

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

mr. sc. Frane Runjić, dr. med.

**PROMJENE UPALNIH MARKERA I PAD SRČANE MITOHONDRIJSKE
AKTIVNOSTI U BOLESNIKA S KORONARNOM ARTERIJSKOM BOLESTI I
BLAGOM SISTOLIČKOM DISFUNKCIJOM**

Doktorska disertacija

Mentor:

prof. dr. sc. Jasna Marinović Ljubković

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

mr. sc. Frane Runjić, dr. med.

**PROMJENE UPALNIH MARKERA I PAD SRČANE MITOHONDRIJSKE
AKTIVNOSTI U BOLESNIKA S KORONARNOM ARTERIJSKOM BOLESTI I
BLAGOM SISTOLIČKOM DISFUNKCIJOM**

Doktorska disertacija

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

prof. dr. sc. Jasna Marinović Ljubković

Split, 2023.

PREDGOVOR

Istraživanje je provedeno na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu, Klinici za bolesti srca i krvnih žila te Zavodu za kardiokirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Marinović Ljubković.

Radna je hipoteza ovog istraživanja bila da bolesnici s koronarnom bolesti imaju povišene razine upalnih markera proporcionalno težini bolesti, te smanjeni kapacitet mitohondrijske respiratorne aktivnosti proporcionalan smanjenju njihove sistoličke funkcije. Glavni rezultati ovog istraživanja su objavljeni u dva izvorna znanstvena članka:

1. Runjic F, Martinovic-Kaliterna D, Salamunic I, Kristic I, Ljubkovic M, Marinovic J. Association of anticardiolipin antibodies, complement and leptin with the severity of coronary artery disease expressed as syntax score. *J Physiol Pharmacol.* 2020 Jun;71(3). doi: 10.26402/jpp.2020.3.09.
2. Ljubkovic M, Runjic F, Bulat C, Cavar M, Frankovic L, Marovic Z, Bilopavlovic N, Marinovic J. Assessment of mitochondrial respiratory capacity in relation to cardiac contractile performance in patients with normal to mildly decreased cardiac systolic function. *J Physiol Pharmacol.* 2022 Dec;73(6). doi: 10.26402/jpp.2022.6.05.

ZAHVALA

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Marinović Ljubković bez koje ovaj rad nikada ne bi bio dovršen.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
1.1. Koronarna arterijska bolest.....	3
1.1.1. Epidemiologija	4
1.1.2. Rizični čimbenici	4
1.1.3. Patofiziologija	5
1.1.4. Komplikacije.....	7
1.1.5. Liječenje.....	8
1.2. Važnost upale u koronarnoj bolesti	10
1.2.1. Antikardiolipinska protutijela	11
1.2.2. Sustav komplementa	12
1.2.3. Leptin	12
1.3. Srčano zatajivanje.....	12
1.3.2. Patofiziologija	14
1.4. Uloga mitohondrija u energetske metabolizmu	15
1.4.1. Metabolizam ugljikohidrata i masnih kiselina u srčanom mišiću.....	16
1.4.2. Mitohondrijska disfunkcija u srčanom zatajivanju	18
1.4.3. Mitohondrijski metabolizam i ishemija miokarda	18
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	21
3. ISPITANICI I METODE	23
4.1. Organizacija i opis istraživanja.....	24
4.2. Ispitanici	24
4.3. Postupci	25
4.3.1. Anamnestičko ispitivanje.....	25
4.3.2. Antropometrijska mjerenja	25
4.3.3. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza uzoraka	25
4.3.3. Vrednovanje složenosti koronarne bolesti	26
4.3.4. Ehokardiografska analiza.....	26
4.3.5. Biopsija miokarda lijeve klijetke	27
4.3.6. Procjena mitohondrijske respiracije.....	27
4.3.7. Analiza tkiva <i>Western blot</i> metodom.....	29
4.4. Statistički postupci.....	29
4. REZULTATI.....	31
4.1. Znanstveno istraživanje 1	32

4.1.1. Obilježja promatrane populacije	32
4.1.2. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskih protutijela	33
4.1.3. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti, komponenti komplementa, leptina i kolesterola	34
4.1.4. Neovisna povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli, nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable	35
4.1.5. Usporedba prema spolu.....	36
4.1.6. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli, nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable, u bolesnika sa šećernom bolesti.....	37
4.1.7. Povezanost između ostalih varijabli.....	38
4.2. Znanstveno istraživanje 2	39
4.2.1. Obilježja promatrane populacije	39
4.2.2. Povezanost između srčane sistoličke funkcije i mitohondrijske respiracije	41
4.2.3. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa sadržajem mitohondrija ili ekspresijom mitohondrijskih kompleksa respiratornog lanca	43
4.2.4. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa mitohondrijskom biogenezaom i dinamikom	44
4.2.5. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa ekspresijom enzima beta oksidacije masnih kiselina.....	45
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČCI.....	54
7. SAŽETAK	56
8. SUMMARY	58
9. POPIS CITIRANE LITERATURE	61
11. ŽIVOTOPIS.....	71

POPIS OZNAKA I KRATICA:

aCL-IgG – antikardiolipinska protutijela klase imunoglobulina G

aCL-IgM – antikardiolipinska protutijela klase imunoglobulina M

ATP – adenzin trifosfat

CRP – C-reaktivni protein

HDL – lipoprotein visoke gustoće

LAD – prednja silazna grana lijeve koronarne arterije

LDL – lipoprotein niske gustoće

LM – deblo lijeve koronarne arterije

LVEF – e젝cijska frakcija lijeve klijetke

NSTEMI – infarkt miokarda bez elevacije ST spojnice

STEMI – infarkt miokarda s elevacijom ST spojnice

1. UVOD

1.1. Koronarna arterijska bolest

Koronarna arterijska bolest je stanje smanjenog protoka krvi u koronarnim arterijama uz posljedičnu ishemiju miokarda, najčešće zbog razvoja aterosklerotske bolesti (1). Manifestacija koronarne arterijske bolesti može se dogoditi u obliku progresije kroničnog koronarnog sindroma ili razvoja akutnog koronarnog sindroma (2).

Kronični koronarni sindrom, odnosno stabilna pektoralna angina, jest najčešći oblik ishemijske bolesti srca koji je povezan sa smanjenom kvalitetom života i povećanom smrtnošću (3). Najčešće je uzrokovana stenotičko-opstrukcijskom bolešću epikardijalnih koronarnih arterija koja rezultira smanjenim protokom krvi i latentnom ishemijom miokarda. Smetnje se obično očituju u stanjima povećanih potreba miokarda kao što je tjelesno opterećenje, a nastaju zbog neravnoteže između krvne opskrbe i metaboličkih potreba miokarda. Različite neinvazivne metode funkcijskih testiranja mogu se koristiti za provociranje simptoma i otkrivanje neizravnih znakova koronarne arterijske bolesti, poput elektrokardiografije, ehokardiografije, scintigrafije ili funkcijske magnetske rezonancije (3). Postavljanje sumnje na stenotičko-opstrukcijsku koronarnu arterijsku bolest nalaže daljnje dijagnostičke pretrage poput invazivne koronarne angiografije koja predstavlja zlatni standard za potvrdu koronarne arterijske bolesti. Štoviše, navedena pretraga omogućuje istodobno intervencijsko liječenje u obliku angioplastike, dok dio bolesnika može biti usmjeren na kardiokirurško liječenje s postavljanjem premosnica (1).

Akutni koronarni sindrom jest nestabilna faza koronarne arterijske bolesti tijekom koje postoji naglo nastalo smanjenje koronarnog protoka s posljedičnom akutnom ishemijom miokarda (4, 5). Dio bolesnika ima potpunu opstrukciju koronarnog protoka u određenom koronarnom području čime je ugroženost odgovarajuće regije miokarda dodatno izražena. Ovisno o kliničkim, elektrokardiografskim i laboratorijskim čimbenicima, klinički entitet akutnog koronarnog sindroma može se podijeliti na nestabilnu pektoralnu anginu, infarkt miokarda bez elevacije ST spojnice (NSTEMI) i infarkt miokarda s elevacijom ST spojnice (STEMI) (4, 5). Svi navedeni oblici akutnog koronarnog sindroma mogu dovesti do različitih kratkotrajnih i dugotrajnih posljedica, uključujući naglu srčanu smrt. Klinička slika navedenih oblika akutnog koronarnog sindroma može biti slična, a diferencijalna dijagnoza se postavlja na temelju elektrokardiografskih promjena i laboratorijske analize biokemijskih markera oštećenja miokarda (6).

1.1.1. Epidemiologija

Prevalencija koronarne arterijske bolesti ovisi o promatranjoj populaciji i geografskom području (7). Procjenjuje se da ~7% opće odrasle populacije u Sjedinjenim Američkim Državama ima koronarnu arterijsku bolest (8). Podatci iz Republike Hrvatske upućuju na prevalenciju koronarne arterijske bolesti od 2913 na 100000 stanovnika što odgovara intermedijarnoj stopi u odnosu na visoko i nisko razvijene europske zemlje (9). Brojni čimbenici utječu na pojavnost koronarne arterijske bolesti, uključujući dob i spol. Analiza populacije starije od 60 godina u Sjedinjenim Američkim Državama pokazala je veću prevalenciju koronarne arterijske bolesti u muškaraca u odnosu na žene (8). Nadalje, pojavnost koronarne arterijske bolesti raste u starijoj populaciji, tako da čak ~30-40% osoba starijih od 60 godina ima koronarnu arterijsku bolest (7, 8). Štoviše, bolesnici stariji od 75 godina imaju posebno izraženo opterećenje od koronarne arterijske bolesti što uključuje najveći rizik od mortaliteta i morbiditeta (3). Prevalencija koronarne arterijske bolesti može biti značajno veća u posebnim populacijama kod bolesnika s određenim komorbiditetima, poput šećerne bolesti.

Incidencija koronarne arterijske bolesti je također značajna pa određene projekcije upućuju da otprilike svakih 40 sekundi jedan stanovnik Sjedinjenih Američkih Država ravije akutni infarkt miokarda (8). To odgovara ~605 000 novo-razvijenih akutnih infarkta miokarda godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama, kao i ~200,000 rekurentnih akutnih infarkta miokarda godišnje, što predstavlja veliko zdravstveno opterećenje (8). Podatci iz Republike Hrvatske upućuju na incidenciju koronarne arterijske bolesti od 249 na 100000 stanovnika (9). Gotovo četvrtina bolesnika ne prepozna simptome akutnog infarkta miokarda što otežava liječenje i povećava stopu komplikacija kod navedenih bolesnika.

1.1.2. Rizični čimbenici

U složenu patogenezu koronarne arterijske bolesti uključeni su brojni čimbenici. Rizični čimbenici za koronarnu bolest dijele se na promjenjive i nepromjenjive čimbenike. Posebnu skupinu promjenjivih rizičnih čimbenika čine tzv. standardni promjenjivi rizični čimbenici koji uključuju arterijsku hipertenziju, šećernu bolest, dislipidemiju i pušenje (10). Navedeni rizični čimbenici imaju važnu ulogu u započinjanju i pogoršavanju koronarne arterijske bolesti. U nepromjenjive rizične čimbenike se ubraja starija životna dob, spolni čimbenici, genetska podloga i epigenetske odrednice (11).

Brojni komorbiditeti su povezani s razvojem koronarne arterijske bolesti. Poznato je da bolesnici sa šećernom bolesti imaju veću incidenciju koronarne arterijske bolesti, kao i veću kompleksnost koronarne arterijske bolesti. Nadalje, kronična bubrežna bolest predstavlja značajan rizični čimbenik za koronarnu arterijsku bolest uz česti razvoj kalcificirajućih stenotičko-opstruktivskih promjena koje nerijetko zahtijevaju napredne metode liječenja. Štoviše, drugi klinički entiteti povezani s ekstrakardijalnom bolešću arterijske cirkulacije, poput periferne arterijske bolesti i kroničnog cerebrovaskularnog sindroma, su također značajno povezani sa razvojem koronarne arterijske bolesti. Povišeni upalni markeri također snažno koreliraju s razvojem koronarne arterijske bolesti, kao i lošijim kliničkim ishodom u navedenih bolesnika.

1.1.3. Patofiziologija

Ključni proces u patofiziologiji koronarne arterijske bolesti jest aterogeneza. Navedeni proces uključuje kompleksnu interakciju različitih žilnih čimbenika (tonus arterije, permeabilnost arterijske stijenke, i sl.), lokalnih mehaničkih čimbenika (smično naprezanje, tkivna kompresija, i sl.), sistemskih čimbenika (tlačno opterećenje arterijske stijenke, razine glukoze, razine kolesterola, i sl.), endotelne disfunkcije, upalne aktivnosti i humoralne nestabilnosti (oksidacijski stres, hormonski utjecaj, ravnoteža između protrombotskih i fibrinolitičkih čimbenika, i sl.) (1).

Aterogeneza predstavlja kontinuirani proces nakupljanja lipida, upalnih stanica i glatkih mišićnih stanica u sloju intime arterijske stijenke. Navedeni proces počinje endotelnom ozljedom i disfunkcijom pod utjecajem različitih noksi (hiperglikemija, hiperkolesterolemija, upala, i sl.) što naposljetku omogućuje interakciju biglikana, ključnog proteoglikana u stijenci arterije, s humoralnim čimbenicima poput lipoproteina niske gustoće (engl. low-density lipoproteins) i upalnih stanica (monociti/makrofazi, T-limfociti, neutrofili) (12). Međudjelovanje navedenih čimbenika omogućuje stvaranje početne faze aterosklerotskog plaka u obliku fokalnog zadebljanja intime arterijske stijenke (engl. fatty streaks) (1).

Daljnijim napredovanjem procesa dolazi do oksidacije lipoproteina u intimi arterijske stijenke pod djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. Važnu ulogu u tom procesu imaju mijeloperoksidaze i lipidoperoksidaze, enzimi koji se otpuštaju iz azurofilnih zrnaca iz prethodno spomenutih upalnih stanica (12). Oksidacija lipoproteina potiče njihovu „aktivaciju“ uz daljnje autokrino i parakrino proupalno djelovanje s kemotaksijom i ekspresijom brojnih

adhezijskih molekula (13). Važni korak u razvoju aterosklerotskog plaka jest migracija glatkih mišićnih stanica u intimu arterijske stijenke koje, pod utjecajem lokalnog miljea, otpuštaju enzime matriks metaloproteinaze. Navedeni enzimi mogu posredovati apoptozu glatkih mišićnih stanica, a što je povezano s daljnjim nakupljanjem makrofaga i progresiji aterosklerotskog plaka (1). Ovisno o trajanju noksi, međudjelovanjem brojnih navedenih čimbenika aterosklerotski plak može prolaziti kroz različite faze, od ranog ateroma do fibroateroma i fibroznog plaka (14). Svi stadiji ateroskleroze, od početnog rasta do komplikacija posredovanih plakom, se smatraju upalnim odgovorom na ozljedu (15).

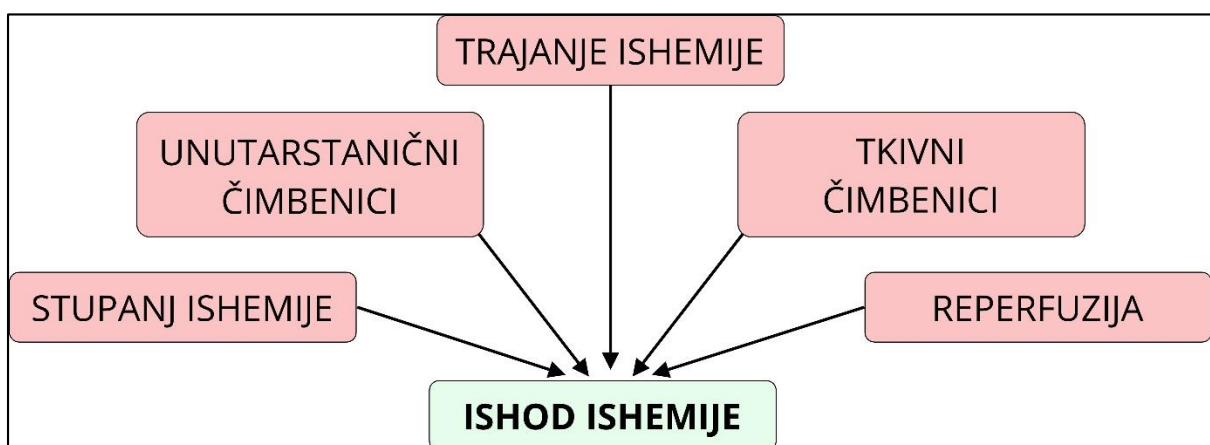
U početnim fazama aterosklerotske lezije primarno dolazi do abluminalnog rasta plaka, dok zahvaćeni segment koronarne arterije istodobno pokazuje pozitivno remodeliranje (tzv. Glagov fenomen) (16). Pritom se lumen koronarne arterije održava, a zbog odsustva opstrukcije protoka nema izravnih kliničkih manifestacija. Tek u kasnijim fazama progresije aterosklerotskog plaka dolazi do smanjenja lumena koronarne arterije i razvoja kronične stenozе. Posljedična opstrukcija protoka kroz koronarnu arteriju može uzrokovati latentnu ishemiju (u naporu) što predstavlja glavno kliničko obilježje kroničnog koronarnog sindroma. Kliničke smetnje navedenih bolesnika ovise o stupnju stenozе, veličini područja u ishemiji, funkciji miokarda i razvijenosti kolateralnih krvnih žila (1).

Dok je stupanj stenozе koronarne arterije glavni medijator kroničnog koronarnog sindroma, svojstva aterosklerotskog plaka predstavljaju ključne odrednice akutnog koronarnog sindroma. Naime, dio aterosklerotskih lezija pokazuje nepovoljna obilježja koja povećavaju rizik za destabilizaciju i disrupciju plaka, neovisno o bazalnom stupnju stenozе lumena. Dominantni uzrok destabilizacije i disrupcije plaka u akutnom koronarnom sindromu jest ruptura aterosklerotskog plaka u fazi fibroateroma s tankom kapom (engl. thin cap fibroatheroma), dok su ostali rjeđi mehanizmi obilježeni fisurom, erozijom ili mikrokrvarenjem unutar plaka (1). Izravno međudjelovanje sastavnica krvi i komponenti aterosklerotskog plaka poput kolagena, glatkih mišićnih stanica i upalnih stanica potiče akutnu trombotsku kaskadu i posljedičnu akutnu opstrukciju lumena. Navedeni bolesnici pritom razvijaju manifestnu ishemiju miokarda (u mirovanju) što je većinom povezano s akutnom nekrozom dijela miokarda i razvojem akutnog infarkta miokarda (1).

1.1.4. Komplikacije

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, a ishemijska bolest srca jest glavni pojedinačni uzrok smrti među svim kardiovaskularnim stanjima (8). Procjenjuje se da zapadne razvijene zemlje imaju dobno-standardizirane stope smrtnosti od ishemijske bolesti srca od <76 na 100,000 stanovnika, dok slabije razvijene zemlje Sjeverne Afrike i Azije imaju stope koje iznose >200 na 100,000 stanovnika (8). Osim značajne stope smrtnosti, postoje brojne druge komplikacije koronarne arterijske bolesti, uključujući razvoj srčanog zatajivanja, razvoj abnormalnosti srčanih zalistaka, sklonost aritmijama, intoleranciju napora, poremećenu kvalitetu života i brojne druge (8, 9). Dio bolesnika razvija teške akutne i subakutne mehaničke komplikacije u obliku peri-infarctnog ventrikulskog septalnog defekta ili teške primarne mitralne regurgitacije koji su unatoč liječenju povezani s visokom smrtnošću (17). Također teška komplikacija koronarne arterijske bolesti koja je često povezana s konkomitantnim srčanim zatajivanjem jest intraventrikulski tromb lijeve klijetke (18).

Gledajući na staničnoj i tkivnoj razini, ishod ishemije miokarda i posljedični razvoj komplikacija ovisi o različitim čimbenicima, uključujući trajanje ishemije, stupanj ishemije, reperfuziju, kardiomiocitne čimbenike i tkivne čimbenike (Slika 1). Određeni kardiomiocitni i lokalni tkivni čimbenici mogu imati važnu ulogu u ishodu ishemije poput prilagodbe na prethodno ishemijsko prekondicioniranje, pojačane koronarne autoregulacije i razvoja tkivne kolateralne mikrocirkulacije (1).



