanica hematopoetskog sustava. Aktivnost BuChE smanjena je u bolesnika s malignim tumorima želuca, debelog crijeva i prostate (White i sur.-1958).

Danas je poznato da su BuChE i AChE povezane s patogeneozom i progresijom Alzheimerove bolesti. BuChE i AChE su ciljno mjesto djelovanja lijekova koji inhibiraju njihovu katalitičku aktivnost i stoga se koriste za liječenje Alzheimerove bolesti. Budući da je za tu bolest značajan deficit kolinergičke funkcije, važno je poznavati i lijekove iz drugih terapijskih skupina koji mijenjajući katalitičku aktivnost oba enzima utječu i na razvoj demencije. To se napose odnosi na antilipidne lijekove i kontroverzne podatke o njihovom učinku na katalitičku aktivnost oba enzima.

### 1.3.3. Utjecaj antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost

Provedena su brojna neklinička istraživanja i kliničke studije sa često suprotnim rezultatima o utjecaju antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost BuChE.

U štakora na normalnoj prehrani kao i na onoj bogatoj ugljikohidratima, gemfibrozil je izazvao značajan porast aktivnosti enzima (Bradamante i sur.-2005). Isti autori pretpostavljaju da je gemfibrozil kao peroksisomni proliferator povećao oksidaciju slobodnih masnih kiselina u jetri, što posljedično izazvalo porast aktivnosti BuChE (Bradamante i sur.-2005). Porast aktivnosti BuChE u plazmi, jetri i bijelom masnom tkivu dokazan je i u štakora s primarnom hipetriacilglicerolemijom nakon primjene FENO (Sisková i sur.-2012). Interesantna su istraživanja Cibickove i sur. (2007), u kojima je dokazano da primjena SIMV, atorvastatina i alendronata u štakora tijekom 7 dana ne utječe na aktivnost BuChE i AChE u krvi. Međutim u istom pokusu je primjena alendronata i SIMV izazvala pad AChE aktivnost u frontalnom režnju mozga (Cibickova i sur.-2007).

Rezultati kliničkih studija pokazuju kako kod pacijenata s hiperlipoproteinemijama tip IIa i IIb tijekom terapije SIMV nije uočeno značajno smanjenje u aktivnosti BuChE u plazmi (Muačević-Katanec i sur.-2005). Kod pacijenata s ishemičkom srčanom bolesti i umjerenom hiperkolesterolemijom, koji su tijekom 2 mjeseca primali 20 mg SIMV dnevno, dokazano je značajno smanjenje triacilglicerola i ukupnog kolesterola, dok

serumska pseudokolinesteraza i aktivnost faktora VII nisu bili značajnije promijenjeni, što pokazuje kako umjerene doze simvastatina ne smanjuju sintezu proteina u jetri (Zdrengea i sur.-2002).

Prema rezultatima *in vitro* pokusa Darvesha i sur. svi statini nemaju jednaki učinak na aktivnost kolinesteraza, tj. dokazano je da lovastatin i SIMV značajno inhibiraju BuChE, dok su mevastatin i pravastatin bez učinka na BuChE (Darvesh i sur.-2004). Nedavni rezultati naših istraživanja su pokazali da višekratna primjena SIMV, atoravastatina i pravastatina povećava katalitičku aktivnost BuChE u plazmi i jetri normolipidemičkih štakora, a slični učinci na kolinesterazu plazme i jetre dokazani su i pri višekratnoj primjeni ROSU (Macan-2011; Bradamante i sur.-2012).

Iz navedenih literaturnih podataka i naših rezultata vidljivo je da su učinci pojedinih statina i fibrata na aktivnost BuChE različiti. Zbog učestale primjene antilipidnih lijekova za liječenje hiperlipoproteinemija važno je znati da li je i njihov povoljan učinak u bolestima središnjeg živčanog sustava u kojima je važna normalna kolinergička transmisija, posljedica inhibicije aktivnosti BuChE, ili su posrijedi drugi mehanizmi djelovanja ovih lijekova.

## **2. HIPOTEZA**

Antilipidni lijekovi ROSU, SIMV i FENO značajno povećavaju katalitičku aktivnost BuChE u mozgu, plazmi i jetri štakora. Povećanje katalitičke aktivnosti enzima ovisno je o primijenjenoj dozi pojedinog antilipidnog lijeka.

### **3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Opći cilj ovog rada je istražiti i međusobno usporediti djelovanje ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE mozga, plazme i jetre normolipidemičnih štakora, te na temelju dobivenih rezultata definitivno utvrditi da li antilipidni lijekovi na aktivnost BuChE djeluju stimulacijski ili inhibicijski. Ukoliko se dokaže stimulacijski utjecaj ovih lijekova na aktivnost BuChE mozga, za neke bolesti središnjeg živčanog sustava takav je učinak štetan.

Specifični ciljevi rada:

1. Utvrditi utjecaj višekratne primjene ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE u mozgu, plazmi i jetri.
2. Utvrditi utjecaj različitih doza ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE u mozgu, plazmi i jetri.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. ŽIVOTINJE

Za istraživanja su korištena 108 štakora soja Wistar mase 300 g i starosti 2-3 mjeseca (vlastiti uzgoj Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). U istraživanjima su praćene smjernice Zakona o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999). Za obavljanje pokusa na projektu, kojeg je ovaj znanstveni rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 04-76/2007-391).

Životinje su tijekom svih pokusa boravile u prostorijama s kontroliranim laboratorijskim uvjetima i slobodnim pristupom hrani i vodi.

### 4.2. ISPITIVANE SUPSTANCIJE

U eksperimentima su korišteni antilipidni lijekovi: rosuvastatin (CAS-147098-20-2) (Crestor®, AstraZeneca d.o.o., Hrvatska) (ROSU), simvastatin (CAS-79902-63-9) (Statex® 20, Pliva, Hrvatska) (SIMV), fenofibrat (CAS-49562-28-9) (Tricor, Abbott Laboratories d.o.o., Hrvatska) (FENO) u obliku tableta.

