

# Prekondicioniranje i ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

---

Kermc, Ino

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:686848>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ino Kermc**

**Prekondicioniranje i ishemijsko-reperfuzijska  
ozljeda**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2016.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Filipa Sedlića, dr.med i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

## Kratice

ADP - adenzin-difosfat (engl. adenosine diphosphate)

AMP - adenzin-monofosfat (engl. adenosine monophosphate)

ARE – antioxidant response element

ATP - adenzin-trifosfat (engl. adenosine triphosphate)

CABG - aortokoronarno premoštenje (engl. coronary artery bypass grafting)

eNOS - endotelna dušik oksid sintetaza

IM - infarkt miokarda

IPC - ishemijsko prekondicioniranje (engl. ischemic preconditioning)

IRI - ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (engl. ischemia-reperfusion injury)

Keap1 – kelch-like ECH-associated protein 1

mitoK<sub>ATP</sub> - mitohondrijski K<sub>ATP</sub> kanal

MPTP - mitohondrijska permeabilizacijska pora (engl. Mitochondrial permeability transition pore)

MVO - mikrovaskularna opstrukcija

Nrf2 - nuclear factor-E2-related factor 2

PCI - perkutana koronarna intervencija (engl. percutaneous coronary intervention)

PI3K - fosfatidil-inozitol 3-kinaza

RIPC - udaljeno ishemijsko prekondicioniranje (engl. remote ischemic preconditioning)

ROS - slobodni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

$\Delta\psi_m$  - potencijal membrane mitohondrija

# Sadržaj

<b>1. Sažetak .....</b>	<b>I</b>
<b>2. Summary .....</b>	<b>II</b>
<b>3. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>3.1 Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda .....</b>	<b>1</b>
3.1.1 Definicija.....	1
3.1.2 Epidemiologija i klinički značaj .....	1
<b>3.2 Prekondicioniranje .....</b>	<b>2</b>
3.2.1 Načela hormeze i definicija prekondicioniranja .....	2
3.2.2 Klinički značaj.....	3
<b>4. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda.....</b>	<b>4</b>
<b>4.1 Klinička prezentacija i komplikacije .....</b>	<b>4</b>
<b>4.2 Etiologija infarkta miokarda i ishemijskog oštećenja .....</b>	<b>4</b>
<b>4.3 Patološke karakteristike ishemijskog oštećenja miokarda .....</b>	<b>5</b>
<b>4.4 Patofiziologija ishemijskog oštećenja .....</b>	<b>6</b>
<b>4.5 Liječenje infarkta miokarda i reperfuzijska ozljeda.....</b>	<b>7</b>
<b>4.6 Patofiziologija reperfuzijskog oštećenja .....</b>	<b>8</b>
4.6.1 Reperfuzijom potaknute aritmije.....	9
4.6.2 Omamljeni miokard .....	9
4.6.3 Mikrovaskularna opstrukcija .....	9
4.6.4 Letalno reperfuzijsko oštećenje miokarda .....	10
<b>4.7 Istraživanja o metodama liječenja i prevencije ishemijsko-reperfuzijske ozljede.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Prekondicioniranje .....</b>	<b>15</b>
<b>5.1 Vrste prekondicioniranja .....</b>	<b>15</b>
5.1.1 Ishemijsko prekondicioniranje .....	15
5.1.2 Farmakološko prekondicioniranje.....	16
<b>5.2 Postkondicioniranje .....</b>	<b>16</b>
<b>5.3 Udaljeno prekondicioniranje .....</b>	<b>17</b>
<b>5.4 Molekularni mehanizmi prekondicioniranja.....</b>	<b>17</b>
5.4.1 Mehanizmi pokretanja prekondicioniranja .....	17
5.4.2 Putevi prijenosa signala u prekondicioniranju .....	18
5.4.3 Zbivanja u mitohondriju .....	19
<b>5.5 Genske i genomske promjene inducirane prekondicioniranjem .....</b>	<b>20</b>

5.5.1	Uloga Keap1-Nrf2 signalnog puta u prekondicioniranju .....	23
5.6	Klinička primjena prekondicioniranja.....	24
6.	Rasprava.....	27
6.1	Prepreke u istraživanjima prekondicioniranja u ljudi .....	27
6.2	Nove perspektive u liječenju infarkta miokarda vezane za prekondicioniranje.....	28
7.	Zaključak .....	29
8.	Zahvale .....	30
9.	Literatura .....	31
10.	Životopis.....	35

# 1. Sažetak

Razumijevanje ishemijsko-reperfuzijske ozljede je danas od izuzetne važnosti uzevši u obzir razna patološka stanja u čijoj se podlozi nalazi ishemijsko-reperfuzijska ozljeda. Na prvome mjestu to su kardiovaskularne bolesti kao veliki uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu, ali također i presađivanje organa, komplikacije anestezije i kirurških operacija.