Slika 1. Dijagram čimbenika koji utječu na ishod ishemije miokarda

1.1.5. Liječenje

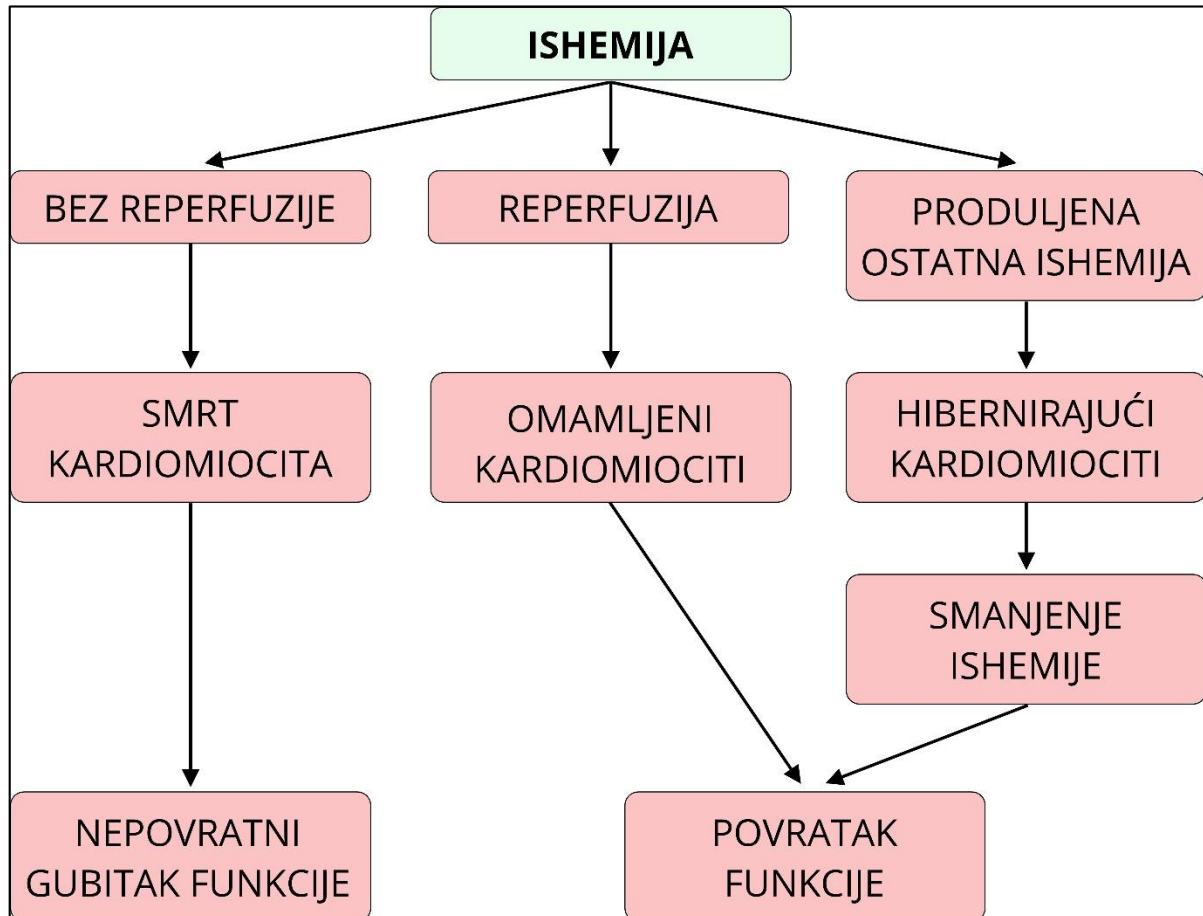
Liječenje bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti zahtijeva multidisciplinarni pristup uz korištenje brojnih nefarmakoloških, farmakoloških, intervencijskih i operacijskih postupaka. Pristup liječenju uvjetovan je kliničkom manifestacijom bolesti (akutni koronarni sindrom, odnosno kronični koronarni sindrom), obilježjima bolesnika i pojedinostima same koronarne arterijske bolesti.

Pristup bolesniku s utvrđenim kroničnim koronarnim sindromom zahtijeva detaljnu evaluaciju simptoma, ehokardiografskog nalaza i funkcijskih dokaza ishemije (3). Važne dodatne podatke donosi nalaz neinvazivne ili invazivne koronarografije, a nakon čega je potrebno donijeti odluku o potrebi za revaskularizacijskim liječenjem. Okosnicu liječenja čine sekundarna prevencija s nefarmakološkim mjerama poput promjene životnog stila i farmakološkim mjerama poput trajne jednostruke antiagregacijske terapije, hipolipemika i ostalih ciljanih lijekova. U dijela bolesnika komplementarnu ulogu ima revaskularizacijsko liječenje (3).

Pristup bolesniku s utvrđenim akutnim koronarnim sindromom zahtijeva diferencijaciju akutnog koronarnog sindroma bez elevacije ST spojnice (NSTEMI) i akutnog infarkta miokarda s elevacijom ST spojnice (STEMI) (4, 5). Svi bolesnici s akutnim koronarnim sindromom bez elevacije ST spojnice zahtijevaju ranu primjenu farmakološke terapije u obliku acetilsalicilne kiseline, a nakon čega je mandatorna stratifikacija rizika koji uvjetuje daljnje dijagnostičko-terapijske postupke (4). Svi bolesnici s akutnim infarktom miokarda s elevacijom ST spojnice zahtijevaju ranu primjenu acetilsalicilne kiseline i dodatnog drugog antiagregacijskog lijeka, a nakon čega je potrebna žurna invazivna koronarografija i perkutana koronarna intervencija (u većine bolesnika) (5). Ostala potporna farmakološka terapija je također potrebna u ranoj fazi svih oblika akutnog koronarnog sindroma, a isto ovisi o obilježjima, komorbiditetima i kliničkom stanju pacijenta. Nadalje, dio bolesnika s akutnim koronarnim sindromom može imati koristi od istovremene primjene različitih oblika mehaničke cirkulacijske potpore (4, 5).

S patomorfološkog gledišta, većina bolesnika s akutnim infarktom miokarda s elevacijom ST spojnice ima akutnu okluziju uzročne epikardijalne koronarne arterije (tzv. okluzivni infarkt miokarda) zbog čega navedeni bolesnici ostvaruju najveću korist od žurne reperfuzije putem perkutane koronarne intervencije. U slučaju nedostupnosti žurne perkutane koronarne intervencije u navedenih bolesnika, potrebno je primijeniti trombolitičku terapiju

radi što ranije reperfuzije (5). Reperfuzija odgovarajuće regije miokarda svakako predstavlja važnu sastavnicu liječenja bolesnika s akutnim infarktom miokarda s elevacijom ST spojnice (Slika 2).



Slika 2. Dijagram ishemijskih ishoda ovisno o reperfuziji

S druge strane, većina akutnih koronarnih sindroma bez elevacije ST spojnice nije precipitirana akutnom okluzijom uzročne epikardijalne koronarne arterije (tzv. neokluzivni infarkt miokarda), već je isto potencirano djelomičnom redukcijom protoka, najčešće u više regija miokarda. Prema tome, ciljno liječenje navedenih bolesnika ovisi o brojnim čimbenicima (4). Osim mogućnosti perkutane koronarne revaskularizacije, dio bolesnika s akutnim koronarnim sindromom može biti medikamentozno liječen, dok dio bolesnika može biti podvrgnut kardiokirurškoj revaskularizaciji miokarda (4, 5).

U usporedbi s perkutanom koronarnom revaskularizacijom, korist od kardiokirurške revaskularizacije mogu imati bolesnici sa šećernom bolesti, značajnom sistoličkom disfunkcijom (LVEF<40%) i kompleksnom koronarnom bolesti koja onemogućuje kompletnu revaskularizaciju perkutanom putem. Također, bolesnici koji su prethodno liječeni perkutanom putem, a razvili su rekurentne restenoze u području postavljenih potpornica mogu imati korist od kardiokirurške revaskularizacije. Završno, bolesnici koji imaju indikaciju za istodobnim operacijskim liječenjem druge srčane bolesti trebaju biti usmjereni na kardiokiruršku revaskularizaciju (4, 19).

1.2. Važnost upale u koronarnoj bolesti

Kronična upala je prepoznata kao glavni čimbenik patogeneze u svim stadijima ateroskleroze koja dovodi do koronarne arterijske bolesti (20). Osim tradicionalnih rizičnih čimbenika, porast pro-upalnih citokina je povezan s lošijim kliničkim ishodima u bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti (12, 21). Povećane vrijednosti visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina koreliraju s povećanim kardiovaskularnim rizikom u općoj populaciji (22). Važnost upale u koronarnoj arterijskoj bolesti je također utvrđena u bolesnika s povećanim obujmom epikardijalnog masnog tkiva koje ima sposobnost lučenja pro-upalnih citokina (23). Pro-upalni citokini iz epikardijalnog masnog tkiva imaju negativne učinke na funkciju kardiomiocita, a parakrina aktivnost epikardijalnog masnog tkiva utječe na metabolizam kardiomiocita i povećava njihov metabolizam masnih kiselina (23). Također, povezanost upale i ateroskleroze utvrđena je u bolesnika sa sistemskim autoimunim bolestima koji pokazuju značajno veći rizik od sistemske ateroskleroze (24).

Utjecaj upale na razvoj kardiovaskularnih komplikacija vidljiv je iz znanstvenih studija kojima je istraživano utjecaj protu-upalnih lijekova na kardiovaskularni rizik. Na primjer, istraživanja u bolesnika s kroničnim upalnim stanjima su utvrdila da je primjena metotreksata povezana s manjom smrtnosti od kardiovaskularnih događaja (25-27), ali je također je utvrđeno i više nuspojava u skupini bolesnika liječenih metotreksatom (28). Osim metotreksata, klinička ispitivanja drugih protu-upalnih lijekova (na primjer monoklonsko protutijelo na interleukin-1 β – Canakinumab, i kolhicin) su pokazala povoljna djelovanja na smanjenje komplikacija koronarne bolesti (29, 30). Također je poznato da statini, lijekovi koji smanjuju kardiovaskularni rizik i rekurenciju koronarne bolesti, ostvaruju značajno smanjenje vrijednosti upalnih parametara, poput visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina (31). Ipak, utjecaj brojnih

zbunjujućih varijabli i heterogenost populacije otežava donošenje izravnih i jasnih zaključaka o smanjenju kardiovaskularnog rizika preko smanjenja sistemske upale protu-upalnim lijekovima.

Važan sustav upalnih parametara koji mogu imati interakciju s koronarnom arterijskom bolesti predstavljaju antikardiolipinska protutijela, komponente komplemента i leptin. Ubrzana ateroskleroza i ponavljajuća tromboembolija dio su kliničkih manifestacija antifosfolipidnog sindroma, a što je posredovano upalom krvožilne stijenke i stvaranjem tromba pod djelovanjem antifosfolipidnih protutijela (32). Jedan od možebitnih efektorskih mehanizama ovog imunološkog odgovora jest sustav komplemента koji je značajno aktivan u bolesnika s antifosfolipidnim sindromom (33). Dodatna moguća poveznica između upalnih i metaboličkih putova koji dovode do koronarne arterijske bolesti su pleiotropni hormoni poput leptina, iako u postojećoj literaturi nema konzistentnih dokaza o istom (34, 35).

1.2.1. Antikardiolipinska protutijela

Antikardiolipinska protutijela su usmjerena na kardiolipin, unutarstanični fosfolipid koji se nalazi u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani i plazmatskoj membrani stanica (36). Prema tome, antikardiolipinska protutijela predstavljaju autoantitijela koja su usmjerena na vlastita tkiva ili molekule tijela. Kardiolipin je molekula koja je uključena u nekoliko važnih fizioloških procesa, uključujući hemostazu (37). Istraživanja su pokazala da je kardiolipin ko-čimbenik za nekoliko mitohondrijskih enzima i respiracijskih kompleksa, a postoje dokazi o posredničkoj ulozi kardiolipina u procesu stanične apoptoze. Iako uloga kardiolipina u procesu hemostaze nije u potpunosti jasna, smatra se da kardiolipin ostvaruje neizravne učinke posredovanjem mitohondrijskih procesa koji su nužni za hemostazu (37). Bolesnici s Barth sindromom, genetskim poremećajem kardiolipina, ostvaruju različite kliničke smetnje poput srčane i skeletne miopatije, neutropenije i retardacije rasta, čime je istaknuta važnost ove molekule (37).

U slučaju prisustva antikardiolipinskih protutijela u krvotoku, može doći do poremećaja funkcije kardiolipina i različitih kliničkih manifestacija. Antikardiolipinska protutijela prvenstveno su povezana sa skupinom poremećaja koji se nazivaju antifosfolipidni sindrom i manifestiraju se povećanim rizikom za tromboembolijske incidente (38). Iako su antikardiolipinska protutijela prethodno povezivana s koronarnom arterijskom bolesti (39), postojeća literatura je nedostatna te nema podataka o povezanosti antikardiolipinskih protutijela

i kompleksnosti koronarne arterijske bolesti. Štoviše, povezanost antikardiolipinskih protutijela s ostalim čimbenicima upale je nedovoljno istražena u kontekstu koronarne arterijske bolesti.

1.2.2. Sustav komplementa

Sustav komplementa čini mreža proteina s važnom ulogom u imunološkom odgovoru (40). To je dio urođenog imunološkog sustava koji osigurava početnu obranu tijela od patogena. Sastoji se od više od 30 proteina, uključujući enzime, regulatore i receptore. Te proteine proizvode različite stanice u tijelu, uključujući hepatocite, makrofage i limfocite (41). Sustav komplementa može se aktivirati kroz tri glavna puta: klasični put, lektinski put i alternativni put. Svaki put pokreću različite molekule ili događaji, ali svi se spajaju u zajednički konačni put (40). Kada se sustav komplementa aktivira, on stvara kaskadu reakcija koje dovode do nekoliko važnih imunoloških funkcija, uključujući opsonizaciju, upalu, stvaranje membranskog napadajućeg kompleksa i uklanjanje imunoloških kompleksa (40, 41). Prethodna istraživanja su pokazala da aktivacija sustava komplementa ima važnu interakciju s antifosfolipidnim protutijelima (25), a povećane razine proteina komplementa su također povezivane s koronarnom arterijskom bolesti (48). Ipak, nema podataka o odnosu sustava komplementa i kompleksnosti koronarne arterijske bolesti.

1.2.3. Leptin

Leptin je protein koji se primarno izlučuje u masnom tkivu, ali je također pronađen u tkivu hrskavice i imunološkim stanicama (42). Osim svoje metaboličke uloge, rastući podatci upućuju na moguću važnu imuno-modulatornu ulogu leptina. Štoviše, određeni autori smatraju da upravo leptin ima važnu posredničku ulogu između metaboličkog i imunološkog sustava (43). Unatoč prethodno opisivanim odnosima između antikardiolipinskih protutijela, komplementa, leptina i glavnih metaboličkih pokretača ateroskleroze (44), nema drugih literaturnih dokaza o njihovoj povezanosti s kompleksnosti koronarne bolesti.

1.3. Srčano zatajivanje

Zatajivanje srca je strukturni i/ili funkcijski poremećaj pri kojem srce, uz uredne volumene i tlakove punjenja, nije u mogućnosti ostvariti dovoljnu krvnu opskrbu tkiva i organa za zadovoljavanje metaboličkih potreba. Ono predstavlja globalni zdravstveni problem s rastućom incidencijom (45). Životni vijek svjetske populacije raste, a time i pojavnost rizičnih

čimbenika za ishemijsku bolest srca i srčano zatajivanje. Entitet srčanog zatajivanja može se dodatno diferencirati prema vremenskom trajanju, etiologiji i globalnoj sistoličkoj funkciji (45). Prema vremenskom trajanju srčanog zatajivanja može se razlikovati akutno srčano zatajivanje i kronično srčano zatajivanje, dok se prema etiologiji označavaju različiti entiteti, poput ishemijske kardiomiopatije, dilatacijske kardiomiopatije, hipertrofijske kardiomiopatije, alkoholne kardiomiopatije, peripartalne kardiomiopatije, i drugih (8). Nadalje, ovisno o globalnoj sistoličkoj funkciji, važna je diferencijacija srčanog zatajivanja s očuvanom ejijskom frakcijom, srčanog zatajivanja s blago reduciranom ejijskom frakcijom i srčanog zatajivanja s reduciranom ejijskom frakcijom (45).

Epidemiološke procjene upućuju da ~2,4% opće svjetske populacije ima postavljenu dijagnozu srčanog zatajivanja, dok je stvarna prevalencija sigurno veća (45). Štoviše, projekcije prepostavljaju da će globalna prevalencija srčanog zatajivanja narasti na 3% do 2030. godine (8). Analize velikih registarskih podataka pokazuju da je incidencija srčanog zatajivanja s očuvanom ejijskom frakcijom u porastu, dok je incidencija srčanog zatajivanja s reduciranom ejijskom frakcijom u padu (8). Ipak, stope ukupne smrtnosti su slične u oba oblika srčanog zatajivanja čime je istaknuta važnost ovog svjetskog zdravstvenog problema (8). Unatoč značajnom poboljšanju terapije za zatajivanje srca, prognoza ovih bolesnika je nepovoljna jer samo ~55% pacijenata preživi 5 godina nakon početne dijagnoze (46).

Terapijski pristup bolesniku sa srčanim zatajivanjem zahtijeva razumijevanje podležeće etiologije srčanog zatajivanja, kao i detaljno poznavanje specifičnih ehokardiografskih pokazatelja, podležećeg srčanog ritma, koronarne anatomije, komorbiditeta i individualnih obilježja bolesnika (45, 47). Budući da patofiziologija srčanog zatajivanja uključuje različite procese, terapijsko djelovanje s više istodobnih lijekova predstavlja okosnicu liječenja srčanog zatajivanja (45). Volumno i tlačno rasterećenje odgovarajućim lijekovima predstavlja važnu stavku liječenja akutnog zatajenja srca, kao i ambulantne prevencije dekompenzacija kroničnog srčanog zatajivanja. Navedeni lijekovi imaju važnu simptomatsko-rasteretnu ulogu kojom se ostvaruje brzo rasterećenje srca, smanjuju rehospitalizacije i poboljšava kvaliteta života. Ipak, okosnicu liječenja srčanog zatajivanja predstavljaju lijekovi koji ostvaruju dugotrajne prognostičke učinke u bolesnika sa srčanim zatajivanjem i smanjuju smrtnost (45). Ovisno o globalnoj sistoličkoj funkciji lijeve klijetke, prognostički učinak različitih lijekova se razlikuje. Primjerice, lijekovi iz skupine beta blokatora, antagonista mineralokortikoida i ostalih inhibitora renin-angiotenzin-aldosteronske osovine ostvaruju najveće prognostičke učinke u bolesnika s reduciranom ejijskom frakcijom lijeve klijetke, dok je njihov prognostički

učinak u ostalih bolesnika sa srčanim zatajivanjem ograničen. S druge strane, inhibitori natrij-glukoznih kotransportera 2 ostvaruju prognostičke učinke u cijelom spektru bolesnika sa srčanim zatajivanjem (47). Završno, pristup bolesnicima sa srčanim zatajivanjem zahtijeva detaljnu evaluacije obilježja bolesnika i individualizirani pristup (45).

1.3.2. Patofiziologija

Patofiziologija srčanog zatajivanja uključuje brojne interakcije različitih čimbenika što dovodi do nedostatnosti srca da ostvari učinkovitu krvnu opskrbu tijela. Navedeni patofiziološki mehanizmi međusobno djeluju i pojačavaju jedan drugoga, dovodeći do progresivnog pada srčane funkcije i kliničkih manifestacija zatajenja srca. Ključne sastavnice patofiziologije srčanog zatajivanja uključuju poremećenu kontraktilnost miokarda, povećano naknadno opterećenje, povećano preopterećenje volumenom, pojačanu neurohormonalnu aktivaciju, srčano remodeliranje i hipoksijsku ozljedu (45).