### 4.3. POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA

Provedena su 3 pokusa, a u svakom od njih životinje su bile raspoređene u 4 skupine, od kojih su 2 skupine bile kontrolne (broj životinja po skupini N=8), a 2 skupine eksperimentalne (broj životinja po skupini N=8-12). Svaki pokus je trajao 21 dan i sastojao se od primjene pojedinih statina (ROSU, SIMV) ili FENO u eksperimentalnim skupinama, odnosno fiziološke otopine u kontrolnim skupinama štakora, nakon čega su životinje žrtvovane.

#### 4.3.1. Kontrolne skupine životinja

Kontrolne skupine štakora su svakodnevno dobivale 5mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne mase *per os* putem gastičke sonde. Katalitička aktivnost BuChE u ovih štakora je predstavljala bazičnu vrijednost, na osnovu koje se zaključivalo da li je primjena antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama životinja izazvala promjene navedenih parametara.

#### 4.3.2. Eksperimentalne skupine životinja

Ispitivani antilipidni lijekovi su primjenjivani u eksperimentalnim skupinama štakora u obliku suspenzije *per os* putem gastičke sonde. Suspenzije su dobivene miješanjem homogeniziranih tableta pojedinog antilipidnog lijeka i fiziološke otopine. Doza ROSU je bila 5 i 10 mg/kg tjelesne mase dnevno, SIMV 10 i 50

mg/kg tjelesne mase dnevno i FENO 30 i 50 mg/kg tjelesne mase dnevno. U svim je pokusima ukupna dnevna doza pojedinih antilipidnih lijekova suspednirana u 5 mL fiziološke otopine na 1 kg tjelesne mase životinja.

#### 4.3.3. Primjena antilipidnih lijekova

Provedena su dva pokusa sa statinima (ROSU, SIMV) i jedan pokus sa FENO.

U prvom pokusu je primjenjivan ROSU, u drugom pokusu je primjenjivan SIMV, a u trećem pokusu je primjenjivan FENO.

Za provođenje pokusa sa statinima u dvije doze (ROSU-pokus I, SIMV-pokus II) i sa fenofibratom u dvije doze (FENO-pokus III) štakori su u svakom pojedinom pokusu bili nasumce raspoređeni u četiri skupine, i to dvije eksperimentalne i dvije kontrolne. U pokusu I prva, nasumce odabrana eksperimentalna skupina štakora je dobivala ROSU u dozi od 5 mg/kg/dan, dok je druga eksperimentalna skupina štakora dobivala ROSU u dozi od 10 mg/kg/dan. U pokusu II prva, nasumce odabrana eksperimentalna skupina štakora je dobivala SIMV u dozi od 10 mg/kg/dan, dok je druga eksperimentalna skupina štakora dobivala SIMV u dozi od 50 mg/kg/dan. U pokusu III prva, nasumce odabrana eksperimentalna skupina štakora je dobivala FENO u dozi od 30 mg/kg/dan, dok je druga eksperimentalna skupina štakora dobivala FENO u dozi od 50 mg/kg/dan.

Primjena svih antilipidnih lijekova u eksperimentalnim skupinama te fiziološke otopine u kontrolnim skupinama životinja provodila se jednom dnevno, svaki dan prije podne između 9 i 10 sati, tijekom 21 dana.

Nakon završene primjene pojedinih antilipidnih lijekova i fiziološke otopine, te 12-satnog noćnog gladovanja, nasumce uzete po jedna eksperimentalna skupina životinja od svake doze i jedna kontrolna skupina iz prvog (ROSU), drugog (SIMV) i trećeg (FENO) pokusa, žrtvovane su 22. dana.

#### 4.3.4. Postupak žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala

Postupak žrtvovanja svih životinja je proveden nakon noćnog gladovanja. Na dan žrtvovanja u 9.00-10.00 sati ujutro životinje su podvrgnute općoj anesteziji inhalacijom dietil-etera. Žrtvovanje je provedeno postupkom uzimanja venske krvi direktno iz srca do eksangvinacije. Tako dobivena krv pohranjena je u heparinizirane epruvete kako bi se iz plazme izvršilo određivanje aktivnosti BuChE. Uzorci plazme za određivanje aktivnosti BuChE pohranjeni su na temperaturi od -20°C. Dijelovi jetre i mozga pohranjeni su na 20°C do trenutka mjerenja aktivnosti BuChE.

### 4.4. BIOKEMIJSKE METODE

#### 4.4.1. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u mozgu

Otopina za mjerenje katalitičke aktivnosti BuChE u mozgu priređena je homogenizacijom 900 mg tkiva mozga u fiziološkoj otopini u omjeru 1:5. Suspenzija je centrifugirana pri 3500 g tijekom 15-20 minuta (Rotofix-32 Hettich, Njemačka). Katalitička aktivnost BuChE u mozgu mjerena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu i sur. (Ellman i sur.-1961). Od otopine koja je sadržavala 3 mL 0,1 M fosfatnog pufera i 100 µL 0,38



mM 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoične kiseline) (DTNB) uzet je 1 mL otopine za mjerenje, u koju je dodano 50  $\mu$ L supernatanta mozga i 100  $\mu$ L butirilkolina (0,9 mM) (Sigma Chem Co., USA), kao supstrata. Za slijepu probu je korištena opisana otopina bez uzorka mozga odgovarajućeg mjernog volumena. Spektrofotometrijsko određivanje linearne brzine reakcije provedeno je mjerenjem promjene apsorbancije tijekom 3 minute pri temperaturi 25°C i valnoj duljini od 412 nm na HPV 220-Iskra-Slovenija spektrofotometru. Katalitička aktivnost BuChE u mozgu izražena je kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu tkiva mozga ( $\mu$ M/min/g).

#### 4.4.2. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u plazmi

Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti BuChE u plazmi izvodilo se na isti način kao prethodno opisano određivanje aktivnosti BuChE u plazmi, gdje se umjesto uzorka plazme u otopinu za mjerenje dodalo 50  $\mu$ L plazme. Katalitička aktivnost BuChE u plazmi izražena je kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po mililitru plazme ( $\mu$ M/min/mL).

#### 4.4.3. Određivanje katalitičke aktivnosti butirilkolinesteraze u jetri

Otopina za mjerenje priređena je homogenizacijom 800 mg tkiva jetre u fiziološkoj otopini u omjeru 1:5. Suspenzija je zatim centrifugirana pri 1876 gea tijekom 15-20 minuta (Rotofix-32 Hettich, Njemačka). Dobiveni supernatant je korišten za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti BuChE.

