

HPLC određivanje sfingozina i sfinganina u serumu kao potencijalnih biomarkera metaboličkog sindroma

Križanac, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:258932>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2016.

Andrea Križanac

675/BPI

**HPLC ODREĐIVANJE
SFINGOZINA I SFINGANINA U
SERUMU KAO POTENCIJALNIH
BIOMARKERA METABOLIČKOG
SINDROMA**

Rad je izrađen u Zavodu za kemiju i biokemiju Katedre za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Ivane Karmelić i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

HPLC ODREĐIVANJE SFINGOZINA I SFINGANINA U SERUMU KAO POTENCIJALNIH BIOMARKERA METABOLIČKOG SINDROMA

Andrea Križanac, 675/BPI

Sažetak: U ovom radu provedeno je određivanje koncentracije C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina ekstrahiranih iz uzoraka seruma zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim metaboličkim sindromom. Cilj rada je bio utvrditi mogu li navedene sfingoidne baze poslužiti kao specifični biomarkeri metaboličkog sindroma. Provedena je ekstrakcija ukupnih sfingolipida nakon čega su sfingoidne baze, C18 sfingozin i C18-DL-*erythro*-sfinganin, oslobođene iz kompleksnih sfingolipida metodom kisele hidrolize. Ekstrahirane sfingoidne baze analizirane su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a dobiveni rezultati su obrađeni statistički. HPLC analiza kod obje ispitivane skupine je pokazala sljedeće: od ukupnih sfingoidnih baza najzastupljenija baza je bila C18 sfingozin, zatim nepoznate OPA derivatizirane baze, dok je u odnosu na ukupne sfingoidne baze najmanje zastupljena bila baza C18-DL-*erythro*-sfinganin. Dobivene su vrijednosti koncentracije ukupnog C18 sfingozina kod zdravih ispitanika od $48,98 \pm 12,80 \text{ nmol ml}^{-1}$ (izraženo kao $SV \pm SD$), a kod ispitanika s MetS $26,29 \pm 9,63 \text{ nmol ml}^{-1}$. Koncentracija ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika iznosila je $1,18 \pm 0,54 \text{ nmol mL}^{-1}$, dok je kod ispitanika s MetS iznosila $0,72 \pm 0,40 \text{ nmol ml}^{-1}$. Omjer C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina kod zdravih ispitanika je iznosio $0,024 \pm 0,009$, a kod ispitanika s MetS $0,027 \pm 0,013$. Pokazano je da ne postoji razlika u koncentracijama sfingoidnih baza između muškaraca i žena unutar svake ispitivane skupine. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji C18 sfingozina ($p < 0,001$) i C18-DL-*erythro*-sfinganina ($p = 0,0032$) između dvije ispitivane skupine. Dobiveni rezultati ukazuju na promjenu metabolizma sfingolipida izazvanog metaboličkim poremećajem u organizmu.

Ključne riječi: HPLC, metabolički sindrom, sfingolipidi, sfingozin, sfinganin

Rad sadrži: 56 stranica, 29 slika, 73 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Izv. prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek*
2. *Izv.prof.dr.sc. Sunčica Beluhan*
3. *Doc.dr.sc. Slavica Potočki* (Medicinski fakultet Sveučilištau Zagrebu)
4. *Prof.dr.sc. Blaženka Kos* (zamjena)

Datum obrane: 17. studenog, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

HPLC DETERMINATION OF SPHINGOSINE AND SPHINGANINE IN SERUM AS POTENTIAL BIOMARKERS OF METABOLIC SYNDROME

Andrea Križanac, 675/BPI

Abstract: In this work, quantitative changes of C18 sphingosine and C18 sphingosine-DL-erythro-sphinganine extracted from serum samples from healthy individuals and patients with diagnosed metabolic syndrome, have been determined. The aim of the study was to determine whether the sphingoid bases can serve as specific biomarkers of metabolic syndrome. Extraction was followed by acid hydrolysis to release the sphingoid base backbones, C18 sphingosine and C18-DL-erythro-sphinganine, from the complex sphingolipids. Extracted sphingoid bases were determined by the method of high performance liquid chromatography (HPLC), and the results were statistically analyzed. HPLC analysis in both groups showed the following: the most abundant base was C18 sphingosine followed by unknown OPA derivatized bases, while in relation to the total sphingoid base content, C18-DL-erythro-sphinganine was recovered as quantitatively minor fraction. The resulting value of concentration of total C18 sphingosine in healthy subjects was $48.98 \pm 12.80 \text{ nmol mL}^{-1}$ (expressed as $SV \pm SD$) and in subjects with MetS $26.29 \pm 9.63 \text{ nmol mL}^{-1}$. The concentration of total C18-DL-erythro-sphinganine in healthy subjects was $1.18 \pm 0.54 \text{ nmol mL}^{-1}$, whereas in subjects with MetS was $0.72 \pm 0.40 \text{ nmol mL}^{-1}$. The ratio of C18-DL-erythro-sphinganine and C18 sphingosine in healthy subjects was 0.024 ± 0.009 , and in subjects with MetS 0.027 ± 0.013 . Serum concentrations of total sphingoid bases showed no major variations between men and women within each group. There was statistically significant difference in the concentration of C18 sphingosine ($p < 0.001$) and C18-DL-erythro-sphinganine ($p = 0.0032$) between two treatment groups. The results indicate a change of sphingolipid metabolism induced by metabolic disorder.

Keywords: HPLC, metabolic syndrome, sphingolipids, sphingosine, sphinganine

Thesis contains: 56 pages, 29 figures, 73 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Sunčica Beluhan, Associate professor*

Reviewers:

1. PhD. *Mirela Ivančić Šantek*, Associate professor
2. PhD. *Sunčica Beluhan*, Associate professor
3. PhD. *Slavica Potočki*, Assistant professor (Faculty of Medicine University of Zagreb)
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 17 November, 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. STRUKTURA SFINGOLIPIDA.....	3
2.1.2. Sfingoidne baze	3
2.1.3. Ceramidi	4
2.1.4. Kompleksni sfingolipidi	5
2.1.4.1. Sfingomijelini	6
2.1.4.2. Glikosfingolipidi.....	6
2.2. BIOSINTEZA SFINGOLIPIDA	8
2.2.1. Sinteza kompleksnih sfingolipida.....	8
2.3. RAZGRADNJA SFINGOLIPIDA	10
2.3.1. Razgradnja sfingozina	11
2.4. SVOJSTVA I FUNKCIJA SFINGOLIPIDA.....	11
2.4.1. Svojstva i funkcije sfingozina i ostalih sfingoidnih baza	13
2.5. METABOLIČKI SINDROM	14
2.5.1. Uloga sfingolipida u razvoju metaboličkog sindroma.....	14
2.6. SFINGOLIPIDI U HRANI	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. ISPITANICI	18
3.2. KEMIKALIJE I OPREMA	19
3.2.1. Osnovne kemikalije	19
3.2.2. Standardi.....	19
3.2.3. Oprema	19
3.2.3.1. HPLC sustav	20
3.3. METODE ISTRAŽIVANJA	21
3.3.1. Ekstrakcija sfingolipida iz seruma.....	21
3.3.1.1. Postupak ekstrakcije sfingolipida	21
3.3.1.2. Kisela hidroliza.....	21
3.3.2. Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	22
3.4. PRIPREMA RADNIH STANDARDNIH OTOPINA	22
3.4.1. Matične standardne otopine.....	22
3.4.1.1. Radne standardne otopine za kalibracijski pravac.....	23
3.4.1.2. Smjesa radnih standarda	23
3.5. PRIPREMA UZORAKA ZA HPLC ANALIZU	23

3.5.1. Uvjeti HPLC analize.....	23
3.6. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA.....	24
3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. SFINGOLIPIDI U SERUMU ZDRAVIH ISPITANIKA	26
4.1.1. Usporedba koncentracije sfingoidnih baza i njihovih omjera u serumu muških i ženskih zdravih ispitanika	31
4.2. SFINGOLIPIDI U SERUMU ISPITANIKA S DIJAGNOSTICIRANIM METABOLIČKIM SINDROMOM	35
4.2.1. Usporedba koncentracije sfingoidnih baza i njihovih omjera u serumu muških i ženskih ispitanika s dijagnosticiranim MetS	39
4.3. USPOREDBA KONCENTRACIJE SFINGOIDINIH BAZA I NJIHOVIH OMJERA U SERUMU ZDRAVIH ISPITANIKA I ISPITANIKA S DIJAGNOSTICIRANIM MetS	42
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Metabolički sindrom (MetS) predstavlja globalni javno-zdravstveni problem današnjice zbog uloge koju ima u razvoju šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. U razvoj metaboličkog sindroma uključeni su brojni promjenjivi rizični čimbenici (hipertenzija, dislipidemija, abdominalna pretilost i inzulinska rezistencija) zajedno s nepromjenjivim rizičnim čimbenicima (dob, spol, genetičko nasljeđe) (Božina, 2014). Iako su simptomi i klinička patogeneza MetS dobro poznati i razumljivi, molekularni mehanizmi na kojima se temelji bolest u velikoj mjeri su još uvijek nejasni.

Nedavno su sfingolipidi potvrđeni kao ključne makromolekule u većini organa oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. Sfingolipidi su specifični po tome što izgrađuju stanice i sudjeluju u staničnoj signalizaciji (Merrill, 2011). Dokazano je da su sfingolipidi posrednici u gubitku osjetljivosti na inzulini, sudjeluju u promicanju karakterističnih upalnih procesa te izazivaju staničnu smrt i disfunkciju u važnim organima kao što su gušterača i srce (Mu i sur., 2013). Metabolički sindrom karakteriziraju cirkulirajući faktori povezani s pretilošću (slobodne masne kiseline i upalni citokini), a koji su odgovorni za nastajanje inzulinske rezistencije (Majumdar i Mastrandrea, 2012). Navedeni stresni podražaji utječu na promjenu metabolizma sfingolipida u stanici, odnosno na sintezu ceramida *de novo* i razgradnju kompleksnih sfingolipida do ceramida i sfingoidnih baza. Slobodne sfingoidne baze, sfingozin i sfinganin, nastale razgradnjom kompleksnih sfingolipida, otpuštaju se iz stanice i prisutne su u plazmi. Shodno tome, razina sfingolipida u plazmi je predložena kao potencijalni biomarker razvoja inzulinske rezistencije, odnosno MetS i prepoznavanja rizika kod pacijenata za razvoj šećerne bolesti tipa 2 (Haus i sur., 2009).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogu li sfingoidne baze, sfingozin i sfinganin, poslužiti kao specifični biomarkeri MetS. U svrhu toga određena je koncentracija sfinganina i sfingozina te njihov omjer u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim metaboličkim sindromom. Specifični cilj rada bio je odrediti referentne vrijednosti navedenih sfingoidnih baza kod zdravih ispitanika te utvrditi mogu li se muškarci i žene zajedno analizirati unutar iste skupine. Cjelokupni tijek istraživanja, u koji je bilo uključeno ukupno 41 ispitanika podijeljenih u dvije skupine, odvijao se u 4 (sukcesivna) koraka:

1. Ekstrakcija sfingolipida iz seruma zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS
2. Kisela hidroliza ekstrahiranih sfingolipida u cilju oslobađanja ukupnih sfingoidnih baza iz kompleksnih sfingolipida
3. Analiza sfingoidnih baza primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)
4. Statistička obrada rezultata

2. TEORIJSKI DIO

Sfingolipidi su prisutni u svim eukariotskim stanicama kao i u nekim prokariotima i virusima (Vesper i sur., 1999; Hanada i sur., 2003). Glavne su komponente staničnih membrana, primarno plazma membrane, a izgrađuju i membrane brojnih intracelularnih kompleksa (Golgijev kompleks, endosomi, mitohondriji, jezgra). Iako su primarno lokalizirani u staničnim membranama, sfingolipidi su pronađeni i u lipoproteinima kao i u drugim funkcionalnim strukturama poput lamelarnih propusnih barijera kože te u sastavu aterosklerotskih plakova (Ribar, 2007).

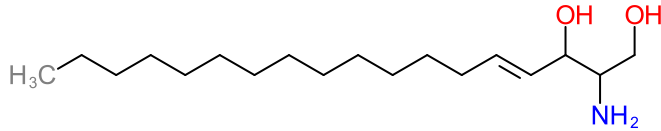
2.1. STRUKTURA SFINGOLIPIDA

Sfingolipidi su amfipatske molekule koje se sastoje od hidrofilnog i hidrofobnog dijela. Do danas je poznato preko 300 sfingolipida, koji su definirani kao spojevi kojima je zajednička dugolančana okosnica - sfingoidna baza.

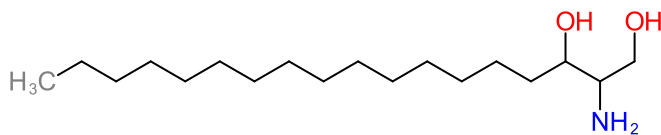
2.1.2. Sfingoidne baze

Sfingoidne baze spadaju u aminoalkohole i obuhvaćaju više od 60 različitih dugolančanih baza, koje se razlikuju u duljini alkilnog lanca (14 do 22 C atoma), broju (0 do 2), poziciji i konfiguraciji dvostruke veze (Zheng i sur., 2006), prisutnosti i/ili odsutnosti hidroksilne skupine na C4 ili C6 atomu (Merrill i sur., 2002), te po razgranatosti alkilnog lanca kao i po prisutnosti i/ili odsutnosti mnogih drugih funkcionalnih skupina poput metilne skupine koja može biti vezana na alkilnu okosnicu ili amino skupinu (Pruett i sur., 2008). Kod većine sisavaca prevladava dugolančana baza s 18 ugljikovih atoma poznata kao sfingozin (Slika 1) (Merrill, 2011). Sfingozin je prvi put okarakterizirao J.L. Thudichum 1884., proučavajući kemijski sastav mozga (Thudichum, 1884). 30-ih godina prošlog stoljeća pronađena je potpuna stereokemijska struktura sfingozina kao *D-eritro-1,3-dihidroksi-2-amino-trans-4-oktadekana*, a 50-ih godina pronađeno je još mnogo drugih struktura dugolančanih baza. Uz sfingozin, kod sisavaca je najzastupljenija sfingoidna baza C18 dihidrosfingozin ili sfinganin. Sfinganin se od sfingozina razlikuje po tome što nema *trans* 4,5 dvostruku vezu (Slika 2) i specifičan je po tome što je intermedijer u *de novo* sintezi sfingolipida. Fitosfingozin, koji se razlikuje od sfingozina po tome što nema *trans-4,5-*dvostruku vezu i ima hidroksilnu skupinu na C4 atomu, najzastupljenija je sfingoidna baza

kvasaca, biljaka i plijesni, ali je u malim količinama pronađen i kod sisavaca (Merrill i sur., 1996).



Slika 1. Struktura sfingozina

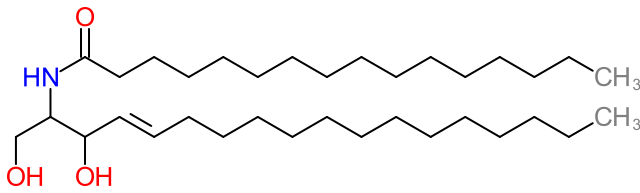


Slika 2. Struktura sfinganina

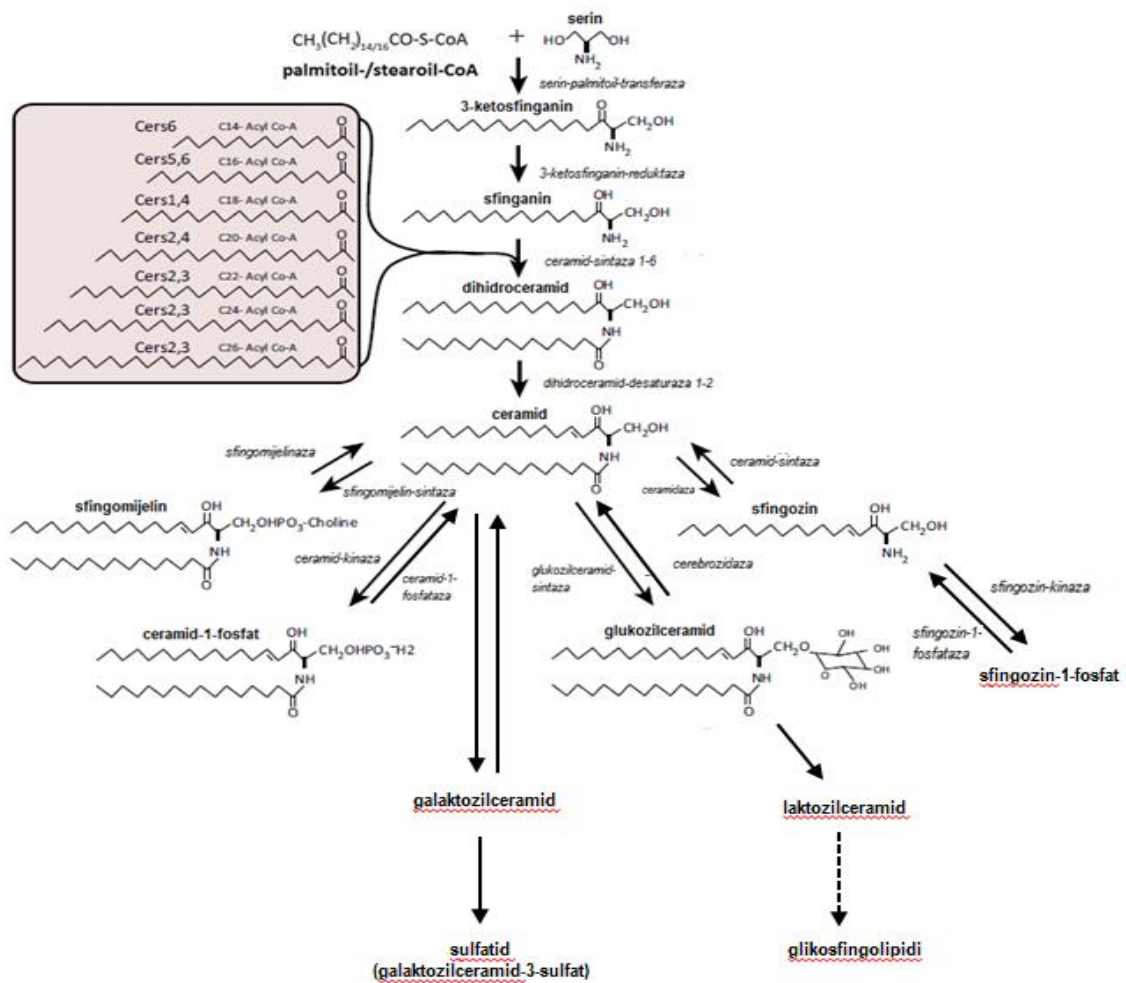
Iako u većini sfingolipida sisavaca prevladavaju dugolančane baze s 18 ugljikovih atoma, neki sfingolipidi kao gangliozidi u mozgu sadrže veće količine C20 sfingozina osobito u poodmakloj dobi (Sonnino i Chigorno, 2000). Sfingolipidi prisutni u plazmi i mlijeku krava sadrže u manjim količinama i C16 sfingozin.

2.1.3. Ceramidi

Slobodne sfingoidne baze prisutne su malim količinama u stanicama sisavaca. Većina sfingoidnih baza je supstituirana na amino skupini s dugolančanom masnom kiselinom različite duljine lanca (C₁₄-C₂₄) kao i različitog stupnja zasićenosti i hidroksilacije tvoreći ceramid (Slika 3). Ceramidi su centralne molekule sfingolipidnog metabolizma (biosinteze i razgradnje) (Slika 4) i osim strukturne uloge u građi složenijih sfingolipida, važnu ulogu imaju kao samostalne bioaktivne molekule poznate po svojim anti-proliferativnim ulogama kao što su apoptoza, ograničavanje rasta i/ili stanična smrt (Ogretmen, 2006).



Slika 3. Struktura C16-ceramida



Slika 4. Metabolizam sfingolipida (Chaurasia i Summers, 2015)

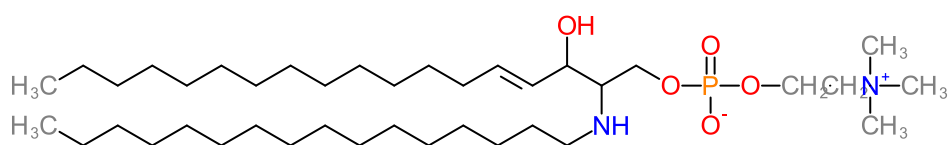
2.1.4. Kompleksni sfingolipidi

Kompleksni sfingolipidi nastaju vezanjem različitih skupina kao što su fosfat, fosfokolin i monosaharidi na C1 atom ceramida. Na taj način nastaju sfingomijelini,

glukozilceramidi, galaktozilceramidi i/ili još kompleksniji sfingolipidi s par do nekoliko desetaka vezanih šećernih ostataka na koje mogu biti vezane dodatne skupine (Merill i sur., 2007; Lopez i Sachnaar, 2009).

2.1.4.1. Sfingomijelini

Sfingomijelini (Slika 5), odnosno sfingozin-fosfati, glavni su strukturni elementi mijelinskih ovojnica živčanih stanica. Kod sfingomijelina, na C1 hidroksilnu skupinu ceramida vezan je fosfokolin. Sfingomijelini se razlikuju prema vrsti masne kiseline vezane amidnom vezom na sfingoidnu bazu. Najzastupljenije masne kiseline u sfingomijelinu su palmitinska (16:0), stearinska (18:0), lignocerinska (24:0) i nervonska (24:1) (Ramstedt i sur., 1999).

