

**UNIVERSITATEA MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINA
Departamentul de Biochimie și Farmacologie**

CIUCANU CRISTIAN IONUȚ



TEZĂ DE DOCTORAT

**INFLUENȚA UNOR MEDICAMENTE FOLOSITE ÎN
TRATAREA ATEROSCLEROZEI
ASUPRA ACIZILOR GRAȘI DIN SÂNGE**

- REZUMAT -

Conducător Științific

Prof. Univ. Dr. DUMITRAȘCU Victor

**Timișoara
2020**

CUPRINS

Listă de lucrări publicate	VII
Listă de abrevieri și simboluri.....	VIII
Listă de tabele și figuri.....	X
Mulțumiri.....	XIII
INTRODUCERE.....	XIV

PARTEA GENERALĂ

CAPITOL 1: Ateroscleroză.....	1
1.1. Considerații generale.....	1
1.2. Mecanismul formării ateromului.....	3
1.3. Mecanismul de oxidare a LDL-colesterolului.....	6
CAPITOL 2: Acizi grași.....	9
2.1. Structură și nomenclatură.....	9
2.2. Clasificarea acizilor grași.....	12
2.3. Acizii grași în lipide.....	13
2.4. Rolul acizilor grași.....	15
2.5. Metode de analiză a acizilor grași.....	17
2.5.1. Cromatografia de gaze.....	17
2.5.2. Esterificarea acizilor grași	19
CAPITOL 3: Statine	21
3.1. General considerations.....	21
3.2. Efectul statinelor asupra corpului uman.....	22
3.2.1. Inhibarea sintezei colesterolului.....	22
3.2.2. Alte efecte benefice	25
3.2.3. Efecte secundare.....	26
3.3. Farmacocinetica statinelor.....	27

PARTEA SPECIALĂ

CAPITOL 4: Contribuția la analiza acizilor grași totali direct dintr-o	
picătură de sânge.....	29
4.1. Considerații generale.....	29
4.2. Experimental.....	31
4.2.1. Substanțe chimice.....	31
4.2.2. Colectarea probelor de sânge	32
4.2.3. Prelucrarea probelor.....	32
4.2.4. Condițiile cromatografiei de gaze.....	33
4.3. Rezultate.....	34
4.3.1. Analiza cromatografică.....	34
4.3.2. Evaluarea calitativă	35
4.3.3. Evaluarea cantitativă.....	39
4.3.4. Metoda de validare.....	39
4.4. Discuții.....	40
4.4.1. Reacția de O-metilare.....	40
4.4.2. Identificarea acizilor grași.....	42
4.4.3. Comparații cu alte metode.....	44
4.4.4. Concluzii parțiale.....	45
CAPITOL 5: Contribuții la analiza selectivă a acizilor grași liberi	
direct în plasmă.....	47
5.1. Considerații generale.....	47
5.2. Materiale și metode	49
5.2.1. Standarde și reactivi.....	49
5.2.2. Condiții GC-MS.....	50
5.2.3. Colectarea și stocarea probelor de sânge.....	51
5.2.4. Analiza statistică.....	52
5.2.5. Metoda de metilare selectivă a acizilor grași liberi.....	52
5.3. Rezultate.....	53

5.3.1. Procesul de metilare.....	53
5.3.2. Cromatogramă GC-MS.....	54
5.3.3. Evaluarea calitativă	55
5.3.4. Evaluarea cantitativă.....	56
5.3.5. Metoda de validare	56
5.4. Discuții.....	59
5.4.1. Mecanismul reacției de metilare.....	59
5.4.2. Optimizarea metilării selective a acizilor grași direct în plasmă.....	61
5.4.3. Analiza GC-MS.....	66
5.4.4. Aplicații la probe de plasmă.....	67
5.4.5. Compararea cu alte metode.....	68
5.4.6. Concluzii parțiale.....	70
CAPITOL 6: Efectul rosuvastatinei asupra concentrației fiecărui acid gras din acizi grași liberi și din acizi grași totali.....	71
6.1. Considerații generale.....	71
6.2. Experimental	73
6.2.1. Subiecți.....	73
6.2.2. Proiectarea studiului și informații clinice.....	73
6.2.3. Analize de laborator.....	74
6.2.4. Analize statistice.....	75
6.3. Rezultate.....	76
6.4. Discuții.....	85
CAPITOL 7: Influența dozei de rosuvastatină asupra acizilor grași liberi totali și acizi grași totali din plasmă.....	91
7.1. Considerații generale.....	91
7.2. Experimental	93
7.2.1. Subiecți.....	93
7.2.2. Proiectarea studiului și informații clinice.....	94
7.2.3. Analize de laborator	95