Budući da tkivo jetre sadrži i BuChE i AChE, spektrofotometrijsko se mjerenje provodilo metodom po Ellmanu i sur. (Ellman i sur.-1961) na način kako je to prethodno opisano za mjerenje aktivnosti BuChE u mozgu i plazmi. Međutim, pri ovom postupku se provode dva koraka: prvo mjerenje koje se izvodi na način opisan za određivanje aktivnosti BuChE u mozgu i plazmi, pri čemu se umjesto uzorka mozga i plazme u otopinu za mjerenje dodaje 100  $\mu$ L supernatanta jetre, te drugo koje se provodi uz dodatak 100  $\mu$ L specifičnog inhibitora aktivnosti BuChE etopropazin hidroklorida (Sigma St. Louis, SAD). Katalitička aktivnost BuChE izračunata je indirektno kao razlika između dva opisana mjerenja te izražena kao mikromol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu tkiva jetre ( $\mu$ M/min/g).

### 4.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Razlika među skupinama je testirana uporabom t-testa za nezavisne uzorke. Rezultat testa je prikazan kao 95% granice pouzdanosti za razliku. Sukladno tome, P vrijednosti manje ili jednake 0,05 su smatrane statistički signifikantnima. Analiza podataka obavljena je uporabom programa GraphPad Prism verzija 5 (Rowe-2007).

## 5. REZULTATI

Rezultati su prikazano tablično i grafički. Statistički značajni rezultati označeni su u tablicama podebljano, a na slikama zvjezdicom.

### 5.1. ROSUVASTATIN - POKUS I

#### 5.1.1. Učinci rosuvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu

ROSU je pri dozi od 5 mg/kg smanjio katalitičku aktivnost BuChE u mozgu za 3%, a pri dozi od 10 mg/kg je značajno povećao katalitičku aktivnost BuChE u mozgu za 19% ( $p=0,003$ ) u odnosu na kontrolne vrijednosti (tablica 1., slika 1.).

#### 5.1.2. Učinci rosuvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

U odnosu na kontrolne vrijednosti, porast katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi pri primjeni ROSU iznosio je pri manjoj dozi (5 mg/kg,  $p=0,001$ ) 21%, a pri većoj dozi (10 mg/kg,  $p=0,0188$ ) 27%. Porast aktivnosti BuChE je pri obje doze bio značajan (tablica 2., slika 2.).

Pri dozi ROSU od 5 mg/kg pad katalitičke aktivnosti BuChE u jetri bio je 22%, a pri dozi od 10 mg/kg 16% u odnosu na pripadajuće kontrolne vrijednosti (tablica 3., slika 3.).

### 5.2. SIMVASTATIN – POKUS II

#### 5.2.1. Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu

Pri dozi SIMV od 10 mg/kg porast katalitičke aktivnosti BuChE u mozgu bio je 10% ( $p=0,0336$ ), a pri dozi od 50 mg/kg 11% ( $p=0,0431$ ) u odnosu na pripadajuće kontrolne vrijednosti. Porast aktivnosti BuChE je pri obje doze bio značajan (tablica 1., slika 4.).

#### 5.2.2. Učinci simvastatina na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

U odnosu na kontrolne vrijednosti, porast katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi pri primjeni SIMV iznosio je pri manjoj dozi (10 mg/kg,  $p=0,0414$ ) 21%, a pri većoj dozi (50 mg/kg,  $p<0,0001$ ) 49%. Porast aktivnosti BuChE je pri obje doze bio značajan (tablica 2., slika 5.).

SIMV je smanjio katalitičku aktivnosti BuChE u jetri za 14% u dozi od 10 mg/kg, te je povećao katalitičku aktivnost BuChE u jetri za 49% u dozi od 50 mg/kg u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrijednosti (tablica 3., slika 6.).

### 5.3 FENOFIBRAT – POKUS III

#### 5.3.1. Učinci fenofibrata na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u mozgu

FENO je u dozi od 30 mg/kg povećao katalitičku aktivnost BuChE u mozgu za 4%, a u dozi od 50 mg/kg je povećao katalitičku aktivnost BuChE za 7% u odnosu na kontrolu (tablica 1., slika 7.).

#### 5.3.2. Učinci fenofibrata na katalitičku aktivnost butirilkolinesteraze u plazmi i jetri

Porast katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi pri dozi FENO od 30 mg/kg bio je 124% ( $p=0,0005$ ) u odnosu na kontrolnu vrijednost, a pri dozi od 50 mg/kg 176% ( $p=0,0004$ ) u odnosu na kontrolnu vrijednost. Porast katalitičke aktivnosti BuChE pri obje doze je bio značajan (tablica 2., slika 8.).

U odnosu na kontrolne vrijednosti, porast katalitičke aktivnosti BuChE u jetri pri primjeni FENO iznosio je pri manjoj dozi (30 mg/kg,  $p=0,043$ ) 93%, a pri većoj dozi (50 mg/kg,  $p=0,0015$ ) 82%. Porast aktivnosti BuChE je pri obje doze bio značajan (tablica 3., slika 9.).

Tablica 1. Učinci ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE u mozgu štakora.

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

Podobljano – statistički značajno

Pokus	Lijek	Katalitička aktivnost BuChE <sup>1</sup> ( $\mu$ M/min/g)	95%-tne granice pouzdanosti	P-vrijednost
1	Kontrola 1	0,064 ± 0,0610 (N=8) (100)	-0,0046 do 0,0076	0,6161
	Rosuvastatin 5 mg/kg	0,062 ± 0,0006 (N=10) (97)		
	Kontrola 2	0,059 ± 0,0066 (N=8) (100)	-0,0172 do -0,0042	0,0030
	Rosuvastatin 10 mg/kg	<b>0,070 ± 0,0063</b> (N=10) (119)		
2	Kontrola 3	0,063 ± 0,0076 (N=8) (100)	-0,0113 do -0,0005	0,0336
	Simvastatin 10 mg /kg	<b>0,069 ± 0,0025</b> (N=10) (110)		
	Kontrola 4	0,063 ± 0,0091 (N=8) (100)	-0,0142 do -0,0003	0,0431
	Simvastatin 50 mg /kg	<b>0,070 ± 0,0016</b> (N=8) (111)		
3	Kontrola 5	0,083 ± 0,0065 (N=8) (100)	-0,0009 do 0,0020	0,1900
	Fenofibrat 30 mg/kg	0,086 ± 0,0045 (N=10) (104)		
	Kontrola 6	0,076 ± 0,0096 (N=8) (100)	-0,0159 do 0,0062	0,3665
	Fenofibrat 50 mg/kg	0,081 ± 0,0126 (N=12) (107)		

Tablica 2. Učinci ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE u plazmi štakora.