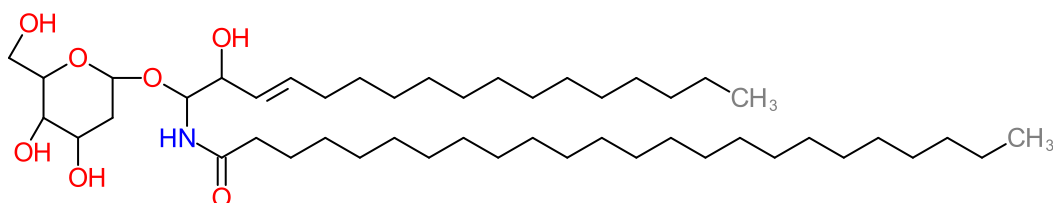


Slika 5. Struktura sfingomijelina

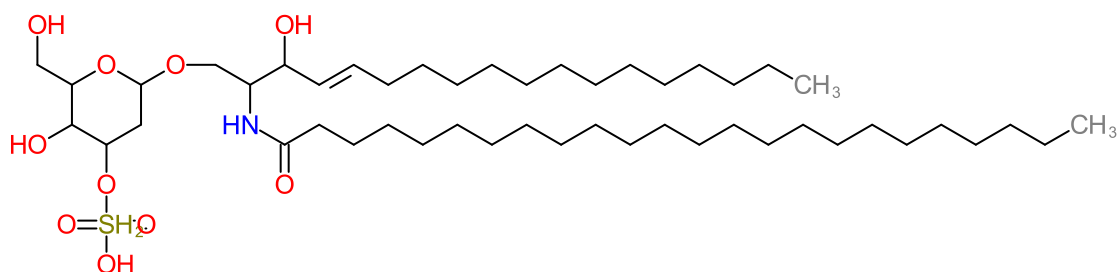
2.1.4.2. Glikosfingolipidi

Glikosfingolipidi predstavljaju veliku skupinu sfingolipida s preko 100 članova kod kojih je ugljikohidratni dio vezan na C1 hidroksilnu skupinu ceramida (Slika 6). Vezani šećerni ostaci uglavnom su: glukoza (Glc), galaktoza (Gal), 2-acetoamido-2-deoksi-D-galaktoza (*N*-acetilgalaktozamin), 2-acetoamido-2-deoksi-D-glukoza (*N*-acetilglukozamin), 6-deoksigalaktoza (fukoza), sialinska kiselina (Sia), glukuronska kiselina (GlcA). S obzirom na kemijsku strukturu šećernog dijela (broj i vrsta šećernih ostataka, tip veze između šećernih ostataka, dodatne skupine vezane na šećerne ostatke), glikosfingolipidi se mogu podijeliti na neutralne i kisele. Skupina najjednostavnijih neutralnih glikosfingolipida naziva se cerebrozidima koji kao ugljikohidratnu komponentu sadrže galaktozu ili glukozu vezanu na ceramid, te tako nastaju galaktocerebrozid (GalCer), glavni lipid membrana živčanih stanica, i glukocerebrozid (GluCer), glavni glikosfingolipid ne-neuralnih tkiva (jetra, slezena). Iz GlcCer, vezanjem dodatnih šećernih jedinica (glukoza, galaktoza, *N*-acetilgalaktozamin), nastaju globozidi. Najjednostavniji globozid je laktozilceramid (LacCer) koji se nalazi u plazma membranama eritrocita. U skupinu kiselih glikosfingolipida spadaju

sulfoglikosfingolipidi i gangliozidi. Najrašireniji sulfoglikolipidi su oni u kojima je hidroksilna skupina galaktoze GalCer na C3 atomu esterificirana sa sulfatnom kiselinom i nazivaju se sulfatidi (Slika 7). Sulfatidi su najzastupljeniji sulfoglikolipidi mozga, bubrega, gastrointestinalnog trakta i muških spolnih stanica u sisavcima (Honke i Taniguchi, 2003).



Slika 6. Struktura glikosfingolipida (GalCer)



Slika 7. Struktura sulfatida

Gangliozidi, kiseli glikosfingolipidi, sastoje se od ceramidnog dijela i neutralnog oligosaharidnog dijela na koji je vezana jedna ili više sialinskih kiselina. Sialinske kiseline prisutne u gangliozidima jesu derivati *N*-acetilneuraminske kiseline koja je aminošećer, a mogu biti dodatno kemijski modificirane (deacetilirane ili *O*-acetilirane). Gangliozidi su prisutni u svim vrstama stanica, no najraznovrsniji i najzastupljeniji su u moždanom tkivu sisavaca gdje čine 10-12% ukupnog lipidnog sadržaja (Tettamanti, 2004; Yu i sur., 2009). Klasifikacija, imenovanje i podjela pojedinih vrsta gangliozida je složena zbog njihove velike raznovrsnosti (preko 180 vrsta do sada otkrivenih vrsta samo prema raznolikosti u ugljikohidratnom dijelu molekule). Postoji više klasifikacija, kao i sustavnog nazivlja gangliozida, a međunarodno je priznato IUPAC_IUB nazivlje (JCBN, 1998). Međutim, zbog svoje jednostavnosti najviše je u upotrebi skraćeno nazivlje prema Lars Svennerholm-u čije nazivlje sadrži informacije o broju sialinskih kiselina (0-7), duljini neutralnog oligosaharidnog lanca (5-n, pri čemu je n broj šećera u gangliozidu, veći broj odgovara kraćem šećernom lancu zbog kromatografske pokretljivosti) (Svennerholm, 1963; Svennerholm, 1980). Dodatno su

gangliozidi razvrstani u četiri podskupine s obzirom na mjesto i raspored vezanja sialinskih kiselina na ugljikohidratni lanac (Wiegandt, 1995).

2.2. BIOSINTEZA SFINGOLIPIDA

De novo biosinteza sfingolipida započinje na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma (ER) kondenzacijom L-serina i palmitoil-CoA (ili steraoil-CoA) pri čemu nastaje 3-ketosfinganin. Reakciju katalizira serin-palmitoil-CoA-transferaza koja kao koenzim sadrži piridoksal-5'-fosfat (Merrill i sur., 2002). 3-ketosfinganin (3-ketodihidrosfingozin) je nestabilan međuprodukt i brzo se reducira u sfinganin pomoću enzima 3-ketosfinganin-reduktaze, mikrosomalne reduktaze ovisne o NADPH (Chen i sur., 2010). Vezanjem aktivirane dugolančane masne kiseline (acil-CoA) amidnom vezom na α -amino skupinu sfinganina uz enzim sfinganin-*N*-aciltransferazu (dihidroceramid-sintaza) nastaje dihidroceramid. U posljednjoj reakciji koja se odvija na ER nastaje ceramid (*N*-acilsfingozin) iz dihidroceramida uvođenjem 4-*trans*-dvostruke veze, odnosno desaturacijom na C4 i C5 uz dihidroceramid-desaturazu (Zheng i sur., 2006). Uvođenje 4-*trans* dvostruke veze vjerojatno se zbiva nakon amidnog vezanja masne kiseline (Merrill, 2011; van Echten-Deckert i Herget, 2006), a ako je tako, onda slobodni sfingozin nije međuprodukt u *de novo* sintezi sfingolipida, te se u stanici u slobodnom obliku nalazi samo kao produkt hidrolize ceramida i/ili kompleksnijih sfingolipida. Taj podatak je važan radi predložene uloge sfingozina kao drugog glasnika u stanici. Sve četiri skupine enzima koji koordinirano sudjeluju u sintezi ceramida različitih duljina acilnog lanca od ne-sfingolipidnih prekursora, nalaze se na citosolnoj strani ER (Gault i sur., 2010).

2.2.1. Sinteza kompleksnih sfingolipida

Ceramid je preteča svih kompleksnih sfingolipida (Merrill i sur., 2011). Zbog hidrofobne prirode ceramida nije moguć njegov spontani transport kroz vodeni medij citosola, stoga stanica mora pronaći put transporta ceramida s membrane ER, gdje je sintetiziran, do Golgijevog kompleksa gdje se odvija sinteza složenijih sfingolipida (Venkataraman i Futerman 2000; Gault i sur., 2010). Stanica koristi dva osnovna mehanizma za transport ceramida od ER; a to su vezikularni i nevezikularni transport. Kod nevezikularnog transporta, citosolni protein koji ima ulogu proteinskog nosača (CERT) transportira ceramid od ER do Golgijeva kompleksa gdje se ceramid može transformirati u sfingomijeline i eventualno u

glikosfingolipide (Hanada, 2003). Vezikularni transport ceramida, koji se smatra glavnim putem transporta ceramida do *cis*-Golijevega kompleksa u svrhu sinteze glikosfingolipida, uključuje transport istim vezikulama kojima se transportiraju proteini iz ER. Međutim, regulacija mehanizma vezikularnog transporta ceramida, a time i regulacija sinteze glikosfingolipida, je još uvijek nepoznata u potpunosti. Smatra se da glavnu ulogu u usmjeravanju ceramida prema sintezi pojedine vrste složenih sfingolipida ima duljina alkilnog lanca masnih kiselina. Ceramidi s masnom kiselinom od 20 i više C atoma se usmjeravaju prema sintezi sfingomijelina, a oni s masnom kiselinom od 16 C atoma su usmjereni prema sintezi glikosfingolipida (Ribar, 2000). Sinteza sfingomijelina odvija se na luminalnoj strani *cis*- i *medial*-Golgi kompleksa prijenosom fosfokolina iz fosfatidilkolina na ceramid pri čemu uz sfingomijelin nastaje i diacilglicerol koji sudjeluje u staničnoj signalizaciji (Huitema i sur., 2004). Zbog toga bi ova reakcija, koju katalizira sfingomijelin-sintaza, trebala biti odlučujuća u metaboličkoj interakciji između sfingolipidnog i diacilglicerolnog signaliziranja (Galut i sur., 2010).

Glikosfingolipidi nastaju postupnom glikozilacijom ceramida pomoću membranski vezanih specifičnih glikoziltransferaza. Cerebrozidi, GalCer i GlcCer, sintetiziraju se iz ceramida i aktiviranih nukleotidnih šećera, odnosno iz UDP-Glc koju koristi glukoziltransferaza i UDP-Gal koju koristi galaktoziltransferaza, pri čemu oba enzima prenose odgovarajuću heksozu na ceramid (Hannun i Futerman, 2004). GalCer se sintetizira u lumenu ER, dok se GlcCer sintetizira na citosolnoj strani membrane (Sprong i sur., 2003). GalCer je supstrat za sulfatottransferazu u lumenu ER koja koristi aktivirani donator sulfata 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat za nastajanje kiselog glikosfingolipida-sulfatida (3'-sulfo-galaktozilceramid) (Honke i Taniguchi, 2003). Na GlcCer, koji nastaje na citosolnoj strani Golgija, veže se galaktoza uz enzim galaktoziltransferazu pri čemu nastaje globozid, laktozilceramid (LacCer), u luminalnom sloju Golgi membrane i usmjerava se sinteza prema kompleksnijim neutralnim glikosfingolipidima (daljnjom adicijom ugljikohidratnih jedinica) i gangliozidima (Yu i sur., 2004). Sinteza jednostavnijih gangliozida, GD3 i GT3, koji su polazne točke složenijih gangliozida, odvija se u proksimalnim odjeljcima Golgijeva kompleksa djelovanjem specifičnih sialiltransferaza. U distalnim Golgijevim odjeljcima, do kojih se prenose vezikularnim transportom, dalje se nadograđuju do još složenijih gangliozida, djelovanjem nespecifičnih *N*-acetilgalaktozamintransferaza, galaktoziltransferaza i sialiltransferaza. Biosinteza gangliozida završava vezikularnim transportom i ugrađivanjem novonastale molekule u plazma membranu (Yu i sur., 2011).

2.3. RAZGRADNJA SFINGOLIPIDA

Katabolizam (razgradnja) sfingolipida na sastavne komponente obuhvaća kompleksne procese koji započinju već na staničnoj membrani, a završavaju u lizosomima djelovanjem lizosomalnih hidrolaza (Tettamanti, 2004; Huwlier i sur., 2010; Kolter i Sandhoff, 2006). Ukoliko međuprodukti katabolizma nisu ponovo uključeni u biosintetski put, proces hidrolize slijedi ireverzibilna degradacija sfingoidnih baza, pri čemu u citosolu nastaju spojevi koji više ne spadaju u skupinu sfingolipida (aldehidi i etanolamin fosfati) (Serra i Saba, 2010). U lizosomalni proces hidrolize je uključeno više od 10 vrsta egzo-hidrolaza, a nedostatak samo jedne vrste rezultira nakupljanjem i skladištenjem odgovarajućeg lipidnog supstrata u lizosomima što može uzrokovati pojavu različitih genetskih bolesti (Huwiler i sur., 2000). Hidrolaze koje sudjeluju u procesu razgradnje sfingolipida mogu biti aktivne u neutralnom, kiselom i bazičnom pH području stoga su podijeljene u tri kategorije. Sialidaze koje razgrađuju gangliozide, β -galaktozidaze i β -glukozidaze su kisele hidrolaze, dok sfingomijelinaze mogu biti i neutralne i bazične (Merrill, 2011). Razgradnja složenih sfingolipida do ceramida je postupna. Dijelovi plazma membrana koji sadrže neutralne glikosfingolipide se putem endocitoze pakiraju i transportiraju do lizosoma. U lizosomima, neutralni glikosfingolipidi se razgrađuju do ceramida postupnom hidrolizom monosaharidnih jedinica, usklađenim djelovanjem više specifičnih egzo-glikozidaza i endo-glikozidaza te proteina za aktiviranje sfingolipida (Huwiler i sur., 2000). Razgradnja gangliozida započinje na plazmatskoj membrani desializacijom složenih gangliozida pomoću sialidaza do odgovarajućeg monosialo-produkta koji se potom razgrađuju u kasnim endosomima ili lizosomima (Tettamanti, 2004).

Sulfatidi se razgrađuju pomoću lizosomske arilsulfataze A koja pretvara sulfatide u GalCer.

Cerebrozidi se razgrađuju pomoću glukozilceramid β -glukozidaze na ceramid i glukozu, odnosno pomoću galaktozilceramid β -galaktozidaze na ceramid i galaktozu. Glukozilceramid se umjesto razgradnje često iskorištava za ponovnu sintezu gangliozida.

Razgradnja sfingomijelina se odvija u endosomima ili lizosomima. Sfingomijelini služe kao skladišta ceramida i njegovih metaboličkih produkata, poput sfingozina, sfingozin-1-fosfata i ceramid-1-fosfata. Različiti stresni uvjeti potiču njihovu razgradnju, pri čemu nastaju ceramid i fosfokolin, u reakciji koju katalizira sfingomijelinaza (fosfodiesteraza) (Clarke i sur., 2006). Sfingomijelinaze s pH optimumom 4,5 se nalaze u lizosomima (lizosomalna kiselna sfingomijelinaza), a sfingomijelinaze s neutralnim pH optimumom se nalaze na vanjskoj strani plazma membrane (Mg^{2+} ovisna neutralna sfingomijelinaza) (Zheng i sur., 2006).

Dakle, osim u lizosomima, sfingomijelini se mogu razgrađivati i u ekstra-lizosomalnim membranama kao odgovor na ekstra- i/ili intra-celularni podražaj.

Ceramidi nastali uklanjanjem ugljikohidratnog lanca glikosfingolipida i fosfokolina sfingomijelina, mogu biti iskorišteni za ponovnu biosintezu sfingolipida, fosforilirani pomoću ceramid-kinaze ili se dalje mogu razgraditi do sfingoidne baze i masne kiseline.

2.3.1. Razgradnja sfingozina

Sfingozin ne nastaje izravno u putu *de novo* biosinteze, već hidrolizom ceramida pomoću ceramidaza. Ceramidaze se nalaze u lizosomalnim i drugim membranama. Postoje tri tipa ceramidaza u sisavcima koje se razlikuju po lokalizaciji i pH optimumu: kisele, neutralne i alkalne ceramidaze (Zheng i sur., 2006). Sfingozin koji nastane razgradnjom ceramida se može koristiti za ponovnu sintezu ili se može razgraditi cijepanjem veze između drugog i trećeg ugljikovog atoma. Za odvijanje ove reakcije, nužna je fosforilacija sfingozina na 1-hidroksilnoj grupi koju katalizira sfingozin-kinaza, prije nego se konačno razgradi na aldehid i etanolamin fosfat (Chen i sur., 2010). Sfingozin-kinaza je citosolni enzim čija se aktivnost povećava u prisutnosti specifičnih faktora rasta poput forbol estera, PDGF faktora, NGF i B podjedinica kolera toksina (Huwlier i sur., 2000). Sfingozin-1-fosfat se može razgraditi na etanolamin-1-fosfat i aldehid, što predstavlja izlaz iz sfingolipidnog metaboličkog puta. Razgradnju sfingozin-1-fosfata katalizira sfingozin-1-fosfat-liaza, pri čemu nastaju etanolamin-fosfat i aldehid. C-18 sfingozin se razgrađuje do trans-2-heksadekanala, a C-18 sfinganin do palmitaldehida. Alternativno, sfingozin-1-fosfat se može defosforilirati pomoću ceramid-1-fosfat-fosfataze. Drugi metabolički put sfingozina je *N*-metilacija pomoću *N*-metiltransferaze, pri čemu mogu nastati metil- i dimetil-sfingozin (Shayman, 2000).

2.4. SVOJSTVA I FUNKCIJA SFINGOLIPIDA

Uz strukturnu ulogu, sfingolipidi imaju važnu ulogu u procesima stanične signalizacije kao i u interakcijama s izvanstaničnim okolišem. Imaju ključnu ulogu u regulaciji brojnih biopatoloških procesa poput razvoja karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih poremećaja te upalnih i infekcijskih bolesti (Heung i sur., 2006). Djeluju kao receptori za faktore rasta (Hakomori, 1991), te služe kao vezno mjesto brojnih mikroorganizama, toksina i virusa (Bennun, 1989). Metaboliti kompleksnih sfingolipida su nova grupa drugih glasnika koji posreduju u odgovoru stanice na faktore rasta, faktore diferencijacije, citokinine i sve veći broj agonista, uključujući stres i toksične inzulte. Na površini stanične membrane,

sfingolipidi mogu biti organizirani u atipične pokretljive agregate nazvane "*lipidni splavovi*" ili "*mikrodomene*"- temeljne funkcionalne jedinice membrane koje čine do 50% ukupne površine membrane. *Mikrodomene* su bogate (gliko)sfingolipidima i kolesterolom, te odgovarajućim funkcionalno specifičnim proteinima (Chen i sur., 2010). Putem funkcionalnih jedinica membrane, sfingolipidi sudjeluju u brojnim procesima kao što su međustanično prepoznavanje, adhezija i prijenos signala (Sonnino i sur., 2010). Ugljikohidratni dijelovi sfingolipida su često specifični za određeni tip stanice te sudjeluju kao posrednici u interakcijama s komplementarnim ligandima, kao što su intracelularni matriks, proteini i receptori (Hakamori, 2009). Uključuju izravno povezivanje ugljikohidratnih dijelova stanice s funkcionalnom grupom na površini susjedne stanice, npr. gangliozidi sudjeluju u interakciji s glikanima vezanim na proteine uključene u regulaciju živčanog sustava (Lopez i Sachnaar, 2009). Osim samih sfingolipida, međuprodukti njihovog metabolizma kao što su ceramidi, sfingoidne baze i fosforilirane sfingoidne baze, sudjeluju u staničnoj signalizaciji kao drugi glasnici i/ili modulatori, te sudjeluju i u brojnim drugim procesima kao što su stanični rast, diferencijacija i apoptoza (Todeschini i sur., 2008).

Ceramidi su centralne molekule sfingolipidnog metabolizma i osim kao strukturne komponente u građi složenijih sfingolipida, važnu ulogu imaju kao samostalne bioaktivne molekule poznate po svojim anti-proliferativnim ulogama kao što su apoptoza, ograničavanje rasta i/ili stanična smrt (Ogretmen, 2006). Ceramidi potiču apoptozu putem aktivacije protein kinaza, uključujući protein kinazu C (PKC), protein fosfatazu 1 i 2A (PP1 i PP2A), te aktivacijom proteaza, kaspaza i katepsina D. Sve je više dokaza koji ukazuju da apoptotičko djelovanje ceramida ima važnu ulogu u supresiji razvoja karcinoma, stoga analozi ceramida i regulatori (aktivatori i inhibitori) njihova metabolizma postaju potencijalni antikancerogeni agensi (Lahiri i Futerman, 2007). U stresnim uvjetima u stanici (UV-zračenje, hipertermija, oksidativni stres) povećava se koncentracija ceramida putem aktivacije *de novo* sinteze ili sfingomijelinaze koja hidrolizira sfingomijelin (Ogretmen, 2006). Prilikom razgradnje sfingomijelina, ceramid se nakuplja unutar *mikrodomena* (Gulbins i Kolesnick, 2003). Bio-fizikalne karakteristike ceramida omogućuju srastanje *mikrodomena* u veće domene u kojima se registriju signalni događaji vezanjem receptora i signalnih molekula. Na taj način, akumulacija ceramida potiče apoptozu prenoseći signal putem membranskih receptora. Novija istraživanja pretpostavljaju da je uloga endogenih ceramida na regulaciju rasta ili apoptoze u različitim tipovima tumorskih stanica mnogo složenija od dosadašnjih saznanja o njihovoj aktivnosti kao drugih glasnika, te da ovisi o staničnom okruženju, subcelularnoj i/ili

membranskoj lokalizaciji kao i o prisutnosti odnosno odsutnosti određenih ciljnih molekula na koje oni djeluju. Primjerice, uočeno je da su ceramidi s različitim duljinama lanaca masno-kiselinskih ostataka, kao što su npr. C16-ceramidi, uključeni u procese stanične proliferacije, dok su C18-ceramidi pokazali pro-apoptotičko djelovanje, pa se stoga enzimi koji kataliziraju njihovu biosintezu smatraju potencijalnom metom u antitumorskoj terapiji (Saddoughi i Ogretmen, 2013). Razlog takvog različitog djelovanja ceramida još uvijek nije razjašnjen (Ogretmen, 2006). Ceramid i sfingozin-1-fosfat su najbolje proučeni bioaktivni sfingolipidi te često izazivaju suprotne učinke u mnogim sustavima. Za razliku od ceramida, sfingozin-1-fosfat potiče rast stanice i sprječava apoptozu (Maceyaka i sur., 2002). Povećana koncentracija sfingozin-1-fosfata aktivira signalne putove koji posreduju u procesima preživljavanja stanica (proliferacija, inflamacija, otpornost na apoptozu, maligna transformacija), stoga se on smatra tumor-promotorskim lipidom (Mendelson i sur., 2014).