7.2.4. Analize statistice.....	96
7.3. Rezultate.....	96
7.4. Discuții.....	107
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII.....	113
BIBLIOGRAFIE.....	117
ANEXE.....	129
I. Copii ale articolelor publicate în aceasta teză.....	129

Cuvinte cheie: Ateroscleroză, Rosuvastatină, Homeostaza colesterolului, Acizi grași totali, Acid gras liberi, Lipide plasmatică, Analiză GC-MS.

PARTEA GENERALĂ

Motivul pentru care a fost ales acest subiect de cercetare s-a datorat faptului că bolile cardiovasculare generate de ateroscleroză sunt originea multor decese. Într-un clasament al cauzelor de deces în SUA în 2015, bolile cardiovasculare sunt pe primul loc, cu 43,8%, urmate de toate tipurile de cancer și boli respiratorii [1]. În Europa, bolile cardiovasculare au crescut la bărbați din 1990 până în 2015 cu 33,57% [2]. Acesta este motivul pentru care subiecții selectați pentru acest studiu au fost bărbați.

Ateroscleroza este un proces inflamator cronic, cunoscut de mai bine de 500 de ani ca fiind una dintre principalele cauze ale bolilor cardiovasculare și implică un număr mare de decese și persoane cu dizabilități.

Mecanismul aterosclerozei este complex și este generat de mulți factori. S-a demonstrat că nivelurile ridicate de lipide din sânge favorizează ateroscleroza.

Cele mai utilizate medicamente pentru scăderea lipidelor din sânge sunt statinele, niacina și fibratele sau o combinație a acestora [3]. Statinele sunt cele mai eficiente în tratarea persoanelor cu risc crescut de ateroscleroză [4]. Statinele reduc LDL (lipoproteine cu densitate scăzută)-colesterolul cu până la 55% și trigliceridele cu până la 30% și cresc HDL (lipoproteine cu densitate ridicată)-colesterolul cu până la 14% în funcție de doză și statina utilizată [3].

Tratamentul cu statine a arătat rezultate substanțiale în reducerea progresiei ateromului coronarian și carotidian, măsurată prin grosimea mediului intim, și poate duce, de asemenea, la regresia plăcii [5]. Terapia cu statine care scad colesterolul reduce semnificativ posibilitatea bolilor cardiovasculare [6, 7]. Studiile la subiecți cu hipertrigliceridemie au arătat că statinele pot inhiba și sinteza trigliceridelor [8]. Statinele sunt asociate cu o scădere a concentrației întregului set de acizi grași liberi (FFA) din plasmă [9].

Cantități mari de acizi grași liberi în plasmă au contribuit la creșterea posibilității de boli cardiovasculare, ceea ce duce în cele din urmă la deces [10, 11]. În plus, în unele studii, s-au făcut asociații între diabetul de tip 2 și leziunile ischemice cu niveluri ridicate de acizi grași liberi [12, 13]. Studii recente au arătat că fiecare acid graș liber are un comportament diferit în patologii aterosclerozei. Astfel, s-a constatat că un nivel ridicat de acizi omega-3 duce la scăderea valorilor tensiunii arteriale [14]. Dintre acizii grași (FA) saturați, doar acidul palmitic a crescut șansa de deces la subiecții cu boli cardiovasculare [15].

Nivelul ridicat de izomerii trans ai acizilor grași s-a dovedit a fi legat de inflamație și stres oxidativ în bolile coronariene. [16]. Multe descoperiri sugerează că acizii grași cu un grad ridicat de nesaturare sunt de o importanță deosebită în toate procesele legate de recunoașterea moleculară la nivel celular, precum și metabolismul celular. [17]. Aceste rezultate arată nevoia de a studia fiecare acid gras sau clasă de acizi grași, mai degrabă decât să se analizeze împreună întregul set de acizi grași.