Relativne promjene (%) su u zagradama.

<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D.

Podobljano – statistički značajno

Pokus	Lijek	Katalitička aktivnost BuChE <sup>1</sup> ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ )	95%-tne granice pouzdanosti	P-vrijednost
1	Kontrola 1	0,066 ± 0,0064 (N=8) (100)	-0,0274 do -0,0085	0,0010
	Rosuvastatin 5 mg /kg	<b>0,080 ± 0,0141</b> (N=10) (121)		
	Kontrola 2	0,066 ± 0,0067 (N=8) (100)	-0,0257 do -0,0027	0,0188
	Rosuvastatin 10 mg /kg	<b>0,084 ± 0,0110</b> (N=10) (127)		
2	Kontrola 3	0,057 ± 0,0064 (N=8) (100)	-0,0244 do -0,0006	0,0414
	Simvastatin 10 mg /kg	<b>0,069 ± 0,0135</b> (N=10) (121)		
	Kontrola 4	0,073 ± 0,0105 (N=8) (100)	-0,0497 do -0,0225	< 0,0001
	Simvastatin 50 mg /kg	<b>0,109 ± 0,0145</b> (N=8) (149)		
3	Kontrola 5	0,075 ± 0,0143 (N=8) (100)	-0,1372 do -0,0479	0,0005
	Fenofibrat 30 mg/kg	<b>0,168 ± 0,0582</b> (N=10) (224)		
	Kontrola 6	0,062 ± 0,0144 (N=8) (100)	-0,1626 do -0,0579	0,0004
	Fenofibrat 50 mg/kg	<b>0,171 ± 0,0692</b> (N=11) (276)		

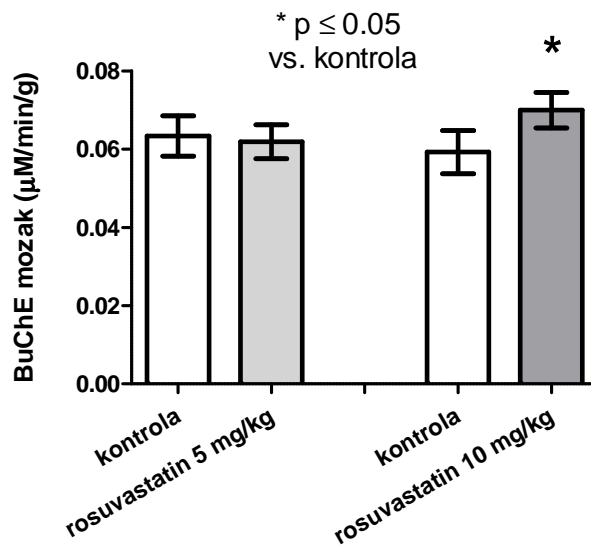
Tablica 3. Učinci ROSU, SIMV i FENO na katalitičku aktivnost BuChE u jetri štakora.

Relativne promjene (%) su u zagradama.

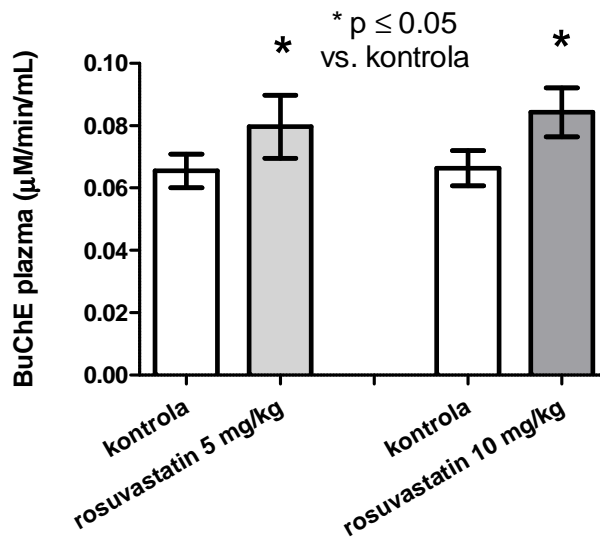
<sup>1</sup> Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± S.D

Podobljano – statistički značajno

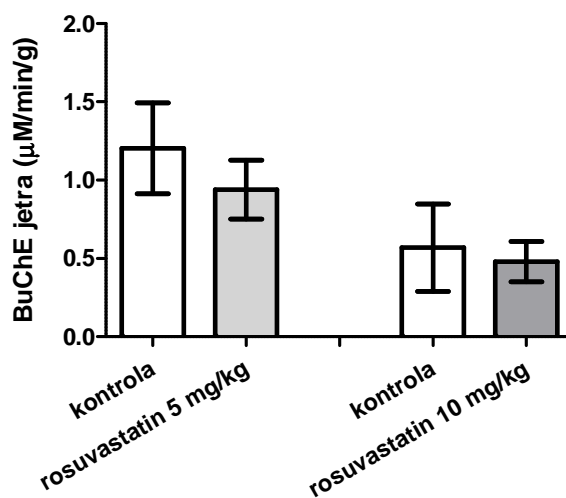
Pokus	Lijek	Katalitička aktivnost BuChE <sup>1</sup> ( $\mu$ M/min/g)	95%-tne granice pouzdanosti	P-vrijednost
1	Kontrola 1	1,20 ± 0,277 (N=6) (100)	-0,0294 do 0,5567	0,0739
	Rosuvastatin 5 mg /kg	0,94 ± 0,244 (N=11) (78)		
	Kontrola 2	0,57 ± 0,300 (N=7) (100)	-0,1836 do 0,3620	0,4898
	Rosuvastatin 10 mg /kg	0,48 ± 0,140 (N=7) (84)		
2	Kontrola 3	0,85 ± 0,189 (N=7) (100)	-0,1194 do 0,3645	0,2938
	Simvastatin 10 mg /kg	0,73 ± 0,238 (N=11) (86)		
	Kontrola 4	0,59 ± 0,195 (N=7) (100)	-0,1194 do 0,3645	0,2938
	Simvastatin 50 mg /kg	0,88 ± 0,203 (N=6) (149)		
3	Kontrola 5	0,41 ± 0,284 (N=8) (100)	-0,621 do -0,1403	0,0043
	Fenofibrat 30 mg/kg	<b>0,79 ± 0,140</b> (N=8) (193)		
	Kontrola 6	0,85 ± 0,574 (N=8) (100)	-1,096 do -0,3066	0,0015
	Fenofibrat 50 mg/kg	<b>1,55 ± 0,259</b> (N=12) (182)		