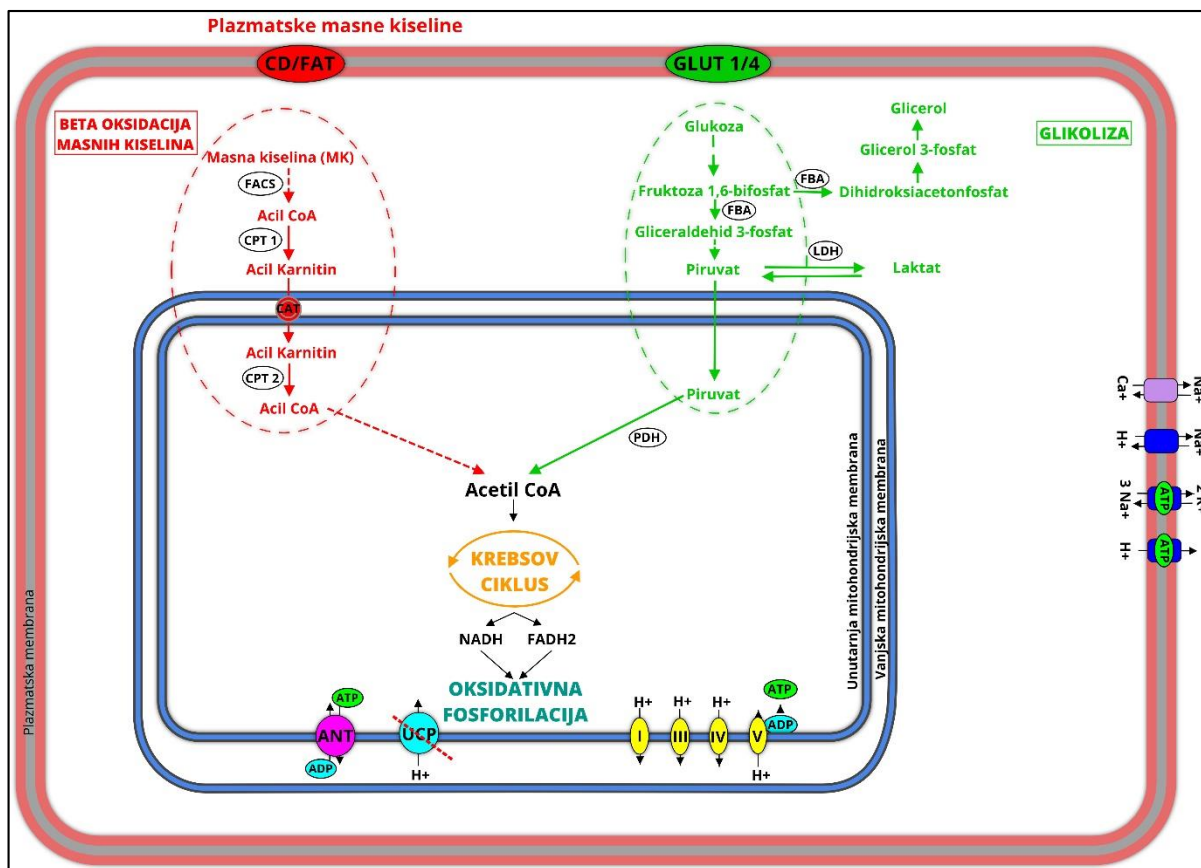
Ovisno o primarnom podležećem uzroku, određeni patofiziološki mehanizmi dominiraju, ali su svi napredni stadiji srčanog zatajivanja obilježeni disproporcionalnim odnosom između potreba i mogućnosti za dostavom energetske supstrate. Time se razvija obrazac pozitivno povratne sprege koja, u odsustvu pravodobnog liječenja, dovodi do terminalnog srčanog zatajivanja. Prema tome, hipoenergoza srca predstavlja važnu sastavnicu naprednih stadija srčanog zatajivanja, ali uloga istog u ranim fazama srčanog zatajivanja nije dovoljno istražena.

Osim sistemskih adaptivnih i maladaptivnih procese, u podlozi zatajivanja srca je i progresivno patološko preoblikovanje miokarda. Na razini kardiomiocita događa se stanična smrt, promjene u efikasnosti kontraktilnog aparata i sprezi ekscitacije i kontrakcije, te promjene energetskeg metabolizma. Metaboličko preoblikovanje kardiomiocita u ishemijskoj bolesti srca i srčanom zatajivanju predstavlja važni događaj, te trenutni literaturni dokazi ne nude odgovor je li riječ o svrsishodnoj prilagodbi, ili patološkim promjenama koje dovode do daljnjeg propadanja srčane funkcije. Obzirom da su mitohondriji u središtu energetskeg metabolizma, oni su predmet brojnih istraživanja (48). Međutim, unatoč velikim naporima koji se ulažu u razvoj terapija usmjerenih na srčanu bioenergetiku, sigurni i klinički učinkoviti rezultati tek se trebaju postići (49).

1.4. Uloga mitohondrija u energetsom metabolizmu

Srce je organ s ogromnim energetske potrebama – procjenjuje se da srce odraslog čovjeka svaki dan koristi oko 6 kg adenozin trifosfata (ATP), što je više nego bilo koji drugi organ u tijelu (50). Stoga je stalna opskrba energetske supstratima i njihovo učinkovito iskorištavanje oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijima od iznimne važnosti za normalan rad srca. Iz tih razloga kardiomiociti su stanice "svejadi" koje imaju sposobnost korištenja različitih supstrata: masnih kiselina, ugljikohidrata (glukoza i piruvat), te u manjoj mjeri ketona i aminokiselina. Korištenje određenog supstrata u određenom trenutku ovisi o njihovoj dostupnosti, energetske potrebama i hormonskom statusu. Ova sposobnost prebacivanja između različitih supstrata za proizvodnju energije naziva se "metabolička fleksibilnost". Na primjer, zdravo srce sagorijeva pretežno masne kiseline (~60-70%). Međutim, u postprandijalnim razdobljima kada je povećana dostupnost glukoze, korištenje ugljikohidrata se povećava. Istraživanja napravljena u različitim životinjskim modelima i ljudima ukazuju na gubitak ove metaboličke fleksibilnosti u završnim fazama srčanog zatajivanja, sa smanjenom upotrebom ugljikohidrata i povećanim oslanjanjem na oksidaciju masnih kiselina za proizvodnju ATP-a (51).

Mitohondrijska respiracija je proces kojim se stvara energija u obliku ATP-a, putem nekoliko međusobno povezanih metaboličkih putova, uključujući glikolizu, ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus) i mitohondrijski lanac prijenosa elektrona. Mitohondriji su glavni izvor visokoenergetskog spoja ATP-a koji se sintetizira uglavnom oksidativnom fosforilacijom u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, prilikom čega se koristi prijenos elektrona i potrošnja kisika za sintezu ATP-a (52). Glavni energetske supstrati koje srce koristi (masne kiseline i ugljikohidrati) se kataboliziraju u acetil-CoA beta oksidacijom, odnosno glikolizom. Molekule acetil-CoA ulaze u Krebsov ciklus i proizvode reducirane međuprodukte NADH i FADH₂. Ovi kofaktori prenose elektrone u mitohondrijskom transportnom lancu elektrona (respiracijski kompleksi I-IV). Tri od ovih kompleksa (I, III i IV) generiraju protonski gradijent kroz unutarnju mitohondrijsku membranu spajanjem transporta elektrona s translokacijom protona iz mitohondrijskog matriksa u intermembranski prostor. Difuzija protona niz protonski gradijent na kompleksu V (ATP-sintaza) daje energiju potrebnu za fosforilaciju ADP-a, te rezultira naposljetku sintezom ATP-a (51) (Slika 3).



Slika 3. Energetski metabolizam kardiomiocita. U središtu energetskog metabolizma kardiomiocita su mitohondriji koji sintetiziraju adenzin trifosfat preko oksidativne fosforilacije korištenjem glavnih energetskih supstrata (masne kiseline i ugljikohidrati). **Kratice:** MCD – malonil CoA dekarboksilaza; ACC – acetil CoA karboksilaza; FACS – acil CoA sintetaza; CPT1 – karnitin palmitoiltransferaza 1; CAT – karnitin/acilkarnitin translokaza; CPT2 – karnitin palmitoiltransferaza 2; PDH – piruvat dehidrogenaza; FBA – fruktoza bifosfat aldolaza; ACL – ATP citrat liaza; UCP – uncoupling protein; ANT – adenin-nukleotid translokaza.

Od ukupne proizvodnje ATP-a u kardiomiocitima, ~95% je dobiveno oksidativnom fosforilacijom (masne kiseline, glukoza, laktat), a tek ~5% glikolizom (53). Dobivena energija se većinom koristi za kontrakciju i relaksacije miokarda, dok se ostatak ATP-a koristi za druge procese poput održavanja homeostaze elektrolita (52, 54).

1.4.1. Metabolizam ugljikohidrata i masnih kiselina u srčanom mišiću

Glukoza, glavni monosaharid koji nastaje razgradnjom ugljikohidrata, ulazi u kardiomiocit preko transmembranskih glukoznih transportera GLUT1 i GLUT4, na temelju

koncentracijskog gradijenta. Unutar stanice, glukoza se fosforilira u glukoza-6 fosfat pomoću enzima heksokinaze, te, u slučaju energetske potrebe, glukoza-6 fosfat ulazi u proces glikolize. Završni rezultat glikolize je nastajanje piruvata (55).

U aerobnim uvjetima, piruvat predstavlja važni supstrat u Krebsovom ciklusu i oksidativnoj fosforilaciji. Točnije, nakon ulaska u mitohondrije preko proteinskog nosača, dolazi do dekarboksilacije piruvata pomoću enzima piruvat dehidrogenaze (PDH), enzima koji predstavlja „usko grlo“ u oksidaciji ugljikohidrata (56). Djelovanjem PDH nastaje acetil koenzim A (acetil-CoA) koji se koristi u Krebsovom ciklusu. S druge strane, u anaerobnim uvjetima dolazi do razgradnje piruvata u laktat pomoću enzima laktat dehidrogenaze. Time se stvara energija u obliku dvije molekule ATP-a zbog čega navedeni ciklus dijelom omogućuje energetske opskrbe za održavanje ionskog transporta u izvanrednim uvjetima poput ishemijske ili metaboličkih alteracija. Ipak, zdravi srčani mišić ima visok aerobni kapacitet pa je anaerobna proizvodnja laktata u energetske metabolizmu kardiomiocita zanemariva (55, 57).

Glavni supstrat energetske metabolizma miokarda su slobodne plazmatske masne kiseline (58). Slobodne plazmatske masne kiseline ulaze u kardiomiocite pasivnom difuzijom ili putem proteina nosača poput translokaze masnih kiselina (FAT/CD36; engl. fatty acid translocase). Nakon ulaska u citoplazmu, masne kiseline se pretvaraju u acil-CoA estere putem citoplazmatske CoA sintetaze. Većina tih estera prebacuje se u mitohondrije za potrebe stvaranja energije, dok se ostatak pohranjuje kao triacilglicerol (TAG) u citoplazmi. Za ulazak masnih kiselina u mitohondrije su neophodni enzimi karnitin palmitoil transferaze (CPT; engl. carnitine palmitoyltransferase) i karnitin acilkarnitin translokaze (CAT; engl. carnitine-acylcarnitine translocase), koja omogućuje prijenos masnih kiselina kroz unutarnju mitohondrijsku membranu (59).

Beta-oksidacija je složen proces koji uključuje nekoliko kemijskih reakcija, a posredovan je pomoću četiri ključna enzima – acil CoA dehidrogenazom, enoil CoA hidratazom, L-3-hidroksi acil CoA dehidrogenazom i 3-ketoacil CoA tiazom. Svaki ciklus beta-oksidacije smanjuje duljinu acil-CoA lanca za dva ugljikova atoma i proizvodi molekule acetil-CoA, FADH₂ i NADH. Acetil-CoA zatim ulazi u Krebsov ciklus gdje se dalje oksidira i proizvodi dodatni NADH. NADH i FADH₂ kao elektronski bogate molekule omogućuju stvaranje dodatne energije u mitohondrijskom respiracijskom lancu. Regulacija beta-oksidacije u srcu odvija se putem negativne povratne sprege i regulacijom transkripcije enzima (58).

1.4.2. Mitohondrijska disfunkcija u srčanom zatajivanju

Brojne studije su pokazale promijenjenu mitohondrijsku funkciju u srčanom zatajivanju što rezultira neusklađenošću srčane potrebe za energijom i njezine proizvodnje, te posljedičnom hipoenergozom miokarda (60). Time se stvara začarani krug koji naposljetku dovodi do progresivnog i ireverzibilnog propadanja funkcije miokarda i terminalnog srčanog zatajivanja. Jedan od značajnih poremećaja mitohondrijskog metabolizma u srčanom zatajivanju jest promjena u korištenju energetskih supstrata s gubitkom metaboličke fleksibilnosti, smanjenjem kapaciteta za korištenje masnih kiselina te prebacivanjem metabolizma na korištenje ugljikohidrata (61). Također, osim smanjene proizvodnje ATP-a, disfunkcionalni mitohondriji također pojačano proizvode reaktivne kisikove radikale (reactive oxygen species – ROS), koji dovode do oksidacijskog oštećenja (62). Mitohondriji u srcu smanjene kontraktilne funkcije imaju i strukturne abnormalnosti poput smanjene i nejednake veličine, poremećenih nabora unutarne mitohondrijske membrane, te oštećenjima vanjske mitohondrijske membrane (63).

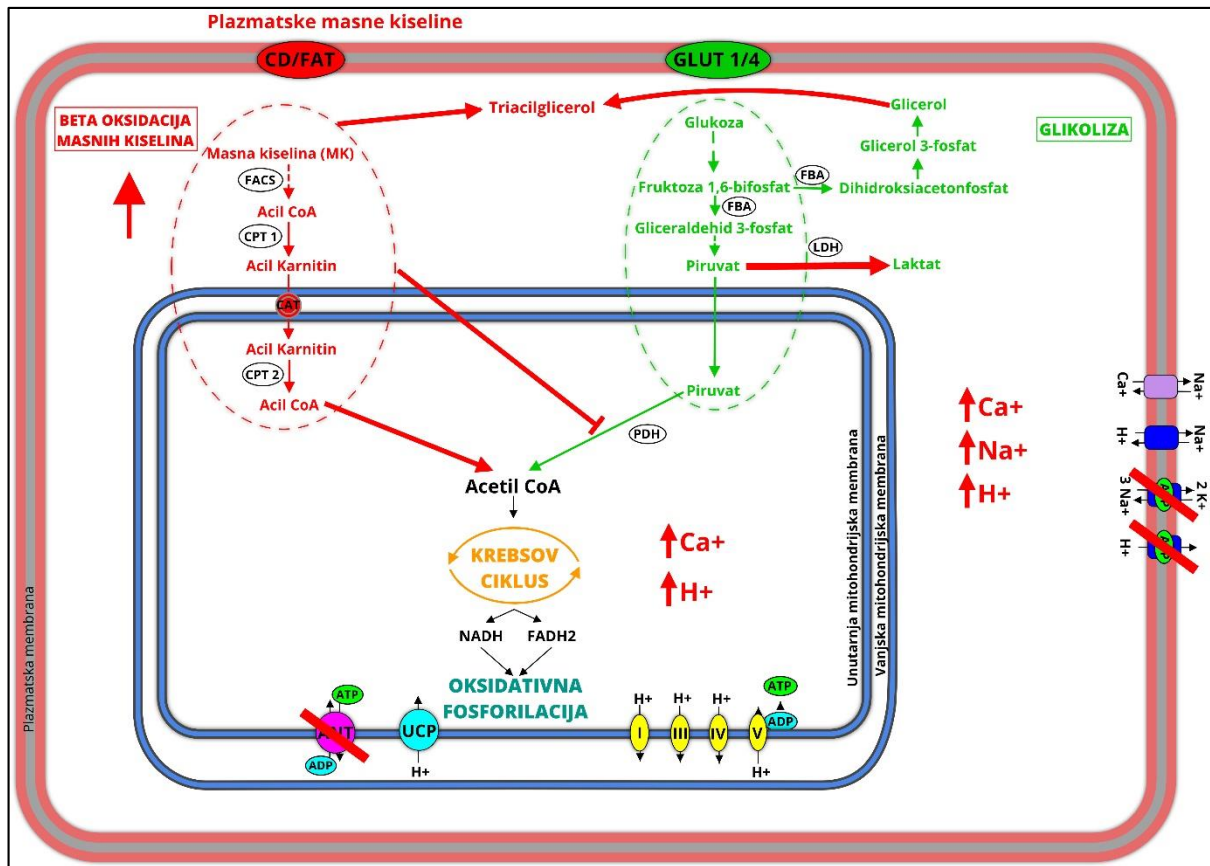
Unatoč brojnim istraživanjima mitohondrijske disfunkcije u srčanom zatajivanju, većina ih je provedena je na raznim životinjskim modelima. Također, kod istraživanja na ljudima sa srčanim zatajenjem, uglavnom se radilo o bolesnicima s terminalnim srčanim zatajivanjem (27). S druge strane, podatci o bolesnicima koji su u ranoj fazi srčanog zatajivanja su uglavnom nedostadni. Nove spoznaje o mogućim ranim bioenergetskim promjenama miokarda bi mogle imati važnu ulogu u razjašnjenju svrhe metaboličkog preoblikovanja. Naime, nije jasno predstavlja li metaboličko preoblikovanje korisni proces prilagodbe ili je riječ o maladaptivnom procesu koji potencira daljnju progresiju srčanog zatajivanja.

1.4.3. Mitohondrijski metabolizam i ishemija miokarda

Ishemija miokarda je stanje nesrazmjera koronarne krvne opskrbe i metaboličkih potreba kardiomiocita. U podlozi istog su različiti poremećaji koronarne arterijske cirkulacije uz posljedičnu latentnu ili manifestnu ishemiju miokarda. Osim nedostatne krvne opskrbe metabolički zahtjevnih kardiomiocita, ishemija miokarda može rezultirati i smanjenim uklanjanjem metaboličkih nusprodukata (52).

Ishemija miokarda je povezana s promjenama u energetske homeostazi kardiomiocita (64). U zdravom srcu postoji uravnotežen odnos između metabolizma masnih kiselina i ugljikohidrata, dok ishemija miokarda narušava oksidacijski metabolizam i rezultira

zmanjenom proizvodnjom ATP-a, ključnog energetskog spoja (54). Anaerobni metabolizam ima mogućnost proizvodnje tek ograničenih količina ATP-a. Iako je to važno za preživljavanje kardiomocita u ishemijskim uvjetima, anaerobni metabolizam dovodi do povećanog unutarstaničnog nakupljanja laktata i vodikovih iona, što uzrokuje ionski disbalans i smanjuje kontraktilnu sposobnost miokarda (Slika 4).



Slika 4. Energetski metabolizam kardiomocita u ishemijskim uvjetima. U ishemijskim kardiomocitima dolazi do povećane dostupnosti i iskorištavanja masnih kiselina, porasta anaerobnog metabolizma i prekida oksidativne fosforilacije što uzrokuje smanjenu energetske iskoristivost i neželjene mitohondrijske učinke. **Kratice:** MCD – malonil CoA dekarboksilaza; ACC – acetil CoA karboksilaza; FACS – acil CoA sintetaza; CPT1 – karnitin palmitoiltransferaza 1; CAT – karnitin/acilkarnitin translokaza; CPT2 – karnitin palmitoiltransferaza 2; PDH – piruvat dehidrogenaza; FBA – fruktoza bifosfat aldolaza; ACL – ATP citrat liaza; UCP – uncoupling protein; ANT – adenin-nukleotid translokaza.

Nekoliko događaja tijekom akutne ishemijske promjene posreduje metaboličke promjene (52, 64). Povećana aktivnost simpatičkog živčanog sustava povećava plazmatske koncentracije

slobodnih masnih kiselina preko povećane aktivnosti tkivne lipaze i smanjenog izlučivanja inzulina. Navedeni procesi povećavaju iskorištavanje masnih kiselina u ishemijskim kardiomiocitima (54). Nadalje, anaerobni metabolizam posreduje razgradnju piruvata u laktat čime je ograničeno stvaranje acetil-CoA iz piruvata. S druge strane, prekid oksidativne fosforilacije na mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona uzrokuje nakupljanje reducirajućih molekula NADH i FADH₂ koji pritom inhibiraju aktivnost nekoliko enzima β-oksidacije (65). To dovodi do nakupljanja međuprodukata masnih kiselina (pr. acil karnitin i acil-CoA esteri) u različitim dijelovima stanice, uključujući mitohondrije i citosol, što može uzrokovati lipotoksičnost s mitohondrijskim oštećenjem, mitohondrijskom disfunkcijom i programiranom staničnom smrću, čak i nakon uspostave reperfuzije (66).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavna hipoteza istraživanja provedenog u svrhu ove doktorske disertacije glasi: *Bolesnici s koronarnom bolesti imaju povišene razine upalnih markera proporcionalno težini bolesti, te smanjeni kapacitet mitohondrijske respiratorne aktivnosti proporcionalan smanjenju njihove sistoličke funkcije.*

U svrhu testiranja navedene hipoteze, postavljeni su sljedeći glavni i sporedni ciljevi ovog istraživanja:

Cilj 1. Utvrditi povezanost između plazmatske razine upalnih markera sa stupnjem težine koronarne bolesti.