Ovaj diplomski rad se sastoji od tri velike cjeline. U prvome dijelu ovoga rada opisani su patofiziološki procesi i mehanizmi u podlozi nastanka, razvitka i liječenja ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Nadalje, opisane su neke od studija u kojima se pokušavao naći lijek za ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu i analizirati njihove rezultate. Drugi dio govori o specifičnom načinu liječenja i prevencije ishemijsko-reperfuzijske ozljede, a to je prekondicioniranje. Posebno su prikazane vrste prekondicioniranja, hipoteze o mehanizmu nastanka tog fenomena te laboratorijske i kliničke studije koje su do sada provedene.

Na kraju, u trećem dijelu ovog rada, sažeta su prva dva, analizirani mogući nedostaci kliničkih studija te opisani daljnji putevi kojima bi se moglo razvijati istraživanje prekondicioniranja.

**Ključne riječi:** ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, prekondicioniranje

## 2. Summary

Understanding ischemia-reperfusion injury is, at this moment, of paramount importance given the various pathological conditions in which it is the main substrate. It has an important role in the cardiovascular pathology as a major cause of overall morbidity and mortality, as well as in organ transplantation and some complications of surgery and anaesthesia.

This thesis is composed of three parts. The first is focused on explaining the pathophysiological processes and mechanisms underlying the formation, development and treatment of ischemia-reperfusion injury. Also, it describes some of the studies aimed at finding a treatment for ischemia-reperfusion injury and analyzes their results.

The second part turns to the specific methods of treatment and prevention of ischemia-reperfusion injury, primarily the preconditioning. It presents the types of preconditioning, the hypotheses regarding the mechanism of this phenomenon, as well as laboratory and clinical studies that have been conducted during the years of research.

Finally, the third part summarizes the first two, analyzes the possible shortcomings of clinical studies, and further describes the possible paths of future research on this topic.

**Key words:** ischemia-reperfusion injury, preconditioning



## **3. Uvod**

### **3.1 Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda**

#### **3.1.1 Definicija**

Ishemija označava stanje nedovoljnog protoka krvi s obzirom na potrebe tkiva, pri čemu osim nedovoljne opskrbe tkiva kisikom dolazi i do nepotpunog odstranjivanja metabolita (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011). Reperfuzija je ponovna uspostava krvotoka nakon ishemije, a pojam ishemijsko-reperfuzijske ozljede označava sumu štetnih učinaka patofizioloških mehanizama ishemije i reperfuzije.

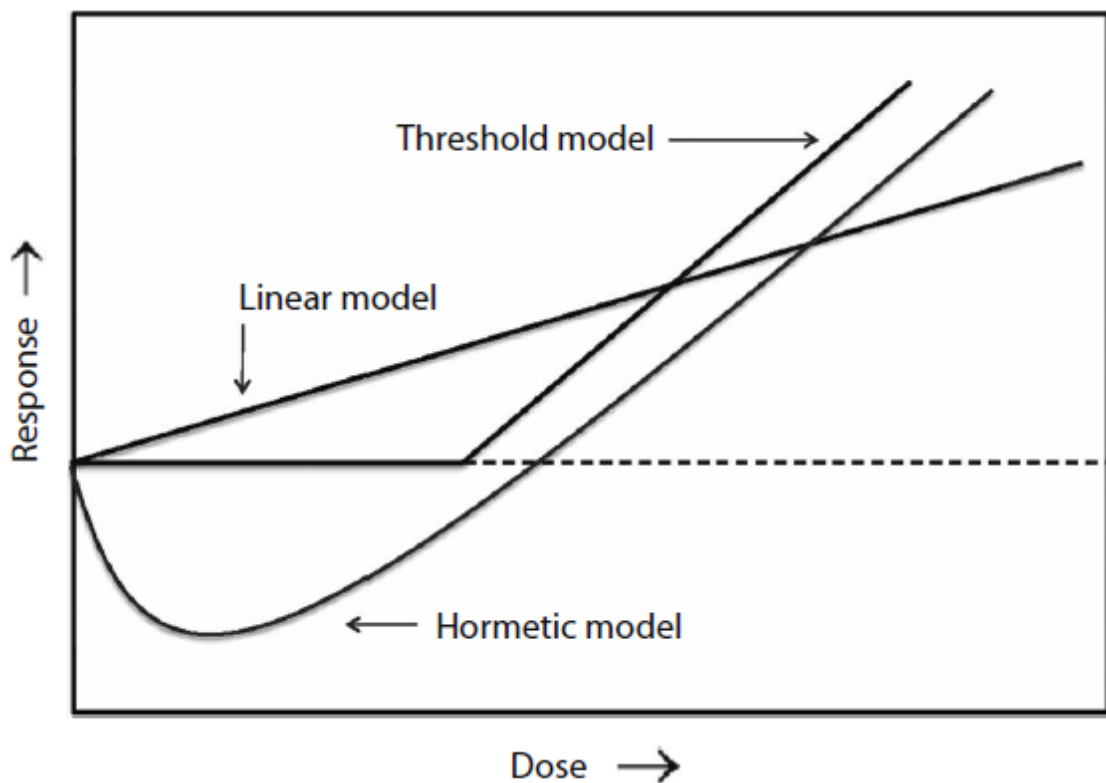
#### **3.1.2 Epidemiologija i klinički značaj**