PARTEA SPECIFICĂ

Această teză de doctorat a avut patru obiective principale. Rezultatele experimentale arată că toate aceste obiective au fost atinse.

OBIECTIVUL 1

Primul obiectiv a fost găsirea și validarea unei metode noi, simple și eficiente pentru a determina cu exactitate concentrația fiecărui acid gras din acizii grași globali din lipidele din sânge.

Cum a fost atins acest obiectiv este prezentat în capitolul 4 [123]. În acest capitol, am dezvoltat o metodă care folosește cromatografia de gaze (GC), care poate efectua analiza simultană a fiecărui acid gras în acizi grași totali împreună cu analiza colesterolului total și a monozaharidelor neutre din sânge, plasmă sau ser. Metoda a fost validată pe sânge integral și apoi a fost aplicată pentru plasmă.

Metoda implică o etapă de eliberare cantitativă a acizilor grași din toate lipidele printr-o hidroliză bazică cu hidroxid de sodiu într-un mediu de dimetil sulfoxid, urmată de conversia grupării carboxil din acidul gras în ester metilic printr-o reacție cu iodură de metil.

Această reacție de derivatizare transformă toți acizii grași în esteri metilici într-un timp scurt. Noutatea metodei este dată de realizarea într-o singură etapă a hidrolizei și esterificării acizilor grași. De asemenea, noutatea este esterificarea acizilor grași simultan cu per-O-eterificarea monozaharidelor neutre și a colesterolului.

Prin urmare, o singură cromatogramă a dus la separarea acizilor grași, a monozaharidelor neutre și a colesterolului. Într-o singură analiză, se determină fiecare componentă a 3 clase diferite de substanțe.

O serie de etape laborioase de preparare a probelor utilizate în alte metode de analiză au fost eliminate. Nenumăratele substanțe din sânge care ar putea interfera în timpul analizei au fost în mare parte eliminate ca urmare a procesului de derivatizare și extracție.