- a. Ispitati povezanost stupnja raširenosti koronarne bolesti i klasičnih rizičnih faktora za aterosklerozu (plazmatske razine glukoze, kolesterola, HDL-a, LDL-a).
- b. Ispitati povezanost markera upale i klasičnih rizičnih faktora za aterosklerozu.
- c. Usporediti vrijednosti antikardiolipinskih protutijela, leptina, komponenti komplementa i lipoproteina ovisno o spolu, u bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti;
- d. Utvrditi povezanost kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i proupalnih čimbenika u podskupini bolesnika sa šećernom bolesti s koronarnom arterijskom bolesti.
- e. Ispitati povezanost stupnja raširenosti koronarne bolesti i klasičnih rizičnih faktora za aterosklerozu (plazmatske razine glukoze, kolesterola, HDL-a, LDL-a).

Cilj 2. Utvrditi povezanost između sistoličke funkcije lijeve klijetke i mitohondrijskog respiracijskog kapaciteta miokarda kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti.

- a. Utvrditi povezanost između mitohondrijskog respiracijskog kapaciteta i izražaja ključnih enzima energetskog metabolizma u miokardu bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti.

3. ISPITANICI I METODE

4.1. Organizacija i opis istraživanja

Provedene su dvije opservacijske, presječne, kliničke znanstvene studije. Prikupljanje podataka je obavljeno pri *Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu, Klinici za bolesti srca i krvnih Kliničkog bolničkog centra u Splitu* i *Zavodu za kardiokirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Splitu* tijekom razdoblja od 1. listopada 2017. do 1. lipnja 2020. godine. Svi ispitanici su dobrovoljno potpisali informirani pisani pristanak prije početka samog istraživanja. Istraživanje je odobreno od *Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu* (2181-198-03-04) i *Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra u Splitu* (2181-147-01; 2181-147-06). Znanstvena istraživanja su provedena u skladu s Helsinškom deklaracijom iz 2013. godine. Opservacijska znanstvena istraživanja pravodobno su registrirana u registru kliničkih ispitivanja *clinicaltrials.gov* (NCT03179137).

4.2. Ispitanici

U znanstvena istraživanja uključeni su ispitanici oba spola. Uključenje ispitanika provedeno je u Kliničkom bolničkom centru Splitu prema principima dobre kliničke prakse (engl. *good clinical practice*).

Prvo znanstveno istraživanje obuhvatilo je 65 odraslih bolesnika koji su podvrgnuti invazivnoj koronarografiji zbog sumnje na koronarnu arterijsku bolest. Kriteriji uključenja bili su: dob ≥ 18 godina; planirana invazivna koronarografija; klinička prezentacija u obliku akutnog koronarnog sindroma i/ili stenokardije u naporu i/ili sumnje na ishemiju miokarda u neinvazivnim testovima. Kriteriji isključenja bili su: prethodna perkutana ili kardiokirurška koronarna revaskularizacija; istovremena bolest srčanih zalistaka; poznata autoimuna bolest; aktivna maligna bolest; teška bolest drugih organskih sustava.

Drugo znanstveno istraživanje obuhvatilo je 40 odraslih bolesnika koji su podvrgnuti elektivnoj kardiokirurškoj revaskularizaciji miokarda zbog značajne koronarne arterijske bolesti. Kriteriji uključenja su bili: ≥ 18 godina; planirana elektivna kardiokirurška revaskularizacija miokarda „*off-pump*“ (bez upotrebe izvantjelesne cirkulacije i kardioplegije); značajna stenoza debla (LM; engl. *left main*) lijeve glavne koronarne arterije (stupanj stenozе $>50\%$) i/ili prednje silazne grane (LAD; engl. *left anterior descending artery*) lijeve koronarne arterije (stupanj stenozе $>70\%$). Svim bolesnicima je napravljena premosnica korištenjem lijeve unutarnje mamarne arterije. Kriteriji isključenja: hemodinamska nestabilnost; hitna

kardiokirurška operacija; teška globalna sistolička disfunkcija – ejekcijska frakcija lijeve klijetke <40% (LVEF; engl. *left ventricular ejection fraction*); prethodna perkutana ili kardiokirurška koronarna revaskularizacija; šećerna bolest tipa 1; istovremena bolest srčanih zalistaka; poznata autoimuna bolest; aktivna maligna bolest; teška bolest drugih organskih sustava.

Svi ispitanici su tijekom bolničkog liječenja primali standardnu farmakološku terapiju sukladno protokolu ustanove i preporukama nadležnih medicinskih društava.

4.3. Postupci

Svi ispitanici podvrgnuti su detaljnoj anamnezi, fizikalnom pregledu, mjerenjima antropometrijskih obilježja, ehokardiografskoj procjeni i laboratorijskoj analizi. Nadalje, svi ispitanici su podvrgnuti rutinskim kliničkim postupcima koji su bili medicinski uvjetovani.

4.3.1. Anamnestičko ispitivanje

Procjena anamnestičkih podataka izvršena je u svih ispitanika koristeći standardni protokol. Prilikom istog su utvrđena osnovna obilježja bolesnika, uključujući dob, spol, konzumaciju nikotinskih proizvoda i prisutnost komorbiditeta kao što su arterijska hipertenzija, šećerna bolest i dislipidemija.

4.3.2. Antropometrijska mjerenja

Antropometrijska mjerenja uključila su mjerenje tjelesne mase, tjelesne visine, srčane frekvencije i arterijskog krvnog tlaka. Također, učinjeno je računanje indeksa tjelesne mase (ITM) dijeljenjem vrijednosti tjelesne mase (kg) s kvadriranom vrijednosti visine (m²). Za mjerenje arterijskog krvnog tlaka korišten je standardni sfigmomanometar, s prikladnom orukvicom. Ispitanici su pritom bili u sjedećem položaju, s nadlakticom u razini srca.

4.3.3. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza uzoraka

Uzorkovanje krvi provedeno je prilikom primitka u bolnicu, prije invazivnih procedura. Uzorci krvi uzeti su venepunkcijom ručne vene putem polietilenskog katetera. Učinjena je

osnovna biokemijska procjena kojom su utvrđene razine glukoze, ukupnog kolesterola, lipoproteina niske gustoće (LDL), lipoproteina visoke gustoće (HDL) i C-reaktivnog proteina (CRP). Dio prikupljenih uzoraka zamrznut je i pohranjen na -80°C za naknadnu analizu faktora uključujući antikardiolipinska protutijela, komplement 3 i 4 (C3 i C4) i leptin. Antikardiolipinska protutijela određena su pomoću kompleta za enzimsku imunoanalizu (Immunology Consultants Laboratory, Newberg, Oregon, SAD), prema uputama proizvođača. Vrijednosti C3 i C4 određene su komercijalno dostupnim imunoturbidimetrijskim testom pomoću analizatora AU 680 (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, Sjedinjene Američke Države). Razine leptina određivane su korištenjem kompleta za enzimsku imunoanalizu (Leptin Human ELISA kit, Clinical Range; Bio Vendor, Brno, Češka Republika).

4.3.3. Vrednovanje složenosti koronarne bolesti

Složenost koronarne arterijske bolesti ocijenjena je pomoću prethodno validiranog anatomskog SYNTAX sustava (<http://www.syntaxscore.com>) koji uključuje lokaciju, težinu i opseg lezija koronarnih arterija na temelju invazivne koronarne angiografije (67). Procjena je provedena od strane 2 neovisna invazivna kardiologa i, u slučaju nepodudarnosti, angiogrami su ponovno procijenjeni dok se ne postigne konsenzus. Navedeni invazivni kardiolozi su bili zaslijepljeni tijekom navedenog postupka.

4.3.4. Ehokardiografska analiza

Ehokardiografska analiza provedena je koristeći standardni protokol za transtorakalnu ehokardiografiju. Mjerenja su učinjena u bolesnika tijekom faze mirovanju u lijevom ležećem položaju koristeći ehokardiografski sustav (Vivid 9E, GE Medical System, Milwaukee, WI, SAD). Sve projekcije za analizu su snimljene i analizirane od strane iskusnih kardiologa s ekspertizom u ehokardiografiji koja rade pri Klinici za bolesti srca i krvnih žila. Zbog organizacijskih ograničenja, nije učinjena reevaluacija ehokardiografskih nalaza od strane 2 neovisna kardiologa.

Za potrebe doktorske disertacije učinjena su osnovna ehokardiografska mjerenja, uključujući određivanje sistoličke funkcije lijeve klijetke i dimenzija srčanih šupljina, procjenu dijastoličke funkcije, procjenu srčanih zalistaka i evaluaciju perikarda. Za procjenu globalne

sistoličke funkcije lijeve klijetke u obliku LVEF korištena je dvodimenzionalna ehokardiografska analiza putem Simpsonove *biplane* metode.

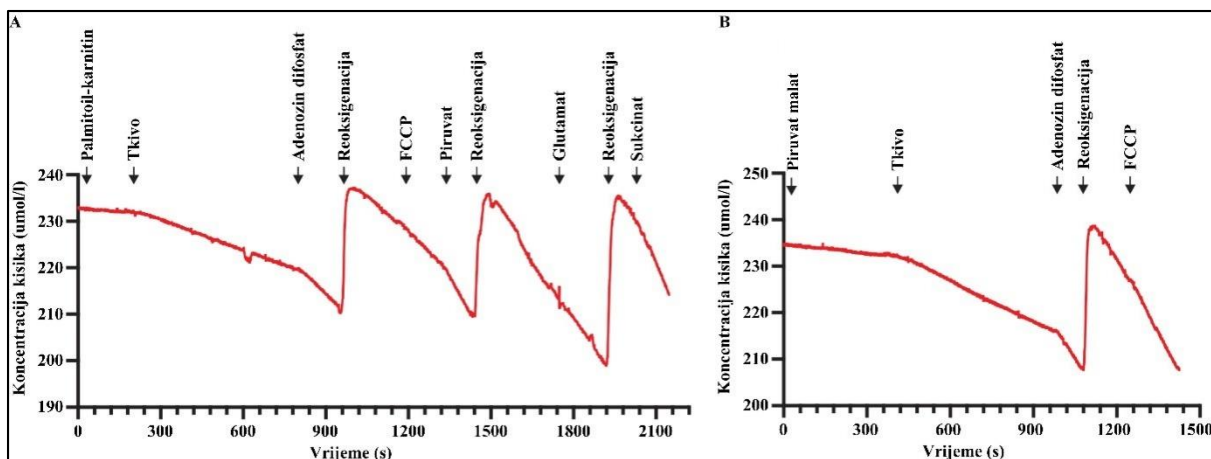
4.3.5. Biopsija miokarda lijeve klijetke

Iglena mikrobiopsija učinjena je tijekom kardiokirurške operacije u anteroseptalnom području subepikardijalnog miokarda lijeve klijetke (područje LAD arterijske opskrbe). Dobiveno tkivo je odmah podijeljeno na dva dijela u operacijskoj sali. Jedan dio tkiva je stavljen u ledeno-hladnu otopinu i unutar 15 minuta transportiran u istraživački laboratorij na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Navedena otopina se koristila i za mjerenje mitohondrijske respiracije, ima pH 7,1 pri 0°C i sastoji se od sljedećih sastavnica: 2,77 mmol/l CaK₂EGTA, 7,23 mmol/l K₂EGTA, 6,56 mmol/l MgCl₂, 5,7 mmol/l Na₂ATP, 15 mmol/l fosfokreatin, 20 mmol/l imidazol, 20 mmol/l taurin, 0,5 mmol/l ditiotreitol, 50 mmol/l K-metansulfonat. Drugi dio tkiva je odmah zamrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80°C za naknadne analize.

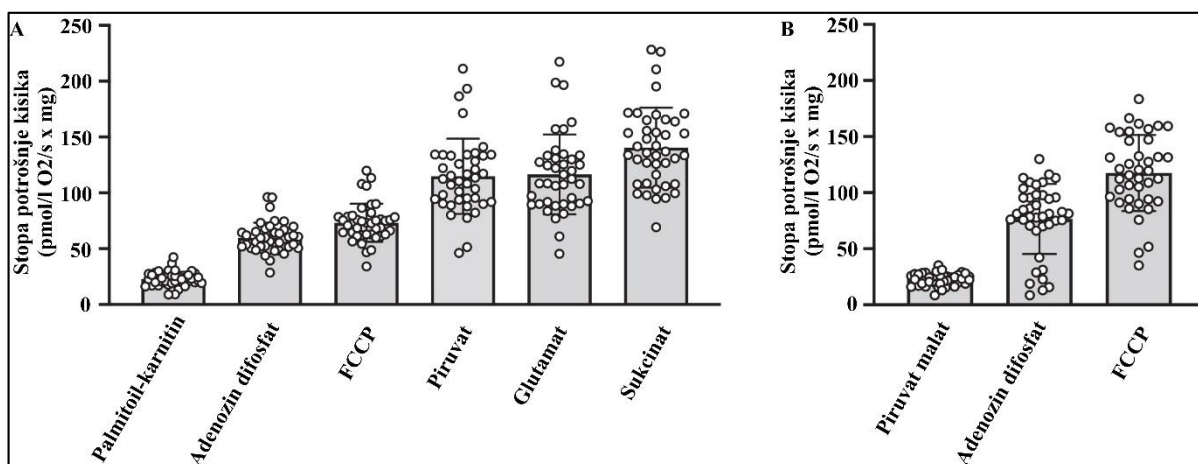
Aktivnosti citrat sintaze i piruvat dehidrogenaze (PDH) u homogeniziranom tkivu lijeve klijetke procijenjene su pomoću komercijalnih kompleta (CS0720, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; AAMT008-1KIT, Merck-Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD) kako je ranije opisano (9). Aktivnost citrat sintaze izražena je u međunarodnim jedinicama po mg tkivnog proteina (U/mg), a PDH kao stopa promjene apsorbancije (mOD/min) po mg proteina.

4.3.6. Procjena mitohondrijske respiracije

Mitohondrijska respiracija određena je kao stopa potrošnje kisika u tkivu u vlaknima miokarda permeabiliziranim saponinom (izražena u pmol O₂/s po miligramu težine mokrog tkiva), pomoću elektrode tipa Clark (Oxygraph, Hansatech Instruments, Pentney, Ujedinjeno Kraljevstvo). Reprezentativni tragovi i stope mitohondrijske respiracije za provedene protokole prikazani su na Slici 5 i 6.



Slika 5. Reprezentativni tragovi iz respirometrijskih mjerenja. Dva eksperimentalna protokola (A i B) su korištena za mjerenje koncentracije kisika prilikom uzastopnog dodavanja supstrata kao što je naznačeno strelicama. **Kratice:** FCCP – trifluoro karbonilcijanid fenilhidrazon.



Slika 6. Brzina mitohondrijske respiracije u ranim fazama respirometrijskih mjerenja. Prikazane su srednje vrijednosti (stupci) i pojedinačni (krugovi) stope potrošnje kisika. **Kratice:** FCCP – trifluoro karbonilcijanid fenilhidrazon.

Za procjenu respiracije temeljene na masnim kiselinama, mitohondriji su opskrbljeni palmitoil-karnitinom (40 $\mu\text{mol/l}$ u prisutnosti 5 mmol/l malata), dok je oksidacija ugljikohidrata procijenjena pomoću piruvata, metabolita glukoze (10 mmol/l , u prisutnost 5 mmol/l malata), uz dodatak ADP (2,5 mmol/l) u oba protokola. Oksidacija supstrata dodatno je stimulirana trifluorokarbonilcijanid fenilhidrazonom (FCCP; 1 $\mu\text{mol/l}$), koji raspršuje potencijal mitohondrijske membrane. Maksimalna respiracija određena je u prisutnosti svih metaboličkih

supstrata (s 5 mmol/l glutamata) i FCCP-a. Ambijentalni kisik je održavan iznad 210 $\mu\text{mol/l}$ kako bi se izbjeglo njegovo difuzijsko ograničenje u vlaknima.

4.3.7. Analiza tkiva *Western blot* metodom

Analiza tkiva *Western blot* metodom korištena je u drugom znanstvenom istraživanju iz ove doktorske disertacije. Smrznuti uzorci tkiva homogenizirani su u modificiranom radioimunoprecipitacijskom puferu (RIPA) s dodatkom inhibitora proteaze i fosfataze. Nakon elektroforeze (SDS-PAGE; engl. sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) i prijenosa, nitrocelulozne membrane ispitane su sljedećim primarnim protutijelima: anti-Mfn-2 (mitofusin-2; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD), anti-PGC-1 α (proliferator peroksisoma-aktivirani receptor (PPAR)- γ koaktivator α , Merck, Darmstadt, Njemačka), ukupni koktel ljudskih antitijela OXPHOS (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), anti-VLCAD (vrlo dugolančana acil-CoA dehidrogenaza, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, SAD), anti-HADHA (alfa podjedinica hidroksi acil-CoA dehidrogenaze, mitohondrijski trifunkcionalni protein, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, SAD) i MitoProfile Pyruvate dehidrogenase WB koktel antitijela (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon inkubacije s odgovarajućim sekundarnim antitijelima i SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države), kemiluminiscentni signal je snimljen pomoću sustava za Chemidoc sustava (Bio-Rad Labs, Des Plaines, Illinois, SAD).

4.4. Statistički postupci

U statističkoj obradi prikupljenih podataka korišten je računalni program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; IBM Corp, Armonk, New York, SAD; verzija 25) i GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD; verzija 8.0 i 9.4) za računalno sučelje Windows 10. Za procjenu normalnosti raspodjele podataka korišten je Shapiro-Wilk test.

Kontinuirane varijable s normalnom raspodjelom prikazane su kao srednje vrijednost \pm standardna devijacija, a ostale kontinuirane varijable prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon). Kategorijske varijable prikazane su kao broj (postotak unutar skupine). Za usporedbu normalno raspodijeljenih kontinuiranih varijabli između dvije skupine korišten je t-test za

neovisne uzorke, a za usporedbu ostalih kontinuiranih varijabli korišten je Mann-Whitney test. Za usporedbu kategorijskih varijabli između skupina korišten je Chi-kvadrat test.