U Republici Hrvatskoj 2011. godine 21% uzroka smrti je uzrokovano ishemijskim bolestima srca te 15% cerebrovaskularnim bolestima (Kralj, 2013). U podlozi obje skupine bolesti stoji ishemijska odnosno ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IRI) iz čega proizlazi važnost boljeg razumijevanja procesa koji pokreću i održavaju taj mehanizam. Osim toga, IRI susrećemo i u presađivanju organa kod kojih je kontroliranje IRI od presudne važnosti za očuvanje organa koji se presađuje. Danas u razvijenim zemljama raste incidencija ateroskleroze, ključnog etiološkog čimbenika za pojavu IRI, čime je i mogućnost nastanka IRI povećana. Točni epidemiološki podaci o aterosklerozi zapravo ne postoje jer se svi epidemiološki podaci odnose upravo na njene klinički najznačajnije posljedice, a to su koronarna bolest srca, odnosno ishemijska bolest srca, infarkt srčanog mišića, tranzitorne ishemijske atake, moždani udar te intermitentne klaudikacije i gangrena zbog aterosklerotičnih promjena perifernih arterija nogu (Reiner 2012).

## 3.2 Prekondicioniranje

### 3.2.1 Načela hormeze i definicija prekondicioniranja

Hormeza je proces prilagodbe stanice ili organizma izazvan izloženosti maloj dozi kemijskog ili okolišnog čimbenika koji je u većim dozama štetan. Odnos doze i učinka u modelu hormeze može se prikazati bifazičnim J ili obrnutim U krivuljama (slika 1.) Iako je hormeza prvotno opisana na toksičnim tvarima koje su imali povoljan učinak u manjim dozama, kasnije je dokazan isti odnos doze i učinka kod izlaganja radijaciji (Jaworowski Z, 2010), kalorijskoj restrikciji (McCay CM i sur, 1989), ishemiji (Murry i sur, 1986) itd. Prekondicioniranje je specifična i vjerojatno najbolje istražena vrsta hormeze. U ishemijskom prekondicioniranju (IPC) tkivo nakon kratkotrajne ishemije postaje otpornije na sljedeću ishemijsku noksu u određenom vremenu (Gamulin S i Kovač Z, 2011).



Slika 1. Bifazična J krivulja prikazuje odnos doze i učinka u modelu hormeze (Hayes AW i Kruger CL, 2014)

### **3.2.2 Klinički značaj**

Pojava prekondicioniranja je opisana u srcu, bubrezima, jetri, mozgu i udovima te predstavlja zaštitni mehanizam u kasnijim slučajevima ishemije u smislu smanjenja veličine infarkta. Iz toga proizlazi veliki potencijal za kliničku primjenu prekondicioniranja kod svih stanja u kojima je IRI značajan patogenetski mehanizam. Taj potencijal danas još nije u potpunosti iskorišten najvećim dijelom zbog nepotpunog razumijevanja mehanizma prekondicioniranja usprkos višegodišnjim istraživanjima, ali i zbog nemogućnosti predviđanja nastanka IRI. U ovom radu bit će prikazana dosadašnja postignuća na tom polju te moguće buduće primjene prekondicioniranja.

## **4. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda**

Klinička prezentacija, nastanak, molekularni mehanizmi te metode liječenja i prevencije IRI će biti opisani na primjeru infarkta miokarda (IM), jer on predstavlja jedan od najbolje istraženih modela prekondicioniranja. Mnogi od ovih mehanizama bi se mogli translahirati i na druge organe.

### **4.1 Klinička prezentacija i komplikacije**

Tipično se IM prezentira snažnom visceralnom boli u prekordiju jačeg karaktera od boli u angini pectoris. Takva bol se može širiti u lijevu ruku i lijevu stranu vrata te može biti praćena simptomima anksioznosti i povraćanjem. Krvni tlak je obično promijenjen, puls ubrzan, a na plućima se mogu čuti krepitacije ako je došlo do edema pluća. Nažalost, čak u 20% slučajeva IM je asimptomatičan, većinom u dijabetičara i žena što može dovesti do krive dijagnoze. Promjene u EKG-u se obično pojavljuju tek nekoliko sati nakon početka IM i uključuju podizanje ili spužtanje ST spojnice, obrnute T valove, a nakon stvaranja ožiljka i patološke Q zupce. Laboratorijski nalazi uključuju povišenje serumskih troponina (troponin I i troponin T) nakon 6 sati u većine bolesnika te povišenje aktivnosti enzima kreatin kinaze, posebice izoenzima CK-MB koji se nalazi u kardiomiocitima. Smrtni ishod se može očekivati u oko 20% bolesnika koji dožive infarkt. Među onima koji prežive, u 80-90% slučajeva nastaju komplikacije. Najvažnije i najčešće od njih su aritmije, zatajivanje srca, proširenje infarkta, tromboza i tromboembolija, fibrinozni perikarditis, ruptura miokarda te ventrikularna aneurizma (Krušlin B i Nola M, 2011).