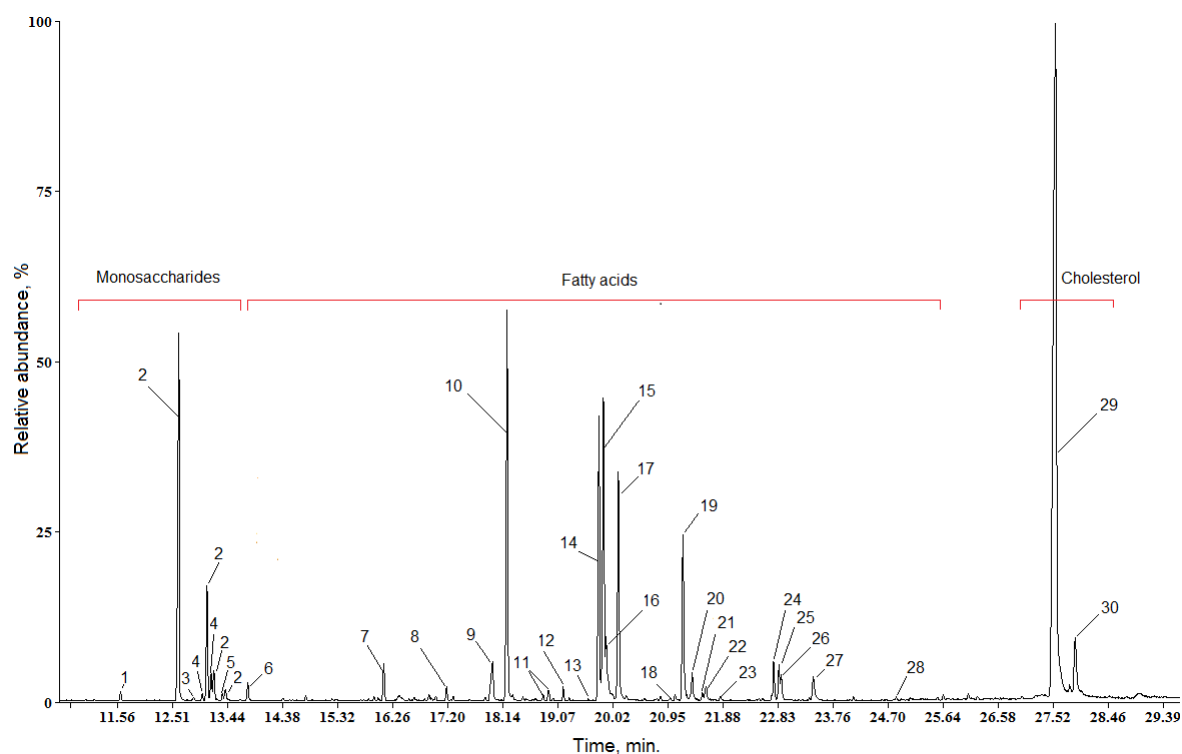


Figura 6. Cromatograma ionică totală GC-MS a colesterolului, acizilor grași și monozaharidelor neutre, din sânge după derivatizare prin metilare. Picuri: (1) metilat-1,5-anhidro-D-glucitol; (2) D-glucoză metilată; (3) metilat-D-fructoză; (4) D-manoză metilată; (5) mio-inozitol metilat; Picurile de la 6 la 28 sunt esteri metilici ai acizilor grași și identitatea lor este dată în Tabelul 1. Picuri: (29) colesteril metil eter; (30) colesterol.

OBIECTIVUL 2

Al doilea obiectiv a fost găsirea unei tehnici pentru analiza fiecărui acid gras numai în fracțiunea de acizi grași liberi din plasmă și a fost dezvoltat în capitolul 5 [124]. Procedura descrisă în acest capitol oferă o metodă foarte rapidă și simplă pentru metilarea selectivă a acizilor grași liberi cu iodură de metil în mediu de dimetil sulfoxid și în prezența carbonatului de potasiu la temperatura camerei într-o singură etapă direct în plasmă.

Reacția de metilare a fost investigată în solvenți aprotici dipolari precum DMSO (dimetil sulfoxid), DMAA (dimetilacetamidă), DMFA (dimetilformamidă) și acetat de etil și în prezența pulberii anhidre precum K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $KHCO_3$, $NaHCO_3$, KOH, și NaOH.

Cel mai bun timp de reacție pentru metilarea totală a acizilor grași liberi fără transmetilarea acizilor grași legați de lipide a fost de mai puțin de 1 min la temperatura camerei folosind iodură de metil și carbonat de potasiu anhidru sau carbonat de sodiu în mediu de dimetil sulfoxid. Un exces mare atât de iodură de metil cât și de bază favorizează reacția de metilare selectivă. DMSO este mai puțin toxic și poate solubiliza proteinele mai bine decât ceilalți membri din această clasă, cum ar fi DMFA și DMAA.

Principala problemă în metilarea directă a acizilor grași liberi în plasmă este prezența acizilor grași legați covalent în trigliceride, colesterol ester și fosfolipide în proba de plasmă. Saponificarea și transmetilarea acizilor grași legați covalent ar putea apărea în prezența bazelor, modificând rezultatele finale. De aceea acest proces s-a cercetat pentru evitare.

S-au găsit condițiile optime de reacție în care s-a evitat transmetilarea acizilor grași legați covalent din plasmă. Esterii metilici ai acizilor grași rezultați au fost introduși direct în mediul de reacție în injectorul cromatografului de gaze, dar ei pot fi și extrași cu n-pentan, în special pentru depozitare pe durate mai lungi.

Limitele de detectare au fost în jur de 0,1 ng / μ L. Precizia și acuratețea au fost evidențiate prin variațiile scăzute de la valoarea medie și o recuperare bună. Această metodă evită pregătirea laborioasă a probelor, cum ar fi cromatografia în strat subțire sau extracția lichid-lichid a acizilor grași liberi din sângele uman.