2.4.1. Svojstva i funkcije sfingozina i ostalih sfingoidnih baza

Zanimanje za sfingoidne baze je počelo nakon što je otkriveno da je sfingozin, najzastupljenija dugolančana sfingoidna baza u sisavaca, potencijalni inhibitor protein kinaze C (Hannun i sur., 1986). To znači da stanica koristi razgradne produkte kompleksnih sfingolipida kako bi regulirala stanične funkcije, analogno s ostalim lipidnim sekundarnim glasnicima (diacilglicerol, arahidonska kiselina i njeni metaboliti i ostali) koji potječu od fosfoglicerolipida (Smith i sur., 2000). Razni efektori kao što su citokini, citotoksični i kemotoksični agensi, stres i ostali, utječu na pojačano ili smanjeno stvaranje sfingozina. U odnosu na ceramid, sfingozin je često zanemaren kao drugi glasnik apoptoze, međutim novija istraživanja pružaju snažne naznake o ulozi sfingozina kao drugog glasnika u stanici te o mogućim mehanizmima koji su uključeni u sfingozinom posredovanu staničnu smrt (Woodcock, 2006). Sfingozin je jaki aktivator sfingozin ovisnih protein kinaza koje fosforiliraju razne stanične proteine (chaperone, heat shock proteine i dr.). Ustanovljeno je da sfingozin i svi stereoizomeri sfingozina te *N*-metil-derivati i homolozi različite duljine alkilnog lanca snažno inhibiraju protein kinazu C *in vivo* te utječu i na aktivnost brojnih drugih protein kinaza (Smith i sur., 2000; Woodcock, 2006) te, za razliku od ceramida, nisu ograničeni na membranske frakcije što sfingozin i druge dugolančane baze čini idealnim sekundarnim glasnicima (Woodcock, 2006). Budući da je sfingozin snažan inhibitor protein kinaze C koja ima važnu regulatornu ulogu u tumorigenezi, istražuje se i mogućnost upotrebe sfingozina kao antitumorskog agensa. Sfingozin inducira apoptozu u diferenciranim stanicama karcinoma želudca (MKN-28 stanice) putem koji je neovisan o aktivaciji protein

kinaze C (Kanno i sur., 2012). Egzogeni sfingozin, glavni metabolički produkt prehrambenih kompleksnih sfingolipida, uzrokuje apoptozu u staničnim linijama humanog karcinoma debelog crijeva (Ogretmen, 2006) i pomoću različitih mehanizama može pridonijeti posredovanju sfingozina u apoptozu što ukazuje na moguću ulogu sfingolipida u kemoprevenciji modulacijom sfingolipida u prehrani (Schmelz i sur., 2000). Međuprodukti u *de novo* sintezi sfingolipida (sfinganin, dihidroceramid i ceramid) su također visoko bioaktivni spojevi i pod normalnim uvjetima njihov iznos u stanici se drži niskim.

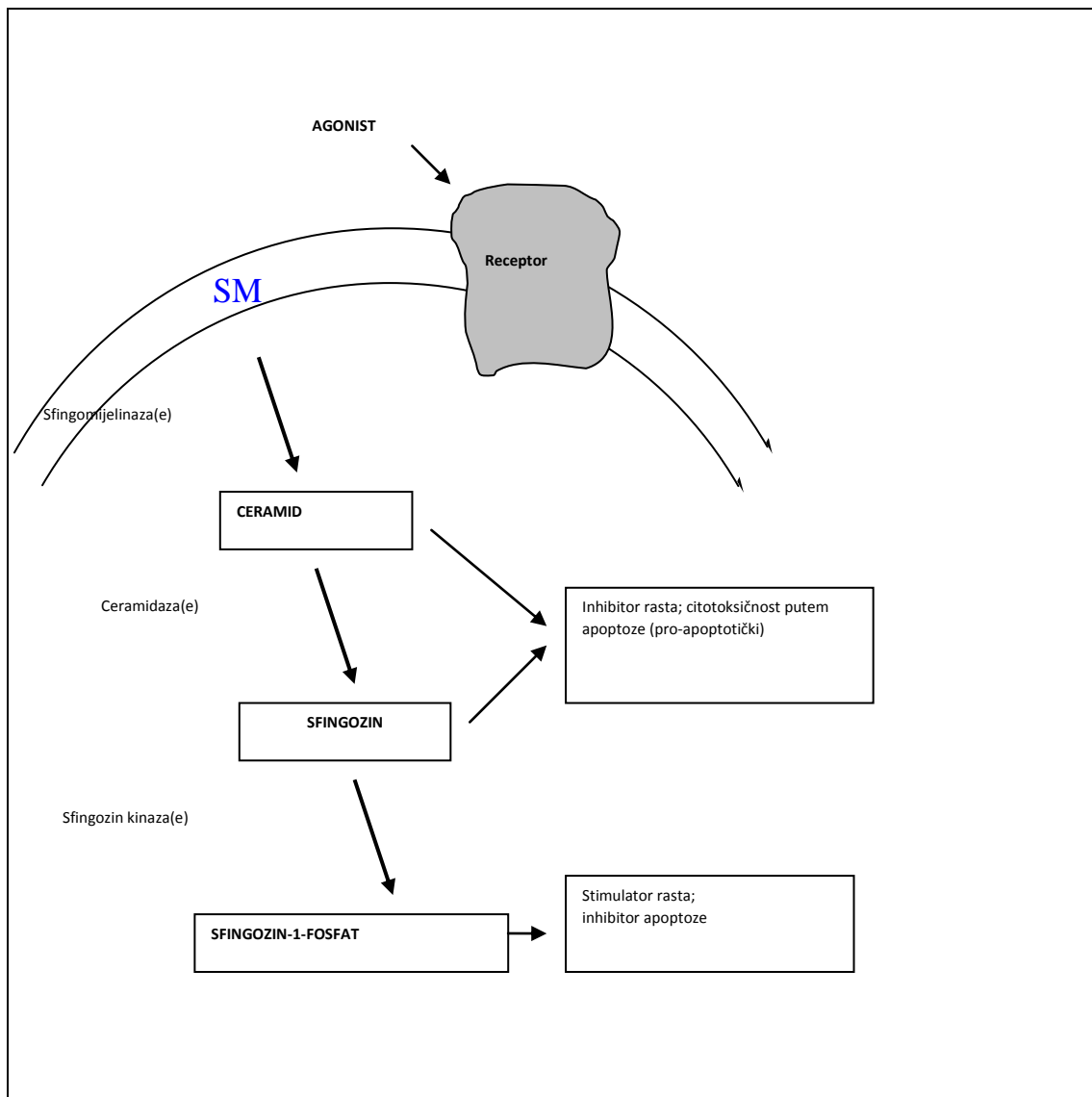
2.5. METABOLIČKI SINDROM

Metabolički sindrom je definiran kao kombinacija nekoliko čimbenika, te je prepoznat kao važan čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i šećerne bolesti tipa 2 (Karmelić, 2016). Čini ga skup promjenljivih rizičnih čimbenika (okolišni čimbenici) uključujući hipertenziju, abdominalnu pretilost, dislipidemiju i inzulinske rezistencije (IR), udruženih s nepromjenljivim rizičnim čimbenicima kao što su dob, spol i genetičko nasljeđe (Božina, 2014). Bez obzira na kompleksnost MetS, većina znanstvenika se slaže da je njegova rastuća prevalencija u svijetu (zahvaćenost između 20-30 % odrasle populacije) uvelike povezana s rastućom prevalencijom abdominalne pretilosti i danas je MetS poprimio pandemijske razmjere (Grundy i sur., 2014). Do danas su razvijene brojne definicije MetS usporedno s novim rezultatima znanstvenih istraživanja, a sve definicije u sastavnice sindroma uključuju pretilost i abdominalnu pretilost, poremećenu toleranciju glukoze i metabolizma inzulina, dislipidemiju i povišeni krvni tlak. Prevalencija MetS u Republici Hrvatskoj iznosi 39-42% u žena i 28-35% u muškaraca s razlikama koje ovise o regiji, kao i o definiciji MetS koja se koristila (Poljičanin i sur., 2012).

2.5.1. Uloga sfingolipida u razvoju metaboličkog sindroma

Patofiziologija MetS je vrlo složena i do danas je samo djelomično razjašnjena. Okarakterizirana je razvojem IR uslijed povećane razine slobodnih masnih kiselina (SMK) koje se oslobađaju u izobilju iz proširene mase masnog tkiva. Posljedica IR je smanjeni ulazak glukoze u periferna tkiva, te povećanje izlučivanja inzulina u β -stanicama gušterače (zbog hiperglikemije) koje hiperinzulinemijom (inzulina ima, ali ne djeluje) nadvladavaju perifernu rezistenciju (Lillioja i sur., 1993). Zbog dugotrajne teške periferne rezistencije, dolazi do iscrpljenja β -stanica gušterače i dalje se ne može povećavati izlučivanje inzulina potrebno za savladavanje IR. Inzulinska rezistencija, odnosno kompenzatorna

hiperinzulinemija, dovode do nastanka niza rizičnih faktora, uključujući hipreglikemiju, povišenu razinu VLDL-a, sniženu razinu HDL-kolesterola, povišenu koncentraciju LDL-kolesterola i arterijsku hipertenziju, a koji se povezuju s MetS (Othman i sur., 2012). Navedeni metabolički poremećaji se razvijaju s pretilošću koja je globalni problem današnjice pa posljedično i MetS. Abdominalna pretilost je povezana s kvantitativnim i kvalitativnim promjenama cirkulirajućih lipida kao i s disregulacijom u izlučivanju brojnih upalnih adipocitokina koji pridonose razvoju MetS (Karmelić i sur., 2012; Hwang i sur., 2015). Uvećani adipociti izlučuju brojne upalne citokine koji potiču lipolizu što doprinosi nakupljanju SMK u perifernim organima (Holland i Summers, 2008). Povišena razina SMK, primarno palmitata, regulira sintezu sfingolipida na razni supstrata kao i aktivacijom ekspresije ključnih enzima poput serin palmitoil-transferaze, dihidroceramid-desaturaze 1 i sfingozin-kinaze 1 (Russo i sur., 2013). Osim povećane razine SMK, ulogu u razvoju IR, odnosno MetS, imaju faktori rasta i citokini koji potiču hidrolizu sfingomijelina u membrani aktivacijom enzimskih sustava (Slika 8). Na taj način nastaju bioaktivni spojevi koji mijenjaju ponašanje stanice. Aktivacija sfingomijelinaze pod utjecajem upalnih citokina kao što je tumor nekrozni faktor (TNF- α), koji je inhibitor inzulinske signalizacije i staničnog stresa, povećava razinu ceramida koji inhibira stanični rast i inducira apoptozu (Majumdar i Mastrandrea, 2012). Ceramid, kao glavni međuprodukt metabolizma sfingolipida, se smatra toksičnim lipidom koji potiče IR, metabolički poremećaj i staničnu smrt u mišićima, srcu i gušterači (Mu i sur., 2013). Ova akumulacija ceramida unutar tkiva potiče i pozitivan *feed back* (povratni) mehanizam koji vodi do povećane proizvodnje upalnih citokina (TNF- α , IL-6, IL-7) što rezultira inhibicijom inzulinom reguliranog unosa glukoze. Zbog ključne uloge u nastajanju IR i upalnih procesa, povišena koncentracija ceramida i njegovih metabolita – sfingoidnih baza u plazmi, može poslužiti kao biomarker ili izravni pokazatelj IR i MetS te rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti (Haus i sur., 2009). Za razliku od upalnih citokina, faktor rasta iz trombocita (PDGF) aktivira enzimske sustave koji provode hidrolizu sfingomijelina do sfingozin-1-fosfata koji je snažan mitogen i inhibitor apoptoze. Te razlike u regulaciji su iznimno bitne jer produkti imaju različite efekte na stanično ponašanje.



Slika 8. Shematski prikaz razgradnje sfingolipida u odgovoru na agonist (signalna uloga) (Ribar, 2000)

2.6. SFINGOLIPIDI U HRANI

Sfingolipidi su prisutni u gotovo svojoj hrani, u manjim količinama. Glavni izvori prehrambenih sfingolipida su mliječni proizvodi (od 160 do >1300 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ sfingolipida) zatim slijedi meso i mesni proizvodi (400-500 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ sfingolipida), riba, jaja (oko 2410 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ sfingolipida), te voće i povrće koji sadrže znatno manju količinu sfingolipida (Vesper i sur., 1999). Soja je također jako bogata sfingolipidima i sadrži > 2400 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ sfingolipida. Struktura sfingolipida prisutnih u hrani značajno ovisi o vrsti hrane. Većina hrane životinjskog porijekla sadrži širok spektar složenih sfingolipida poput sfingomijelina, cerebrozida, globozida, gangliozida i sulfatida. U mlijeku su sfingolipidi prisutni u lipidnim

kapljicama, a sadržaj sfingolipida po litri mlijeka iznosi: oko 39-119 mg sfingomijelina, 6-11mg glukozilceramida, 6,5-15 mg laktozilcerebrozida i ~ 11 mg gangliozida. Kompleksni sfingolipidi u biljkama su uglavnom cerebrozidi. Zbog strukturne različitosti (varijacije u lipidnoj okosnici i bočnim ograncima), sfingolipidi se teško analiziraju u hrani (Ribar i Mesarić, 2007). Većina sfingolipida se razgradi u crijevima pomoću enzima probavnog trakta: glukoceramidaze, sfingomijelinaze i ceramidaze, stoga je u crijevima povišena koncentracija bioaktivnih molekula, ceramida i sfingoidnih baza. Sfingoidne baze (sfingozin i sfinganin) se otpuštaju iz stanice u plazmu. Samo 25% unesenih sfingolipida se ne razgradi, nego se izbaci putem fekalija, većinom u obliku ceramida. Prehrana obogaćena sfingolipidima može povećati razinu sfingomijelina u serumu što potiče aterogenezu. Naime, visoke razine sfingomijelina doprinose agregaciji i zadržavanju LDL-kolesterola u arterijskoj stijenci. Međutim, postoji mala vjerojatnost da povećanje unosa sfingolipida potiče njihovo nakupljanje prilikom debljanja (Holland i Summers, 2008).

Razgradnja sfingolipida na ceramid i sfingozin u probavnom traktu može smanjiti rizik od karcinoma debelog crijeva s obzirom na navedena funkcionalna svojstva razgradnih produkata kompleksnih sfingolipida. Upravo zato se sfingolipidi smatraju funkcionalnim sastojcima hrane (Vesper i sur., 1999). Osim navedenog, prisutnost sfingolipida u hrani može štiti organizam od bakterija, toksina i infekcija (Ribar i Mesarić, 2007).

Poznato je da način prehrane ima bitan utjecaj na ljudsko zdravlje. Istraživanja ukazuju da prehrana bogata nezasićenim masnim kiselinama, kao što je mediteranski tip prehrane ima brojne prednosti u odnosu na druge tipove prehrane kao što je kontinentalna prehrana koja je bogata zasićenim masnim kiselinama. Međutim, danas se sve više prakticira prehrana s viskom sadržajem zasićenih masnoća što vodi pretilosti, a posljedično i razvoju MetS kao i daljnjih komplikacija. Prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama utječe i na razinu sfingolipida što upućuje na povezanost metabolizma sfingolipida i patofiziologije organizma. Poremećaj u metabolizmu ceramida izazvan povećanim unosom zasićenih masnih kiselina, primarno palmitata, ima ključnu ulogu u pogoršanju stanične homeostaze i funkcije. Prehrana s visokim sadržajem masti uzrokuje povećanje razine ceramida u jetri, masnom tkivu, mišićima i srcu. Takva prehrana može dovesti do promjene u metabolizmu sfingolipida, a shodno tome, sfingolipidni putovi razgradnje potiču promjene u organizmu uzrokovane pretilošću, poput IR (Choi i Snider, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ISPITANICI

U istraživanju je sudjelovalo 41 ispitanika (28 žena i 13 muškaraca) hrvatskog podrijetla, rodbinski nepovezanih, uključujući 21 bolesnika s MetS i 20 zdravih ispitanika. Analizirani su sfingolipidi u svježem serumu ispitanika dobivenom centrifugiranjem uzoraka krvi ispitanika koji su bili na tašte.

Ispitanici s MetS su izabrani među ambulantnim bolesnicima u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, dok su zdravi ispitanici odabrani između bolničkog osoblja i ostalih stanovnika grada Zagreba koji su obavljali redoviti sistematski pregled. Zdravi su ispitanici po dobi, spolu i podrijetlu odgovarali skupini ispitanika s MetS. Za definiranje MetS koristili su se kriteriji NCEP-ATP III (engl. *National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel* (Grundy i sur., 2005). U istraživanje nisu bili uključeni bolesnici sa šećernom bolesti, trudnice, bolesnici s Cushingovom bolesti i hipo- ili hipertiroidizmom. Svaki ispitanik je ispunio upitnik o obiteljskoj anamnezi: o kardiovaskularnim bolestima, hipertenziji, debljini, zatim o uzimanju lijekova i vrsti prehrane (mediteranski, kontinentalni i mješoviti tip prehrane). Mediteranska prehrana je podrazumijevala svakodnevnu konzumaciju maslinovog ulja, voća i povrća, ribe dva do tri puta tjedno, bijelog mesa umjesto crvenog i orašastih plodova barem tri puta tjedno. Kontinentalni tip prehrane se sastojao od crvenog mesa i mesnih prerađevina, manjih količina voća i povrća, rijetke konzumacije ribe, bez maslinovog ulja. Dijeta koja je uključivala elemente mediteranske i kontinentalne prehrane kategorizirana je kao mješovita. Antropometrijska mjerenja su uključivala mjerenje tjelesne mase, visine i opsega struka. BMI je izračunat dijeljenjem tjelesne mase izražene u kilogramima s kvadratom tjelesne visine izražene u metrima.

Svaki ispitanik je dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju potvrdio potpisivanjem informiranog pristanka. Provođenje istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su sakupljeni u okviru projekta "Funkcijska genomika i proteomika rizičnih čimbenika ateroskleroze" (108-1080134-0136).

3.2. KEMIKALIJE I OPREMA

3.2.1. Osnovne kemikalije

Uporabljene su sljedeće kemikalije (kurzivom su označeni proizvođači):

Kalijev hidroksid (KOH) (*Kemika*), amonijev hidroksid (NH₄OH) (*Fluka*), klorovodična kiselina (HCl) (*Fluka*), etanol (C₂H₅OH) (*Riedel-de Haën AG*), metanol CH₃OH) (*Riedel-de Haën AG*), metanol HPLC čistoće (CH₃OH) (*Sigma Aldrich*), kloroform (CHCl₃) (*Sigma Aldrich*), ortoftaldialdehid (OPA) (*Sigma Aldrich*), 2-merkaptioetanol (*Sigma Aldrich*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₆) (*Sigma Aldrich*).

3.2.2. Standardi

Uporabljeni su sljedeći standardi (kurzivom su označeni proizvođači):

D-sfingozin iz kravljeg mozga, aprox. 99 % (TLC) (C₁₈H₃₇NO₂) (*Sigma Aldrich*), C18-DL-eritro-dihidrosfingozin (*Sigma Aldrich*), C20 sfinganin (*Avanti Polar Lipids*).