### **4.2 Etiologija infarkta miokarda i ishemijskog oštećenja**

Infarkt miokarda je u više od 95% oboljelih uzrokovan aterosklerozom koronarnih arterija. U manjeg broja bolesnika infarkt je uzrokovan arterijskom hipotenzijom (npr. u šoku), emboličnim začepljenjem koronarnih krvnih žila, spazmom koronarnih žila uzrokovanih kokainom, sistemnim vaskulitisom koji zahvati i koronarne arterije i nekim drugim rijetkim bolestima. Svi ti procesi u konačnici dovode do nedostatne opskrbe tkiva kisikom i hranjivim tvarima i ishemijskog oštećenja tkiva.

### 4.3 Patološke karakteristike ishemijskog oštećenja miokarda

Prve makroskopski vidljive promjene u miokardu vide se tek nakon 24 sata od nastanka okluzije koronarne arterije. Tijekom drugog dana područje infarkta djeluje blijede od okolnog miokarda i slijedom promjena nakon šest tjedana područje zacijeljenog infarkta sive je boje i nalikuje na vezivni ožiljak. Mikroskopski, u tijeku drugoga dana nekroza srčanih miocita i srčanih kapilara postaje uočljiva, a popraćena je infiltracijom neutrofilnih leukocita. Od četvrtoga do šestoga dana neutrofili se nadomještaju makrofazima koji postupno to područje pretvaraju u granulacijsko tkivo i na kraju u vezivni ožiljak. (Krušlin B i Nola M, 2011) Čitav slijed je prikazan u tablici 1.

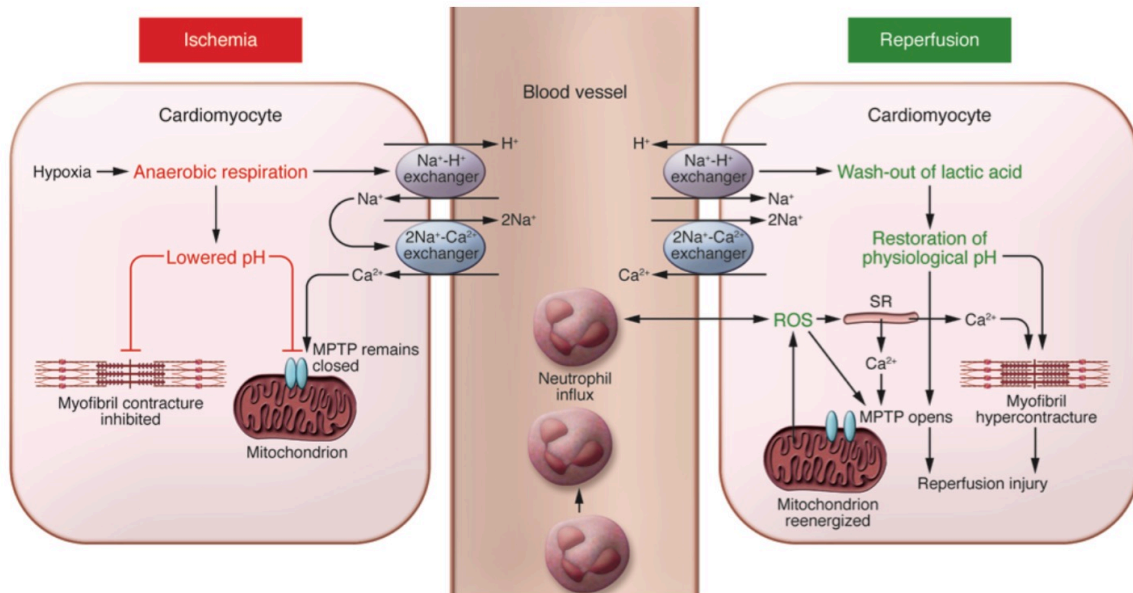
Tablica 1. Slijed promjena u infarktu miokarda (Krušlin B i Nola M, 2011)

Vrijeme	Vrsta promjena	Mikroskopske promjene
0-24 sata	ireverzibilno oštećenje miocita	valovita vlakna, hiperkontrakcija
1-3 dana	nekroza + akutna upala	nekroza miocita, brojni neutrofili
4-6 dana	akutna + kronična upala	piknotični neutrofili, makrofagi, ostatci nekrotičnih miocita
7-14 dana	kronična upala + granulacijsko tkivo	makrofagi, angioblasti, fibroblasti
2-5 tjedana	granulacijsko tkivo	angioblasti, fibroblasti, makrofagi, kolagen
6 tjedana	ožiljak	fibroblasti i obilan kolagen