Tabelul 7 compară metoda noastră cu alte esterificări selective ale acizilor grași liberi direct în plasmă. Metoda propusă de noi necesită cel mai scurt timp de derivatizare (1 min), evită transmetilarea acizilor grași legați covalent în lipide și efectuează o metilare completă a acizilor grași liberi. Produsele de derivatizare pot fi injectate și fără extracție cu solvenți.

Tabelul 7. Principalele caracteristici ale metodelor utilizate pentru metilarea directă a acizilor grași liberi în plasmă.

Parametru luat în studiu	Metoda de metilare			
	Pace-Asciak [11]	Tserng and al. [12]	Lapage & Roy [13]	Metoda propusă
Reactiv	Diazometane-Metanol	2,2-Dimetoxipropan- Acid clorhidric	Metanol- Clorură de acetyl	Iodură de metil Solid K_2CO_3 or Na_2CO_3
Solvent	Dietil ether	Apă-Metanol	Metanol	Dimetil sulfoxid
Temperatură, °C	22	Temperatura camerei	24-29	20
Reaction time, min.	10	15	45	1

Cantitatea de reactivi de derivatizare nu trebuie să fie foarte precisă, fiind utilizată într-un exces mare și fără a genera produse secundare. Acești reactivi sunt mai accesibili cercetătorilor și nu necesită condiții speciale pentru manipulare.

OBIECTIVUL 3

Al treilea obiectiv a fost măsurarea modificării concentrației fiecărui acid gras în acizii grași globali și acizii grași liberi după tratamentul cu rosuvastatină și determinarea factorilor care cauzează aceste modificări ale plasmei. Acest obiectiv a fost dezvoltat în capitolul 6 [147].

Măsurarea modificărilor concentrației fiecărui acid gras din acizii grași totali și din acizii grași liberi din plasmă a fost studiată la subiecții cu vârsta de peste 65 de ani care nu aveau boli cardiovasculare, hipertensiune arterială sau diabet, dar aveau o concentrație mare de colesterolului. Procesul a fost controlat placebo, dublu-orb, randomizat și într-un studiu încrucișat. Subiecții, colecții de date și analize de rezultate nu erau toți conștienți de tratamentul primit de subiecți. Subiecții participanți au fost educați despre stilul de viață impus în timpul acestui studiu și au fost de acord să respecte modificarea stilului de viață, în ceea ce privește dieta și exercițiile fizice. Toți au mâncat aceeași dietă obișnuită pe toată durata studiului. Cromatografia de gaze (GC) a fost utilizată pentru analiza individuală a acizilor grași. Analiza GC necesită conversia acizilor grași în esteri metilici.

Rezultatele din acest capitol arată că tratamentul cu rosuvastatină a scăzut semnificativ concentrațiile absolute ale fiecărei acid gras saturat și acid gras mono-nesaturat în fracția de acizi grași liberi, precum și în acizii grași totali. Tabelul 11 arată schimbarea față de valoarea inițială a concentrației absolute și modificarea procentuală a fiecărui acid gras din plasma totală în timpul tratamentului cu rosuvastatină. Acizii grași cu mai mult de două legături duble au avut mici scăderi. Excepția este pentru acizii grași poli-nesaturați cu 20 - 22 de carboni în moleculă, care nu au avut nici o schimbare semnificativă în fracțiunea de acizi grași liberi și o creștere mică în acizii grași totali.

Efectele tratamentului cu rosuvastatină asupra nivelului fiecărui acid gras în fracțiunea de acizi grași liberi și a lipidelor plasmatiche totale pot fi o sursă de beneficii suplimentare, pe lângă scăderea LDL-colesterolului în bolile cardiovasculare.

Descoperirile noastre oferă o explicație a modificărilor nivelului fiecărui acid gras din plasmă pe baza mecanismelor homeostaziei colesterolului. Din rezultatele noastre

experimentale, se poate presupune că prin blocarea biosintezei colesterolului de către rosuvastatină, mecanismele de reglare din homeostazia colesterolului vor încerca să mențină echilibrul cu mai puțin colesterol, modificând concentrațiile de lipide implicate în homeostazia colesterolului.

Rosuvastatina este direct implicată numai în biosinteza colesterolului și indirect prin homeostazia colesterolului în biosinteza acizilor grași, esteri colesterolului, fosfolipide apolipoproteina A-1, apolipoproteina B-100 și trigliceridele.