3.2.3. Oprema

Tijekom istraživanja korišten je sljedeći pribor i instrumenti

- Termostat "Instrumentaria", Hrvatska
- Mikrocentrifuga MIKRO-242, "Tehtnica Železniki", Slovenija
- Centrifuga "Tehtnica Železniki", Slovenija
- Miješalica EV-202 "Tehtnica Železniki", Slovenija
- Vodena kupelj "Sutjeska", Jugoslavija
- Ultrazvučna kupelj "Iskra", Slovenija
- Uparivač Univapo 100 H s jedinicom za hlađenje Unicryo MC 2L "Uniequip", Njemačka
- Analitička vaga s mogućnošću mjerenja 0,1 mg, max. 120 g (*Sartorius, Njemačka*)
- Mikropipeta, promjenjivi volumen, 0,5-20, 10-100 i 100-1000 µL (*Eppendorf, Njemačka*)
- Sustav pripremu vode QTM 3 (električna vodljivost 0,06 µS; otpornost 18.2 MΩ·cm (*Millipore*))
- Nastavci za mikropipete od 10, 100 i 1000 µL (*Eppendorf, Njemačka*)
- Epruvete od 1,5 mL

- Epruvete s navojem i teflonskim PTFE čepom (*Deotto Lab, Hrvatska*)
- Ultrafree-MC filteri za veličine pora od 0,45 µm za mikrocentrifugiranje uzoraka prije prebacivanja u bočice za samostalno injektiranje (*Sigma Aldrich*)
- Bočice za samostalno injektiranje (vial) s navojnim čepom(PTFE/SIL) za uzorkovanje sustavom za tekućinsku kromatografiju od 1,8 mL (*Perkin Elmer*)
- Menzura, staklena, graduirana od 25, 100, 500 mL

3.2.3.1. HPLC sustav

Za HPLC analizu uporabljena je oprema proizvođača "*Perkin Elmer*", *Norwalk, Connecticut, SAD*:

- Binarna recipročna pumpa s jednim klipom (Series 200, Liquid Chromatograph)
 - Vakuum degasser (Series 200)
 - Pećnica za kolonu (Series 200)
 - Jedinica za samostalno uzorkovanje (Series 200)
 - Fluorescentni detektor (Model LC 240)
 - Interface (Series 900)
 - Link
 - Software TotalChrom Workstation Version 6.2.0.

U radu je korištena:

- Analitička kolona (Radial-PakTMC cartridge, Nova-PakTMC18, 10 cm x 0,8 cm, 4 µm, "*Waters*", *SAD*)
- Nosač s predkolonskim filterom Guard-Pak assembly, Nova-Pak C18, 4 µm, "*Waters*", *SAD*
- Modul za kolonu RCM 8 x 10, "*Waters*", *SAD*

Aparatura za filtraciju otapala:

- Lijevak volumena 300 mL
- Nosač za filter-papir
- Nitrocelulozni filter-papir 47 mm, 0,45 µm, "*Millipore*", *SAD*

- Staklena boca volumena 1L koja se spaja na vakuum, "Millipore", SAD

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1. Ekstrakcija sfingolipida iz seruma

Iz seruma su sfingolipidi ekstrahirani pomoću smjese organskih otapala (metanol : kloroform = 1:2, v/v) prema modificiranoj metodi ekstrakcije koju su opisali Riley i suradnici (1994).

3.3.1.1. Postupak ekstrakcije sfingolipida

U 0,5 ml uzorka seruma dodano je 2,25 ml smjese $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2, v/v) i 0,15 ml 2N NH_4OH , te je sadržaj epruvete (epruveta s navojem) promiješan na miješalici i stavljen na inkubaciju tijekom jednog sata na 37°C u vodenoj kupelji. Smjesi u epruvetama, ohlađenoj na sobnu temperaturu, dodano je 1,5 ml CHCl_3 i 3 ml alkalne vode (0,1 ml 2N NH_4OH + 250 ml destilirane deionizirane vode, $\text{pH}=8,0-10,0$; dnevno priređene). Epruvete su lagano preokretane dvadesetak puta i centrifugirane 10 minuta na 3000 okretaja minuti^{-1} pri sobnoj temperaturi kako bi se postigla separacija faza. Nakon centrifugiranja donja kloroformska faza je izvučena i prebačena u čistu epruvetu u koju je dodano 3 ml alkalne vode, te je smjesa pažljivo promiješana i ponovno centrifugirana 20 minuta na 3000 okretaja minuti^{-1} . Postupak ispiranja kloroformske faze s alkalnom vodom ponovljen je još jednom, nakon čega je vodena faza uklonjena pomoću sisaljke, a kloroformska faza uparena do suhog. Ovako priređeni uzorci pohranjeni su pod dušikom na $+4^\circ\text{C}$ preko noći ili su odmah podvrgnuti kiseljoj hidrolizi.

3.3.1.2. Kisela hidroliza

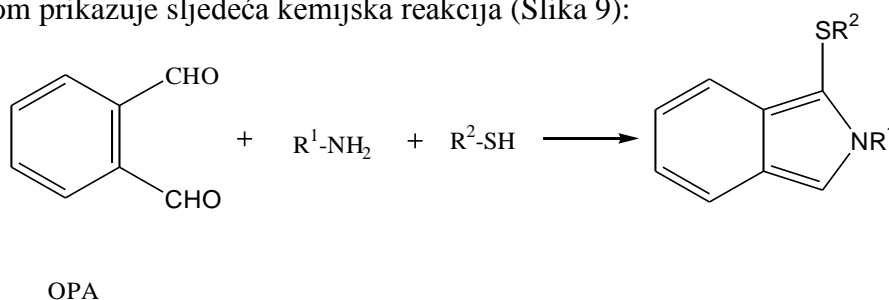
Svrha kisele hidrolize je oslobađanje sfingoidnih baza iz kompleksnih sfingolipida. Kiselinskim tretmanom dolazi do hidrolize amidno vezane masne kiseline i polarne grupe esterificirane na prvom ugljikovom atomu sfingoidne baze. Dobivena frakcija sfingolipida je hidrolizirana s vodenom metanolnom HCl i pročišćena prema metodi koju su opisali Yoo i suradnici (1996).

Suhom ekstraktu dodano je 0,5 mL vodene metanolne HCl (1 M HCl pripremljena je neposredno prije upotrebe). Epruveta je začepljena teflonskim čepom i ostavljena preko noći (približno 15 h) u termostatu na 68°C . Nakon što je sadržaj epruvete ohlađen na sobnu temperaturu, dodano je 0,5 mL zasićene metanolne KOH (30 g KOH otopljeno u 100 ml

metanola, te je smjesa profiltrirana kroz naborani filter papir), 0,5 mL alkalne vode, 0,1 mL 2 N NH₄OH i 0,6 ml CHCl₃, te je sadržaj epruvete pažljivo promiješan i centrifugiran 20 minuta na 3000 okretaja minuti⁻¹ pri sobnoj temperaturi. Gornji vodeni sloj je uklonjen, a kloroformski sloj je ispran 3 puta sa po 0,9 mL alkalne vode, prebačen u ependorf epruvete (1,5 mL) i uparen do suhog. Nakon uparavanja, epruvete su napunjene dušikom i pohranjene na -20 °C do analize. Početni volumen seruma za kiselu hidrolizu bio je 50 µL.

3.3.2. Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) provedena je analiza sfingoidnih baza. Baze su prije nanošenja na kolonu derivatizirane orto-ftaldialdehidnim reagensom (OPA), koji se veže sa sfingoidnom bazom preko njezine amino skupine. OPA reagens je pripremljen otapanjem 5 mg OPA reagensa i 5 µL 2-merkaptoetanolu u 0,1 mL etanola, i nadopunjen do 10 mL bornim puferom. Borni pufer je pripremljen otapanjem 1,423 g borne kiseline u 50 mL prethodno prokuhane i ohlađene destilirane deionizirane vode, nakon čega je podešen pH na 10.5 pomoću 1 M KOH. OPA reagens pripremljen na ovaj način je stabilan 7 dana ukoliko se čuva na +4 °C u mraku. Derivatizaciju sfingoidnih baza s OPA reagensom prikazuje sljedeća kemijska reakcija (Slika 9):



Slika 9. Prikaz derivatizacije sfingoidnih baza

3.4. PRIPREMA RADNIH STANDARDNIH OTOPINA

3.4.1. Matične standardne otopine

Kao matične standardne otopine za pripremu radnih standarda korištene su 1 mM otopine C18-DL-*eritro*-dihidrosfingozina, C18 D-sfingozina i C20 sfinganina u etanolu. Tako priređene matična standardna otopina služi za pripremu radnih standardnih otopina, odnosno radnih standardnih otopina za kalibraciju. Matične standardne otopine mogu biti čuvane na -20 °C do 6 mjeseci u mraku.

3.4.1.1. Radne standardne otopine za kalibracijski pravac

Radne standardne otopine korištene za izradu kalibracijskog pravca i za optimizaciju metode su pripravane razrjeđivanjem matične standardne otopine s etanolom. Korištene su koncentracije standarda C18 sfingozina od: 3, 10, 20, 30, 40 i 55 nmol mL⁻¹ i koncentracije standarda sfinganina od 0,5, 0,8, 1,0, 1,2, 1,5 i 2,0 nmol mL⁻¹. Radne standardne otopine za kalibracijski pravac čuvane su do su na +4 °C te pripravane jedanput tjedno.

3.4.1.2. Smjesa radnih standarda

Smjesa standarda za HPLC pripravljena je dnevno miješanjem po 5 µL 10 µM otopine C18-DL-*eritro*-dihidrosfingozina, 5 µL 10 µM otopine C18 D-sfingozina i 5 µL 10 µM otopine C20 sfinganina, te je dodano 485 µL mobilne faze i 100 µL OPA reagensa. Smjesa je dobro promiješana na miješalici i ostavljena da odstoji 20 - 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je smjesa profiltrirana centrifugiranjem u kivetama s filtrom veličine pora 0.45 µm 1 minutu i prebačena u pripadne bočice jedinice za samostalno injektiranje (viale).

3.5. PRIPREMA UZORAKA ZA HPLC ANALIZU

Uzorci za HPLC analizu pripravani su tako da je suhi ekstrakt otopljen u 500 µL mobilne faze, stavljen u ultrazvučnu kupelj (1 minuta), te ostavljen stajati 10 minuta uz povremeno protresanje. Potom je dodano 100 µL OPA reagensa i smjesa je dobro promiješana na miješalici 30 sekundi. Nakon stajanja 20 – 30 minuta, smjesa je profiltrirana centrifugiranjem kroz filter veličina pora 0.45 µm 1 minutu, prebačena u vialu, te naposljetku injektirana.

3.5.1. Uvjeti HPLC analize

Kao mobilna faza korištena je smjesa CH₃OH:H₂O = 88:12 (v/v), profiltrirana s pomoću vakuum uređaja za filtriranje uz uporabu nitroceluloznog filter-papira dimenzija pora 0.45 µm te degazirana vakuum degazerom radi uklanjanja otopljenih plinova odnosno mikromjehurići iz mobilne faze prije nego što ona dođe do pumpe HPLC sustava. Radni protok mobilne faze je bio 2 mL min⁻¹. Vrijeme trajanja analize iznosilo je 30 minuta pri čemu se eluiraju svi pikovi iz uzorka. Detekcija je provedena primjenom fluorescentnog detektora pri valnoj duljini emisije 440 nm i ekscitacije 334 nm. Faktor prigušenja (eng. *attenuation factor*) je bio 512 i 1024 ovisno o uzorku. Faktor odgovora (eng. *response*) je bio

prilagođen na 2. Napon fotomultiplikatora (eng. *photomultiplier voltage*) je iznosio 750 V. Temperatura pećnice za kolonu je iznosila 30°C, a vanjska temperatura 24°C. Uzorci su prije injektiranja i analize čuvani u autoinjektoru pri stalnoj temperaturi +6°C u bočicama za uzorkovanje. Volumen injektiranog uzorka je iznosio 50 µL.

3.6. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA

Identifikacija C18-sfingozina i C18-DL-*eritro*-sfinganina u uzorku utvrđivana je usporedbom vremena zadržavanja (engl. *retention time*, RT) analita koji se nalazi u ispitivanom uzorku s onim u vanjskom (eksternom) standardu. Kvantifikacija je izvršena preko kalibracijskog pravca dobivenog s vanjskim standardom (niz radnih standardnih otopina poznatih koncentracija u očekivanom rasponu). Standardima su snimljeni kromatogrami i površine pikova te su prikazani u ovisnosti o koncentraciji.

Dodatna potvrda, posebno kod nižih koncentracija, provedena je korištenjem unutarnjeg (internog) standarda C20 sfinganina uz pomoć kalibracijskog pravca, na način da je u kalibracijski niz radnih standardnih otopina isto kao i u uzorak dodana točno određena koncentracija internog standarda. Rezultat predstavlja omjer površine pika analiziranog sastojka i površine pika internog standarda u usporedbi s omjerom površine pika radne standardne otopine i površine pika internog standarda.

3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Za statističku analizu korišteni su programi za osobna računala i to IBM SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) i MedCalc 10.2.0. (Frank Schonjans, Belgium). Za analizirane parametre izračunate su srednja vrijednost i standardna devijacija i određena je normalnost raspodjele pomoću *Kolmogorov-Smirnov testa*. Analiza numeričkih varijabli između ispitivanih skupina je provedena korištenjem Studentovog *t*-testa (testiranje jednakosti aritmetičkih sredina dvaju neovisnih uzoraka). Interpretacija rezultata postavljena je na 5 %-tnoj razini značajnosti ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

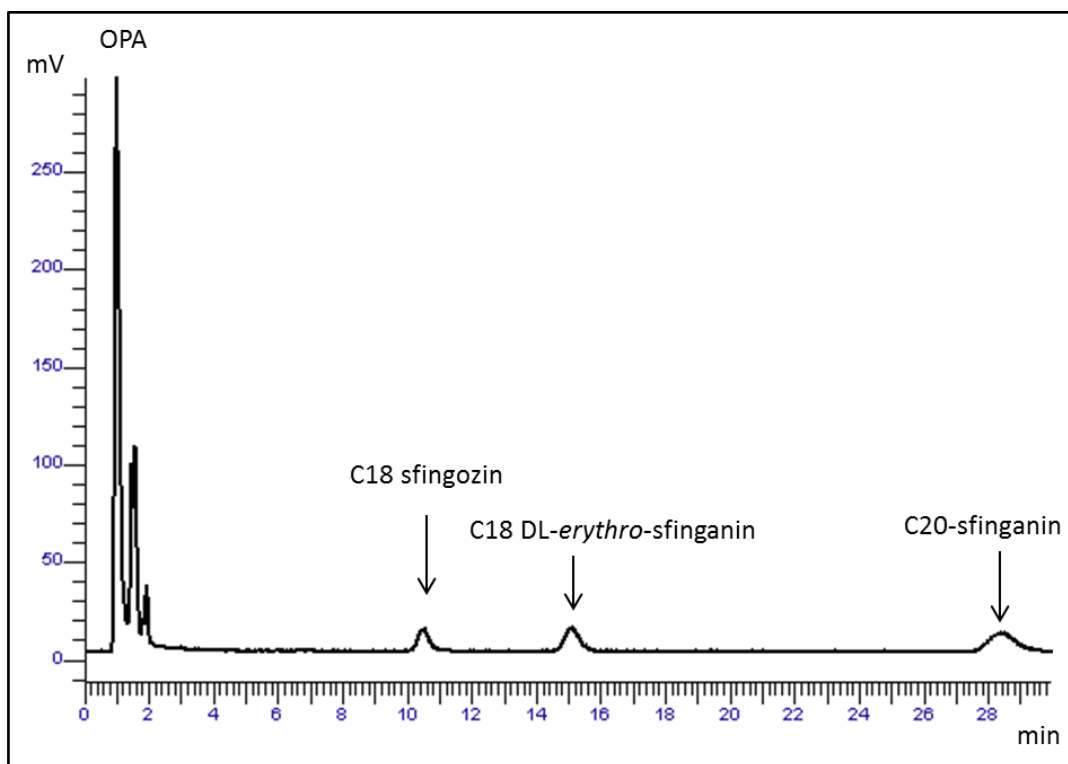
U ovome radu praćen je metabolizam sfingolipida u specifičnim uvjetima. Određivane su koncentracije ukupnih sfingoidnih baza, C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina, te njihovog omjera kod zdravih ispitanika (kontrolna skupina) i kod ispitanika s dijagnosticiranim MetS. Glavni cilj ovog istraživanja je bio utvrditi mogu li navedene sfingoidne baze, kao i njihovi omjeri poslužiti kao specifični biljezi (biomarkeri) metaboličkog sindroma (MetS). U tu svrhu određene su referentne koncentracije ukupnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika koji su po dobi, spolu i podrijetlu odgovarali skupini ispitanika s MetS. Također su određene i koncentracije ukupnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina seruma kod ispitanika s dijagnosticiranim MetS. Provedena je i usporedba koncentracija C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika i u serumu ispitanika s MetS s obzirom na spol kako bi se utvrdilo mogu li se muškarci i žene analizirati zajedno unutar pojedine skupine. U svrhu ostvarenja glavnog cilja ovog istraživanja provedena je usporedba koncentracija ukupnih sfingoidnih baza, C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina, između navedenih skupina (zdravi ispitanici i ispitanici s MetS) kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama i mogu li navedene baze poslužiti kao biomarkeri MetS. Rezultati su prikazani grafički kao srednja vrijednost (SV), dok je disperzija (devijacija) rezultata oko srednje vrijednosti izražena standardnom devijacijom (SD). Postojanje, odnosno nepostojanje statistički značajne razlike u koncentracijama sfingoidnih baza između analiziranih skupina, utvrđeno je Studentovim-*t*-testom.

Analize su napravljene na 20 rodbinski nepovezanih zdravih ispitanika (6 muškaraca i 14 žena) u dobi od 21 do 67 godina (srednja vrijednost (SV) \pm standardna devijacija (SD): 47,3 \pm 10,6 godine), odabranih za vrijeme rutinske medicinske kontrole i na 21 rodbinski nepovezanih ispitanika s dijagnosticiranim MetS (7 muškaraca i 14 žena) koji su izabrani među ambulantnim bolesnicima u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, u dobi od 28 do 67 godina (SV \pm SD: 47,7 \pm 9,5). Zdravi ispitanici su po dobi, spolu i podrijetlu odgovarali skupini ispitanika s MetS. Svim ispitanicima su načinjena antropometrijska mjerenja (tjelesna masa, visina i opseg struka, OS) i izračunat je indeks tjelesne mase (BMI) te je upitnikom ispitan način prehrane (mediteranska, kontinentalna ili miješana prehrana). U uzorcima seruma ispitanika provedena je kisela hidroliza prethodno ekstrahiranih sfingolipida u svrhu oslobađanja sfingoidnih baza iz kompleksnih sfingolipida (ukupne sfingoidne baze). Dobiveni

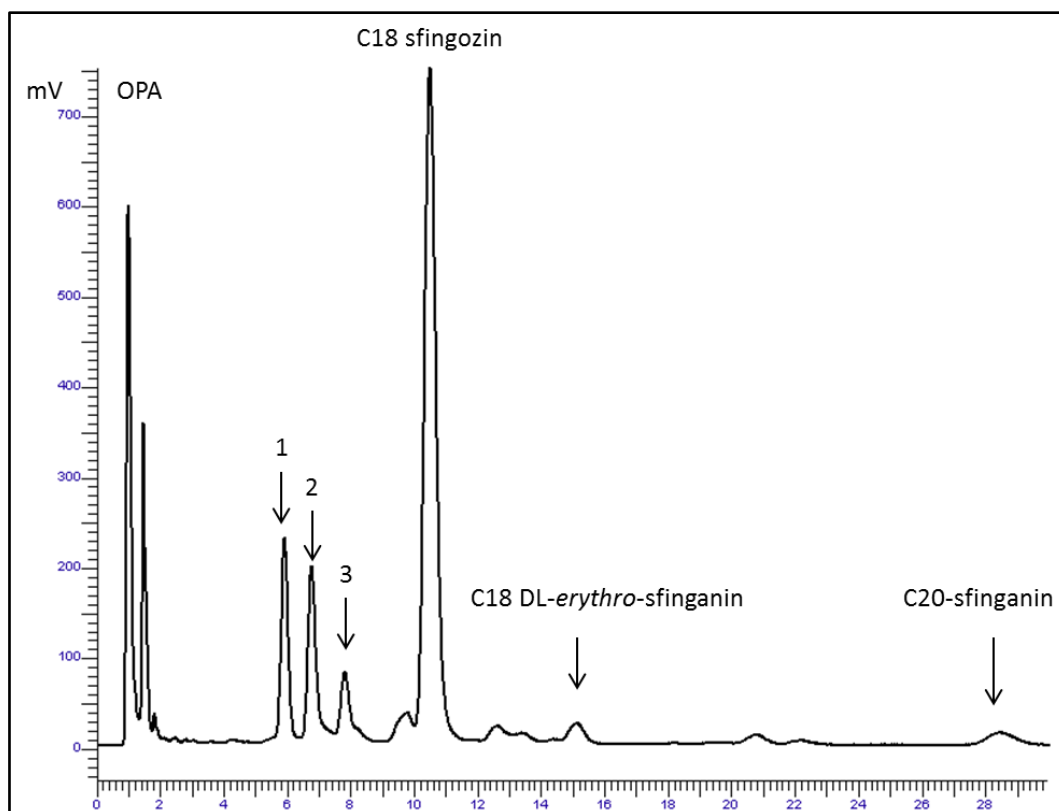
ekstrakti podvrgnuti su tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) u svrhu praćenja kvantitativnih promjena ukupnih sfingoidnih baza, C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina, u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim metaboličkim sindromom. Ekstrakcija sfingolipida za svaki analizirani uzorak seruma provedena je u duplikatu, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost.

4.1. SFINGOLIPIDI U SERUMU ZDRAVIH ISPITANIKA

Uzorci seruma zdravih ispitanika (6 muškaraca i 14 žena) podvrgnuti su ekstrakciji sfingolipida, nakon čega je uslijedila kisela hidroliza. Na Slikama 10 i 11 prikazani su tipični kromatogrami (standardi i uzorci) na temelju kojih je provedena kvantifikacija sfingoidnih baza. Identifikacija sfingoidnih baza u uzorku utvrđena je usporedbom njihovih retencijskih vremena (RT) s onim u vanjskom standardu pri istim uvjetima. Kvantifikacija je provedena preko kalibracijskog pravca niza radnih standardnih otopina dobivenog s vanjskim standardom. Dodatna potvrda, posebno kod nižih koncentracija, provedena je korištenjem unutarnjeg standarda C20 sfinganina, dodanog analiziranim serumima.