#### 4.4 Patofiziologija ishemijskog oštećenja

Nedostatak kisika i nutrijenata rezultira slijedom biokemijskih i metaboličkih promjena u miokardu. Nedostatak kisika zaustavlja proces oksidativne fosforilacije što uzrokuje depolarizaciju membrane mitohondrija, prestanak stvaranja ATP-a i izostanak kontraktilne funkcije kardiomiocita. Trošenje ATP-a dodatno pojačava i aktivnost mitohondrijske F-ATP-aze, enzima koji u normalnim uvjetima koristi gradijent vodikovih iona za sintezu ATP-a, a sada funkcionira obratno, razgrađujući ATP kako bi održao potencijal membrane mitohondrija. Bez prisustva ATP-a i  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-aza ne može obavljati svoju funkciju što vodi do nakupljanja intracelularnog  $\text{Na}^+$ . Nasuprot  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-azi, koja zakazuje tek pri vrlo niskoj koncentraciji ATP-a,  $\text{Ca}^{2+}$  crpke na sarkoplazmi i membrani sarkoplazmatske mrežice vrlo su osjetljive na manjak ATP-a. Stoga već malo smanjenje koncentracije ATP-a usporava izbacivanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazme pa se njegova koncentracija u sarkoplazmi tijekom diastole povisuje i ometa relaksaciju miokarda (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011). U nedostatku kisika stanica metabolički skreće u proces anaerobne glikolize, koristeći glikogen kao zadnju rezervu glukoze i rezultirajući nakupljanjem laktata u stanici koji snižava stanični pH. Osim snižavanja pH, proces anaerobne glikolize povećava osmolarnost unutarstanične tekućine jer prijašnja jedna molekula osmotski gotovo inaktivnog glikogena sada postaje mnogo osmotski aktivnih molekula laktata. Smanjeni rad  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-aze, osmotski aktivnog transportera, također pridonosi povećanju osmolarnosti. Niski pH na različite načine utječe na kontraktilnost miokarda. Porast koncentracije  $\text{H}^+$  iona ometa vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$  na troponin C. Acidoza smanjuje aktivnost miozinske ATP-aze i usporava prijenos  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazme u sarkoplazmatsku mrežicu. Tim mehanizmima acidoza (opća ili lokalna, u miokardu, nastala zbog anaerobnog metabolizma u hipoksiji) smanjuje kontraktilnost miokarda. Povećani broj vodikovih iona aktivira i  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  izmjenjivač koji izbacuje višak  $\text{H}^+$  iona iz stanice u zamjenu za  $\text{Na}^+$  ione, a zatim ti  $\text{Na}^+$  ioni aktiviraju  $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  izmjenjivač koji izbacuje  $\text{Na}^+$  iz stanice, a ubacuje  $\text{Ca}^{2+}$ . Nadalje,  $\text{H}^+$  ioni se "natječu" s  $\text{Ca}^{2+}$  ionima za vezivno mjesto na mitohondrijskoj permeabilizacijskoj pori (MPTP) što sprječava njeno otvaranje i daljnje patološke promjene koje su posljedica njenog otvaranja (slika 2). Konačni rezultat sniženja pH u ishemiji je protektivan zbog sprječavanja otvaranja MPTP-a i smanjene kontraktilnosti kardiomiocita, a time i smanjenja potrošnje ATP-a. Međutim, nastali višak intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  zbog

snižena pH mogu svojim osmotskim djelovanjem skupa sa molekulama laktata uzrokovati bubrenje stanice i naposljetku njenu smrt. (Hausenloy DJ i Yellon DM, 2013).



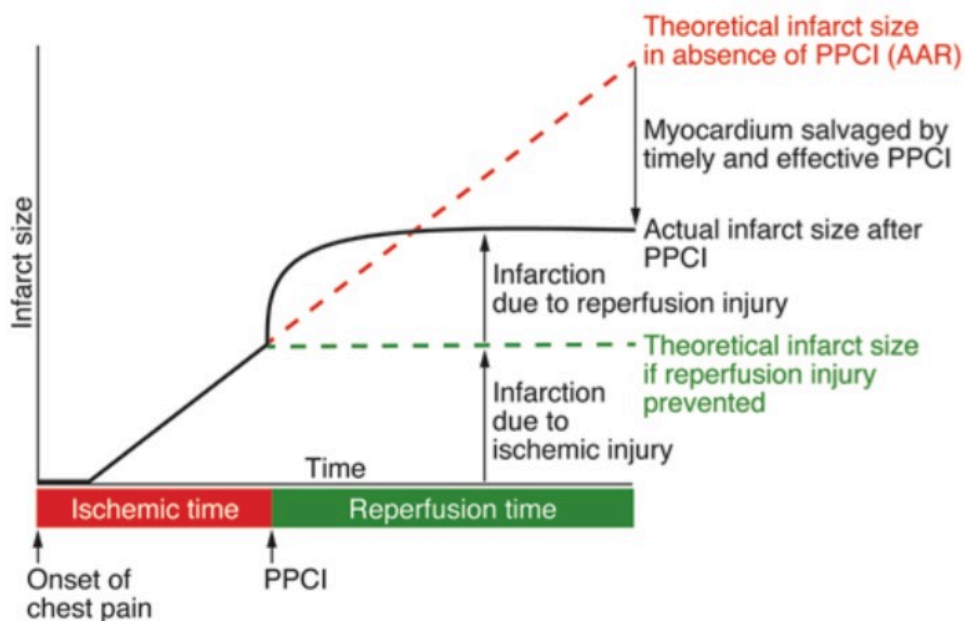
Slika 2. Biokemijske i metaboličke promjene u ishemičnom miokardu (Hausenloy DJ i Yellon DM, 2013)