Za procjenu povezanosti parametrijskih kontinuiranih varijabli je korištena Pearson analiza (dvije varijable), odnosno višestruka linearna regresijska analiza (više varijabli). Za procjenu povezanosti neparametrijskih kontinuiranih varijabli je korištena Spearman analiza (dvije varijable), odnosno Kernel regresijska analiza (više varijabli) uz *bootstrap* metodu. U prvom znanstvenom istraživanju učinjena je prilagodba za sljedeće varijable: dob, indeks tjelesne mase, plazmatska koncentracije glukoze i plazmatska koncentracije kolesterola. U drugom znanstvenom istraživanju učinjena je prilagodba za sljedeće varijable: dob, spol, indeks tjelesne mase i šećernu bolest tipa 2. Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

4. RESULTATI

4.1. Znanstveno istraživanje 1

4.1.1. Obilježja promatrane populacije

Prvo znanstveno istraživanje uključilo je ukupno 65 ispitanika oba spola, prosječno starije životne dobi ($65,0 \pm 8,0$ godina) i prekomjerne tjelesne mase ($28,0 \pm 3,6$ kg/m²). Većina ispitanika je imala arterijsku hipertenziju (N=37, 57,0%), dok su drugi komorbiditeti bili prisutni u manjine ispitanika. Prema prosječnom SYNTAX zbroju (medijan 5,0), većina ispitanika imala je nisku angiografsku kompleksnost koronarne bolesti (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja ispitanika

Varijable	Znanstveno istraživanje 1
	Ispitanici (n=65)
Osnovna obilježja i komorbiditeti	
Dob (godine) *	65,0 ± 8,0
Ženski spol ‡	23 (35,0%)
ITM (kg/m ²) *	28,0 ± 3,6
Šećerna bolest tipa 2 ‡	26 (40,0%)
Arterijska hipertenzija ‡	37 (57,0%)
Dislipidemija ‡	27 (41,0%)
Pušenje ‡	14 (22,0%)
SYNTAX zbroj †	5,0 (0,0-20,0)
Laboratorijski parametri	
Glukoza u plazmi (mmol/l) †	5,9 (5,1-8,2)
LDL-kolesterol u plazmi (mmol/l) *	3,0 ± 0,8
HDL-kolesterol u plazmi (mmol/l) *	1,3 ± 0,3
Trigliceridi u plazmi (mmol/l)	1,9 (1,45-2,7) †
Kolesterol u plazmi (mmol/l) *	5,0 ± 1,0
Ehokardiografski parametri*	
Ejekcijska frakcija (%)	59,0 ± 12,0

*Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za kontinuirane parametrijske varijable

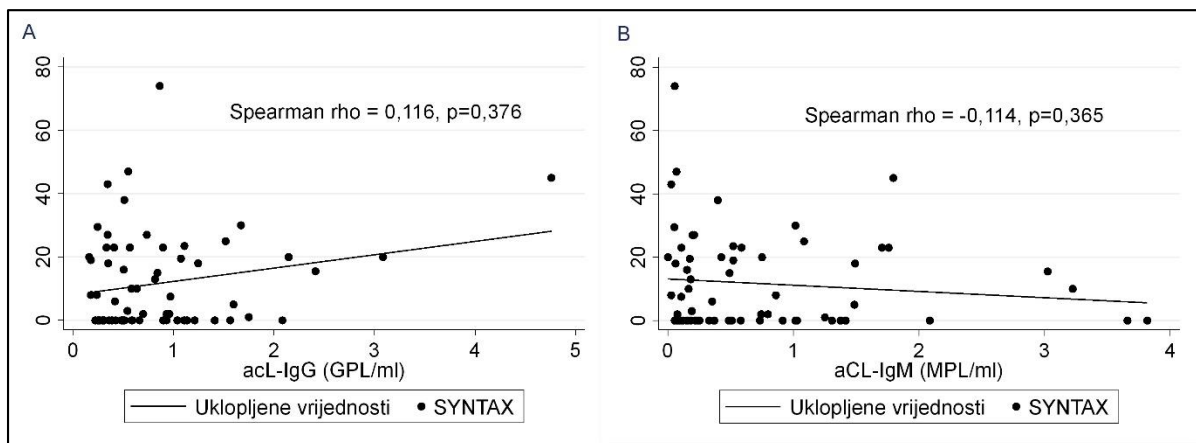
†Podatci su prikazani kao kao medijan (interkvartilni raspon) za kontinuirane neparametrijske varijable.

‡Podatci su prikazani kao kao broj (postotak) za kategorijske varijable.

Kraticke: n/a – nije primjenjivo; ITM – indeks tjelesne mase; SYNTAX – SYNergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and coronary artery bypass surgery.

4.1.2. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskih protutijela

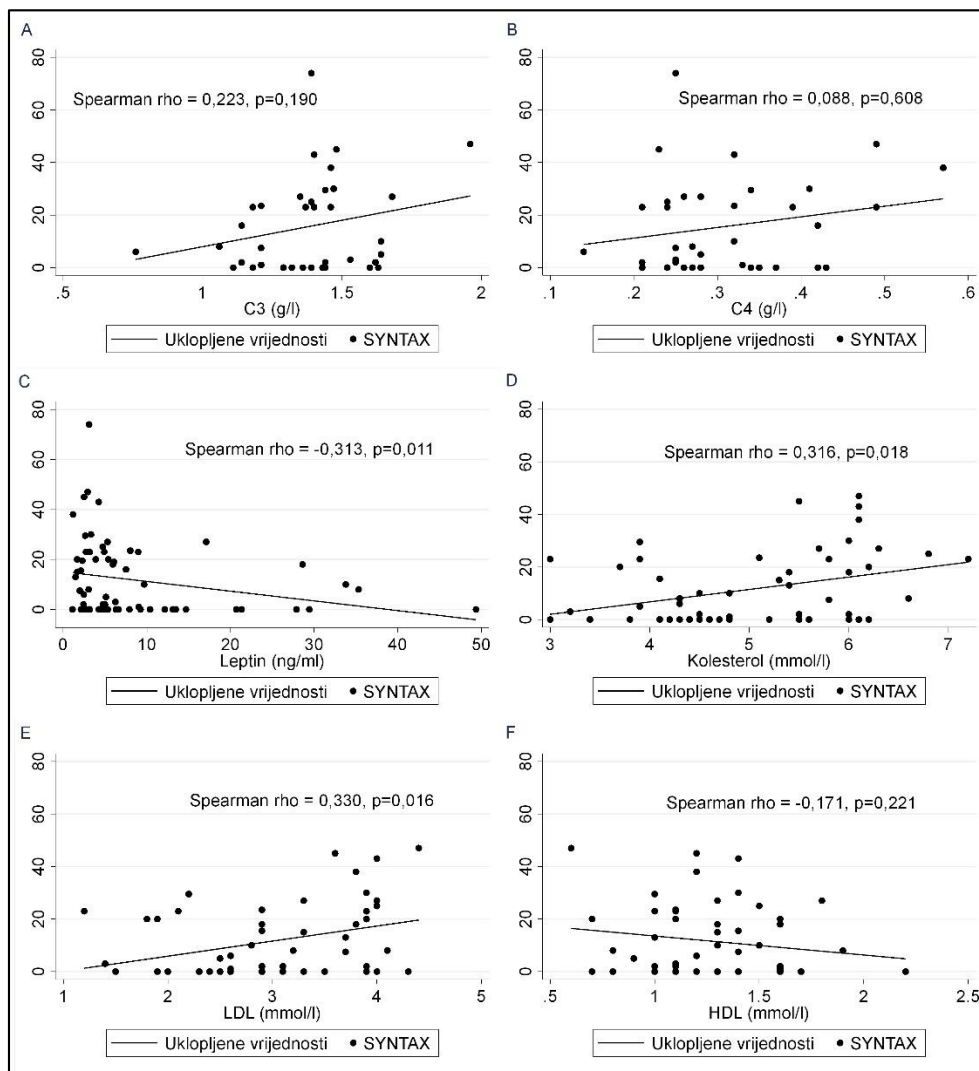
U jednostruskoj analizi nije utvrđena statistički značajna korelacija između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i aCL-IgG antikardiolipinskih protutijela ($\rho=0,116$, $P=0,376$), kao ni između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i aCL-IgM antikardiolipinskih protutijela ($\rho=0,114$, $P=0,365$) (Slika 7).



Slika 7. Povezanost kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskih protutijela IgG i IgM (A i B). Kratice: aCL-IgG, antikardiolipinsko protutijelo imunoglobulin G; aCL-IgM, antikardiolipinsko protutijelo imunoglobulin M; SYNTAX, SYnergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and coronary artery bypass surgery.

4.1.3. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti, komponenti komplementa, leptina i kolesterola

Nije utvrđena statistički značajna korelacija između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i komponenti komplementa C3 i C4 ($P>0,05$). Također nije utvrđena statistički značajna korelacija između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i leptina ($P>0,05$). Plazmatske koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola pokazale su statistički značajnu pozitivnu korelaciju s kompleksnošću koronarne arterijske bolesti ($\rho=0,316$, $P=0,018$, odnosno $\rho=0,330$, $P=0,016$) (Slika 8).



Slika 8. Povezanost kompleksnosti koronarne arterijske bolesti (SYNTAX) i odabranih varijabli: C3 i C4 komponente komplementa (A i B), leptin (C) i kolesterola (D), LDL (E) i HDL (F). **Kratice:** LDL, lipoprotein niske gustoće; HDL, lipoprotein velike gustoće; SYNTAX, SYnergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and coronary artery bypass surgery.

4.1.4. Neovisna povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli, nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable

Nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable, utvrđena je neovisna statistički značajna pozitivna korelacija kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG (β 5,58, $P=0,005$), dok nije bilo neovisne povezanosti između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i ostalih odabranih varijabli nakon prilagodbe za dob, indeks tjelesne mase i koncentracije glukoze i kolesterola u krvi (Tablica 2).

Tablica 2. Višestruka regresijska analiza neovisne povezanosti između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli

Varijable	β (95% interval pouzdanosti)	P
aCL-IgG (GPL/ml)	5,58 (0,21 – 8,61)	0,005
aCL-IgM (MPL/ml)	-2,48 (-2,04 – 5,44)	0,879
Leptin (ng/ml)	-0,56 (-4,30 – 5,44)	0,743
C3 (g/l)	18,96 (-2,09 – 50,39)	0,162
C4 (g/l)	46,39 (-31,71 – 99,81)	0,130

Napomena: Kernel višestruka regresija analiza. Napravljene su prilagodbe za dob, indeks tjelesne mase i koncentracije glukoze i kolesterola u krvi.

4.1.5. Usporedba prema spolu

Usporedba različitih varijabli između muških i ženskih ispitanika pokazala je statistički značajno veće vrijednosti SYNTAX zbroja (11,5 vs, 4,0, $P=0,002$) i niže vrijednosti leptina ($4,3 \pm 2,3$ vs, $16,8 \pm 12,6$, $P<0,001$) u muških ispitanika (Tablica 3).

Tablica 3. Usporedba odabranih varijabli prema spolu ispitanika

Varijable	Muški ispitanici (n=42)	Ženski ispitanici (n=23)	P
Dob (godine)*	65,0 ± 9,0	63,0 ± 1,0	0,590
ITM (kg/m ²)*	28,1 ± 3,0	28,1 ± 5,0	0,990
SYNTAX zbroj [†]	11,5 (1,3-23,0)	4,0 (0,0-8,0)	0,002
Glukoza u plazmi (mmol/l) [†]	5,9 (5,1-8,6)	5,5 (4,7-6,7)	0,102
Kolesterol u plazmi (mmol/l)*	5,0 ± 1,1	5,1 ± 0,9	0,690
LDL-kolesterol u plazmi (mmol/l)*	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,7	0,950
HDL-kolesterol u plazmi (mmol/l)*	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,010
Trigliceridi u plazmi (mmol/l) [†]	2,1 (1,5-2,8)	1,6 (1,1-2,1)	0,227
C-reaktivni protein (mg/dl)*	2,8 ± 3,3	2,8 ± 2,5	0,970
Leptin (ng/ml)*	4,3 ± 2,3	16,8 ± 12,6	<0,001
aCL-IgG (GPL/ml)*	1,0 ± 0,9	0,6 ± 0,4	0,049
aCL-IgM (MPL/ml)*	0,7 ± 0,8	0,8 ± 1,0	0,620
C3 (g/l)*	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,490
C4 (g/l)*	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,620

*Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za kontinuirane parametrijske varijable

[†]Podatci su prikazani kao kao medijan (interkvartilni raspon) za kontinuirane neparametrijske varijable.

Kratice: aCL – antikardiolipinsko protutijelo; C3 – komponenta komplementa C3; C4 – komponenta komplementa C4; HDL – lipoprotein visoke gustoće; ITM – indeks tjelesne mase; LDL – lipoprotein niske gustoće; SYNTAX – SYnergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and coronary artery bypass surgery.

Zanimljivo, regresijska analiza osjetljivosti je pokazala statistički značajnu pozitivnu korelaciju antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG i SYNTAX zbroja u muških ispitanika ($\beta=2,27$, $P=0,030$), dok isto nije pronađenu u ženskih ispitanika ($\beta=9,77$, $P=0,090$).

4.1.6. Povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli u bolesnika sa šećernom bolesti

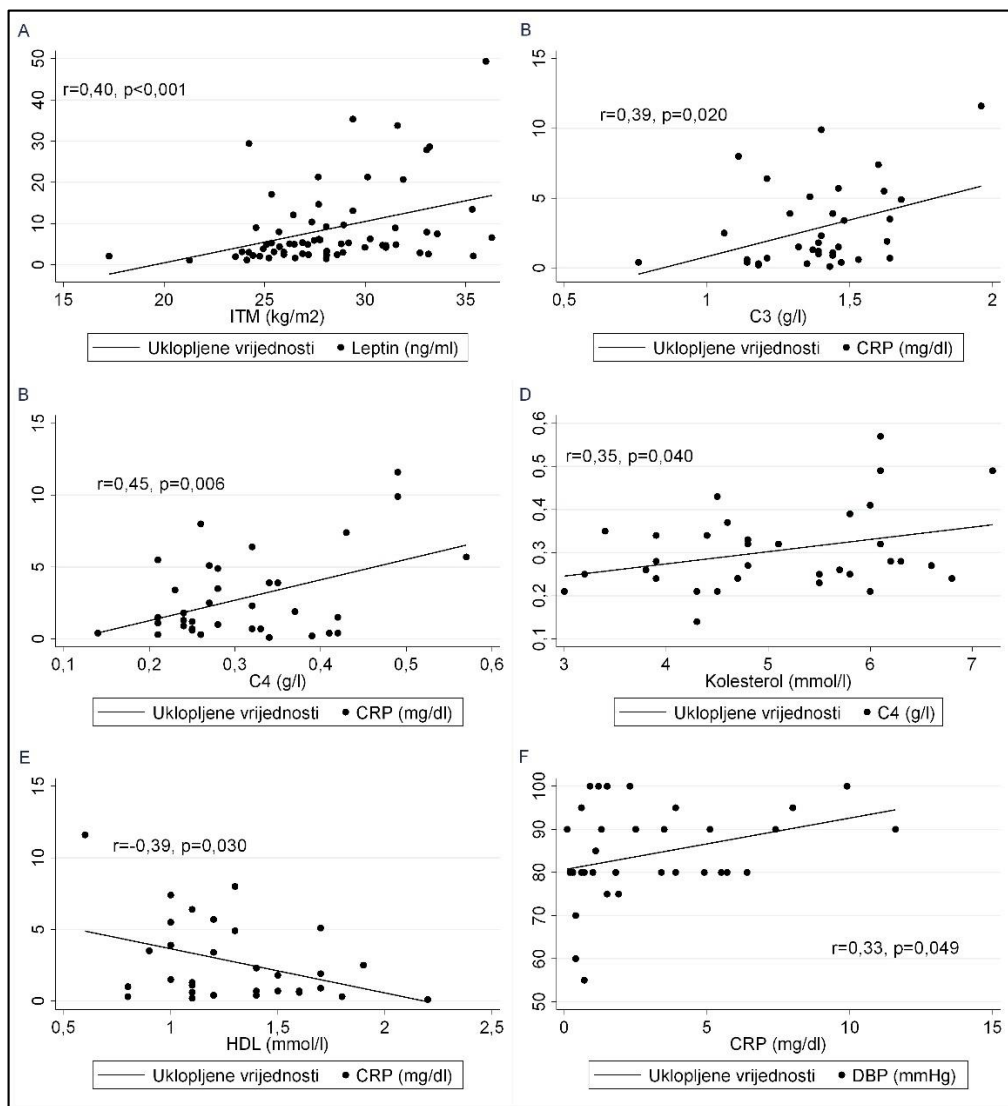
Nije utvrđena statistički značajna korelacija kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli u podskupini bolesnika sa šećernom bolesti (Tablica 4).

Tablica 4. Jednostruka korelacijska analiza povezanosti između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i odabranih varijabli u bolesnika sa šećernom bolesti

Varijable	ρ	<i>P</i>
aCL-IgG (GPL/ml)	-0,23	0,361
aCL-IgM (MPL/ml)	-0,03	0,903
Leptin (ng/ml)	-0,55	0,019
C3 (g/l)	0,33	0,320
C4 (g/l)	0,30	0,374

4.1.7. Povezanost između ostalih varijabli

Dodatne eksploracijske analize pokazale su statistički značajnu pozitivna korelaciju između leptina i indeksa tjelesne mase ($r=0,40$, $P<0,001$). Nadalje, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija C4 komponente komplemента s C-reaktivnim proteinom i ukupnim kolesterolom ($r=0,45$, $p=0,006$). Također, utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između HDL kolesterola i C-reaktivnog proteina ($r=-0,39$, $p=0,030$), kao i statistički značajna pozitivna korelacija između dijastoličkog krvnog tlaka i C-reaktivnog proteina ($r=0,33$, $p=0,049$) (Slika 9).



Slika 9. Povezanost između odabranih varijabli: leptin i ITM (A), CRP i C3 (B), CRP i C4 (C), C4 i kolesterol (D), CRP i HDL (E), DBP i CRP (F). **Kratice:** CRP, C-reaktivni protein; DBP, dijastolički krvni tlak; LDL, lipoprotein niske gustoće; HDL, lipoprotein velike gustoće.

4.2. Znanstveno istraživanje 2

4.2.1. Obilježja promatrane populacije

Drugo znanstveno istraživanje uključilo je ukupno 40 ispitanika oba spola, prosječno starije životne dobi ($66,0 \pm 8,0$ godina) i prekomjerne tjelesne mase ($29,3 \pm 4,2$ kg/m²). Više od dvije trećine ispitanika su imali arterijsku hipertenziju (N=29, 70,0%), a četvrtina ispitanika je imala šećernu bolest tipa 2 (N=10, 25,0%). Prema prosječnom EuroSCORE II zbroju ($2,5 \pm 1,7$), većina ispitanika imala je intermedijarni rizik operacijskog zahvata (Tablica 5).

Tablica 5. Osnovna obilježja ispitanika

Varijable	Znanstveno istraživanje 2
	Ispitanici (n=40)
Osnovna obilježja i komorbiditeti	
Dob (godine) *	$66,0 \pm 8,0$
Ženski spol [‡]	9 (23,0%)
ITM (kg/m ²) *	$29,3 \pm 4,2$
Šećerna bolest tipa 2 [‡]	10 (25,0%)
Arterijska hipertenzija [‡]	29 (70,0%)
EuroScore II (%) *	$2,5 \pm 1,7$
Laboratorijski parametri	
HbA1c (%) *	$6,1 \pm 1,1$
LDL-kolesterol u plazmi (mmol/l) *	$2,0 \pm 0,7$
HDL-kolesterol u plazmi (mmol/l) *	$1,1 \pm 0,3$
Trigliceridi u plazmi (mmol/l)	$1,8 \pm 0,9^*$
Ehokardiografski parametri*	
Ejekcijska frakcija (%)	$60,4 \pm 12,0$
LV relativna debljina stijenki (cm)	$0,52 \pm 0,7$
Dijametar lijevog atrija (mm)	$4,4 \pm 0,6$
Brzina MV E (cm/s)	$77,3 \pm 20,9$
Brzina MV A (cm/s)	$89,1 \pm 25,3$
MV E/A omjer	$0,8 \pm 0,2$
MV deceleracijsko vrijeme (ms)	$224,3 \pm 9,2$
Lijekovi[‡]	

Acetilsalicilna kiselina	37 (93,0%)
Ostali antiagregacijski lijekovi	28 (70,0%)
Beta blokator	32 (80,0%)
ACE inhibitor/ARB	23 (58,0%)
Statin	32 (80,0%)
Nitrat	9 (23,0%)
Diuretik	5 (13,0%)
Blokator kalcijских kanala	4 (10,0%)
Amiodaron	3 (8,0%)
Inzulina	4 (10,0%)
Oralni hipoglikemik	13 (33,0%)

*Podatci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija za kontinuirane parametrijske varijable

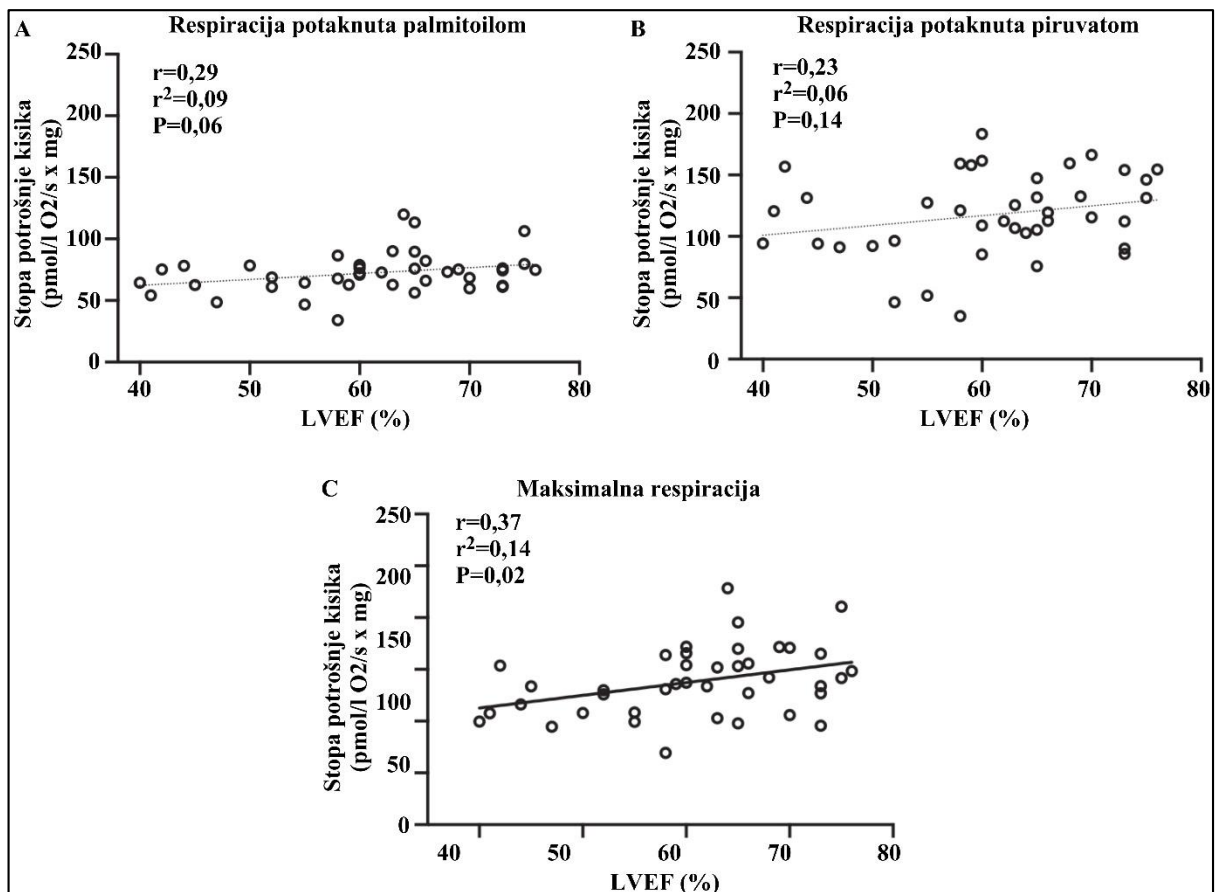
†Podatci su prikazani kao kao medijan (interkvartilni raspon) za kontinuirane neparametrijske varijable.