Slika 10. HPLC kromatogram smjese radnih standarda analiziranih kao OPA derivati pri faktoru prigušenja 1024

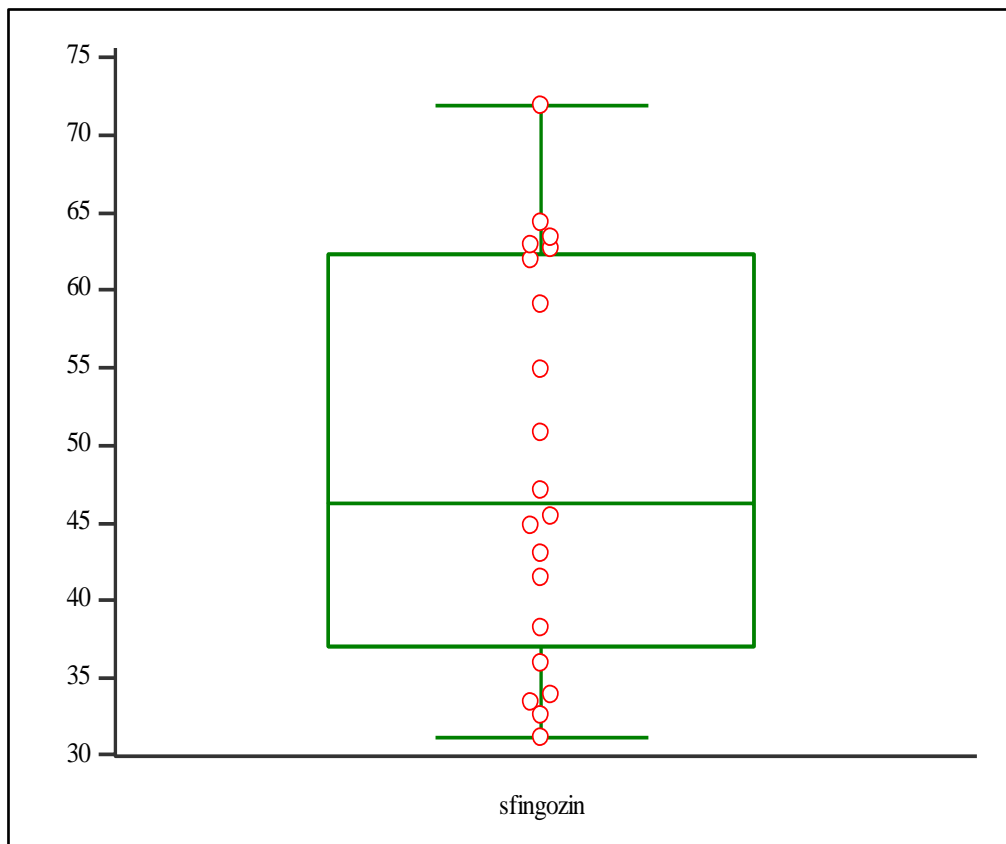


Slika 11. HPLC kromatogram ukupnih sfingoidnih baza ekstrahiranih iz seruma zdravih kontrola analiziranih kao OPA derivati pri faktoru prigušenja 1024

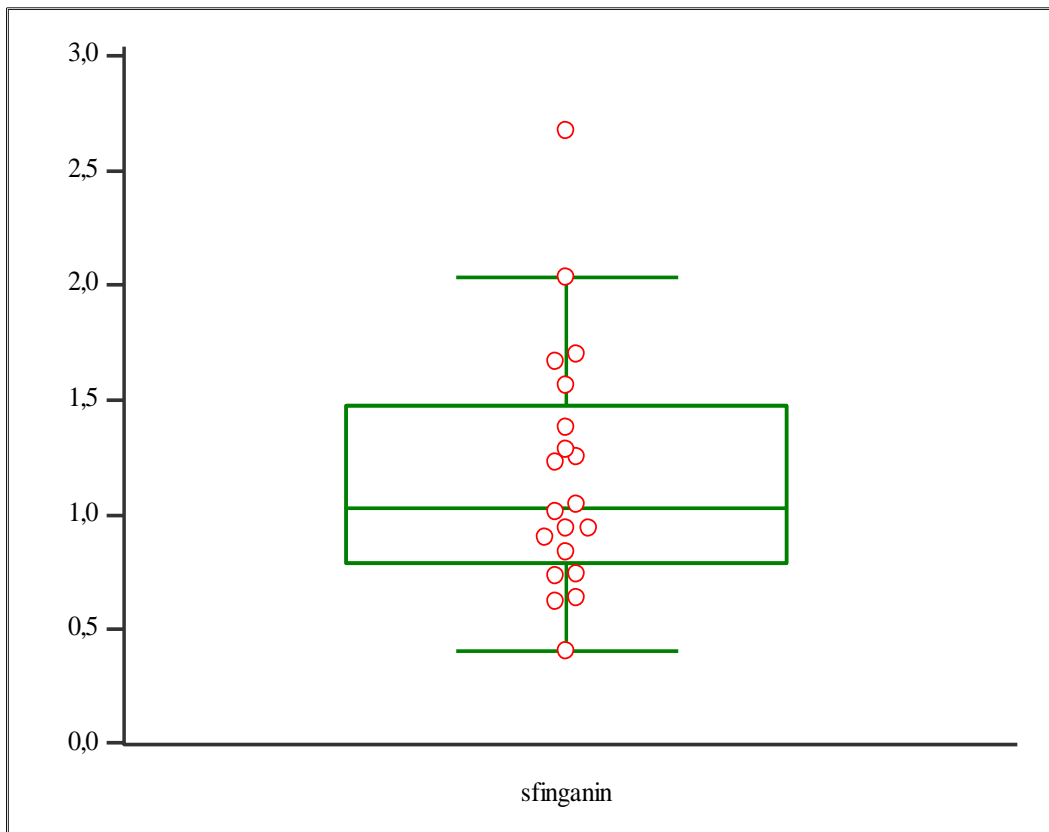
Dobiveni HPLC kromatogrami pokazali su pojavu pet OPA derivata sfingoidnih baza eluiranih iz kolone kod zdravih ispitanika i kod ispitanika s metaboličkim sindromom. Dvije vršne vrijednosti (dva pika) su identificirane usporedbom njihovih RT s onima u autentičnim standardima (C18 sfingozin i C18 DL-*erythro*-sfinganin) s tim da je HPLC analiza provedena pri identičnim uvjetima. Preostale OPA derivate nismu mogle biti identificirane zbog toga jer u radu nisu uporabljeni odgovarajući autentični standardi pa brojevi 1, 2 i 3 pokazuju njihov slijed eluiranja sa kolone. Budući da se razdvajanje analita s reverzno-faznim HPLC-om zasniva na razlikama u lipofilnosti i polarnosti (nepokretna faza je nepolarna, a mobilna faza polarna) što je komponenta nepolarnija duže će se zadržati na koloni, odnosno imat će dulje vrijeme retencije. Stoga smo zaključili da neidentificirani pikovi (pikovi 1, 2 i 3), s obzirom da se kraće zadržavaju na koloni u odnosu na pik koji odgovara C18 sfingozinu, svakako odgovaraju sfingoidnim bazama koje su polarnije od C18 sfingozina kao i od C18 DL-*erythro*-sfinganina. Jedna od njih bi mogla biti C18 fitosfingozin, sfingoidna baza koja se razlikuje od sfingozina po tome što nema *trans*-4,5-dvostruku vezu i ima hidroksilnu skupinu na C4 atomu. C18 fitosfingozin je najzastupljenija sfingoidna baza kvasaca, biljaka i plijesni, ali je u malim količinama pronađen i kod sisavaca (Merrill i sur., 1996). Iako u većini

sfingolipida sisavaca prevladavaju dugolančane baze s 18 ugljikovih atoma opisana je prisutnost i malih količina C20 fitosfingozina, stoga pretpostavljamo da bi jedna od OPA derivatiziranih baza koje se pojavljuju prije C18 sfingozina mogla biti i C20 fitosfingozin (Karlsson, 1964). Zanimljivo je primijetiti da nepoznati derivati čine znatan udio ukupnog postotka sfingoidnih baza od oko 2,08-18,66 % (OPA derivat 1: 5,03-11,13 %, OPA derivat 2: 5,41-18,66 %, OPA derivat 3: 2,08-6,03 %) te se čini se da predstavljaju uobičajene sfingoidne baze tipične za sisavce. Da bi potvrdili naše pretpostavke potrebno je daljnja istraživanja usmjeriti prema točnom identificiranju nepoznatih OPA derivatiziranih dugolančanih baza koje se pojavljuju prije C18 sfingozina primjenom LC-MS-a.

U zdravih ispitanika koncentracije ukupnog C18 sfingozina u serumu su se kretale od 31,24 do 71,92 nmol mL⁻¹ (SV ± SD: 48,98 ± 12,80 nmol mL⁻¹), dok su koncentracije ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu iznosile 0,41 do 2,67 nmol mL⁻¹ (SV ± SD: 1,18 ± 0,54 nmol mL⁻¹). Empirijska normalnost raspodjele određena *Kolmogorov-Smirnovim* testom pokazala je da su koncentracije C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika normalne raspodjele ($p > 0,1$ za sfingozin isto kao i za sfinganin) što je prikazano na Slikama 12 i 13.

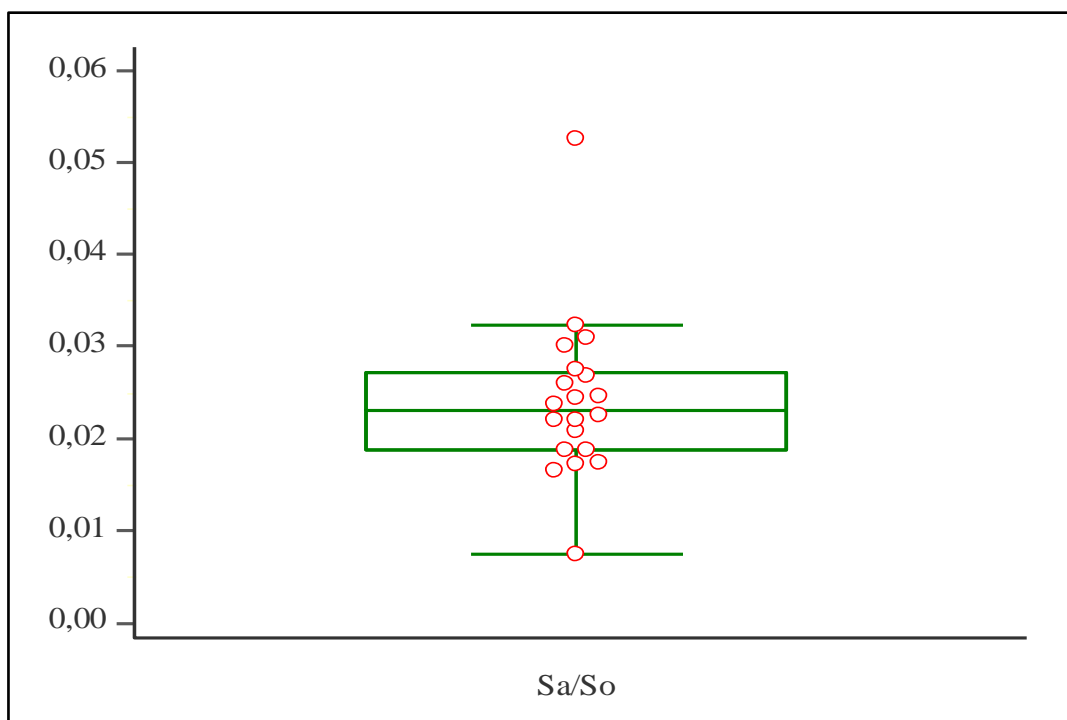


Slika 12. Prikaz normalnosti raspodjele koncentracije C18 sfingozina kod zdravih ispitanika



Slika 13. Prikaz normalnosti raspodjele koncentracije C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika

Istim statističkim testom utvrđeno je da omjer ukupnog C18 sfinganina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu također pokazuje normalnost raspodjele (Slika 14).



Slika 14. Prikaz normalnosti raspodjele omjera C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika

Omjer ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina u serumu bio je u rasponu od 0,007 do 0,053 (SV \pm SD: 0,024 \pm 0,009). Iz kromatograma kao i iz analiziranih rezultata vidljivo je da je najmanje zastupljena sfingoidna baza u serumu C18-DL-*erythro*-sfinganin s udjelom od 1,2-4,6% ukupnih sfingoidnih baza, dok je najviše zastupljena sfingoidna baza C18 sfingozin s udjelom od 58,5-75,5 % ukupnih sfingoidnih baza. Rezultati potvrđuju činjenicu je da je C18 sfingozin najzastupljenija sfingoidna baza kompleksnih sfingolipida sisavaca (Merrill, 2011), dok je najmanje zastupljena baza C18-DL-*erythro*-sfinganin. Dobiveni rezultati su u skladu s pretpostavkom da se prilikom *de novo* biosinteze sfingolipida uvođenje 4-*trans* dvostruke veze zbiva nakon amidnog vezanja masne kiseline na sfinganin (Merrill, 2011; van Echten-Deckert i Herget, 2006). Navedeno ukazuje na to da slobodni C18 sfingozin nije međuprodukt u *de novo* sintezi sfingolipida, te se u stanici u slobodnom obliku nalazi samo kao produkt hidrolize ceramida i/ili kompleksnijih sfingolipida, čime se potvrđuje i njegova uloga drugog glasnika u stanici.

U istraživanju koje su proveli Wei i sur. (2014) na uzorku od 23 zdrava ispitanika u dobi od 28-58 godina, pri čemu je u istraživanje bilo uključeno 11 ženskih ispitanika, dobivene su vrijednosti za koncentraciju sfingozina u serumu od 103,9 \pm 25,4 nmol mL⁻¹ (izraženo kao SV \pm SD), a za koncentraciju sfinganina u serumu vrijednosti od 2,9 \pm 1,0 nmol mL⁻¹. Slične

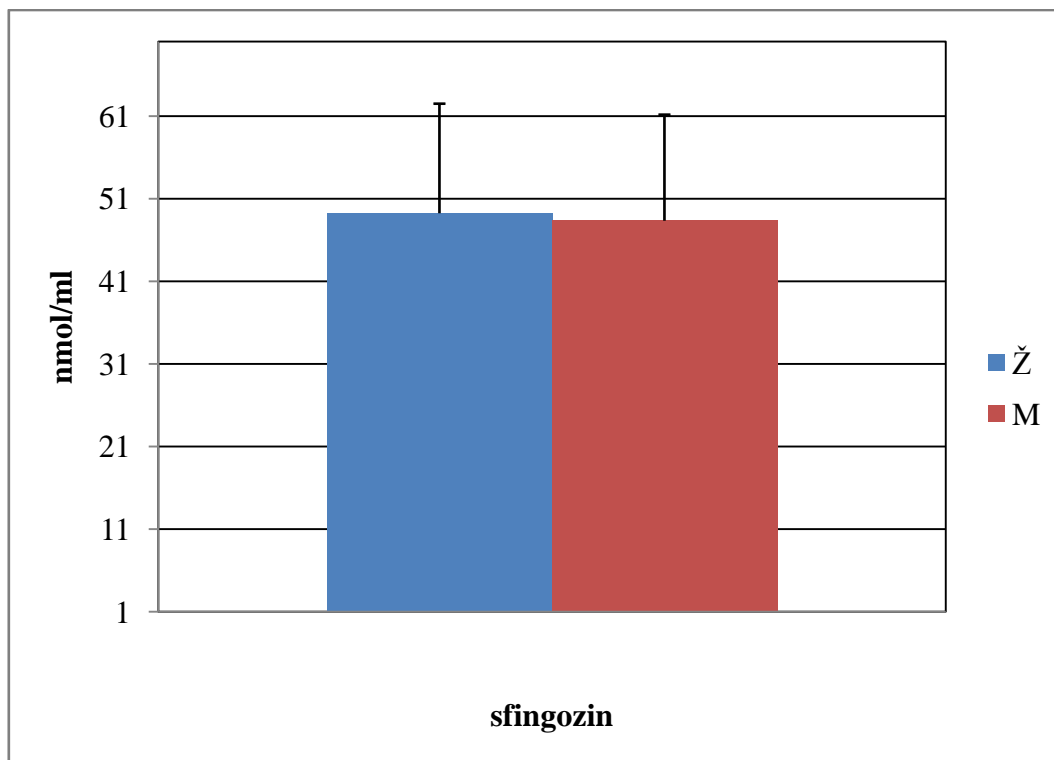
rezultate su dobili i Othman i sur. (2012) koji su istraživanje proveli na uzorku od 25 zdrava ispitanika u dobi od 57-65 godina pri čemu je bilo uključeno 10 ženskih ispitanika. Dobili su vrijednosti za koncentraciju sfingozina u serumu od $88,83 \pm 27,23 \text{ nmol mL}^{-1}$, a za koncentraciju sfinganina u serumu $2,17 \pm 0,9 \text{ nmol mL}^{-1}$.

Usporedbom vrijednosti koncentracije sfingozina i sfinganina u serumu zdravih ispitanika navedenih autora (Othman i sur., 2012; Wei i sur., 2014) s dobivenim vrijednostima u ovom radu, može se primijetiti da su dobivene vrijednosti koncentracija ukupnog sfingozina i sfinganina znatno niže od vrijednosti koncentracija koje su dobili spomenuti autori. Othman i sur. (2012) su proveli istraživanje i na štakorima pri čemu su dobivene vrijednosti za koncentraciju sfingozina $24,3 \pm 7,6 \text{ nmol/L}$, te za koncentraciju sfinganina $1,0 \pm 0,5 \text{ nmol/L}$, što je znatno niže u odnosu na rezultate u ovom radu.

Neslaganje rezultata se može pripisati određenim vanjskim čimbenicima, ali i genetičkim preduvjetima, koji su mogli dovesti do zapaženih odstupanja. Također su uzorci navedenih istraživanja analizirani LC-MS metodom (tekućinska kromatografija-masena spektrometrija), dok je u ovom radu provedena HPLC analiza što je također moglo doprinjeti neslaganju rezultata. Osim navedenog, razlika u koncentraciji je bila neizbježna i zbog toga što su navedena istraživanja uključivala i rezultate bazne hidrolize čija je svrha cijepanje acilglicerolipida i lizosfingolipida (slobodne sfingoidne baze modificirane na C1 hidroksilnoj skupini) u svrhu otpuštanja slobodnih sfingoidnih baza. Stoga bi bilo potrebno provesti i baznu hidrolizu sfingolipida radi realnije usporedbe.

4.1.1. Usporedba koncentracije sfingoidnih baza i njihovih omjera u serumu muških i ženskih zdravih ispitanika

Koncentracija ukupnog C18 sfingozina (izražena kao $SV \pm SD$) kod zdravih muških ispitanika je iznosila $48,34 \pm 12,83 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ženskih $49,25 \pm 13,25 \text{ nmol mL}^{-1}$ što je prikazano na Slici 15. U istraživanju koje su proveli Ribar i sur. (2003) koncentracija C18 sfingozina kod muških ispitanika (20 M) je iznosila $28,28 \pm 8,96 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ženskih $22,52 \pm 10,19 \text{ nmol mL}^{-1}$ (20 Ž) što je znatno niže od vrijednosti izmjerenih u ovom radu.

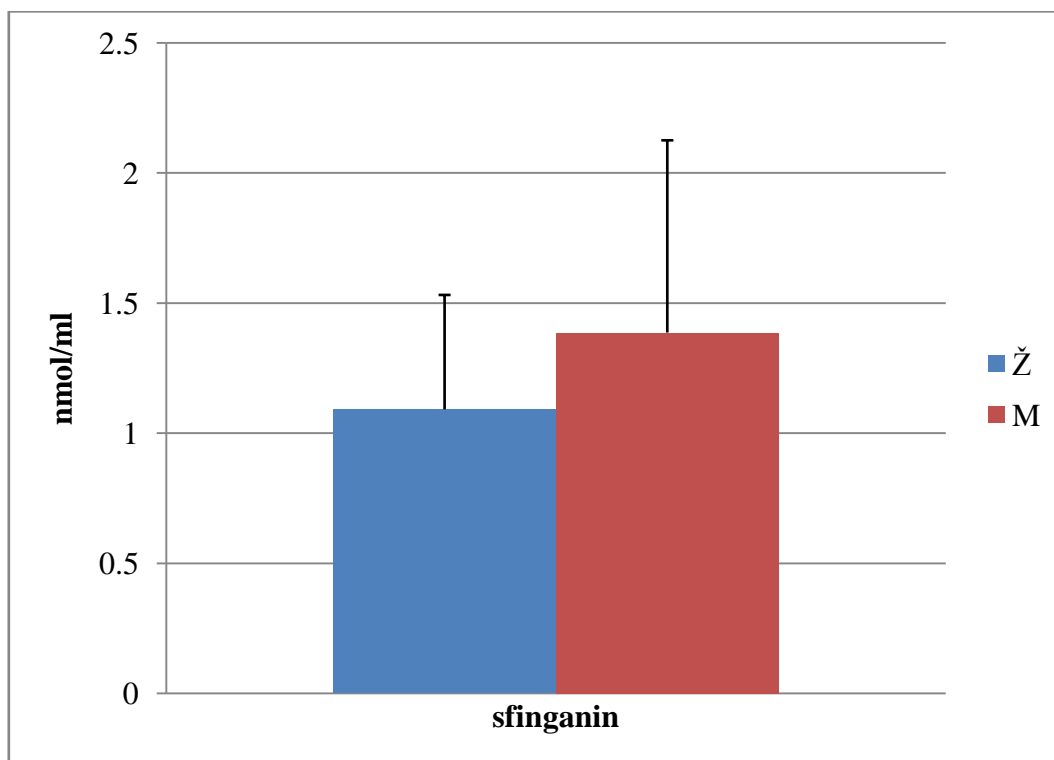


Slika 15. Koncentracije ukupnog C18 sfingozina u serumu zdravih muških i ženskih ispitanika (M=muškarci, Ž=žene)

Analiza rezultata *t*-testom je pokazala da nema statistički značajne razlike u koncentraciji C18 sfingozina u serumu zdravih muškaraca i žena ($p=0,8892$), što je u skladu sa spomenutim istraživanjem (Ribar i sur., 2003) gdje također nije bilo statističke značajne razlike u koncentraciji sfingozina u serumu zdravih muškaraca i žena. Međutim, u ovom istraživanju broj ženskih ispitanika je znatno viši u odnosu na muške ispitanike što je moglo doprinijeti nepostojanju razlike.