Zbog promjena u ionskom sastavu stanične tekućine u ishemičnim stanicama miokarda klijetke i subendokardnim Purkynjeovim stanicama smanjuje se membranski potencijal te amplituda i brzina uspona akcijskog potencijala. Mijenja se i trajanje akcijskog potencijala, a može se povećati sklonost spontanoj dijastoličkoj depolarizaciji, navlastito u Purkynjeovim stanicama (Šmalcelj A i Duraković Z, 2011). Ishemijska oštećenja miokarda tako mogu i indirektno dovesti do smrti pacijenta zbog letalnih aritmija nastalih uslijed prethodno opisanih događaja.

#### 4.5 Liječenje infarkta miokarda i reperfuzijska ozljeda

U liječenju IM postoji standardna terapija lijekovima koji su primarno orijentirani na zaustavljanje daljnje progresije ishemije miokarda kao što su morfij, aspirin, kisik, nitrati i klopidogrel te terapija s ciljem ponovne uspostave krvotoka u ishemičnom području. To se može učiniti medikamentozno, trombolitičkim lijekovima ili invazivno, perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) ili postavljanjem aortokoronarnog

premoštenja (CABG). Zlatni standard u liječenju pacijenata sa IM je danas PCI, dok se reperfuzija trombolitičkim lijekovima radi u slučaju nedostupnosti PCI unutar 90 minuta od dolaska pacijenta. Aortokoronarno premoštenje nije metoda prvog izbora zbog puno veće dostupnosti i brže reperfuzije prvim dvjema metodama. Iako je proces reperfuzije poželjan u liječenju IM i što je prije učinjen to je bolja prognoza pacijenta, dokazano je da reperfuzija sama po sebi oštećuje ishemično tkivo. (slika 3)



Slika 3. Udio ishemijskog i reperfuzijskog oštećenja u konačnoj veličini infarkta miokarda (Hausenloy DJ i Yellon DM, 2013)

#### 4.6 Patofiziologija reperfuzijskog oštećenja

Prema rezultatima nekih istraživanja čini se da bi reperfuzijska ozljeda mogla utjecati na čak do 50% ukupne veličine IM i to na nekoliko načina (Yellon DM i Hausenloy DJ, 2007).



#### **4.6.1 Reperfuzijom potaknute aritmije**

Postoji nekoliko teorija o njihovom nastanku, ali zajedničko im je da se temelje na heterogenosti oporavka područja ishemije. Heterogenosti u vremenskom smislu, ali i u smislu mjesta ishemije. Stanice koje su duže vremena bile u ishemiji, nakon reperfuzije oporavljat će se sporije, ali isto tako područja koja uključuju različite vrste stanica će se oporavljati različito (Manning AS, Hearse DJ 1984).