Tabelul 11. Modificarea față de valoarea inițială a concentrației absolute și modificarea procentuală a fiecărui acid gras din plasma totală în timpul tratamentului cu rosuvastatină.

Acid gras	Schimbare față de valorile de bază, $\mu\text{mol/L}$ (Media \pm SD).	Valoarea medie procentuală a schimbării, %	Efect, p value
Dodecanoic	-62.33 \pm 5.58	-49.01	< 0.00001
Tetradecanoic	-148.93 \pm 19.64	-49.18	< 0.00001
Pentadecanoic	-2.69 \pm 2.23	-6.23	< 0.05
Hexadecanoic	-1311.53 \pm 101.87	-48.99	< 0.00001
Heptadecanoic	-4.57 \pm 2.32	-5.36	< 0.01
Octadecanoic	-548.86 \pm 68.66	-47.20	< 0.00001
Eicosanoic	-4.81 \pm 1.57	-10.80	< 0.001
Docosanoicacid	-13.33 \pm 4.43	-11.96	< 0.001
Hexadecenoic	-30.00 \pm 9.72	-10.59	< 0.001
Octadecenoic	-1432.17 \pm 160.47	-43.85	< 0.00001
Eicosenoic	-8.68 \pm 2.57	-10.42	< 0.001
Octadecadienoic	-408.11 \pm 79.14	-14.40	< 0.0001
Eicosadienoic	0.30 \pm 1.49	0.93	0.65
Octadecatrienoic	-4.68 \pm 1.10	-6.26	< 0.01
Eicosatrienoic	4.07 \pm 1.65	2.44	< 0.01
Eicosatetraenoic	27.80 \pm 7.40	2.84	< 0.001
Docosatetraenoic	2.33 \pm 1.64	2.61	< 0.05
Docosapentenoic	0.96 \pm 0.61	0.67	< 0.05
Docosahexaenoic	3.05 \pm 1.35	1.13	< 0.01
FA trace	-10.13 \pm 5.19	-3.02	< 0.01

OBIECTIVUL 4

Al patrulea obiectiv a fost determinarea efectului creșterii dozei de rosuvastatină asupra acizilor grași plasmatici totali și liberi și corelarea acestor modificări cu modificarea concentrației altor lipide implicate în homeostazia colesterolului. Acest obiectiv a fost dezvoltat în capitolul 7 [148].

În acest capitol a fost investigată pentru prima dată influența a patru doze (5, 10, 20 și 40 mg) de rosuvastatină asupra concentrației de acizi grași totali și acizi grași liberi (Figura 13) și corelația modificărilor de concentrație cu modificările concentrației altor lipide la bărbații cu hipercolesterolemie.

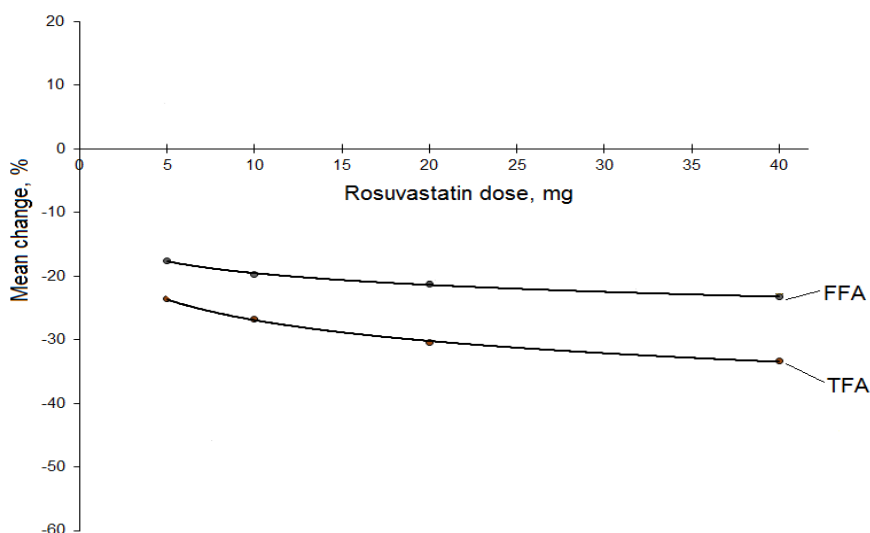


Figura 13. Variația modificărilor procentuale ale acizilor grași în lipidele totale (TFA) și a tuturor acizii grași liberi (FFA) în funcție de doza de rosuvastatină.