Koncentracija ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu muških ispitanika je iznosila $1,39 \pm 0,74 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ženskih $1,09 \pm 0,44 \text{ nmol mL}^{-1}$ (Slika 16) što je primjetno više u odnosu na rezultate Ribar i sur. (2003) gdje je koncentracija ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu muških ispitanika iznosila $0,61 \pm 0,15 \text{ nmol mL}^{-1}$, a u serumu ženskih ispitanika $0,58 \pm 0,25 \text{ nmol mL}^{-1}$. Značajne razlike u koncentraciji C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u odnosu na spomenuto istraživanje se možda mogu objasniti dobnom razlikom između analiziranih skupina budući da se navedeno istraživanje odnosilo na mlađu populaciju u dobi od 29 ± 5 godina (20 M) i 23 ± 3 godina (20 Ž). Promjenu koncentracije sfingoidnih baza s obzirom na dob istražili su Lightle i sur. (2000) na mlađim i starijim

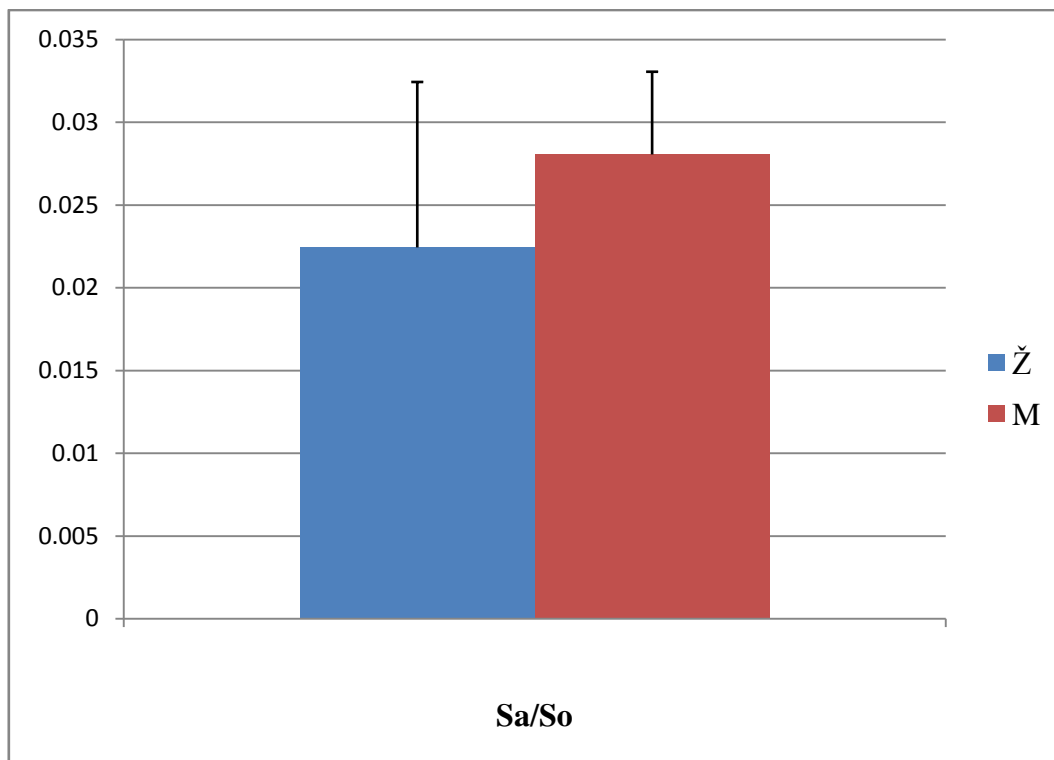
štakorima, pri čemu su utvrdili smanjenje sinteze sfingomijelina i povećanje ceramidazne aktivnosti (pojačana razgradnja sfingomijelina) kod starijih štakora što je rezultiralo povećanjem koncentracije C18 sfingozina. Abnet i sur. (2001) su to potvrdili na ljudskom modelu gdje je pronađeno značajno povišenje koncentracije sfingozina kod starijih ispitanika u odnosu na mlađe.



Slika 16. Koncentracije ukupnog C18 DL-erythro-sfinganina u serumu zdravih muških i ženskih ispitanika

t-test je pokazao da nema statistički značajne razlike u koncentraciji C18 DL-erythro-sfinganina u serumu zdravih muškaraca i žena ($p=0,2771$) što se slaže s rezultatima koje su dobili Ribar i sur. (2003).

Omjer ukupnog C18-DL-erythro-sfinganina i C18 sfingozina u serumu kod muških ispitanika iznosio je $0,028 \pm 0,012$, a kod ženskih ispitanika $0,022 \pm 0,007$ (Slika 17) što je približno jednako vrijednostima Ribar i sur. (2003) koji su dobili vrijednosti za omjer ukupnog C18 DL-erythro-sfinganina i C18 sfingozina od $0,02 \pm 0,01$ za muškarce i $0,03 \pm 0,01$ za žene.



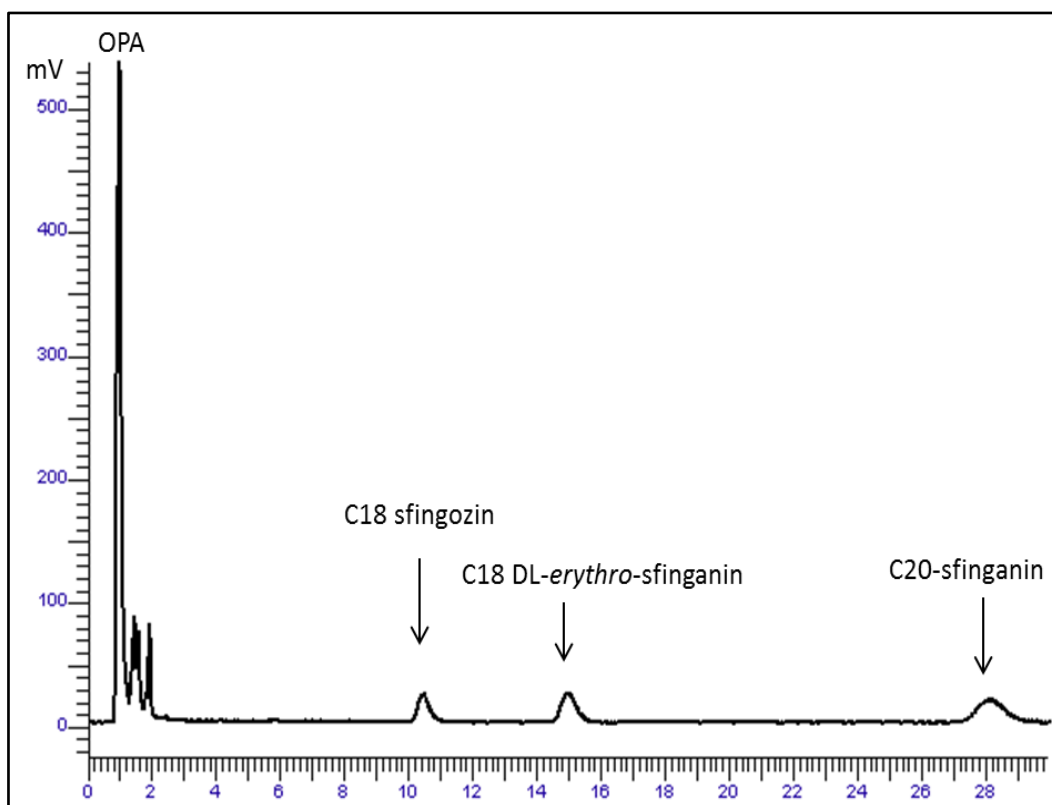
Slika 17. Omjeri C18-DL-erythro-sfinganina (Sa) i C18 sfingozina (So) u serumu zdravih muških i ženskih ispitanika

t-testom je dokazano da nema statistički značajne razlike u omjeru ukupnog C18-DL-erythro-sfinganina i C18 sfingozina u serumu zdravih muškaraca i žena ($p=0,2015$) kao i kod Ribar i sur. (2003).

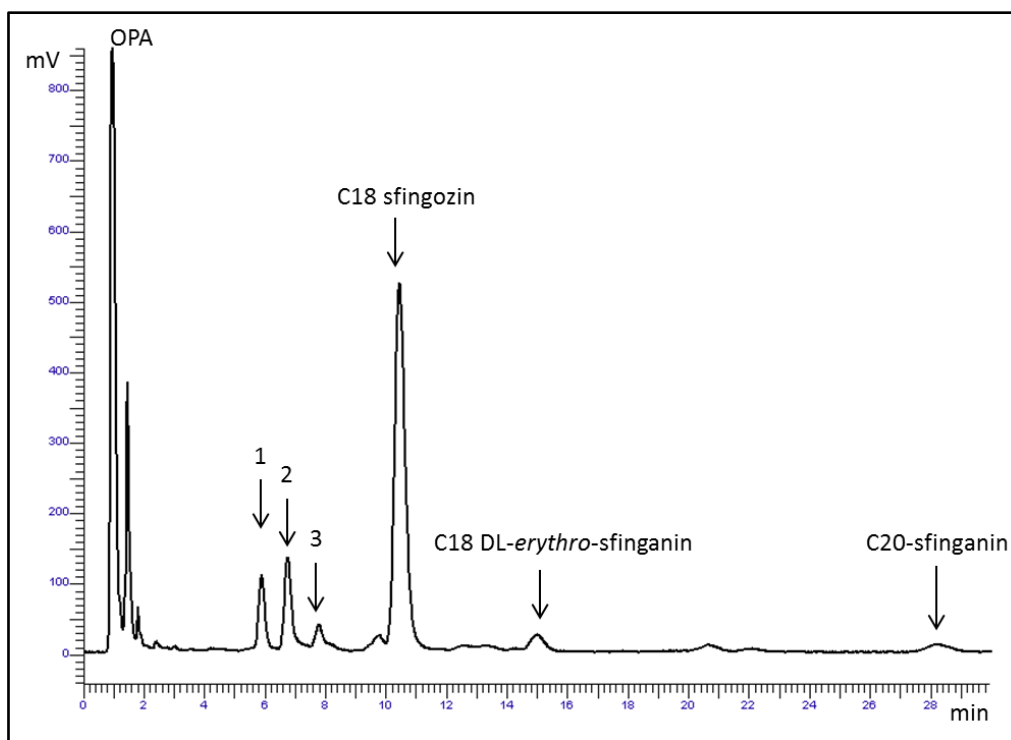
Dobiveni rezultati su pokazali da nema razlike u koncentraciji ukupnih sfingoidnih baza (C18-DL-erythro-sfinganina i C18 sfingozina), kao i njihovog omjera, između muških i ženskih ispitanika što je u skladu s rezultatima istraživanja provedenog u Kini gdje također nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji C18 sfingozina i C18-DL-erythro-sfinganina kao ni omjera C18-DL-erythro-sfinganina i C18 sfingozina između muških i ženskih ispitanika (Abnet i sur., 2001). U navedenom istraživanju je sudjelovalo 129 muškaraca i 136 žena u dobi od 40-69 godina. Nepostojanje razlike u koncentracijama sfingoidnih baza između muškaraca i žena potvrdili su i van der Westhuizen i sur. (1999) istraživanjem provedenim u Keniji i Istočnoj Africi (2 regije) na većem broju muških i ženskih ispitanika u dobi od 43-60 godina.

4.2. SFINGOLIPIDI U SERUMU ISPITANIKA S DIJAGNOSTICIRANIM METABOLIČKIM SINDROMOM

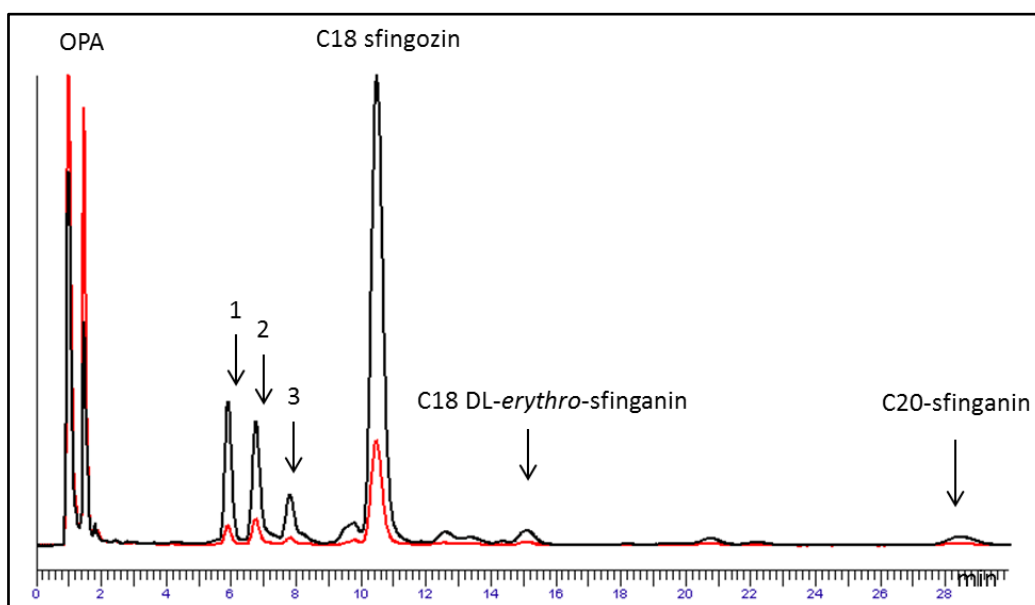
Uzorci seruma ispitanika (7 muškaraca i 14 žena) s dijagnosticiranim MetS podvrgnuti su ekstrakciji sfingolipida, nakon čega je uslijedila kisela hidroliza. Na Slikama 18 i 19 prikazani su tipični kromatogrami (standardi i uzorci) na temelju kojih je provedena kvantifikacija sfingoidnih baza. HPLC analiza sfingoidnih baza u serumu ispitanika s MetS provedena pri identičnim uvjetima kao i analiza sfingoidnih baza u serumu zdravih kontrola (Slika 20).



Slika 18. HPLC kromatogram smjese radnih standarda analiziranih kao OPA derivati pri faktoru prigušenja 512

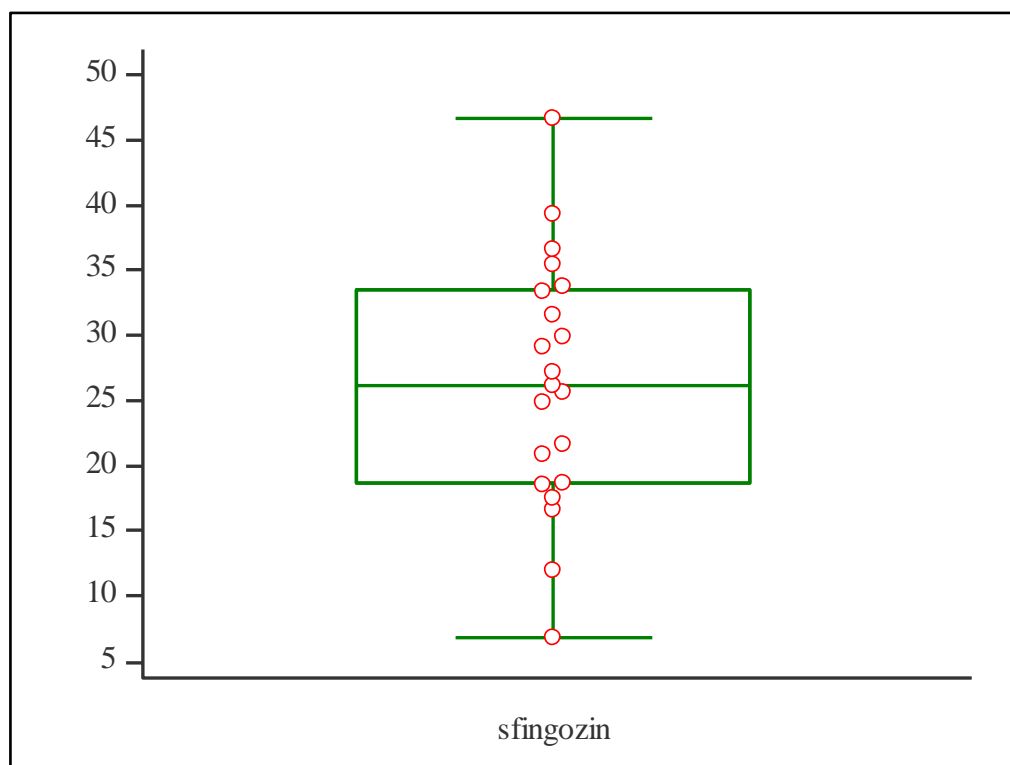


Slika 19. HPLC kromatogram ukupnih sfingoidnih baza ekstrahiranih iz seruma ispitanika s dijagnosticiranim MetS analiziranih kao OPA derivati pri faktoru prigušenja 512

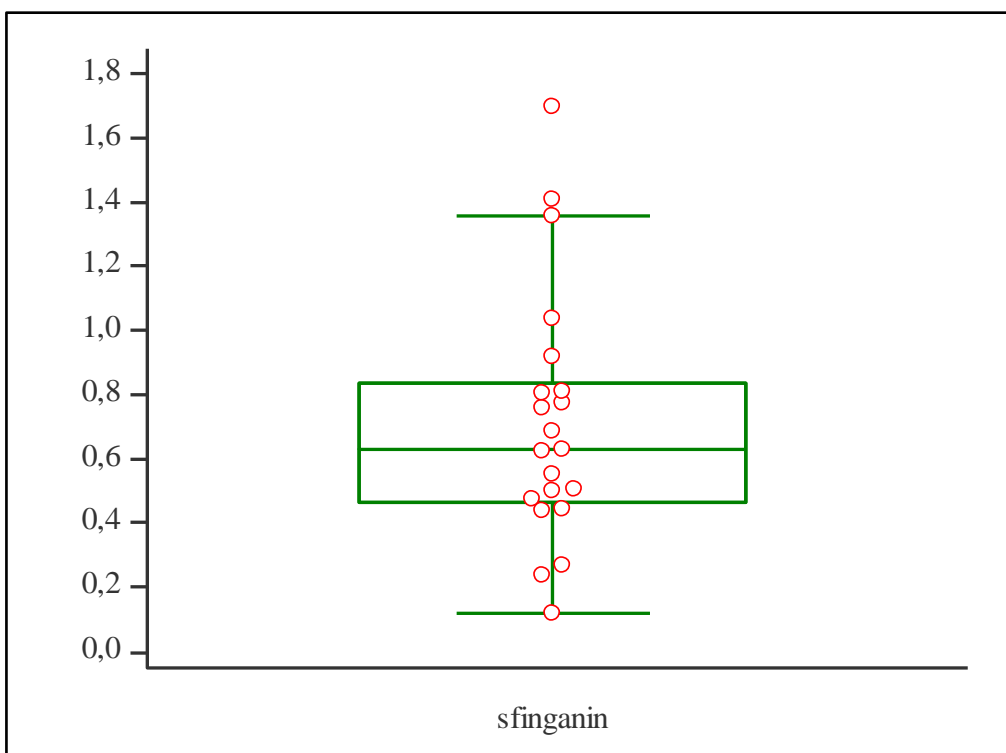


Slika 20. Preklapajući prikaz i HPLC kromatograma ukupnih sfingoidnih baza ekstrahiranih iz seruma zdravih kontrola (crno) i iz seruma ispitanika s MetS (crveno) analiziranih kao OPA derivati pri faktoru prigušenja 1024

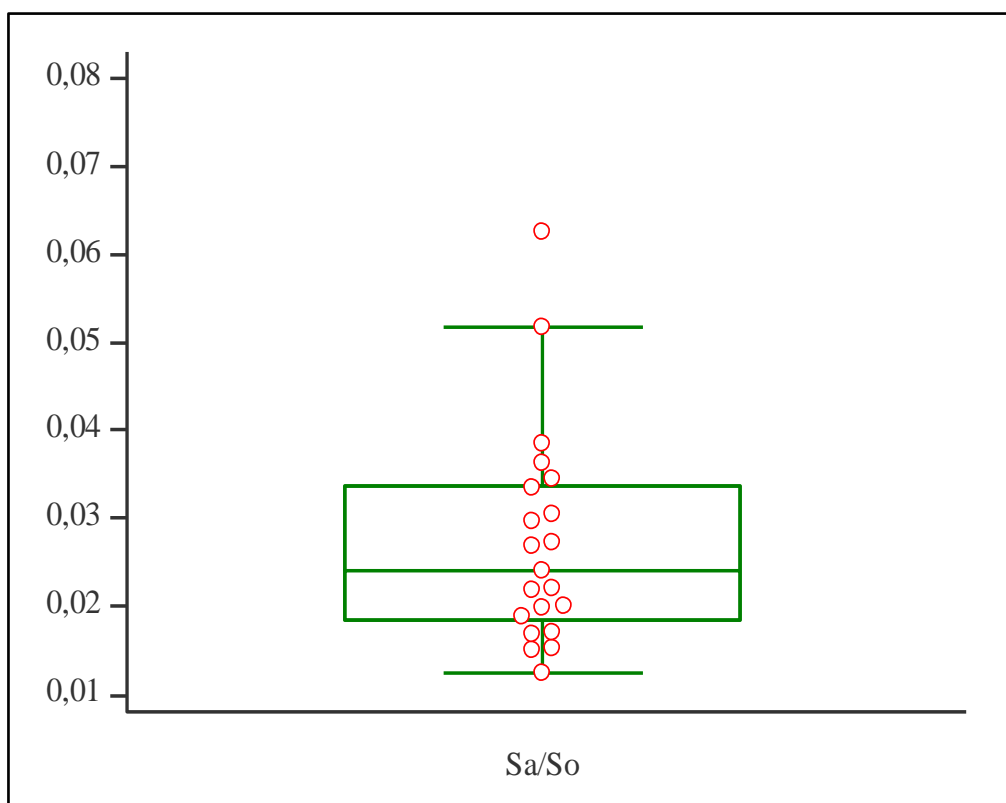
Dobiveni HPLC kromatogrami pokazali su pojavu pet OPA derivata sfingoidnih baza eluiranih iz kolone isto kao i kod zdravih ispitanika prisutnih u sličnim postotcima u odnosu na ukupne sfingoidne baze (59,4-74,6 % za sfingozin; 0,93-4,18 % za sfinganin, 2,69-23,75 % za OPAderivate sfingidinih baza (OPA derivat 1: 5,12-11,33 %, OPA derivat 2: 7,69-23,75 %, OPA derivat 3: 2,69-5,54 %)) kao i kod kontrolne skupine, stoga vrijede iste pretpostavke koje smo naveli kod analize HPLC kromatograma za zdrave ispitanike. Identifikacija sfingoidnih baza u uzorku utvrdila se na isti način kao i kod zdravih ispitanika. U ispitanika s dijagnosticiranim MetS koncentracije ukupnog C18 sfingozina su se kretale od 6,85 do 46,64 nmol mL⁻¹ (SV ± SD: 26,29 ± 9,63 nmol mL⁻¹), dok su koncentracije ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina iznosile od 0,12 do 1,69 nmol mL⁻¹ (SV ± SD: 0,72 ± 0,40 nmol mL⁻¹). Empirijska normalnost raspodjele određivana je *Kolmogorov-Smirnovim* testom koji je pokazao da su koncentracije C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika normalne raspodjele ($p > 0,1$ za C18 sfingozin isto kao i za C18-DL-*erythro*-sfinganina) što je prikazano na Slikama 21 i 22. Istim statističkim testom utvrđeno je da omjer ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina također pokazuje normalnost raspodjele (Slika 23). Omjer ukupnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina bio je u rasponu 0,012 do 0,062 (SV ± SD: 0,027 ± 0,013).