#### **4.6.2 Omamljeni miokard**

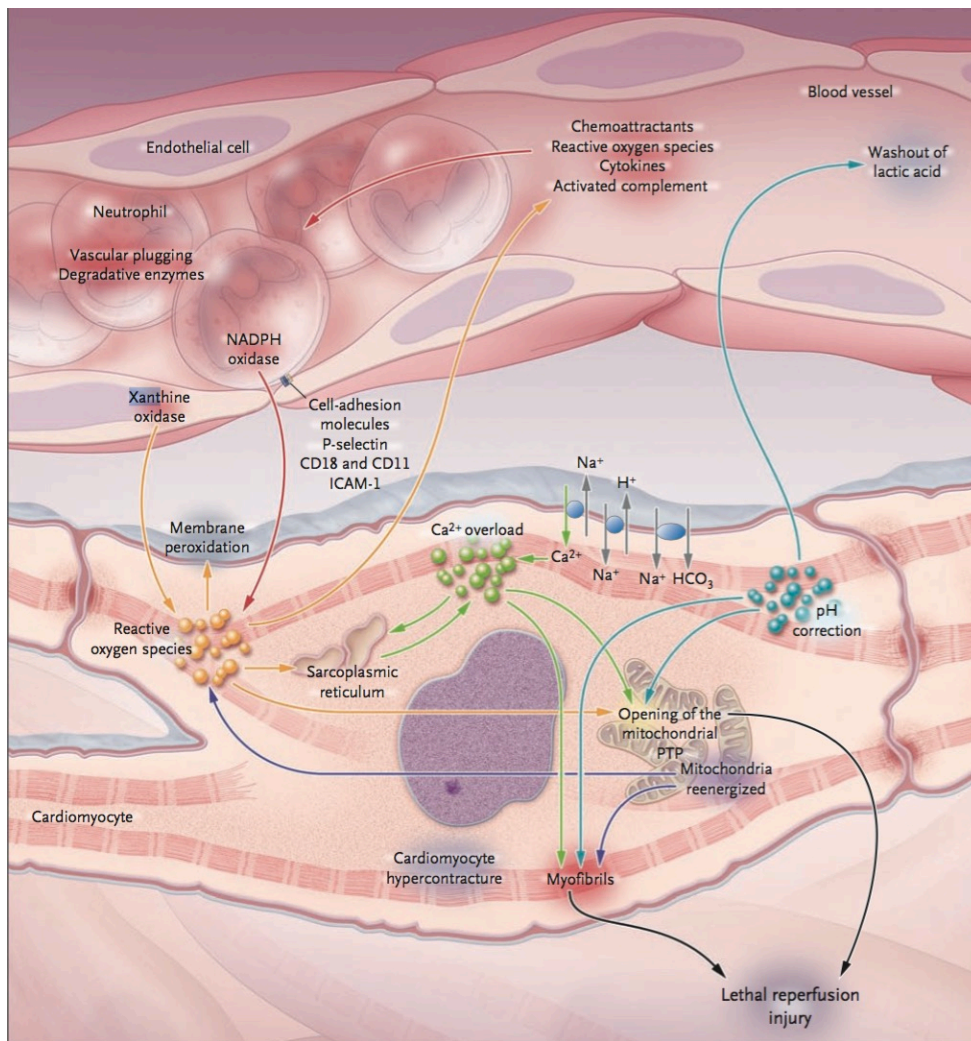
Omamljeni miokard je naziv za fenomen prolaznog slabljenja ili gubitka mehaničke funkcije miokarda nakon kraćih razdoblja ishemije usprkos uspostavljenom normalnom protoku krvi. Akinetični i naizgled infarcirani segmenti miokarda ne oporavljaju se odmah nego tek nekoliko sati ili dana nakon reperfuzije, ovisno o duljini trajanja ishemije. Rezultat je oksidativnog stresa, gubitka adeninskih nukleotida i viška intracelularnog  $Ca^{2+}$  (Depre C i Vatner SF, 2007).

#### **4.6.3 Mikrovaskularna opstrukcija**

Mikrovaskularna opstrukcija uključuje ireverzibilno oštećenje kapilara i njihovu kompresiju nabubrenim endotelnim stanicama i kardiomiocitima, mikroembolizaciju dijelova aterosklerotskog plaka, mikrotrombe, otpuštanje vazomotornih i trombogenih tvari i začepljenje kapilara neutrofilima. Na koronarnoj angiografiji prilikom PCI u akutnom infarktu miokarda mikrovaskularna opstrukcija (MVO) se manifestira kao usporeni protok krvi kroz koronarne krvne žile. U čak 30-40% pacijenata koji imaju normalan nalaz koronarne angiografije se kasnije kontrastnom ehokardiografijom, kontrastnom MR-om ili SPECT-om može dokazati postojanje MVO (Hausenloy DJ i Yellon DM, 2013).

#### 4.6.4 Letalno reperfuzijsko oštećenje miokarda

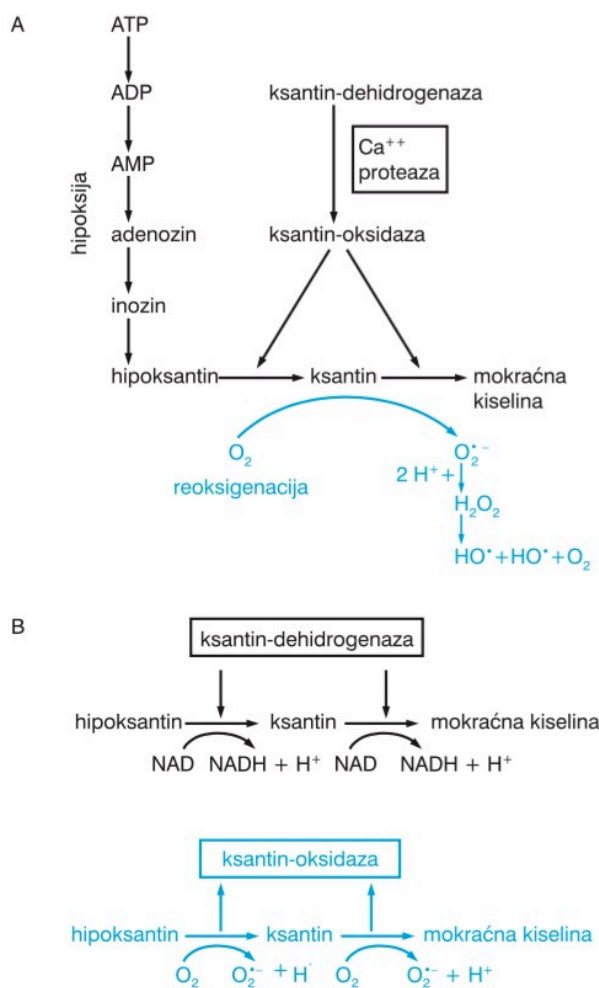
Neki kardiomiociti koji su još uvijek bili živi na kraju ishemije tek nakon reperfuzije ulaze u procese stanične smrti kao što su apoptoza, nekroza ili autofagija. Taj fenomen naziva se letalno reperfuzijsko oštećenje miokarda. Brojni su mehanizmi odgovorni za tu pojavu uključujući oksidativni stres, gomilanje intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$ , prebrza korekcija pH, otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore (MPTP) i upala posredovana upalnim stanicama koje dolaze na mjesto ishemije (slika 4).