Rezultatele experimentelor noastre au indicat că, comparativ cu placebo, toate dozele de rosuvastatină au redus semnificativ acizii grași totali, acizii grași liberi, LDL-colesterolul, colesterolul total, apolipoproteina B-100, trigliceridele și fosfolipidele, în timp ce au crescut apolipoproteina A-1 și HDL-colesterolul. Efectul de feedback al homeostaziei colesterolului, care crește sinteza endogenă a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductazei datorită inactivării sale de către rosuvastatină, explică forma logaritmică a curbelor de variație a modificării concentrației de acizi grași totali, acizi grași liberi și a altor lipide implicate în homeostazia colesterolului.

Asocierea dintre modificarea de acizi grași totali și de acizi grași liberi cu modificările LDL-colesterolului, HDL- colesterolului, colesterolului total, apolipoproteinei B-100 și A-1, fosfolipidelor și trigliceridelor a fost sugerată prin analiza de regresie liniară. Aceste rezultate demonstrează că modificările concentrației acizilor grași totali și acizilor grași liberi sunt puternic corelate cu modificările concentrației de lipide implicate în homeostazia colesterolului. Figura 18 ilustrează corelațiile pentru acizii grași totali. Datorită acestei corelații ridicate, putem folosi funcțiile de regresie liniară pentru a prezice valorile acizilor grași totali și acizilor grași liberi din valorile altor lipide.

Tabelul 18. Parametrii de corelație a acizilor grași totali cu lipide și lipoproteine implicate în homeostazia colesterolului.

Variabilă independentă (X)	Variabilă dependentă (Y)		
	Acizi grași totali		
	Ecuția regresiei liniare	Coeficient de corelare (r)	P-Value
Total cholesterol	$Y = 1.71X + 2.57$	0.9997	<0.0001
LDL-cholesterol	$Y = 1.69X + 5.52$	0.9983	< 0.0001
HDL-cholesterol	$Y = -38.88X + 59.25$	-0.9991	< 0.001
Triglyceride	$Y = 20.59X - 6.25$	0.9994	< 0.001
Phospholipide,	$Y = 5.9X - 1.32$	0.9979	< 0.001
Apolipoproteina B-100	$Y = 0.027X + 4.47$	0.9982	< 0.01
Apolipoproteina A-1	$Y = -1.87X + 82.7$	-0.9914	< 0.0001

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. Capitolul 4 prezintă pentru prima dată o metodă care poate determina simultan într-o singură cromatogramă de gaze compoziția acizi grași, compoziția monozaharidelor și nivelul colesterolului dintr-o probă de sânge. Metoda este foarte specifică și selectivă, dacă avem în vedere că există multe substanțe în sânge. Nici o altă metodă cromatografică sau enzimatică nu ar putea realiza acest lucru.

Pentru prima dată, condițiile pentru reacția de metilare permit realizarea simultană atât a reacțiilor de esterificare a acizilor grași, cât și a reacțiilor de monozaharidă și esterificare a colesterolului.

2. În **Capitolul 5** am efectuat pentru prima dată analiza acizilor grași liberi prin cromatografie de gaze, utilizând o esterificare selectivă a acizilor grași liberi din plasmă în cel mai scurt timp (1 min) comparativ cu alte metode. Această nouă metodă a evitat transmetilarea acizilor grași legați covalent în lipide și a efectuat o metilare completă a acizilor grași liberi.

3. În **Capitolul 6** am măsurat pentru prima dată modificarea concentrației fiecărui acid gras în acizii grași globali și acizii grași liberi după tratamentul cu rosuvastatină. A fost propusă pentru prima dată o explicație a modificărilor nivelului fiecărui acid gras din plasmă pe baza mecanismelor homeostaziei colesterolului.