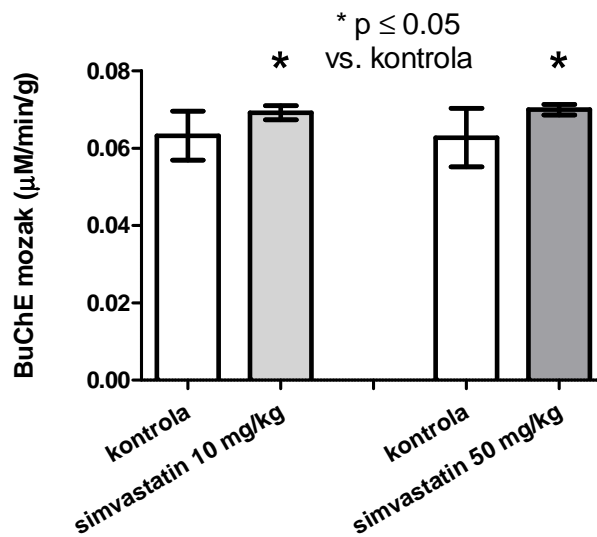
Slika 1. Katalitička aktivnost BuChE u mozgu štakora nakon primjene ROSU tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD



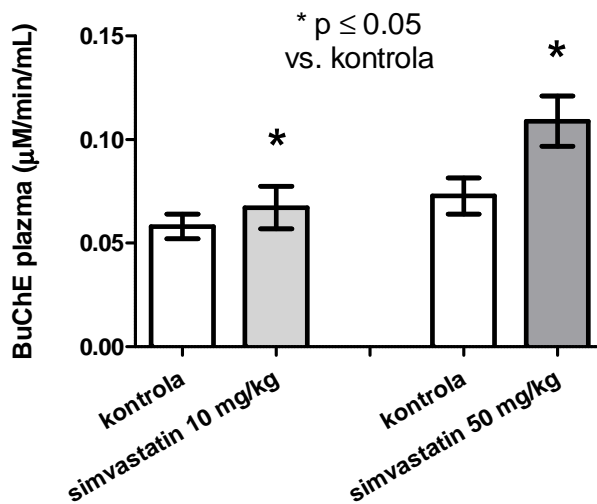
Slika 2. Katalitička aktivnost BuChE u plazmi štakora nakon primjene ROSU tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD



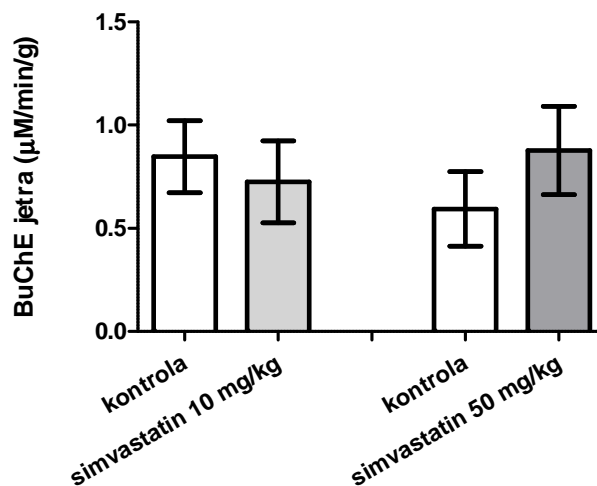
Slika 3. Katalitička aktivnost BuChE u jetri štakora nakon primjene ROSU tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD



Slika 4. Katalitička aktivnost BuChE u mozgu štakora nakon primjene SIMV tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD

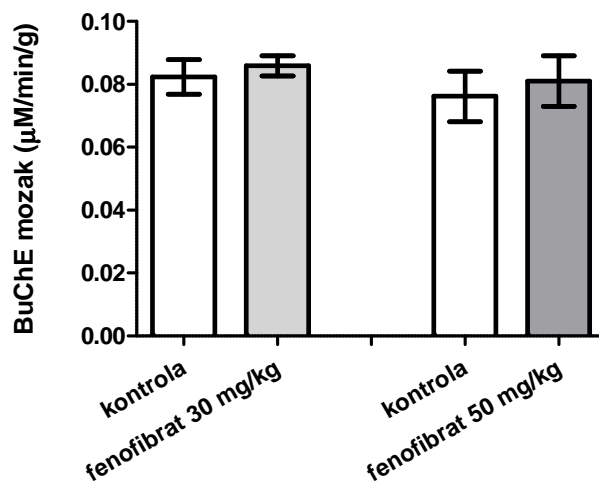


Slika 5. Katalitička aktivnost BuChE u plazmi štakora nakon primjene SIMV tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD

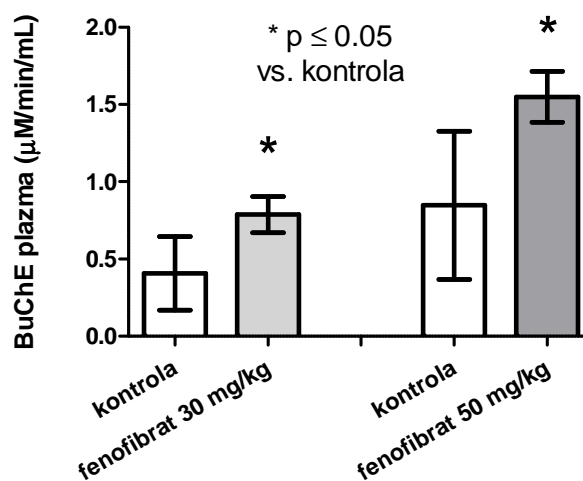


Slika 6. Katalitička aktivnost BuChE u jetri štakora nakon primjene SIMV tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD

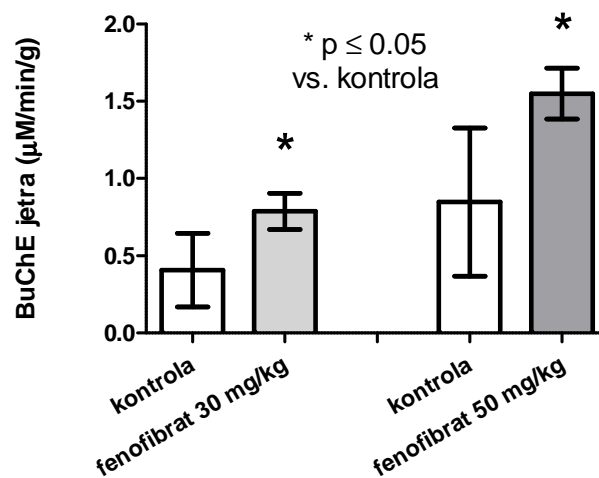




Slika 7. Katalitička aktivnost BuChE u mozgu štakora nakon primjene FENO tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD



Slika 8. Katalitička aktivnost BuChE u plazmi štakora nakon primjene FENO tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD



Slika 9. Katalitička aktivnost BuChE u jetri štakora nakon primjene FENO tijekom 3 tjedna. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$ SD

## 6. RASPRAVA

Iz rezultata pokusa je vidljivo da višekratne primjene veće doze ROSU i obje doze SIMV značajno povećavaju katalitičku aktivnost BuChE mozga u odnosu na kontrolne vrijednosti. Porast katalitičke aktivnosti BuChE je u slučaju ROSU iznosio 19%, a kod SIMV 11% (tablica 1., slike 1. i 4.). Pri višekratnoj primjeni obje doze FENO, porast aktivnosti BuChE u mozgu prema vrijednosti kontrolne grupe je bio mali (do 7%) (tablica 1., slika 7.). U Uvodu je spomenut sve veći značaj BuChE u osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti, iako je za sada jedini priznati klinički pristup u njezinom liječenju inhibicija AChE. Dokazano je također da aktivnost AChE u mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolesti progresivno pada, dok aktivnost BuChE pokazuje povećanje, odnosno da BuChE može zamijeniti ulogu AChE u hidrolizi acetilkolina u mozgu. Stoga i inhibitori BuChE u terapiji Alzheimerove bolesti dobivaju sve veće značenje (Giacobini-2003). Važnost rezultata u ovom ispitivanju je u činjenici da ROSU, SIMV i FENO stimuliraju aktivnost BuChE, što može pogoršati funkciju kolinergičkog sustava i kognitivno stanje pacijenata s Alzheimerovom bolesti. Mehanizam stimulacijskog učinka ovih lijekova na aktivnost BuChE mozga mora se tek razjasniti, uz napomenu da sva tri lijeka mogu penetrirati u mozak.

Višekratna primjena obje doze sva tri antilipidna lijeka koji su korišteni u ovom pokusu izazvala je značajan porast katalitičke aktivnosti plazme. Značajan porast aktivnosti BuChE u odnosu na aktivnosti enzima kontrolnih skupina kretao se od 21% (5 mg/kg ROSU i 10 mg/kg SIMV; tablica 2., slike 2. i 5.) do 124% i 176% nakon primjene obje doze FENO (tablica 2., slika 8.). I rezultati praćenja aktivnosti enzima u plazmi dosljedno ukazuju na stimulacijski učinak ROSU, SIMV i naročito FENO na katalitičku aktivnost BuChE u plazmi. Rezultati dobiveni sa obje doze SIMV potvrdili su rezultate istraživanja (Macan-2011) o njegovom stimulacijskom učinku na katalitičku aktivnost BuChE.

Što se tiče rezultata ispitivanja utjecaja ispitivanih antilipidnih lijekova na katalitičku aktivnost BuChE u jetri, iz tablice 3. i slika 3. i 6. je vidljivo da su obje doze ROSU i mala doza SIMV djelovale inhibicijski na aktivnost BuChE u jetri. Pad aktivnosti BuChE, koji kod oba statina nije bio značajan, kretao se od 14% (SIMV u dozi od 10 mg/kg) do 22% (ROSU u dozi od 5 mg/kg). Najveći porast aktivnosti BuChE u jetri u odnosu na kontrolne vrijednosti izmjeren je nakon primjene FENO, a iznosio je 93% (30 mg/kg) i 82% (50 mg/kg) (tablica 3, slika 9.). Stimulacijski učinak FENO na katalitičku aktivnost BuChE plazme dokazan u ovom radu sličan je stimulacijskom učinku gemfibrozila na aktivnost BuChE (Bradamante i sur.-2005).

Smatramo da su značajno veće katalitičke aktivnosti BuChE u plazmi posljedica stimulacijskog učinka sva tri antilipidna lijeka na sintezu BuChE u jetri preko PPAR $\alpha$  receptora. Poznata je činjenica da u jetri glodavaca PPAR $\alpha$  agonisti induciraju izraženu proliferaciju peroksisoma, posljedica čega je hepatomegalija,  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina, povećano stvaranje vodikovog peroksida (dakle slobodnih radikala) i oksidacijski stres. (Arnaiz i sur.-1995). Budući da su statini i fibrati agonisti PPAR $\alpha$  receptora, njihovom primjenom vrlo vjerojatno dolazi do poticanja proliferacije peroksisoma, koja je indirektno odgovorna za izraženi porast aktivnosti BuChE u plazmi i jetri štakora. Pretpostavljamo da ROSU, SIMV i FENO preko proliferacije peroksisoma uzrokuju u jetri  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina. Butiril-koenzim A koji nastaje tijekom metabolizma masnih kiselina je odgovoran u prisutnosti kolina za nastanak butirilkolina (Clitherow i sur.-1963). Ukoliko se butirilkolin ne razgradi, može svojim snažnim nikotinskim djelovanjem izazvati toksične učinke. Poznato je da se BuChE odmah nakon sinteze u jetri oslobađa u krv. Većina naših rezultata upravo pokazuje paralelan porast

aktivnosti enzima u jetri (povećana sinteza) i plazmi (povećano oslobađanje). Najveći porast aktivnosti BuChE u plazmi i jetri je izazvao FENO, što se može protumačiti njegovom većom potentnosti za PPAR receptore od statina. Iznimke su obje doze ROSU i mala doza SIMV, koje su u jetri izazvale pad aktivnosti, ali koji nije bio značajan. Smatramo da pad aktivnosti BuChE u jetri može biti posljedica manje potentnosti i djelotvornosti statina za PPAR $\alpha$  receptore, ili vrlo brzog oslobađanja BuChE iz jetre u krv.