‡Podatci su prikazani kao kao broj (postotak) za kategorijske varijable.

Kratice: n/a – nije primjenjivo; HbA1c – glikozirani hemoglobin; ITM – indeks tjelesne mase; LV – lijeva klijetka; MV – mitralni zalistak.

4.2.2. Povezanost između srčane sistoličke funkcije i mitohondrijske respiracije

Nije utvrđena statistički značajna korelacija između LVEF i mitohondrijske respiracije koja je potaknuta supstratima metabolizma masnih kiselina ili ugljikohidrata. Međutim, maksimalna mitohondrijska respiracija (u prisutnosti svih supstrata) je pokazala statistički značajnu pozitivnu korelaciju s e젝cijskom frakcijom lijeve klijetke ($r=0,37$, $P=0,020$) (Slika 14).



Slika 10. Povezanost sistoličke funkcije lijeve klijetke (LVEF) s oksidativnim kapacitetom mitohondrija. Prikazana je korelacija između LVEF i mitohondrijske respiracije u prisutnosti palmitoila kao glavnog supstrata (A), piruvata (B) i svih supstrata (maksimalna respiracija; C).

Kratice: LVEF, e젝cijska frakcija lijeve klijetke.

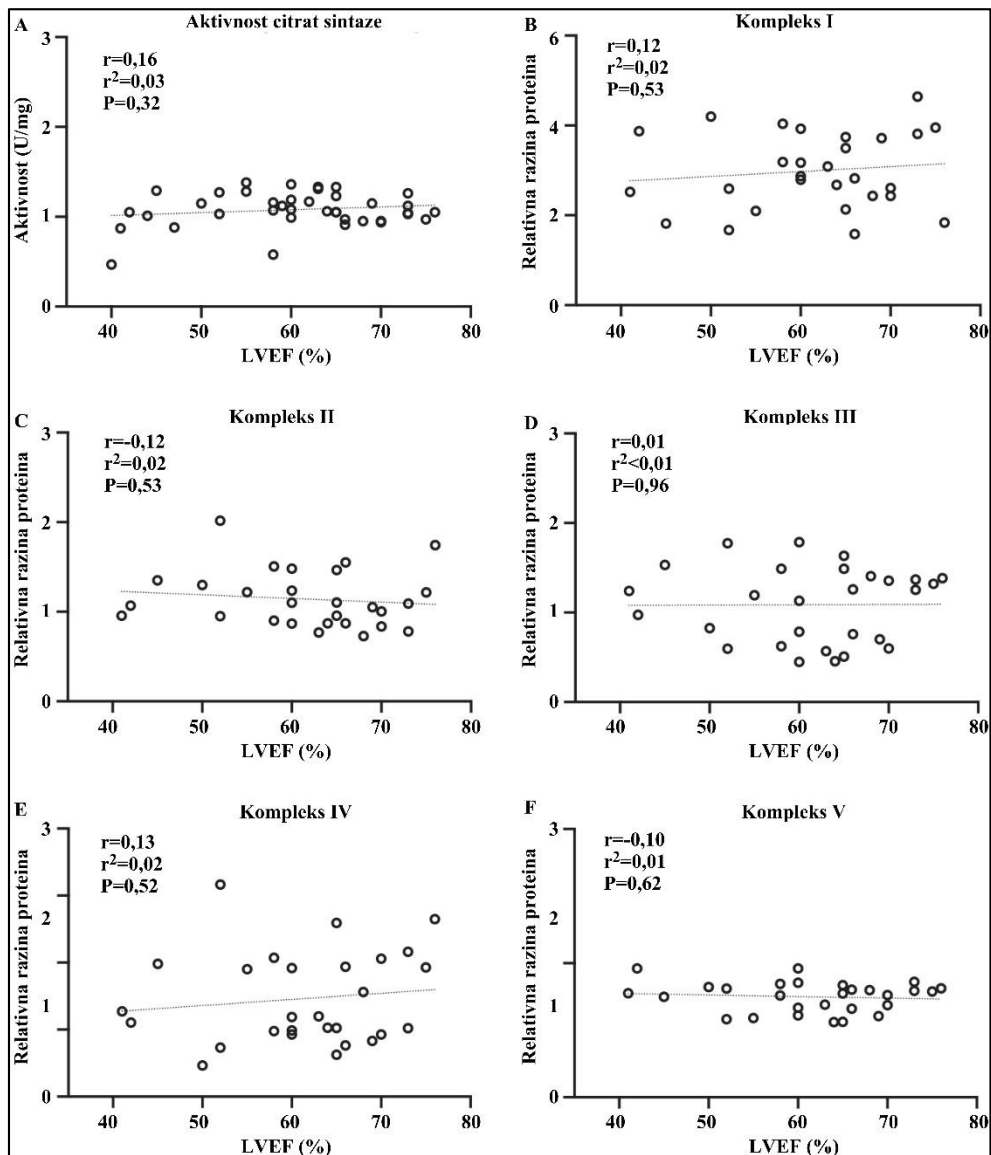
Rezultati o statistički značajnoj povezanosti maksimalne mitohondrijske respiracije (u prisutnosti svih supstrata) i LVEF su potvrđeni nakon prilagodbe za dob, spol, indeks tjelesne mase i šećernu bolest tipa 2 (Tablica 6).

Tablica 6. Povezanost između ejekcijske frakcije lijeve klijetke i mitohondrijskih parametara nakon prilagodbe za dob, spol, indeks tjelesne mase i dijagnozu šećerne bolesti tipa 2

Varijable	β (95% interval pouzdanosti)	P-vrijednost
Maksimalna respiracija	0,11 (0,01–0,21)	0,030
Respiracija potaknuta palmitoilom	0,19 (-0,09–0,47)	0,170
Respiracija potaknuta piruvatom	0,07 (-0,09–0,23)	0,400
Aktivnosti citrat sintaze	10,43 (-8,75–29,60)	0,280

4.2.3. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa sadržajem mitohondrija i ekspresijom mitohondrijskih kompleksa respiratornog lanca

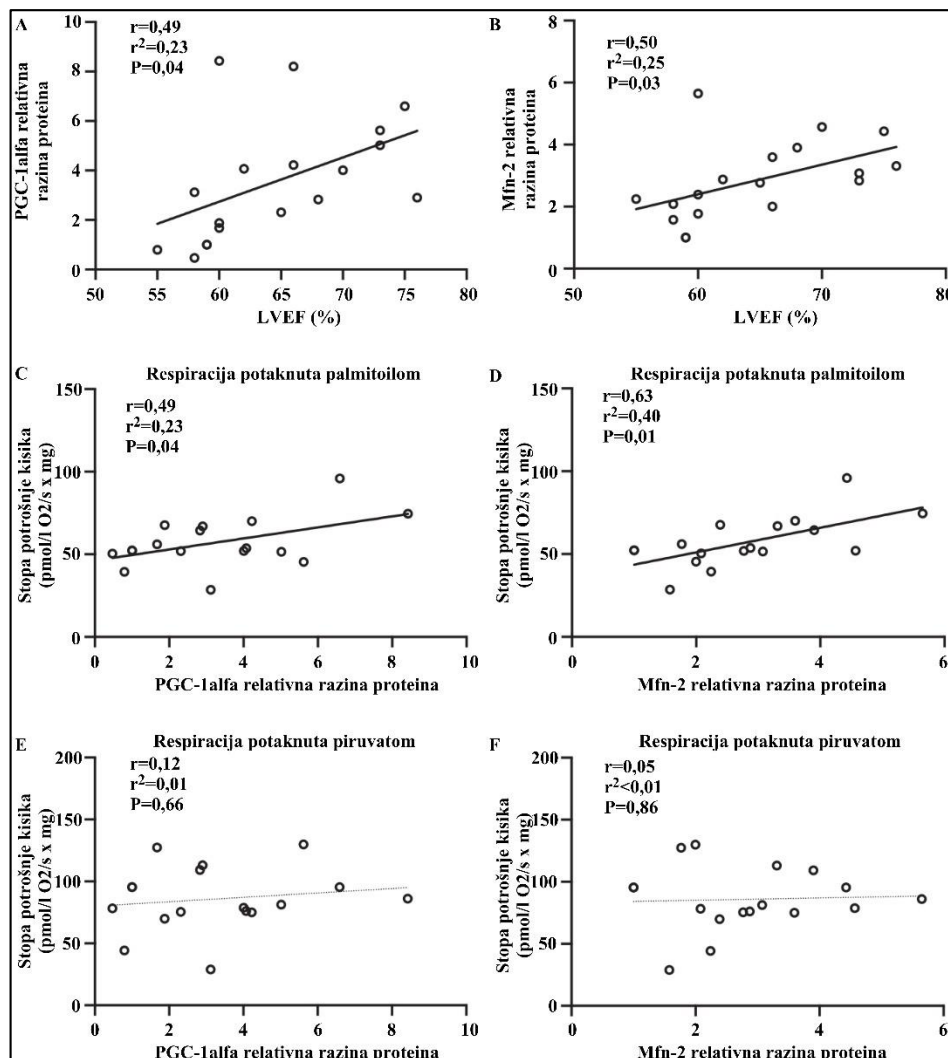
Nije utvrđena korelacija između LVEF i aktivnosti citrat sintaze (Slika 11). Slično tome, ekspresija pojedinačnih kompleksa mitohondrijske respiracije nije pokazala korelaciju s ejijskom frakcijom lijeve klijetke i maksimalnom mitohondrijskom respiracijom (Slika 11).



Slika 11. Povezanost kontraktilnosti miokarda (LVEF) s količinom mitohondrija (citrat sintaza; A) i ekspresijom mitohondrijskih kompleksa respiratornog lanca (kompleks I-V; B-F). **Kratice:** LVEF, ejijska frakcija lijeve klijetke.

4.2.4. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa mitohondrijskom biogenezi i dinamikom

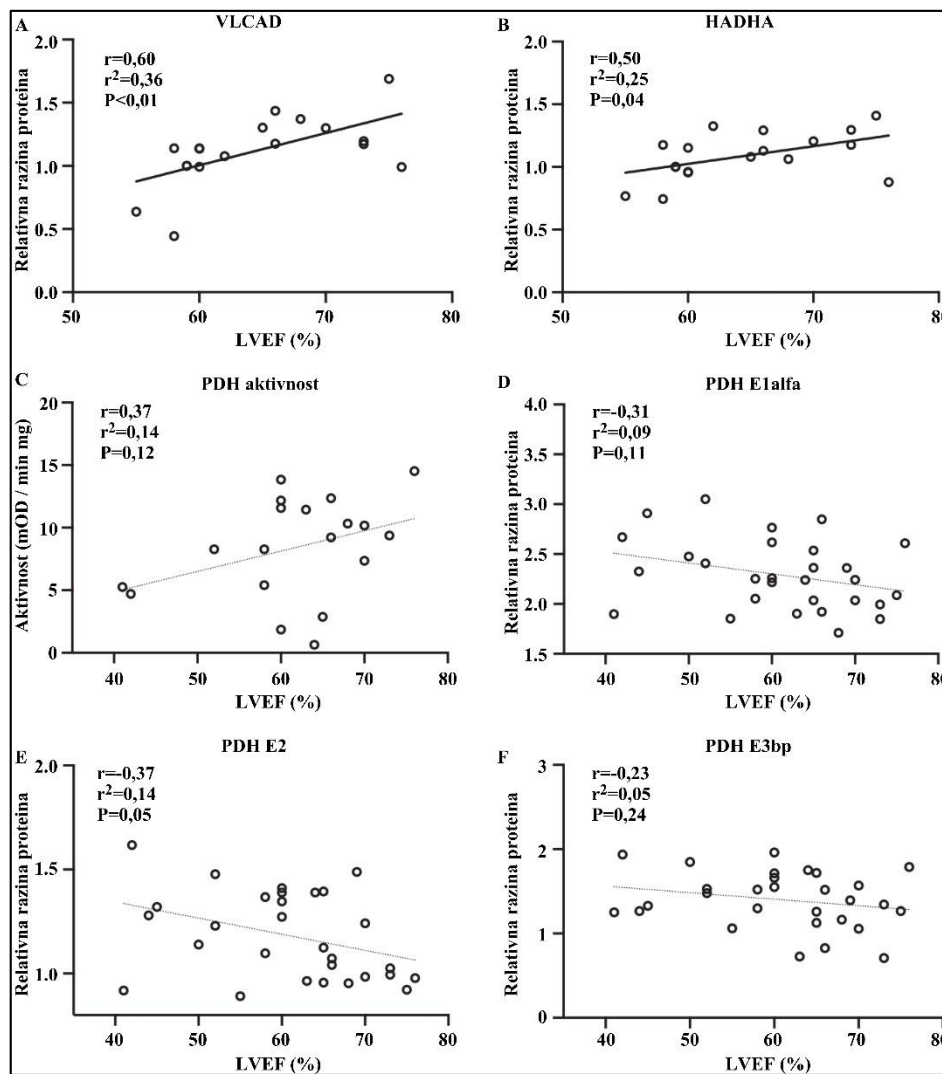
Utvrđena je statistički značajna povezanost LVEF i ekspresije čimbenika mitohondrijske biogeneze i remodeliranja (PGC-1 α i Mfn-2) u miokardu. Nadalje, izražaj u miokardu PGC-1 α i Mfn-2 proteina, također pokazuje statistički značajnu povezanost s mitohondrijskom respiracijom u prisutnosti palmitoila, dok isto nije utvrđeno mitohondrijsku respiraciju potaknutu piruvatom (Slika 12).



Slika 12. Povezanost LVEF sa mitohondrijskom biogenezi i dinamikom. Prikazane su korelacije između LVEF i ekspresije PGC-1 α (A) i Mfn-2 (B) u miokardu. Također su prikazane korelacije između razina ekspresije PGC-1 α i Mfn-2 s respiracijom potaknutom palmitoilom ili piruvatom; (C, D) odnosno (E, F). **Kratice:** LVEF, ejectiveska frakcija lijeve klijetke; Mfn-2, mitofusin-2; PGC-1 α , receptor- γ koaktivator α aktiviran proliferatorom peroksisoma.

4.2.5. Povezanost srčane sistoličke funkcije sa ekspresijom enzima beta oksidacije masnih kiselina

Utvrđena je statistički značajna povezanost između LVEF i razine glavnih enzima odgovornih za oksidaciju masnih kiselina VLCAD (katalizira početni korak oksidacije dugolančanih masnih kiselina) i HADHA (katalizira drugi i treći korak β -oksidacije). S druge strane, isto nije potvrđeno za ekspresiju glavnih podjedinica piruvat-dehidrogenaze, ključnog enzima u metaboličkom putu oksidacije ugljikohidrata (Slika 13).



Slika 13. Povezanost LVEF sa ekspresijom β -oksidacijskih enzima. Prikazane su korelacije između LVEF i ekspresija β -oksidacijskih enzima VLCAD (A) i HADHA. (C-F) prikazuju korelacije između LVEF i aktivnosti te ekspresije PDH podjedinica E1 α , E2 i E3bp. **Kratice:** LVEF, ejekcijska frakcija lijeve klijetke; HADHA, alfa podjedinica hidroksiacyl-CoA dehidrogenaze; PDH, piruvat dehidrogenaza; VLCAD, acil-CoA dehidrogenaza vrlo dugog lanca.

5. RASPRAVA

Provedenim istraživanjima u sklopu ove doktorske disertacije smo prikupili nova saznanja o povezanosti sistemske upale i stupnja koronarne arterijske bolesti, te o povezanosti mitohondrijske respiratorne sposobnosti miokarda sa srčanom sistoličkom funkcijom kod pacijenata s koronarnom arterijskom bolesti koji su podvrgnuti kirurškoj revaskularizaciji. Time smo potvrdili postavljenu hipotezu i ispunili glavne ciljeve ove doktorske disertacije.

U prvom znanstvenom istraživanju istraživali smo mogući odnos između imunoloških i proupalnih čimbenika (aCL protutijela, komplement C3, C4 i leptin), te težine i opsega bolesti koronarnih arterija. Iako su ti čimbenici opsežno proučavani u kontekstu kardiovaskularnih i sistemskih autoimunih bolesti, još uvijek postoje praznine koje do sada nisu riješene. Otkrili smo da čak i kod pacijenata koji ne boluju od autoimune bolesti postoji pozitivan odnos između aCL-IgG autoantitijela i SYNTAX zbroja koji izražava težinu koronarne bolesti. SYNTAX zbroj je negativno povezan s koncentracijom leptina u serumu, dok nije pronađena povezanost s razinama faktora komplementa C3 i C4. Korelacije između komponenti komplementa i CRP-a, kao i njihova povezanost s ukupnim kolesterolom, HDL-om i dijastoličkim krvnim tlakom potvrđuju poznate interakcije između upalnih puteva, prometa kolesterola u krvi i vaskularnih bolesti.

Postoje različiti načini za stupnjevanje težine koronarne arterijske bolesti. U svakodnevnoj kliničkoj praksi najviše se koriste angiografski zbrojevi poput anatomskog SYNTAX zbroja koji je validiran u brojnim populacijama. Iako je isti izvorno razvijen za odlučivanje o optimalnoj strategiji revaskularizacije (67), brojna naknadna istraživanja su utvrdila da SYNTAX zbroj ima prognostičku vrijednost u predviđanju velikih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja u različitim bolesnika, čime je potvrđena njegova klinička relevantnost (68, 69). U ovoj studiji, regrutirani pacijenti pokazali su relativno različite razine ozbiljnosti koronarne bolesti – sa SYNTAX rasponom od 0 do 47. Stoga su neki od naših pacijenata bili zdravi (što se tiče koronarne ateroskleroze), dok su neki imali ekstenzivnu CAD.

Kronična upala niskog stupnja već je prepoznata kao važan čimbenik koji doprinosi patološkom remodeliranju miokarda u različitim kardiovaskularnim poremećajima (70). Upala je ključna za početak i progresiju aterogeneze, uz standardne metaboličke rizične čimbenike poput hiperkolesterolemije. Nastavno tome, proupalni čimbenici poput C-reaktivnog proteina se koriste kao dodatni biomarkeri za predviđanje rizika i stratifikaciju bolesnika s kardiovaskularnim bolestima (71). Ubrzana ateroskleroza je također utvrđena kod bolesnika koji boluju od sistemskih autoimunskih bolesti kao što su sistemski eritemski lupus i

antifosfolipidni sindrom (24). Sukladno tome, provedeno je nekoliko istraživanja o utjecaju protuupalnih lijekova kod bolesnika s koronarnom bolesti, a prvotni rezultati sugeriraju njihov povoljni učinak u smislu smanjenja kardiovaskularnih neželjenih ishoda (27-30).