4. În **Capitolul 7** am investigat pentru prima dată influența a patru doze (5, 10, 20 și 40 mg) de rosuvastatină asupra modificărilor concentrației de acizi grași totali și acizi grași liberi. Am demonstrat pentru prima dată că modificările concentrației acizilor grași totali și acizilor grași liberi sunt puternic corelate cu modificările concentrației de lipide implicate în homeostazia colesterolului.

BIBLIOGRAPHY

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway W, et al. Heart Disease and Stroke Statistics 2018 Update: A report from the american heart association. *Circulation*. 2018;137:e67–e492.
2. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. European cardiovascular disease statistics 2017. Brussels: European Heart Network; 2017. Available from: <http://www.ehnheart.org/images/CVD-statistics-report-August-2017.pdf>. [Accessed 10.01.2019].
3. Lewis SJ. Prevention and Treatment of atherosclerosis: A practitioner's guide for 2008. *Am J Med*. 2009;122:S38–S50.
4. Gotto AMJr. Establishing the benefit of statins in low-to-moderate risk primary prevention: The Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Atheroscler Suppl*. 2007;8:3-8.
5. Bedi U, Singh M, Singh P, Molnar J, Khosla S, Arora R. Effects of statins on progression of coronary artery disease as measured by intravascular ultrasound. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(7):492–496.
6. Gotto AMJr, Grundy SM. Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial data. *Circulation*. 1999; 99:E1–E7.
7. Brookes ZLS, McGown CC, Reilly CS. Statins for all: the new premed? *Br J Anaesth*. 2009;103(1):99–107.
8. Grundy SM. Consensus statement: Role of therapy with "statins" in patients with hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol*. 1998;81:1B-6B.

9. Sahebkar A, Simental-Mendía LE, Pedone C, et al. Statin therapy and plasma free fatty acids: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81:807–818.
10. Pilz S, Scharnagl H, Tiran B, et al. Free fatty acids are independently associated with all-cause and cardiovascular mortality in subjects with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(7):2542–2547.
11. Ghosh A, Gao L, Thakur A, Siu PM, Lai CWK. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):50
12. Chung J-W, Seo, W-K, Kim, G-M, et. al. Free fatty acid as a determinant of ischemic lesion volume in nonarterial-origin embolic stroke. *J. Neurol. Sci*. 2017;382:116–121.
13. Sobczak AIS, Blindauer CA, Stewar, AJ. Changes in plasma free fatty acids associated with type-2 diabetes. *Nutrients*. 2019;11(9):2022.
14. Colussi G, Catena C, Novello M, Bertin N, Sechi LA. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(3):191–200.
15. Kleber ME, Delgado GE, Dawczynski C, et al. Saturated fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *J Clin Lipidol*. 2018;12(2):455–463.
16. Ahmed SA, Kharroubi W, Kaoubaa N, et al. Correlation of trans fatty acids with the severity of coronary artery disease lesions. *Lipids Health Dis*. 2018;17:52.
17. Shaikh SR, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection. *Chem Phys Lipids*. 2008; 153(1): 24–33.
123. Ciucanu I, Pilat L, **Ciucanu CI**, E. Şişu, V. Dumitraşcu, Simultaneous analysis of neutral monosaccharides, fatty acids and cholesterol as biomarkers from a drop of blood, Bioanalysis. 2016;8;(20):2147–2156.
124. **Ciucanu CI**, Vlad DC, Ciucanu I, Dumitraşcu V. Selective and fast methylation of free fatty acids directly in plasma for their individual analysis by gas chromatography- mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 2020;1624:461259.
147. **Ciucanu CI**, Olariu S, Vlad CD, Dumitrascu V. Effect of rosuvastatin on the concentration of each fatty acid in the fraction of free fatty acids and total lipids in human plasma: The role of cholesterol homeostasis. Biochem. Biophys. Rep. 2020;24:100882.
148. **Ciucanu CI**, Olariu S, Vlad CD, Dumitrascu V. Influence of rosuvastatin dose on total fatty acids and free fatty acids in plasma: Correlations with lipids involved in cholesterol homeostasis. Medicine (Baltimore). 2020;99:e23356 .