Budući da su PPAR receptori dokazani i u mozgu, stimulacijski učinak statina i fibrata na aktivnost BuChE mozga, a što je dokazano u našim ispitivanjima, može biti i posljedica agonističkog djelovanja ovih lijekova na PPAR receptore u mozgu (Carniglia i sur.-2013).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Višekratna primjena malih doza ROSU i SIMV, te obje doze FENO nisu utjecale na aktivnost BuChE mozga u odnosu na kontrolne vrijednosti.
2. Višekratna primjena velikih doza ROSU i SIMV izazvale su mali, ali značajni porast aktivnosti BuChE mozga u odnosu na kontrolne vrijednosti.
3. Višekratna primjena sva tri antilipidna lijeka u obje doze izazvala je značajan porast katalitičke aktivnosti BuChE plazme.
4. Samo su obje doze FENO izazvale značajan porast BuChE jetre. Porast aktivnosti BuChE izmjeren je i nakon primjene velike doze SIMV, ali bez značajnosti u odnosu na kontrolne vrijednosti.
5. Učinci antilipidnih lijekova na aktivnost BuChE nisu ovisni o dozi.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem se voditeljici rada prof. dr. sc. Vlasti Bradamante na uloženom trudu i pomoći pri cjelokupnom nastanku ovog rada. Zahvalu dugujem dipl. ing. biokemije Željki Roci za stručnu pomoć pri radu s pokusnim životinjama i korištenju biokemijskih metoda, te dr. Pašku Konjevodi na pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

## 9. POPIS LITERATURE

- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Olukoga AO, Gordon C, Arrol S, Bhatnagar D, Boulton AJ, Durrington PN. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clin Sci* 1993;85:77-81.
- Alvarez A, Opazo C, Alarcón R, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol.* 1997;272:348-361.
- Arnaiz SL, Travacio M, Llesuy S, Boveris A. Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:175-180.
- Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol.* 2002;54:661-671.
- Bradamante V, Marija M, Vrkić N, Lucić B, Radić B. Interrelated effects of high sucrose diet and gemfibrozil on butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in rats. *Periodicum Biologorum* 2005;107:189-193.
- Bradamante V, Vukšić A, Blažević N, Bilušić M, Konjevoda P. The effects of rosuvastatin and simvastatin on plasma and liver cholinesterases in rats. 6th European Congress of Pharmacology, EPHAR 2012 July, 17-20, Granada. Poster
- Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. Gemfibrozil decreases atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. *Diabetologia* 2006;49:766-774.
- Carniglia L, Durand D, Caruso C, Lasaga M. Effect of NDP- $\alpha$ -MSH on PPAR- $\gamma$  and - $\beta$  expression and anti-inflammatory cytokine release in rat astrocytes and microglia. *PLoS One.* 2013;8:e57313.
- Cibickova L, Palicka V, Cibicek N, Cermáková E, Mícuda S, Bartosová L, Jun D. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res.* 2007;56:765-770.
- Cibickova L, Hyspler R, Ticha A, Cibicek N, Palicka V, Cermakova E, Zadak Z. Cholesterol synthesis in central nervous system of rat is affected by simvastatin as well as by atorvastatin. *Pharmazie* 2008;63:819-822.
- Cibickova L, Hyspler R, Mícuda S, Cibicek N, Zivna H, Jun D, Ticha A, Brckova E, Palicka V. The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids* 2009;74:13-19.
- Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, Cappellini MD. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:55-60.
- Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature* 1963;199:1000-1001.
- Cucuianu M, Popescu TA, Haragus ST. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipidemic subjects. *Clin Chim Acta* 1968;22:151-155.
- Dalla Y, Singh N, Jaggi AS, Singh D. Memory restorative role of statins in experimental dementia: an evidence of their cholesterol dependent and independent actions. *Pharmacol Rep* 2010;62:784-796.

- Daniels TF, Kilinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 2005;5:474-488.
- Darvesh S, Martin E, Walsh R, Rockwood K. Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clin Biochem.* 2004;37:42-49.
- Dickson DW. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol. Aging* 1997;18:S21-S26.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
- Fabijanić D. Pleiotropic effects of statins. *Medicus* 2010;19:163-169.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;66:137-147.
- Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2003;28:515-522.
- Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Ridker PM. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;360:1851-1861.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija*, Mc Graw Hill Medical, 2009. Urednici hrvatskog izdanja: Trkulja V, Klarica M, Šalković-Petrišić M., Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
- Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc. Res.* 2000;47:648-657.
- Kutty KM. Biological function of cholinesterase. *Clin Biochem* 1980;13:239-243.
- Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal* 1994;8:247-250.
- Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem* 2000;75:1320-1331.
- Macan M. Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora (dizertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet; 2011.
- Magarian EO, Dietz AJ. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. *J Clin Pharmacol* 1987;27:819-820.
- Muačević-Katanec D, Bradamante V, Reinec Z, Sucić M, Poljicanin T, Busljeta I, Metelko Z. Clinical study on the effect of simvastatin on butyrylcholinesterase activity. *Arzneimittelforschung* 2005;55:271-275.
- Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2005;38:799-805.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*, Churchill Livingstone, 2003. Urednik hrvatskog izdanja: Geber J., Golden marketing Tehnička knjiga, Zagreb, 2006.

Roensch J, Crisby M, Nordberg A, Xiao Y, Zhang LJ, Guan ZZ. Effects of statins on alpha7 nicotinic receptor, cholinesterase and alpha-form of secreted amyloid precursor peptide in SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 2007;50:800-806.

Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

Rowe P. Essential statistics for the pharmaceutical sciences. Chichester: Wiley; 2007.