Poznato je da antifosfolipidna protutijela (antikardiolipinska protutijela, lupus antikoagulans i anti- β 2 glikoprotein I) mogu aktivirati prokoagulacijske puteve koji potiču upalu i razvoj tromba djelujući preko molekule β 2-glikoprotein I (32). Nekoliko znanstvenih istraživanja je proučavalo odnos između antifosfolipidnih protutijela i koronarne arterijske bolesti (72-74). Nedavna meta-analiza podataka o 2425 bolesnika iz 11 kliničkih ispitivanja upućuje da bolesnici s povećanim razinama antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG imaju udvostručen rizik od ponovnog velikog neželjenog kardiovaskularnog događaja (72). Međutim, ne postoje jasni podaci o povezanosti težine koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskih protutijela u bolesnika koji su podvrgnuti invazivnoj koronarografiji, što je potaklo prvo znanstveno istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju neovisnu pozitivnu povezanost između serumskih razina antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG i ukupnog SYNTAX zbroja, dok nije utvrđena značajna povezanost između serumskih razina aCL-IgM i ukupnog SYNTAX zbroja. Navedeno može upućivati na važnost trajanja upale u povezanosti s koronarnom arterijskom bolesti. Nadalje, budući da su svi uključeni bolesnici imali normalne razine antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG (<20 U/ml), može se zaključiti da se biološki učinci aCL-IgG protutijela mogu ostvariti čak u normalnom rasponu titra antitijela u bolesnika s odsustvom sistemske autoimunosne bolesti. Štoviše, ovi rezultati su sukladni jednom starijem istraživanju koje je dokazalo pozitivnu povezanost između antifosfolipidnog protutijela na anti- β 2-glikoprotein I i SYNTAX zbroja u bolesnika koji su podvrgnuti kardiokirurškoj revaskularizaciji (75).

Iako je ova doktorska disertacija ispitivala isključivo sistemske serumske razine antikardiolipinskih protutijela, lokalne razine antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG u stijenci koronarne arterije možda imaju veću važnost i ulogu. Naime, prethodno je pokazano da molekula β 2-glikoprotein I, kao glavni medijator protrombotskog i proupalnog djelovanja antikardiolipinskih protutijela, ima značajnu ekspresiju u području stanica glatkih mišića, makrofaga i endotelnih stanica unutar aterosklerotske lezije (76). Primjerice, prethodno je utvrđeno da vezanje antikardiolipinskog protutijela i β 2-glikoproteina I potiče stvaranje pjenastih stanica preko vezanja oksidiranog kompleksa LDL-a i β 2-glikoproteina I s makrofazima (77). Nadalje, utvrđeno je da prijenos limfocita koji su reaktivni na β 2-glikoprotein I ostvaruje ubrzanu aterosklerozu u miševa s knockout genom za na LDL-receptor

(76). Prema tome, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se dodatno utvrdio utjecaj lokalnih razina antikardiolipinskih protutijela na razvoj i progresiju koronarne arterijske bolesti.

Uključeni ispitanici iz ove doktorske disertacije su imali nisku angiografsku kompleksnost koronarne bolesti što treba uvažiti prilikom interpretacije rezultata istraživanja. Međutim, jedno starije istraživanje autora Dinckal i sur. pokazalo je pozitivnu povezanost između antifosfolipidnog protutijela na anti- β 2-glikoprotein I i SYNTAX zbroja u bolesnika s uznapređovalom koronarnom arterijskom bolesti (SYNTAX zbroj >23) (75), što moguće upućuje na postojanu povezanost antifosfolipidnih protutijela i SYNTAX zbroja kroz cijeli spektrom kompleksnosti koronarne bolesti.

Osim antikardiolipinskih protutijela, ova doktorska disertacija je također ispitala povezanost komponenti sustava komplementa i leptina s kompleksnošću koronarne arterijske bolesti. Prethodna istraživanja su pokazala da bolesnici s antifosfolipidnim sindromom razvijaju aktivaciju sustava komplementa, što sugerira da bi komplement mogao imati važnu ulogu u protrombotskim i proaterogenim učincima antifosfolipidnih protutijela (33). Nadalje, povećane vrijednosti cirkulirajućih proteina komplementa su prethodno povezane s kalcifikacijama koronarnih arterija u asimptomatskih osoba (78). Međutim, rezultati ove doktorske disertacije nisu pokazali značajnu povezanost između komponenti komplementa i SYNTAX zbroja. Navedeni rezultati mogli bi biti posljedica ograničenog broja ispitanika, kao i činjenice da nisu mjerene aktivne komponente komplementa C3a i C4a. Budući da je ova doktorska disertacija ipak utvrdila pozitivnu korelaciju između C4 komponente komplementa i poznatih medijatora koronarne arterijske bolesti kao što su kolesterol i C-reaktivni protein, potrebna su daljnja istraživanja s većim uzorkom kako bi se razjasnila prava uloga komplementa u patofiziologiji koronarne arterijske bolesti.

Jedan od važnih pleiotropnih čimbenika koji moduliraju upalni odgovor jest leptin (79, 80), hormon koji izlučuju stanice bijelog masnog tkiva, s primarnom ulogom u regulaciji energetske ravnoteže i metabolizma (81). Osim što ima metaboličku ulogu, pokazano je da leptin može imati proupalne učinke (82, 83), s mogućim proaterogenim posljedicama (84, 85). Ipak, rezultati dostupnih istraživanja o povezanosti leptina i koronarne arterijske bolesti nisu konzistentni (34, 35, 79). Ova doktorska disertacija također nije utvrdila značajnu neovisnu povezanost između leptina i SYNTAX zbroja što može bitno sugerira da interakcija upale i progresije koronarne arterijske bolesti nije posredovana pretpostavljenim proupalnim učincima leptina. Ipak, zbog ograničenja istraživanja nije moguće donijeti definitivne zaključke, već su potrebna daljnja istraživanja o ovoj temi.

Završno, utvrđene su značajne spolne razlike u kompleksnosti koronarne arterijske bolesti, kao i u razinama antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG, pri čemu muškarci imaju težu koronarnu arterijsku bolest i viši titar protutijela. Nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable, utvrđena je značajna pozitivna povezanost između antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG i SYNTAX zbroja u muškaraca, dok isto nije potvrđeno za ženske ispitanike. Navedeno bi moglo biti posljedica manjeg broja ženskih ispitanika, kao i nižih vrijednosti SYNTAX zbroja u ženskih ispitanika. Nadalje, ženski ispitanici su također imali veće serumske razine leptina u usporedbi s muškarcima. Ove spolne razlike u skladu su s prethodnim znanstvenim istraživanjima (86). S druge strane, podanaliza u bolesnika s šećernom bolesti nije utvrdila značajnu povezanost antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG i SYNTAX zbroja što također može biti posljedica ograničenog uzorka, ali i specifičnost populacije bolesnika sa šećernom bolesti (87), zbog čega su potrebna daljnja istraživanja.

U drugom znanstvenom istraživanju utvrđena je značajna povezanost LVEF s kapacitetom mitohondrijske respiracije i β -oksidacije, korištenjem izravnih mjerenja u biopstatima miokarda lijeve klijetke. Nadalje, utvrđena je pozitivna povezanost između glavnih pokretača mitohondrijske biogeneze/remodeliranja (PGC-1 α i Mfn-2) i mitohondrijske respiracije posredovane masnim kiselinama, dok ista povezanost nije nađena s mitohondrijskom respiracijom posredovanom ugljikohidratima.

Postojeća istraživanja o ulozi mitohondrijskoj respiratorne funkcije u kroničnom srčanom zatajivanju uglavnom su rađena na miokardu pretklijetki, dok su istraživanja koja su koristila miokard lijeve klijetke uključivale bolesnike u završnom stadiju kroničnog zatajenja srca (88-91). Dio tih istraživanja je uključio bolesnike koji su bili liječeni uređajem za potporu lijeve klijetke ili transplantacijom srca zbog čega su uglavnom pokazivali smanjenu mitohondrijsku respiraciju u sklopu terminalnog zatajenja srca. Također, uznapredovalo kronično zatajenje srca je povezano s gubitkom metaboličke fleksibilnosti (89, 90, 92) te smanjenjem oksidacije masnih kiselina i povećanog korištenja ugljikohidrata (60). To je u suprotnosti sa zdravim miokardom koji pretežito koristi masne kiseline, ali također posjeduje visoku metaboličku fleksibilnost kada dođe do promjene dostupnosti supstrata (65).

S ciljem identificiranja mitohondrijskih promjena koje prethode značajnom smanjenju kontraktilne funkcije srca, uključili smo bolesnike podvrgnute operaciji ugradnje koronarne prenosnice (coronary artery bypass grafting, CABG) s normalnom do blago smanjenom srčanom sistoličkom funkcijom. Utvrdili smo pozitivnu korelaciju LVEF i maksimalne mitohondrijske respiracije u populaciji bolesnika s ejekcijskom frakcijom $\geq 40\%$. Ovi rezultati

su u skladu s prethodnima koji su pokazali da dolazi do progresivno manje mitohondrijske respiracije s porastom NYHA klase (90). S druge strane, nismo pronašli povezanost između LVEF i mitohondrijske respiracije posredovane ugljikohidratima (piruvat), kao ni LVEF i mitohondrijske respiracije posredovane masnim kiselinama (palmitoil).

Nadalje, u ovoj doktorskoj disertaciji nije utvrđena povezanost između aktivnosti citrat sintaze, pokazatelja količine mitohondrija, i LVEF, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (90). Za razliku od ranijih istraživanja koja su utvrdila smanjenu ekspresiju respiratornog kompleksa I, kao i smanjenu respiraciju povezanu s kompleksom I u miokardu bolesnika sa terminalnim stadijem kroničnog zatajenja srca (90, 93), ovdje nije utvrđena povezanost između ekspresije mitohondrijskih respiracijskih kompleksa i LVEF. Također, nije utvrđena asocijacija između LVEF i mitohondrijske respiracije u prisutnosti supstrata koji proizvode NADH (piruvat, malat i glutamat). Navedeni rezultat sugerira da smanjenje funkcije respiracijskog kompleksa I ne pridonosi blagoj sistoličkoj disfunkciji u bolesnika s koronarnom bolesti.

Normalna funkcija mitohondrija regulirana je procesima koji uključuju biogenezu i dinamiku mitohondrija (fisija/fuzija), kao i čišćenje nevaljalih mitohondrija. Glavni regulator mitohondrijske funkcije u tkivima s visokim oksidativnim metabolizmom je inducibilni transkripcijski PPAR- γ koaktivator α (PGC1- α) (94, 95). Brojna istraživanja provedena na životinjskim modelima pokazala su da su PGC-1 α i njegovi ciljni putovi smanjeni u uvjetima patološke srčane hipertrofije i zatajenja srca (96). Podatci iz istraživanja na ljudima su rijetki i uglavnom su temeljeni na populaciji bolesnika s uznapredovalim ili terminalnim stadijima zatajenja srca koji inače pokazuju varijabilnu ekspresiju PGC-1 α (97, 98). Ipak, analiza na bolesnicima s očuvanom ejskijskom frakcijom (LVEF \geq 55%) pokazala je da je razina ekspresije PGC-1 α pozitivno korelirana sa sistoličkom funkcijom. Dodatni važni čimbenik za održavanje mitohondrijske funkcije je Mfn-2, koji upravlja ranim koracima mitohondrijske membranske fuzije (99). Prethodno je utvrđeno da je patološko remodeliranje u kroničnom zatajenju srca povezano s nižom regulacijom Mfn-2, kao i s malim fragmentiranim mitohondrijima (91, 99). Ova doktorska disertacija potvrđuju povezanost između Mfn-2 i sistoličke funkcije lijeve klijetke čak i kod bolesnika s normalnom LVEF.

Ekspresija PGC-1 α je također korelirala s mitohondrijskom respiracijom posredovanom palmitoilom, što ponovno naglašava važnost PGC-1 α za metabolizam masnih kiselina u miokardu (95, 96, 100). S druge strane, veza nije utvrđena između PGC-1 α i mitohondrijske respiracije posredovane piruatom. Slično tome, ekspresija Mfn-2 je pokazala pozitivnu povezanost s mitohondrijskom respiracijom posredovanom palmitoilom, ali ne i s

mitohondrijskom respiracijom posredovanom piruvatom. Navedeni podatci pozitivne korelacije između mitohondrijske oksidacije masnih kiselina i Mfn-2 mogu se objasniti činjenicom da PGC-1 α , snažan regulator mitohondrijske oksidacije masnih kiselina, također stimulira ekspresiju Mfn-2 (101). Budući da izravni učinak Mfn-2 na metabolizam mitohondrijskih lipida još nije detaljno istražen (102), isto bi moglo biti predmet budućih ciljanih istraživanja.

Nadalje, ekspresija β -oksidacijskih enzima VLCAD i HADHA pokazala je povezanost s LVEF. Ova povezanost nije potvrđena za aktivnost i ekspresiju piruvat-dehidrogenaze (enzima koji ograničava brzinu metabolizma ugljikohidrata), što sugerira da već u ranim fazama metaboličkog remodeliranja srcu postoji vezu između sistoličke funkcije i mitohondrijskog kapaciteta za korištenje masnih kiselina. Međutim, ista veza ne postoji s metaboličkim putem oksidacije ugljikohidrata.

Smanjena mitohondrijska oksidacija masnih kiselina, u kombinaciji s njihovom povećanom plazmatskom razinom i njihovim povećanim unosom u stanice miokarda, dovodi do pojačanog usmjeravanja unutarstaničnih masnih kiselina prema sintezi lipida. Prvenstveno je riječ o sintezi inertnih triacilglicerola koji se pohranjuju u obliku lipidnih kapljica (103). Masne kiseline se mogu ugraditi i toksične spojeve poput diacilglicerola i ceramida. Utvrđeno je da su molekule ceramida koje sadrže dugolančane masne kiseline posebno štetne (66), a njihova je razina povećana u miokardu bolesnika sa zatajenjem srca (66, 104).

Znanstvena istraživanja iz ove doktorske disertacije imaju određena ograničenja. Prije svega, ne može se isključiti utjecaj heterogenosti populacije na rezultate znanstvenih istraživanja. Naime, u prvom znanstvenom istraživanju iz doktorske disertacije ispitivana je populacija s heterogenim vrijednostima SYNTAX zbroja što upućuje na različitu kompleksnost koronarne bolesti – od odsustva značajne koronarne bolesti do ekstenzivne koronarne arterijske bolesti. Nadalje, istraživanja su usmjerena na ciljane populacije bolesnika koji su podvrgnuti invazivnoj koronarografiji, odnosno kardiokirurškoj revaskularizaciji miokarda, zbog čega su moguće selekcijske sustavne pogreške. Prema tome, rezultate ove doktorske disertacije treba primjenjivati isključivo na populaciju bolesnika koja odgovara uključenim i isključenim kriterijima istraživanja. Primjerice, bolesnici iz drugog znanstvenog istraživanja imali su značajnu koronarnu bolest koja je zahtijevala kiruršku revaskularizaciju, a regija bioptata (prednji septum) je imala smanjenu krvnu opskrbu, pa se ovi rezultati odnose isključivo na ovu populaciju bolesnika (105). Kod dijela bolesnika iz drugog znanstvenog istraživanja nije bilo moguće provesti sva mjerenja zbog nedostatne mase biopsijskog tkiva (10 mg ili manje).

Završno, nije moguće isključiti sustavnu pogrešku zbog utjecaja zbunjujućih varijabli na rezultate istraživanja. Primjerice, neki od uključenih bolesnika imali su šećernu bolest tipa 2 što može utjecati na funkciju mitohondrija (106). Ipak, autori su težili eliminaciji utjecaja zbunjujućih varijabli na rezultate istraživanja korištenjem višestruke regresijske analize. Sukladno navedenome, rezultate ove doktorske disertacije treba interpretirati u skladu s ograničenjima istraživanja.

Zaključno, ova doktorska disertacija utvrdila je značajnu pozitivnu povezanost između antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG, kao surogata kronične upale, i kompleksnosti koronarne arterijske bolesti u obliku SYNTAX zbroja. Navedena povezanost nije utvrđena za ostale medijatore upale poput antikardiolipinskog protutijela aCL-IgM, komponenti komplementa C3 i C4, te leptina. Također, ova doktorska disertacija utvrdila je značajnu pozitivnu povezanost LVEF i mitohondrijske respiracije, kao i pozitivnu povezanost LVEF i kapaciteta oksidacije masnih kiselina. Oksidacija ugljikohidrata ne pokazuje povezanost s LVEF u ovoj populaciji bolesnika.

6. ZAKLJUČCI

Naše prvo istraživanje je pokazalo postojanje značajne povezanosti između autoimunog odgovora na kardiolipin i težine koronarne arterijske bolesti, čak i u odsutnosti autoimune bolesti. S obzirom na prethodna saznanja o povišenim razinama antikardiolipinskih protutijela kod bolesnika s ponavljanim kardiovaskularnim incidentima, naši rezultati naglašavaju potrebu za dodatnim istraživanjima uloge antikardiolipinskih protutijela u razvoju koronarne arterijske bolesti te potencijalnog razvoja novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa s fokusom na autoimuni odgovor.

Naše drugo istraživanje je pokazalo da bolesnici s blago oslabljenom srčanom kontraktilnom funkcijom imaju promjene mitohondrijskog metabolizma u miokardu, sa smanjenjem respiratornog i beta oksidacijskog kapaciteta. Ovo smanjenje kapaciteta srčanog tkiva za proizvodnju energije najvjerojatnije doprinosi patološkom remodeliranju miokarda i daljnjem propadanju srčane kontraktilne funkcije. Naši rezultati upućuju na važnost daljnjih istraživanja s fokusom na usporavanje promjena mitohondrijske funkcije u kroničnom srčanom zatajivanju.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Svrha ovih istraživanja bila je utvrditi povezanost između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i proupalnih čimbenika u obliku antikardiolipinskih protutijela, kao i utvrditi povezanost između globalne sistoličke funkcije lijeve klijetke i parametara mitohondrijske respiracije.

Materijali i metode: Provedena su opservacijska, presječna, klinička znanstvena istraživanja. Obuhvaćeno je ukupno 65 odraslih bolesnika koji su podvrgnuti invazivnoj koronarografiji zbog sumnje na koronarnu arterijsku bolest (prvo istraživanje) i 40 odraslih bolesnika koji su podvrgnuti elektivnoj kardiokirurškoj revaskularizaciji miokarda zbog značajne koronarne arterijske bolesti (drugo istraživanje). Svi ispitanici podvrgnuti su detaljnoj anamnezi, fizikalnom pregledu i ehokardiografskim mjerenjima. Ispitanici iz drugog istraživanja su intraoperacijski podvrgnuti biopsiji miokarda, te naknadnim eksperimentalnim procjenama mitohondrijske funkcije u tkivu miokarda.

Rezultati: Utvrđena je neovisna statistički značajna pozitivna korelacija kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i antikardiolipinskog protutijela aCL-IgG (β 5,58, $P=0,005$), dok nije bilo neovisne povezanosti između kompleksnosti koronarne arterijske bolesti i ostalih odabranih varijabli (aCL-IgG, leptin, C3, C4) nakon prilagodbe za dob, indeks tjelesne mase i koncentracije glukoze i kolesterola u krvi. Nadalje, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između maksimalne mitohondrijske respiracije u tkivu miokarda i ejeckijske frakcije lijeve klijetke ($r=0,37$, $P=0,020$), što je potvrđeno nakon prilagodbe za zbunjujuće varijable (β 0,11, $P=0,030$). Slično tome, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između ejeckijske frakcije lijeve klijetke i izražaja glavnih enzima oksidacije masnih kiselina. S druge strane, nije utvrđena značajna povezanost između srčane sistoličke funkcije i indikatora mitohondrijske količine u tkivu, niti razine pojedinih respiratornih kompleksa. Također, nije nađena značajna korelacija između srčane sistoličke funkcije i mitohondrijskog kapaciteta za oksidaciju ugljikohidrata.