Slika 21. Prikaz normalnosti raspodjele koncentracije C18 sfingozina kod ispitanika s MetS



Slika 22. Prikaz normalnosti raspodjele koncentracije C18-DL-*erythro*-sfinganina kod ispitanika s MetS



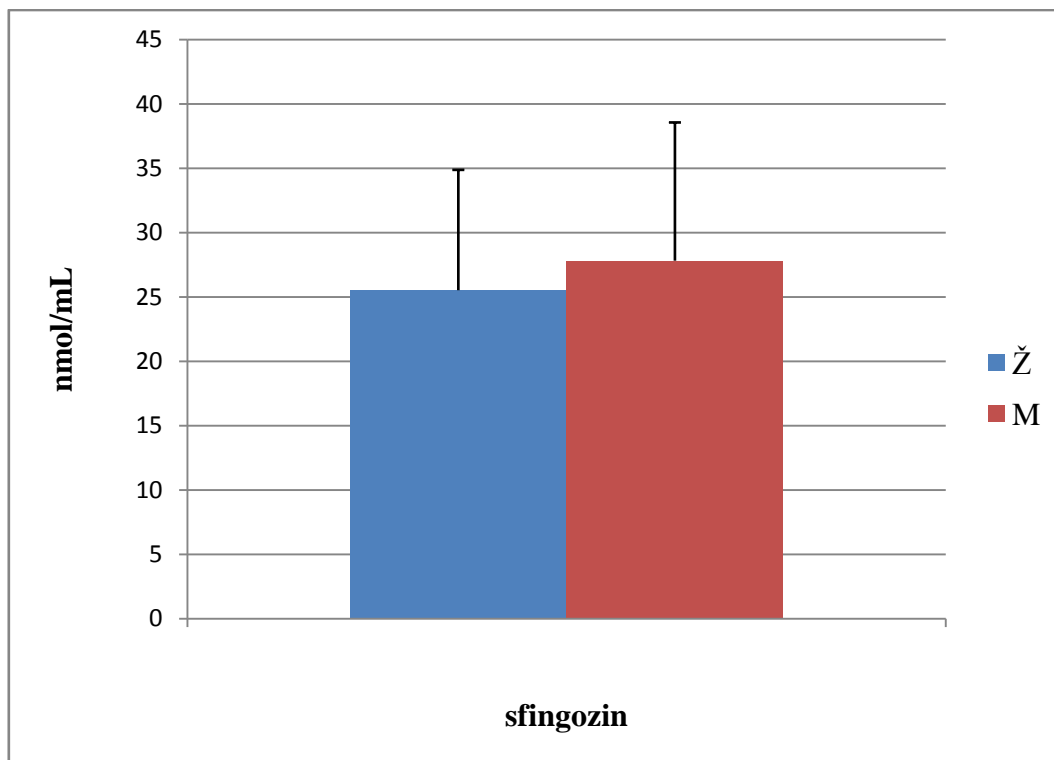
Slika 23. Prikaz normalnosti raspodjele omjera C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina i kod ispitanika s MetS

U istraživanju koje su proveli Othman i sur. (2012) dobivene su koncentracije za C18 sfingozin od $81,66 \pm 21,28 \text{ mol mL}^{-1}$ te za C18-DL-*erythro*-sfinganina $2,2 \pm 0,77 \text{ nmol mL}^{-1}$ kod ispitanika oboljelih od MetS što je znatno više od rezultata dobivenih u ovom radu. Navedeno istraživanje je uključivalo i ispitanike s dijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 2, pri čemu nije pronađena razlika u koncentracijama sfingozina i sfinganina između ispitanika s MetS i šećernom bolesti tipa 2. Wei i sur. (2014) su istraživanje proveli samo s ispitanicima oboljelim od šećerne bolesti tipa 2 te dobili vrijednosti za C18 sfingozin $87,1 \pm 20,4 \text{ nmol mL}^{-1}$, a za C18-DL-*erythro*-sfinganina $2,4 \pm 0,6 \text{ nmol mL}^{-1}$ u serumu bolesnih ispitanika. Razlike u rezultatima navedenih istraživanja te ovog istraživanja mogu se potkrijepiti istim pretpostavkama kao kod rezultata zdravih ispitanika.

4.2.1. Usporedba koncentracije sfingoidnih baza i njihovih omjera u serumu muških i ženskih ispitanika s dijagnosticiranim MetS

Dobiveni rezultati koncentracije ukupnog C18 sfingozina kod muških ispitanika s dijagnosticiranim MetS iznosili su $27,82 \pm 10,74 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ženskih $25,53 \pm 9,53 \text{ nmol mL}^{-1}$ (Slika 24).

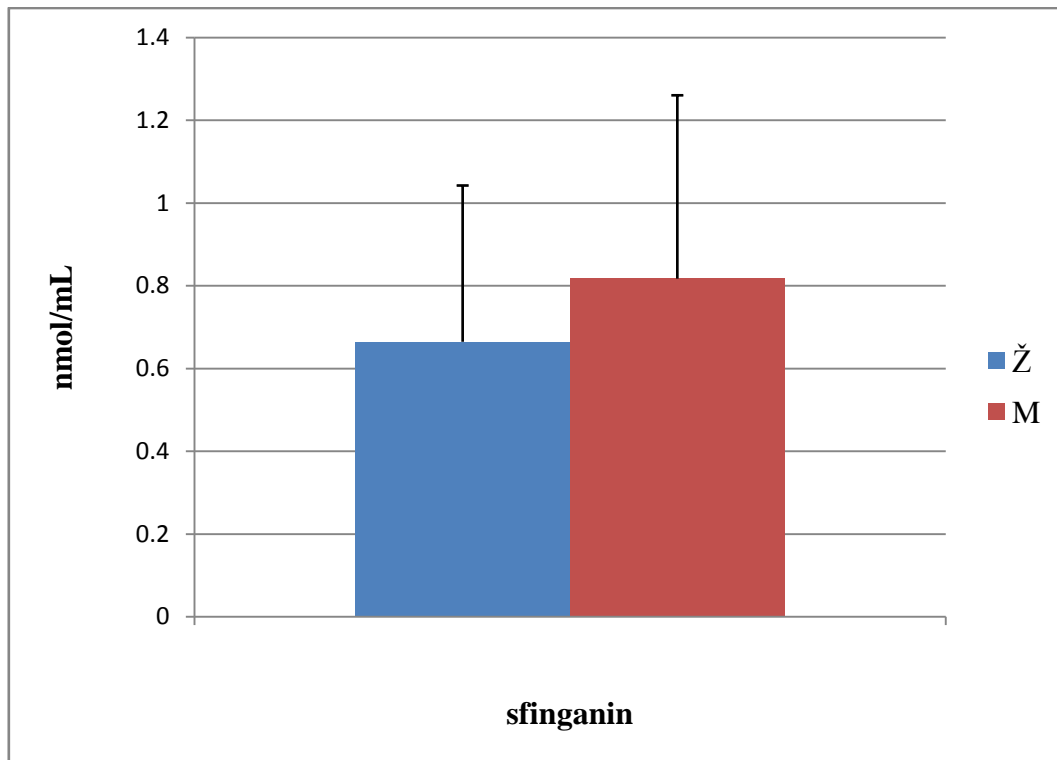
Zasad ne postoje literaturni navodi koji pokazuju koncentraciju sfingodinih baza kod muških i ženskih ispitanika s dijagnosticiranim MetS te njihovu usporedbu, stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se potvrdili dobiveni rezultati.



Slika 24. Koncentracije ukupnog C18 sfingozina u serumu muških i ženskih ispitanika s dijagnostičiranim MetS

t-test je pokazao da nema statistički značajne razlike u koncentraciji C18 sfingozina u serumu muškaraca i žena s dijagnostičiranim MetS ($p=0,6192$).

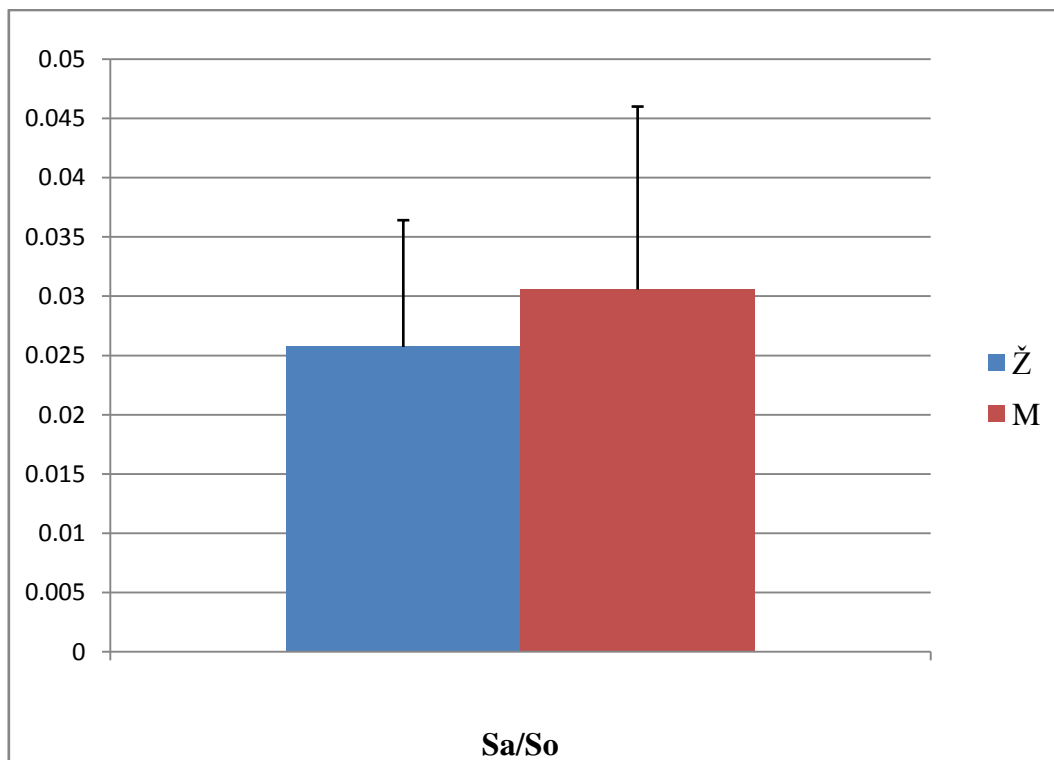
Koncentracija ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina kod muških bolesnih ispitanika je iznosila $0,87 \pm 0,44 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ženskih $0,66 \pm 0,38 \text{ nmol mL}^{-1}$ (Slika 25).



Slika 25. Koncentracije ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu muških i ženskih ispitanika s dijagnosticiranim MetS

t-test je pokazao da nema statistički značajne razlike u koncentraciji C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu muškaraca i žena s dijagnosticiranim MetS ($p=0,4196$).

Omjer ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina kod muških bolesnih ispitanika je iznosio $0,031 \pm 0,015$, a kod ženskih $0,026 \pm 0,011$ (Slika 26).



Slika 26. Omjeri ukupnog C18 DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina (Sa/So) u serumu muških i ženskih ispitanika s dijagnosticiranim MetS

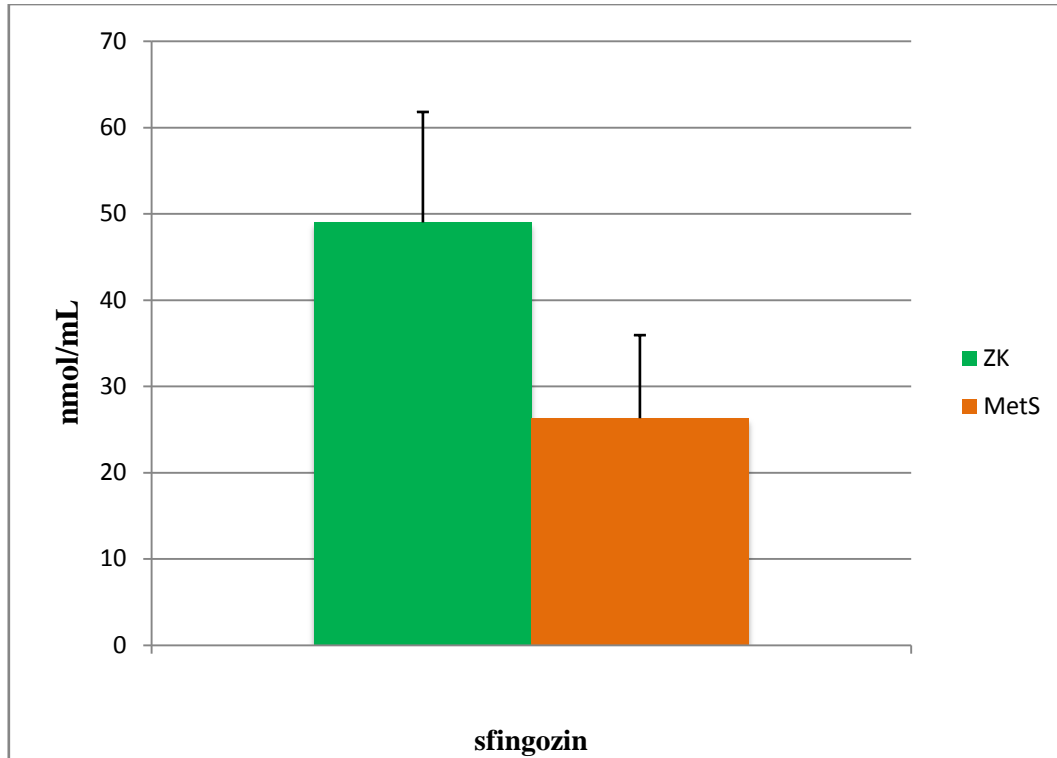
t-test je pokazao da nema statistički značajne razlike u omjeru C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina u serumu muškaraca i žena s dijagnosticiranim MetS ($p=0,4162$).

Budući da istraživanje nije pokazalo statistički značajne razlike u koncentracijama sfingoidnih baza i njihovih omjera ni kod zdravih ni kod bolesnih ispitanika, sve daljnje analize ćemo raditi tako da su muškarci i žene u istoj skupini kod obje skupine (zdravi ispitanici i ispitanici s MetS).

4.3. USPOREDBA KONCENTRACIJE SFINGOIDINIH BAZA I NJIHOVIH OMJERA U SERUMU ZDRAVIH ISPITANIKA I ISPITANIKA S DIJAGNOSTICIRANIM MetS

Usporedba srednjih vrijednosti koncentracije sfingozina provedena *t*-testom kod zdravih ispitanika (nazvani zdrava kontrola, ZK) i ispitanika s dijagnosticiranim MetS je prikazana na Slici 27. Koncentracija C18 sfingozina kod zdravih ispitanika iznosila je $48,98 \pm 12,80 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod oboljelih ispitanika iznosila je $26,29 \pm 9,63 \text{ nmol mL}^{-1}$. Rezultati

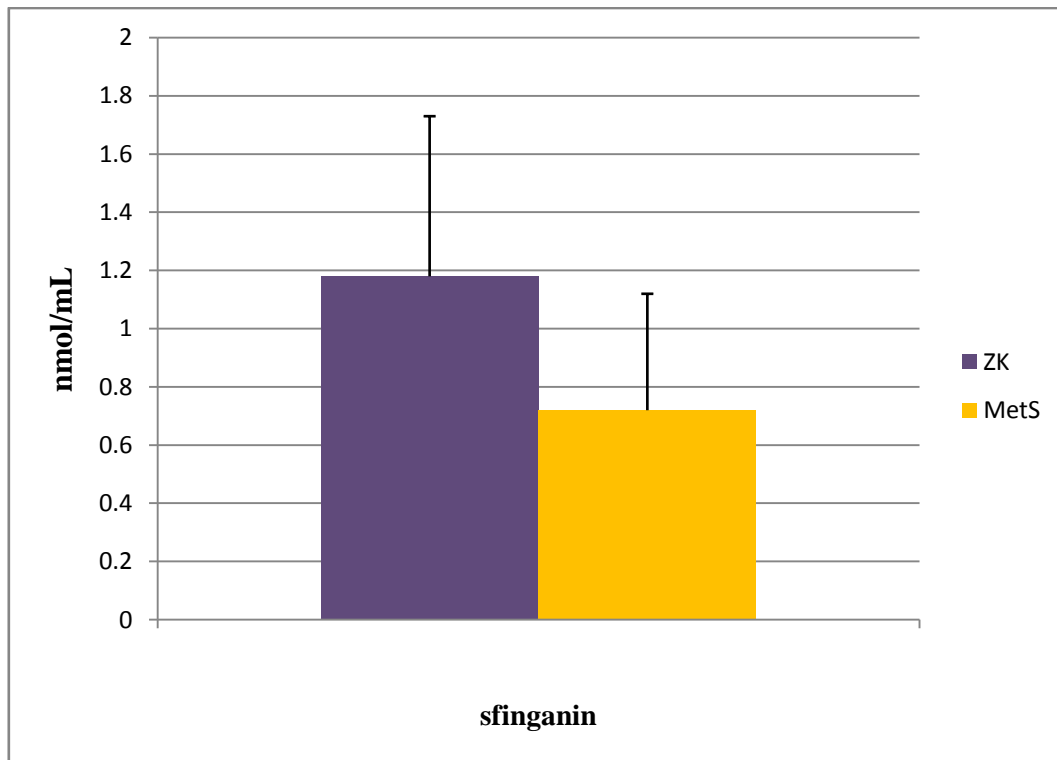
pokazuju da je koncentracija C18 sfingozina u serumu ispitanika s metaboličkim sindromom 46% niža u odnosu na koncentraciju C18 sfingozina u serumu zdravih ispitanika.



Slika 27. Koncentracije ukupnog C18 sfingozina u serumu kod zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS

Utvrđena je statistički značajna razlika (*t*-test) u koncentraciji C18 sfingozina u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS ($p < 0,001$).

Usporedba koncentracije C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS je prikazana na Slici 28. Koncentracija C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika iznosila je $1,18 \pm 0,55 \text{ nmol mL}^{-1}$, a kod ispitanika s dijagnosticiranim MetS $0,72 \pm 0,40 \text{ nmol mL}^{-1}$, odnosno 39% niža u odnosu na zdrave ispitanike.



Slika 28. Koncentracije ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS

Ustanovljena je statistički značajna razlika u koncentraciji C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS (t -test, $p=0,0032$).

Dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji ukupnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina između zdravih ispitanika i ispitanika kojima je dijagnosticiran MetS. Rezultati istraživanja nisu u skladu s rezultatima koje su dobili Wei i sur. (2014), te Othman i sur. (2012). Naime, navedeni autori nisu pronašli značajnu razliku u koncentraciji C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina među zdravim i oboljelim ispitanicima. Njihovi rezultati su pokazali značajnu razliku samo u koncentraciji deoksifingoidnih baza (sinteza iz L-alanina) koje su bile povišene u plazmi pacijenata s dijagnosticiranim MetS i šećernom bolesti tipa 2 pa su ih predložili kao potencijalne biomarkere navedenih bolesti.

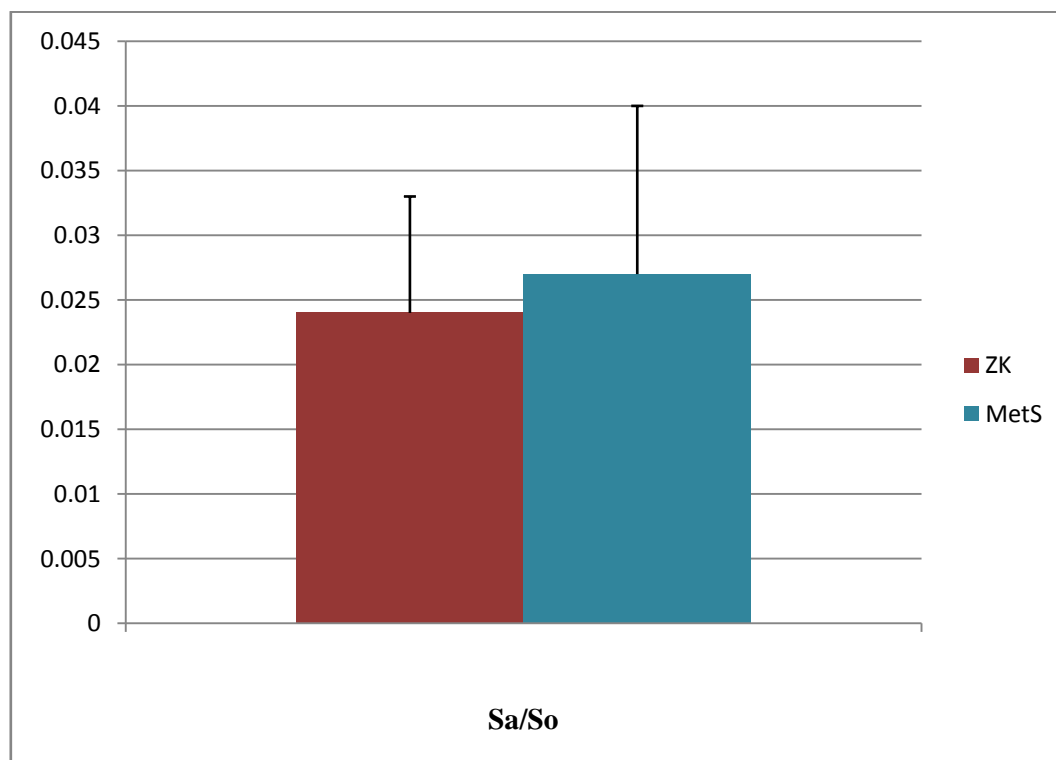
Smanjenje ukupne koncentracije C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina kod naših ispitanika kojima je dijagnosticiran MetS ukazuje na smanjenu koncentraciju kompleksnih sfingolipida, odnosno na njihovu pojačanu razgradnju. Zbog povećane razgradnje

kompleksnih sfingolipida kod ispitanika s MetS očekujemo da bi trebala biti povišena koncentracija slobodnih sfingoidnih baza koje se otpuštaju iz stanice i prisutne su u plazmi. Navedenu pretpostavku trebalo bi potvrditi baznom hidrolizom nakon ekstrakcije sfingolipida iz seruma. Našu pretpostavku potkrepljuju i literaturni podaci koji pokazuju povećanje razine slobodnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u plazmi pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. Povećana razina C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina sugerirala je povećanu razinu ceramida. Naime, ako je povišena razina ceramida u plazmi, onda je dostupna i veća količina tvari za deacilaciju i nastajanje C18 sfingozina što objašnjava njegovu povišenu koncentraciju u plazmi oboljelih pacijenata (Górska i sur., 2005). Povećanje razine ceramida u plazmi pretilih pacijenata potvrdili su i Haus i sur. (2009). Istraživanje provedeno na pretilim miševima je pokazalo smanjenje razine ukupnih sfingomijelina i ceramida te povećanje razine slobodnog sfingozina u adipoznom tkivu što upućuje na hidrolizu sfingomijelina u ceramid koji se dalje konvertira u C18 sfingozin. Međutim, analiza sfingolipida u plazmi pretilih miševa je ukazala na povišenu razinu sfingomijelina, ceramida, sfingozina i sfingozin-1-P. Povećanje razine sfingolipida u plazmi pretilih miševa je bilo povezano s povećanjem rizika od kardiovaskularnih bolesti (Samad i ostali, 2006).

Dobiveni rezultati se mogu objasniti činjenicom da stresni uvjeti u stanici, poput faktora rasta, oksidativnog stresa i citokina koji se povezuju s MetS, potiču hidrolizu sfingomijelina u membrani aktivacijom enzimskih sustava (Chavez i Summers, 2012). S obzirom na veliku kompleksnost sfingolipidnog metabolizma, njegova regulacija je također kompleksna i multifaktorijalna, stoga je potrebna detaljnija analiza za potpunu sliku o ekspresiji i aktivnosti pojedinih enzima uključenih u sfingolipidni metabolizam. Sukladno tome, zasad postoji i jako malo literaturnih podataka o načinu povezanosti MetS sa sfingolipidnim metabolizmom, osobito kod ljudi. Možemo se pozvati na rezultate Samad i sur. (2006) i objasniti dobivene rezultate pretpostavkom da je kod ispitanika oboljelih od MetS značajno povišena ekspresija enzima koji sudjeluju u hidrolizi složenih sfingolipida i nastajanju ceramida, odnosno C18 sfingozina, uključujući alkalnu i neutralnu sfingomijelinazu te alkalnu i kiselu ceramidazu. Nasuprot tome, ekspresija enzima koji kataliziraju reakcije prevođenja ceramida u složene sfingolipide, poput glukozilceramid sintaze i N-acetilneuraminilgalaktozilceramid (GM3) sintaze je vjerojatno smanjena kod ispitanika s MetS. Ključnu ulogu u razvoju inzulinske rezistencije ima i tumor nekrozni faktor (TNF- α) zbog inhibicije inzulinske signalizacije i aktivacije kisele i neutralne sfingomijelinaze (Majumdar i Mastrandrea, 2012). Budući da je ceramid uključen u upalne procese, povećanje koncentracije ceramida pojačava izlučivanje upalnih citokina koji su uključeni u regulaciju sfingolipidnog metabolizma, između ostalog i

TNF- α (Holland i Summers, 2008). Daljnja istraživanja bi trebala dovesti u korelaciju razinu sfingoidnih baza u serumu sa koncentracijom TNF- α . S obzirom na biološku aktivnost sfingoidnih baza te ulogu C18 sfingozina kao drugog glasnika u stanici, C18 sfingozin može izazvati brojne štetne učinke u stanicama, poput inhibicije aktivnosti protein kinaze C, imobilizacije kalcija iz unutarstaničnih nakupina i smanjenje sadržaja cikličkog AMP-a (Woodcock, 2006). Stoga se na osnovu dobivenih podataka može pretpostaviti da smanjenje razine ukupnih sfingoidnih baza u serumu ispitanika s dijagnosticiranim MetS, odnosno povećanje slobodnih sfingoidnih baza, može biti faktor koji doprinosi pogoršanju stanične funkcije u MetS te se zbog toga koncentracija C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u serumu može predložiti kao potencijalni biomarker MetS.

Usporedba omjera C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina (Sa/So) u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS je prikazana na Slici 29. Omjer Sa/So kod zdravih ispitanika je iznosio $0,024 \pm 0,009$, a kod ispitanika s dijagnosticiranim MetS $0,027 \pm 0,013$.



Slika 29. Omjeri ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina (Sa/So) u serumu kod zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS

Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika (*t*-test) u omjeru Sa/So u serumu zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS ($p=0,3496$).

Naši rezultati pokazuju 41,3 puta veću koncentraciju ukupnog C18 sfingozina u odnosu na koncentraciju C18-DL-*erythro*-sfinganina kod zdravih ispitanika, a kod ispitanika s dijagnosticiranim MetS 36,5 puta veću koncentraciju C18 sfingozina u odnosu na C18-DL-*erythro*-sfinganin. Značajno veća koncentracija C18 sfingozina u odnosu na C18-DL-*erythro*-sfinganin se objašnjava činjenicom da je C18 sfingozin najzastupljenija humana sfingoidna baza te da čini okosnicu većine složenih sfingolipida (Quehenberger i sur., 2010). Nadalje, viša koncentracija C18 sfingozina se može potkrijepiti i činjenicom da C18 sfingozin nije intermedijer *de novo* sinteze sfingolipida za razliku od C18-DL-*erythro*-sfinganina, već u stanici u slobodnom obliku postoji samo kao produkt razgradnje kompleksnih sfingolipida ili sfingolipida iz hrane. Iz navedenog te iz nepostojanja statistički značajne razlike u omjeru C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina, može se zaključiti da uvjeti u stanici koji dovode do razvoja MetS utječu podjednako na smanjenje sinteze, odnosno povećanje razgradnje kompleksnih sfingolipida. Ipak, omjer C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina ne može poslužiti kao prediktivni biljeg razvoja MetS budući da se kod razvoja MetS smanjuje ukupna razina i C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina pa sukladno tome promjene u omjeru C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina nisu značajne.

Koncentracija slobodnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina u plazmi može biti indirektni pokazatelj omjera *de novo* sinteze i razgradnje ceramida u stanici pa bi moguća promjena u omjeru slobodnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina mogla ukazati na utjecaj MetS na sintezu i razgradnju kompleksnih sfingolipida za što bi bilo potrebno provesti daljnju analizu (baznu hidrolizu) radi određivanja koncentracije slobodnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina te njihovog omjera.

Prema rezultatima ovog istraživanja može se uočiti smanjenje koncentracije ukupnog C18 sfingozina i C18-DL-*erythro*-sfinganina u skupini ispitanika s dijagnosticiranim MetS u usporedbi s kontrolnom skupinom te nepostojanje razlike u koncentraciji sfingoidnih baza i njihovog omjera između spolova unutar iste skupine što je u skladu s očekivanjima. Primjetno je da metabolizam sfingolipida doprinosi razvoju MetS, odnosno inzulinske rezistencije. Iako su dobiveni rezultati statistički značajni, da bi se uzeli u obzir potrebno je izvesti daljnja istraživanja kako bi se potvrdili dobiveni rezultati te smanjila moguća ograničenja istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije ukupnog C18 sfingozina i C18 DL-*erythro*-sfinganina u serumu zdravih ispitanika ne razlikuju se značajno između muškaraca i žena, kao ni omjer koncentracija C18-DL-*erythro*-sfinganin / C18 sfingozin (Sa/So).
2. Koncentracije ukupnog C18 sfingozina i C18 DL-*erythro*-sfinganina u serumu ispitanika s dijagnosticiranim MetS ne razlikuju se značajno između muškaraca i žena, kao ni omjer koncentracija C18 DL-*erythro*-sfinganin / C18 sfingozin (Sa/So).
3. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentracijama ukupnog C18 sfingozina ($p < 0,001$) i C18-DL-*erythro*-sfinganina ($p = 0,0032$) između zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS što ukazuje na promjenu metabolizma sfingolipida izazvanog metaboličkim poremećajem u organizmu.
4. Omjeri ukupnog C18-DL-*erythro*-sfinganina i C18 sfingozina se ne razlikuje značajno između zdravih ispitanika i ispitanika s dijagnosticiranim MetS jer metabolički poremećaj u organizmu u jednakoj mjeri potiče razgradnju kompleksnih sfingolipida kao što smanjuje njihovu sintezu.

6. LITERATURA

Abnet, C. C., Borkowf, C. B., Qiao, Y. L., Albert, P. S., Wang, E., Merrill, A. H. J. (2001) A Cross-Sectional Study of Human Serum Sphingolipids, Diet and Physiologic Parameters. *J. Nutr.* **131**, 2748–2752.

Božina, T. (2014) Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma. Disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Chavez, J. A., Summers, S. A. (2012) A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metabol.* **15**, 585–594.

Choi, S., Snider, A. J. (2015) Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. *Mediat. Inflamm.* **2015**, 1-15.

Gault, C. R., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (2010) An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 1-23.

Górska, M., Dobrzyń, A., Baranowski, M. (2005) Concentrations of sphingosine and sphinganine in plasma of patients with type 2 diabetes. *Med. Sci. Monitor* **11**, 35-38.

Grundey, S. M., Neeland, I. J., Turer, A.T., Vega, G. L. (2014) Ethnic and gender susceptibility to metabolic risk. *Metab. Syndr. Relat. D.* **12**, 110–6.

Grundey, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Spertus, J. A, Costa, F. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome - An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735-2752.

Gulbins, E., Kolesnick, R. (2003) Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **22**, 7007–7070.

Hanada, K. (2003) Serin palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**, 16-30.

Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, A. H., Bell, R. M. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.* **261**, 12604–12609.

Hannun, Y. A., Futerman, A. H. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**, 777-782.

Haus, J. M., Kashyap, S. R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K. R., Defronzo, R. A. (2009) Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* **58**, 337–343.

Heung, L. J., Luberto, C., Del Poeta, M. (2006) Role of Sphingolipids in Microbial Pathogenesis. *Infect. Immun.* **74**, 28-39.

Holland, W.L., Summers, S.A. (2008) Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* **29**, 381–402.

Honke, K., Tainguchi, N. (2003) Function of Gal 3-sulfotransferases. *Tanpakushitsu kakusan koso* **48**, 963-966.

Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F., Holthius, J. C. (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **23**, 33-44.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., Sandhoff, K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1485**, 63–69.

Hwang, Y.C., Hayashi, T., Fujimoto, W. Y., Kahn, S. E., Leonetti, D. L., McNeely, M. J. (2015) Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int. J. Obesity* **39**, 1365–1370.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1998) Nomenclature of glycolipids. *Eur. J. Biochem.* **257**, 293-298.

Kanno, T., Nishimoto, T., Fujita, Y., Gotoh, A., Nakano, T. and Nishizaki, T. (2012) Sphingosine induces apoptosis in MKN-28 human gastric cancer cells in an SDK-dependent manner. *Cell. Physiol. Biochem.* **30**, 987–994.

Karmelić, I., Lovrić, J., Božina, T., Ljubić, H., Vogrinc, Ž., Božina, N. (2012) Adiponectin Level and Gene Variability Are Obesity and Metabolic Syndrome Markers in a Young Population. *Arch. Med. Res.* **43**, 145–153.

Karmelić, I., Lovrić, J., Božina, T., Merkle, A., Božina, N., Sertić, J. (2016) Is there any association of apolipoprotein E gene polymorphisms with metabolic syndrome in a young population of Croatian origin?. *Ann. Hum. Biol.* 1-8.

Karlsson, K. A. (1964) The existence of C18- and C20- phytosphingosine in animal tissues. *Acta. Chem. Scand.* **18**, 2397–239.

Kolter, T., Sandhoff, K. (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 2057-2079.

Lahiri, S., Futerman, A. H. (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2270–2284.

Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E. (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 1988–1992.

Liotta, D. C., Merrill, A. H. Jr. (2008) Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J.Lipid Res.* **49**, 1621-1639.

Lopez, P. H., Schnaar, R. L. (2009) Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **19**, 549-557.

- Majumdar, I., Mastrandrea, L.D. (2012) Serum sphingolipids and inflammatory mediators in adolescents at risk for metabolic syndrome. *Endocrine* **41**, 442–449.
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T. (2014) Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* **141**, 5–9.
- Merrill, A. H. Jr., Liotta, D. C., Riley, R. E. (1996) Bioactive Properties of Sphingosine and Structurally Related Compounds. *Handbook of Lipid Research* **8**, 205-237.
- Merrill, A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A., Riley, R.T. (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Persp.* **109**, 283–289.
- Merrill, A. H. Jr., Sandhoff, K. (2002) Sphingolipids: metabolism and cell signaling. *New Comprehensive Biochemistry* **36**, 373-407.
- Merrill, Jr. A. H., Smith, W.L. (2002) Shingolipid Metabolism and Signaling Minireview Series. *J. Biol. Chem.* **277**, 25841-25842.
- Merrill, A. H. Jr., Wang, M. D., Park, M., Sullards, M. C. (2007) (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 457-464.
- Merrill, Jr. A. H. (2011) Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem. Rev.* **111**, 6387-6422.
- Mu, C., Reichel, M., Gulbins, E., Kornhuber, J., Petrache, I., Petrusca, D.N. (2013) Sphingolipids in Disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* **216**, 247–264.
- Ogretmen, B. (2006) Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett.* **580**, 5467–5476.
- Othman, A., Rütli, M.F., Ernst, D., Saely, C.H., Rein, P., Drexel, H. (2012) Plasma deoxysphingolipids: A novel class of biomarkers for the metabolic syndrome? *Diabetologia* **55**, 421–431.

Panagiotakos, D. B., Pitsavos C, Chrysohoou C. (2004) Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am. Heart J.* **147**, 106-112.

Poljičanin, T., Sekerija, M., Boras, J., Canecki-Varzic, S., Metelko, Z., Kern, J. (2012) Metabolic syndrome--community nursing evaluation and intervention: the CroHort study. *Collegium Antropol.* **36**, 35–40.

Pruett, S. T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Hayens, C. A., Sullards, M. C., Ramstedt, B., Leppimaki, P., Axberg, Slotte, P. (1999) Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *Eur. J. Biochem.* **266**, 997–1002.

Quehenberger, O., Armando, A.M., Brown, A.H., Milne, S.B., Myers, D.S., Merrill, A. H. (2010) Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J. Lipid Res.* **51**, 3299–305.

Ribar, S. (2000) Omjer sfinganin/sfingozin u ljudi kao mogući pokazatelj unošenja fumozina. Magistarski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Ribar, S., Mesarić, M., Sedić, M. (2003) Sphingoid Bases as Possible Diagnostic Parameters. *Croat. Med. J.* **44**, 165–170.

Ribar, S., Mesarić, M. (2007) Sphingolipids in food. *Period. Biol.* **109**, 123-128.

Riley R.T., Wang, E., Merrill, A.H. Jr. (1994) Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: Use of free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC* **77**, 533-540

Saddoughi, S. A., Ogretmen, B. (2013) Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv. cancer res.* **117**, 37–58.

Samad, F., Hester, K. D., Yang, G., Hannun, Y. A., Bielawski, J. (2006) Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: A potential mechanism for cardiovascular and

metabolic risk. *Diabetes* **55**, 2579–2587.

Schmelz, E. M., Sullards, M. C., Dillehay, D. L., Merrill, A. H. (2000) Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *J. Nutr.* **130**, 522–527.

Serra, M., Saba, J. D. (2010) Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv. Enzyme Regul.* **50**, 349-362.

Smith, E. R., Merrill, A. H., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (2000) Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. *Method. Enzymol.* **312**, 361–373.

Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V., Prinetti, A. (2010) Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. *FEBS Lett.* **584**, 1914–1922.

Sonnino, S., Chigorno, V. (2000) Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1469**, 63-77.

Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., van der Sluijjs, P. (2003) Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose: ceramide galactosyl-transferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3482-3493.

Svennerholm, L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**, 613-623.

Svennerholm, L. (1980) Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **125**, 11-19.

Tettamanti, G. (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* **20**, 301-317.

Thudicum, J.L.W. (1884) A treatise on the Chemical Constitution of Brain, Bailliere, Tindall and Cox, London, UK.

Todeschini, R.A., Hakomori, S. (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *BBA-Gen. Subjects*. **1780**, 421–433.

van der Westhuizen, L., Brown, N. L., Marasas, W. F., Swanevelder, S., Shephard, G. S. (1999) Sphinganine/sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 1153–1158.

van Echten-Deckert, G., Herget, T. (2006) Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1758**, 1978-1994.

van Overloop, H., Gijsbers, H., Van Veldhoven, P. P. (2006) Further characterization of mammalian ceramide kinase: substrate delivery and (stereo)specificity, tissue distribution, and subcellular localization studies. *J. Lipid Res.* **47**, 268-283.

Venkataraman, K., Futerman, A.H. (2000) Ceramide as a second messenger: Sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol.* **10**, 408–412.

Vesper, H., Schmelz, E. M., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V., Merrill, A. H. (1999) Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *J. Nutr.* **129**, 1239–1250.

Wei, N., Pan, J., Pop-Busui, R., Othman, A., Alecu, I., Hornemann, T. (2014) Altered sphingoid base profiles in type 1 compared to type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* **13**, 161.

Wiegandt, H. (1995) The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav. Brain Res.* **66**, 85-97.

Woodcock, J. (2006) Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB life* **58**, 462–466.

Yoo, H. S., Norred, W. P., Riley, R.T. (1996) A rapid method for quantifying free sphingoid bases and complex sphingolipids in microgram amounts of cells following exposure to fumonisin B1. *Toxicol. In Vitro* **10**, 77–84.

Yu, R. K., Nakatani, Y., Yanagisawa, M. (2009) The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J. Lipid Res.* **50**, 440–445.

Yu, R. K., Tsai, Y. T., Ariga, T. , Yanagisawa, M. (2011) Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-an overview. *J. Oleo Sci.* **60**, 537-544.

Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Alegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M.C., Cabot, M., Merrill Jr., A. H. (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1864-1884.