Rxlist: the internet drug indeks. Rxlist c2013. Dostupno na: <http://www.rxlist.com/antara-drug/clinical-pharmacology.htm> [pristupljeno 5.travnja 2013.]

Rxlist: the internet drug indeks. Rxlist c2013. Dostupno na: <http://www.rxlist.com/crestor-drug/clinical-pharmacology.htm> [pristupljeno 8.travnja 2013.]

Rxlist: the internet drug indeks. Rxlist c2013. Dostupno na: <http://www.rxlist.com/zocor-drug/clinical-pharmacology.htm> [pristupljeno 5.travnja 2013.]

Sano M, Bell KL, Galasko D, Galvin JE, Thomas RG, van Dyck CH, Aisen PS. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. *Neurology* 2011;77:556-563.

Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol.* 2008;22:162-171.

Sisková K, Bilka F, Adameová A, Balazová A, Mydla M, Pauliková I. Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency. *Pharmazie* 2012;67:345-350.

Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ, Lopez JE, Sabbagh MN. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advise to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging* 2002;6:324-331.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998;98:2088-2093.

Stojanov M, Stefanović A, Džingalašević G, Mandić-Radić S, Prostran M. Butyrylcholinesterase activity in young men and women: association with cardiovascular risk factors. *Clin Biochem* 2011;44:623-626.

White BV, Wetstone H, Lamotta R. Serum cholinesterase activity in malignant neoplasms. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1958;69:176-181.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E.

Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 2007;100:1442-1451.

Zdrengha D, Bodizs G, Predescu D, Oprea M, Zdrengha M. The effect of Simvastatin upon serum pseudocholinesterase and plasmatic factor VII. *Rom J Intern Med.* 2002;40:3-9.

Zubelewicz-Szkodzińska B, Szkodziński J, Romanowski W, Błazelonis A, Danikiewicz A, Muc-Wierzoń M, Szkilnik R. Simvastatin decreases concentration of interleukin-2 in hypercholesterolemic patients after treatment for 12 weeks. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004;18:295-301.



**Nina Blažević**

## **UČINCI ANTILIPIDNIH LIJEKOVA NA BUTIRILKOLINESTERAZU U BIOLOŠKOM MATERIJALU ŠTAKORA**

### **10. SAŽETAK**

Butirilkolinesteraza (BuChE) se sintetizira u jetri i odmah izlučuje u krv. Osim u plazmi i jetri, prisutnost enzima je dokazana i u mozgu. U središnjem živčanom sustavu BuChE hidrolizira acetilkolin i poput acetilkolinesteraze važna je za normalnu kolinergičku funkciju. Oba enzima se u mozgu povezuju s kolinergičkim deficitom i progresijom demencije. Stoga se lijekovi koji inhibiraju katalitičku aktivnost kolinesteraza koriste za liječenje Alzheimerove bolesti. Učinci antilipidnih lijekova na aktivnost BuChE plazme i mozga su suprotni, tj. mogu stimulirati ili inhibirati njezinu aktivnost. Stoga su ciljevi ovog rada bili u Wistar štakora utvrditi učinak višekratne primjene različitih doza rosuvastatina, simvastatina i fenofibrata na aktivnost BuChE mozga, plazme i jetre. Male doze oba statina i obje doze fenofibrata nisu utjecali na aktivnost BuChE mozga, dok su je veće doze oba statina malo ali značajno povećale. Sva tri lijeka izazvali su značajan porast aktivnosti BuChE u plazmi, dok je u jetri značajan porast aktivnosti izazvao samo fenofibrat. Prema ovim rezultatima smatramo da je utjecaj antilipidnih lijekova na aktivnost BuChE štetan, što je od značaja za bolesti središnjeg živčanog sustava s oštećenom kolinergičkom funkcijom.

Ključne riječi: antilipidni lijekovi, butirilkolinesteraza, mozak, plazma

**Nina Blažević**

## **THE INFLUENCE OF ANTILIPID DRUGS ON BUTYRYLCHOLINESTERASE IN BIOLOGICAL SAMPLES OF RATS**

### **11. SUMMARY**

Butyrylcholinesterase (BuChE) is synthesized in liver and released into plasma immediately after synthesis. BuChE is also presented in brain where hydrolyses acetylcholine and, like acetylcholinesterase, is important for normal function of cholinergic system. In brain both enzymes are associated with cholinergic deficit and progression of dementia. Therefore drugs that inhibit enzyme activity are used for treatment of Alzheimer's disease. The aims of study are to establish the influence of multiple applications of rosuvastatin, simvastatin and fenofibrate on BuChE activity in brain, plasma and liver of Wistar rats. In brain, small doses of both statins and fenofibrate in both doses haven't changed the BuChE activity, but high doses of both statins have caused a little but significant increase of enzyme activity. Increase of plasma BuChE activity was significant after administration of all three drugs. Fenofibrate has caused the significant increase of BuChE activity in liver. According to these results we suggest that the increase of BuChE activity is the side effect of antilipid drugs and is important for the illnesses of central nervous system with disturbed cholinergic function.

Key words: antilipid drugs, butyrylcholinesterase, brain, plasma

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 3. rujna 1989. Pohađala sam II. gimnaziju u Zagrebu koju sam završila 2008. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2009. dobila sam Dekanovu nagradu za najboljeg studenta prve godine. Trenutno sam studentica V. godine Medicinskog fakulteta i prosjek ocjena mi je 4,92. U projektu „Serumske esteraze, leptin, lipidi i antilipidni lijekovi“ sudjelujem od drugog semestra akademske godine 2011/2012. U srpnju 2012. sudjelovala sam na VI. europskom kongresu farmakologa EPHAR u Granadi u Španjolskoj s radom „The effects of rosuvastatin and simvastatin on plasma and liver cholinesterases in rats“, mentor: prof. dr. sc. Vlasta Bradamante. U prosincu 2012. sudjelovala sam na Svjetskom kongresu kliničke lipidologije u Budimpešti u Mađarskoj s radom „The effects of rosuvastatin, simvastatin and fenofibrate on brain malondialdehyde in rats“, mentor: prof. dr. sc. Vlasta Bradamante. Demonstrator sam na Katedri za histologiju i embriologiju i Katedri za internu medicinu.