Zaključci: Razine antikardiolipinskog aCL-IgG protutijela su značajno povezane sa kompleksnosti koronarne arterijske bolesti u obliku SYNTAX zbroja, dok ista veza ne postoji s ostale medijatore upale poput antikardiolipinskog protutijela aCL-IgM, komponenti komplementa C3 i C4, te leptina. Također, kod pacijenata u ranim fazama patološkog remodeliranja miokarda i blago smanjenom sistoličkom funkcijom, postoji veza između LVEF i mitohondrijske respiratorne sposobnosti te kapaciteta oksidacije masnih kiselina.

8. SUMMARY

Doctoral dissertation title: Changes in inflammatory markers and reduced cardiomyocyte mitochondrial activity in patients with coronary artery disease and mild systolic dysfunction.

Objectives: The aim of this study was to determine the relationship between the complexity of coronary artery disease and pro-inflammatory factors in the form of anticardiolipin antibodies, as well as to determine the relationship between global left ventricular systolic function and mitochondrial respiration parameters.

Materials and methods: An observational, cross-sectional, clinical research was conducted. A total of 65 adult patients who underwent invasive coronary angiography due to suspected coronary artery disease (first study) and 40 adult patients who underwent elective surgical myocardial revascularization due to significant coronary artery disease (second study) were included. All subjects underwent a detailed medical history, physical examination and echocardiographic measurements. Subjects from the second study underwent intraoperative myocardial biopsy, which was followed by subsequent experimental assessments of mitochondrial function in biopsied myocardial tissue.

Results: An independent statistically significant positive correlation of the complexity of coronary artery disease (SYNTAX score) and anticardiolipin antibody aCL-IgG was determined (β 5.58, $P=0.005$), while there was no such association for other selected variables (aCL-IgG, leptin, C3, C4) after adjusting for age, body mass index, glucose and cholesterol levels. Furthermore, a statistically significant positive correlation was found between maximal mitochondrial respiration in myocardial tissue and left ventricular ejection fraction ($r=0.37$, $P=0.020$), which was confirmed after adjustment for confounding variables (β 0.11, $P=0.030$). Similarly, a statistically significant positive correlation was found between the left ventricular ejection fraction and the expression of the main fatty acid oxidation enzymes. On the other hand, no significant correlation was found between cardiac systolic function and indicators of mitochondrial quantity in the tissue, nor the level of individual respiratory complexes. Also, no significant correlation was found between cardiac systolic function and mitochondrial capacity for carbohydrate oxidation.

Conclusions: Anticardiolipin aCL-IgG antibody levels are significantly related to the complexity of coronary artery disease in the form of SYNTAX score, while the same relationship does not exist with other mediators of inflammation such as anticardiolipin antibody aCL-IgM, complement components C3 and C4, and leptin. Also, in patients in the early stages of pathological remodeling of the myocardium and slightly reduced systolic

function, there is a relationship between LVEF and mitochondrial respiratory ability and fatty acid oxidation capacity.

9. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481-8.
2. Menees DS, Bates ER. Evaluation of patients with suspected coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2010;21(7):386-90.
3. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-77.
4. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289-367.
5. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.
6. Atwood J. Management of Acute Coronary Syndrome. *Emerg Med Clin North Am*. 2022;40(4):693-706.
7. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, Timmis A, Huculeci R, Torbica A, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nature Reviews Cardiology*. 2022;19(2):133-43.
8. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association. 2022;145(8):e153-e639.
9. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *European Heart Journal*. 2022;43(8):716-99.
10. Li S, Gao X, Yang J, Xu H, Wang Y, Zhao Y, et al. Number of standard modifiable risk factors and mortality in patients with first-presentation ST-segment elevation myocardial infarction: insights from China Acute Myocardial Infarction registry. *BMC Med*. 2022;20(1):217.
11. Inouye M, Abraham G, Nelson CP, Wood AM, Sweeting MJ, Dudbridge F, et al. Genomic Risk Prediction of Coronary Artery Disease in 480,000 Adults: Implications for Primary Prevention. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(16):1883-93.

12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2045-51.
13. Khine HW, Teiber JF, Haley RW, Khera A, Ayers CR, Rohatgi A. Association of the serum myeloperoxidase/high-density lipoprotein particle ratio and incident cardiovascular events in a multi-ethnic population: Observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis.* 2017;263:156-62.
14. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-66.
15. Rognoni A, Cavallino C, Veia A, Bacchini S, Rosso R, Facchini M, et al. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2015;13(1):10-3.
16. Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular Remodeling. 2007;27(8):1722-8.
17. Giblett JP, Matetic A, Jenkins D, Ng CY, Venuraju S, MacCarthy T, et al. Post-infarction ventricular septal defect: percutaneous or surgical management in the UK national registry. *Eur Heart J.* 2022;43(48):5020-32.
18. Camaj A, Fuster V, Giustino G, Bienstock SW, Sternheim D, Mehran R, et al. Left Ventricular Thrombus Following Acute Myocardial Infarction. 2022;79(10):1010-22.
19. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J.* 2019;40(2):87-165.
20. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):368-80.
21. Kaptoge S, Seshasai SR, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35(9):578-89.
22. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation.* 2004;109(23):2818-25.
23. Nakazato R, Dey D, Cheng VY, Gransar H, Slomka PJ, Hayes SW, et al. Epicardial fat volume and concurrent presence of both myocardial ischemia and obstructive coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2012;221(2):422-6.
24. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD, Sfikakis PP. Systemic Inflammatory Response and Atherosclerosis: The Paradigm of Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).

25. Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9313):1173-7.
26. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(2):295-307.
27. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2011;108(9):1362-70.
28. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E, et al. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med*. 2019;380(8):752-62.
29. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
30. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2019;381(26):2497-505.
31. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195-207.
32. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;378(21):2010-21.
33. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):1030-5.
34. Bidulescu A, Liu J, Chen Z, Hickson DA, Musani SK, Samdarshi TE, et al. Associations of adiponectin and leptin with incident coronary heart disease and ischemic stroke in african americans: the jackson heart study. *Front Public Health*. 2013;1:16.
35. Martin SS, Blaha MJ, Muse ED, Qasim AN, Reilly MP, Blumenthal RS, et al. Leptin and incident cardiovascular disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2015;239(1):67-72.
36. Wang D, Lv W, Zhang S, Zhang J. Advances in the Research on Anticardiolipin Antibody. *J Immunol Res*. 2019;2019:8380214.

37. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(16):2493-506.
38. Chaturvedi S, McCrae KR. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev.* 2017;31(6):406-17.
39. Ertaş F, Can O, Acet H, Ozbakkaloglu M. The clinical significance of anticardiolipin antibody levels in patients with acute myocardial infarction: a regional study. *Postepy Kardiol Interwencyjne.* 2013;9(4):328-31.
40. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):227-35.
41. Lappegård KT, Garred P, Jonasson L, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A, et al. A vital role for complement in heart disease. *Mol Immunol.* 2014;61(2):126-34.
42. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med.* 2010;152(2):93-100.
43. Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gómez-Reino JJ, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nature Reviews Rheumatology.* 2017;13(2):100-9.
44. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:354.
45. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal.* 2021;42(36):3599-726.
46. Jones NR, Roalfe AK, Adoki I, Hobbs FDR, Taylor CJ. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(11):1306-25.
47. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure. 2022;79(17):e263-e421.
48. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):457-70.
49. Ghionzoli N, Gentile F, Del Franco AM, Castiglione V, Aimo A, Giannoni A, et al. Current and emerging drug targets in heart failure treatment. *Heart Fail Rev.* 2022;27(4):1119-36.
50. Ritterhoff J, Tian R. Metabolism in cardiomyopathy: every substrate matters. *Cardiovasc Res.* 2017;113(4):411-21.

51. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions: Potential for pharmacological interventions. *Cardiovascular Research*. 1997;33(2):243-57.
52. Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(3):E578-91.
53. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*. 2013;113(6):709-24.
54. Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):2080-90.
55. Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. 2021;128(10):1487-513.
56. Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J*. 2001;358(Pt 1):69-77.
57. Bae J, Paltzer WG, Mahmoud AI. The Role of Metabolism in Heart Failure and Regeneration. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:702920.
58. Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1333-50.
59. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(2):72-7.
60. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3716-26.
61. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(4):238-50.
62. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabae A, Bristow MR, et al. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail*. 2005;11(6):473-80.
63. Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24(11):1333-47.

64. Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O. Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol.* 1998;82(5a):2k-13k.
65. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):207-58.
66. Law BA, Liao X, Moore KS, Southard A, Roddy P, Ji R, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *Faseb j.* 2018;32(3):1403-16.
67. Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, Morice MC, Colombo A, Dawkins K, et al. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention.* 2005;1(2):219-27.
68. Serruys PW, Onuma Y, Garg S, Sarno G, van den Brand M, Kappetein AP, et al. Assessment of the SYNTAX score in the Syntax study. *EuroIntervention.* 2009;5(1):50-6.
69. Guedeney P, Barthélémy O, Zeitouni M, Hauguel-Moreau M, Hage G, Kerneis M, et al. Prognostic Value of SYNTAX Score in Patients With Infarct-Related Cardiogenic Shock: Insights From the CULPRIT-SHOCK Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2020;13(10):1198-206.
70. Podolec J, Baran J, Siedlinski M, Urbanczyk M, Krupinski M, Bartus K, et al. Serum rantes, transforming growth factor- β 1 and interleukin-6 levels correlate with cardiac muscle fibrosis in patients with aortic valve stenosis. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(4).
71. Yousuf O, Mohanty BD, Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ, Nasir K, et al. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(5):397-408.
72. Pastori D, Bucci T, Triggiani M, Ames PRJ, Parrotto S, Violi F, et al. Immunoglobulin G (IgG) anticardiolipin antibodies and recurrent cardiovascular events. A systematic review and Bayesian meta-regression analysis. *Autoimmun Rev.* 2019;18(5):519-25.
73. Petri M. The lupus anticoagulant is a risk factor for myocardial infarction (but not atherosclerosis): Hopkins Lupus Cohort. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):593-5.
74. Sherer Y, Tenenbaum A, Praprotnik S, Shemesh J, Blank M, Fisman EZ, et al. Coronary artery disease but not coronary calcification is associated with elevated levels of cardiolipin, beta-2-glycoprotein-I, and oxidized LDL antibodies. *Cardiology.* 2001;95(1):20-4.
75. Dinckal MH, Ozkaynak B, Mert B, Sahin I, Sigirci S, Gulsen K, et al. The relationship between antibeta 2 glycoprotein antibodies and SYNTAX score in patients undergoing coronary artery by-pass graft surgery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(17):2556-61.

76. George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Shaish A, Kopolovic J, et al. Adoptive transfer of beta(2)-glycoprotein I-reactive lymphocytes enhances early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 2000;102(15):1822-7.
77. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1997;107(3):569-73.
78. Nagaraj N, Matthews KA, Shields KJ, Barinas-Mitchell E, Budoff MJ, El Khoudary SR. Complement proteins and arterial calcification in middle aged women: Cross-sectional effect of cardiovascular fat. The SWAN Cardiovascular Fat Ancillary Study. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):533-9.
79. Caselli C, De Graaf MA, Lorenzoni V, Rovai D, Marinelli M, Del Ry S, et al. HDL cholesterol, leptin and interleukin-6 predict high risk coronary anatomy assessed by CT angiography in patients with stable chest pain. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):55-61.
80. Caselli C, Del Turco S, Ragusa R, Lorenzoni V, De Graaf M, Basta G, et al. Association of PCSK9 plasma levels with metabolic patterns and coronary atherosclerosis in patients with stable angina. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):144.
81. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
82. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371-9.
83. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772-83.
84. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):47-60.
85. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*. 2017;98:51-8.
86. Jastrzebska M, Marcinowska Z, Oledzki S, Chelstowski K, Siennicka A, Klysz M, et al. Variable gender-dependent platelet responses to combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary-artery disease. *J Physiol Pharmacol*. 2018;69(4).
87. Jastrzebska M, Lisman D, Szelepajlo A, Oledzki S, Chelstowski K, Clark JS, et al. Evaluation of platelet reactivity during combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in relation to diabetes type 2 and the GPIIB/IIIA receptor gene polymorphism. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70(2).
88. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Höfer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(12):1729-38.

89. Scheiber D, Jelenik T, Zweck E, Horn P, Schultheiss HP, Lassner D, et al. High-resolution respirometry in human endomyocardial biopsies shows reduced ventricular oxidative capacity related to heart failure. *Exp Mol Med*. 2019;51(2):1-10.
90. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F, et al. Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail*. 2013;15(2):150-7.
91. Sabbah HN, Gupta RC, Singh-Gupta V, Zhang K, Lanfear DE. Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in the Failing Heart: Normalization Following Long-Term Therapy with Elamipretide. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018;32(4):319-28.
92. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(2):271-7.
93. Cordero-Reyes AM, Gupte AA, Youker KA, Loebe M, Hsueh WA, Torre-Amione G, et al. Freshly isolated mitochondria from failing human hearts exhibit preserved respiratory function. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;68:98-105.
94. Oka SI, Sabry AD, Cawley KM, Warren JS. Multiple Levels of PGC-1 α Dysregulation in Heart Failure. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:2.
95. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*. 2005;1(4):259-71.
96. Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schreppler A, Schwarzer M, et al. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(2):492-500, .e1.
97. Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC, Lehman JJ. PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(2):201-12.
98. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res*. 2010;106(9):1541-8.
99. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 2004;305(5685):858-62.
100. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not

PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res.* 2003;92(5):518-24.

101. Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacín M, Zorzano A. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes.* 2006;55(6):1783-91.

102. Emery JM, Ortiz RM. Mitofusin 2: A link between mitochondrial function and substrate metabolism? *Mitochondrion.* 2021;61:125-37.

103. Stanley WC, Recchia FA. Lipotoxicity and the development of heart failure: moving from mouse to man. *Cell Metab.* 2010;12(6):555-6.

104. Ji R, Akashi H, Drosatos K, Liao X, Jiang H, Kennel PJ, et al. Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight.* 2017;2(9).

105. Peng X, Peng DF, Tang SY. Effect of diltiazem on exercise tolerance in patients with stable coronary artery disease and hypertension. *J Physiol Pharmacol.* 2021;72(4).

106. Ljubkovic M, Gressette M, Bulat C, Cavar M, Bakovic D, Fabijanic D, et al. Disturbed Fatty Acid Oxidation, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Left Ventricle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2019;68(10):1924-33.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Frane Runjić

Datum i mjesto rođenja: 28. travnja 1977. godine, Split, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvat

Adresa stanovanja: Vrboran 41, 21000 Split, Hrvatska

Telefon: +385 95 804 8868

E-adresa: frane.runjic@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 1991.-1995. Srednja škola prirodnih znanosti i matematike, Split, Hrvatska
- 1995.-2001. Medicinski fakultet u Rijeci
- 2002.-2004. Postdiplomski studij iz Biomedicine
- 2001. Doktor medicine
- 2008. Magistar znanosti

ZNANJA I VJEŠTINE

Aktivno služenje engleskim jezikom

Posjedovanje organizacijskih, administrativnih i socijalnih vještina

Vozač B kategorije

NAGRADE

Dobitnik Dekanove nagrade za najboljeg studenta u klasi (Medicinski fakultet u Rijeci)

RADNO ISKUSTVO

- 1998.-2001. Student-demonstrator pri Katedri za patologiju, Medicinski Fakultet u Rijeci
- 2001.-2002. Staž za doktore medicine, Klinički bolnički centar Rijeka
- 2003. Doktor medicine, privatna klinika „Obad“
- 2004.-2008. Specijalizacije iz Interne medicine, Klinički bolnički centar u Splitu
- 2008.-2013. Specijalist interne medicine, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar u Splitu

- 2013.-2019. Specijalist kardiologije, Klinika za bolesti srca i krvnih žila, Klinički bolnički centar u Splitu
- 2019. Pročelnik intervencijske kardiologije, Klinika za bolesti srca i krvnih žila, Klinički bolnički centar u Splitu

ČLANSTVA

- Hrvatsko kardiološko društvo
- Radna skupina za intervencijsku kardiologiju
- Radna skupina za akutni koronarni sindrom

PUBLIKACIJE

- Runjic F, Martinovic-Kaliterna D, Salamunic I, Kristic I, Ljubkovic M, Marinovic J.J. Association of anticardiolipin antibodies, complement and leptin with the severity of coronary artery disease expressed as syntax score. *Physiol Pharmacol.* 2020;71(3). doi: 10.26402/jpp.2020.3.09. Epub 2020 Oct 15.
- Ljubkovic M, Runjic F, Bulat C, Cavar M, Frankovic L, Marovic Z, Bilopavlovic N, Marinovic J.J. Assessment of mitochondrial respiratory capacity in relation to cardiac contractile performance in patients with normal to mildly decreased cardiac systolic function. *J Physiol Pharmacol.* 2023;73(6). doi:10.26402/jpp.2022.6.05.
- Jukić A, Carević V, Zekanović D, Stojanović-Stipić S, Runjić F, Ljubković M, Fabijanić D. Impact of Percutaneous Coronary Intervention on Exercise-Induced Repolarization Changes in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2015;116(6):853-7. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.06.009. Epub 2015 Jun 25.
- Kristić I, Crnčević N, Runjić F, Čapkun V, Polašek O, Matetic A, Vrsalovic M. ACEF performed better than other risk scores in non-ST-elevation acute coronary syndrome during long term follow-up. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021;21(1):70.
- Kristić I, Matetic A, Crnčević N, Runjić F, Polašek O, Vrsalovic M. Sex Differences in Characteristics and Outcomes among Low-Risk Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Patients during Long Term Follow-Up. *J Clin Med.* 2021 Jun 25;10(13):2802. doi: 10.3390/jcm10132802. PMID: 34202393; PMCID: PMC8267884.
- Runjic F, Matetic A, Bunc M, Crncevic N, Kristic I. An Unusual Femoral Sheath Severing with Successful Recapture: A Case Report. *Reports.* 2021;4(4):34. doi: 10.3390/reports4040034

- Runjic F, Matetic A, Bunc M, Crncevic N, Kristic I. Small Degenerated Surgical Bioprosthetic Valve should be Treated with Supra-Annular Valve-in-Valve Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Journal of Integrative Cardiology Open Access*. 2021;4;102. doi: 10.31487/j.JICOA.2021.04.02
- Delić N, Matetic A, Domjanovic J, Kljaković-Gašpić T, Šarić L, Ilić D, Došenović S, Domazet J, Kovač R, Runjić F, Stojanović Stipić S, Duplančić B. Effects of Different Inhalation Therapy on Ventilator-Associated Pneumonia in Ventilated COVID-19 Patients: A Randomized Controlled Trial. *Microorganisms*. 2022; 10(6): 1118. doi: 10.3390/microorganisms10061118.
- Domjanović J, Matetic A, Baković Kramarić D, Domjanović Škopinić T, Borić Škaro D, Delić N, Runjić F, Jeličić I. Association of the novel CROW-65 risk score and mortality in hospitalized kidney transplant recipients with COVID-19 : A retrospective observational study. *Wien Klin Wochenschr*. 2022 Jul 7:1–8. doi: 10.1007/s00508-022-02052-9.
- Runjic F, Matetic A, Kristic I, Crncevic N. Rapid pacing during aortic valve interventions: Review of pacing options and experience from Split. *Cardiol Croat*. 2021;16(9-10):298-9.
- Crncevic N, Matetic A, Runjic F, Kristic I. Transradial balloon aortic valvuloplasty: a case report. *Cardiol Croat*. 2021;16(9-10):297.
- Matetic A, Romić M, Crncevic N, Kristic I, Tomulic V, Runjic F. Analgosedation during transcatheter aortic valve implantation: Review and protocol at University Hospital Centre Split. *Cardiol Croat*. 2021;16(9-10):293-4.
- Domjanovic Skopinic T, Bakovic Kramaric D, Matetic A, Runjic F, Kristic I, Carevic V. Hypo-attenuated leaflet thickening after transcatheter aortic valve implantation. *Cardiol Croat*. 2023;18(5-6):126-7.
- Matetic A, Kristic I, Bakovic Kramaric D, Crncevic N, Runjic F. Reviving the old: percutaneous balloon mitral valvuloplasty. *Cardiol Croat*. 2023;18(3-4):87-88.
- Runjic F, Kristic I, Crncevic N, Zanchi J, Matetic A. Fully percutaneous transaxillary approach for transcatheter aortic valve implantation: initial experience from Split. *Cardiol Croat*. 2023;18(3-4):89-90.