Slika 4. Prikaz čimbenika letalnog reperfuzijskog oštećenja miokarda (Yellon DM i Hausenloy DJ, 2007)

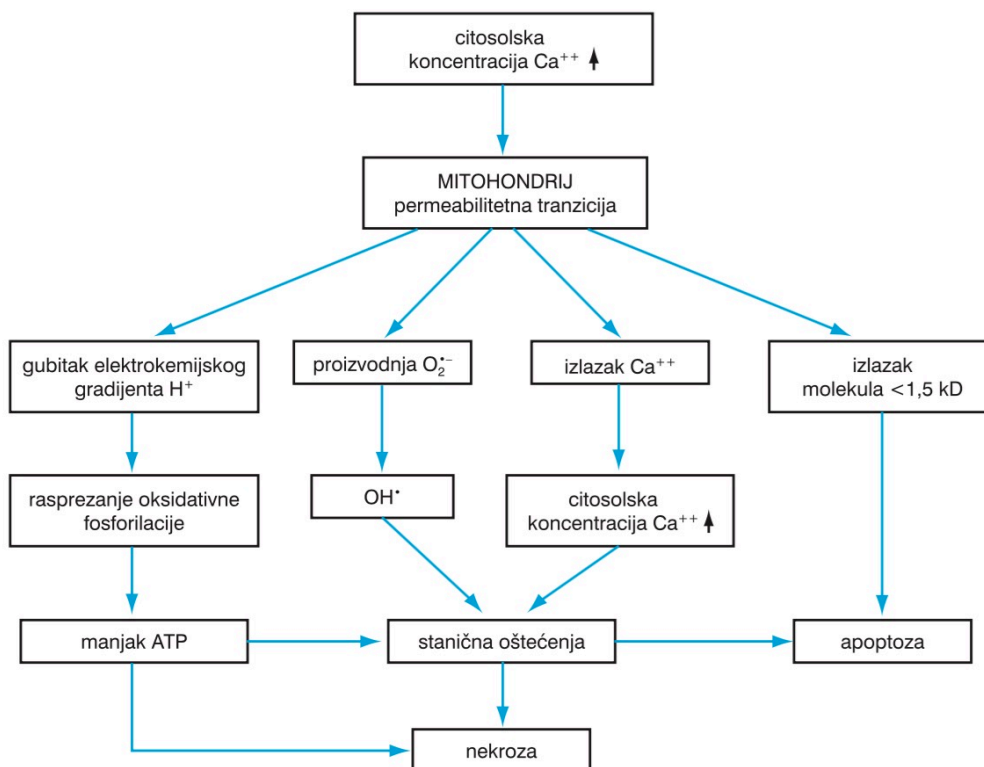
Višak  $\text{Ca}^{2+}$  nastao ishemijskim oštećenjem sada neposredno ili u kompleksu s kalmodulinom aktivira fosfolipaze  $\text{A}_1$  i  $\text{A}_2$  koje odcjepljuju masne kiseline iz

fosfolipidnog omotača stanice te ga tako oštećuju. Među njima je i arahidonska kiselina čiji daljnji metabolizam ciklooksigenacijom i lipooksigenacijom rezultira slobodnim kisikovim radikalima (ROS). Kompleks  $\text{Ca}^{2+}$  s kalmodulinom u endotelnim stanicama aktivira proteazu koja pretvara enzim ksantin-dehidrogenazu u ksantin-oksidadu. U normalnim uvjetima taj enzim s razgradnih produkata ATP-a, ksantina i hipoksantina prenosi elektrone i vodik na NAD. U uvjetima hipoksije ksantin-oksidadu ima povećanu količinu supstrata zbog pretvorbe ATP-a u ADP i AMP te prenosi elektrone na molekularni kisik i stvara superoksidni anion  $\text{O}_2^-$  (slika 5). Drugi način kako kompleks  $\text{Ca}^{2+}$  s kalmodulinom stvara ROS je aktivacija NO sintetaze u endotelnim i živčanim stanicama. Novostvoreni NO djeluje citotoksično spajanjem s superoksidnim anionom, prelaskom u peroksinitritni anion. (Krvavica S i Gamulin S, 2011).



Slika 5. Stvaranje ROS razgradnjom ATP-a ksantin-oksidadom (Krvavica S i Gamulin S, 2011)

Osim navedenih mehanizama nastanka ROS, bitan izvor ROS u reperfuziji je "curenje" elektrona iz respiratornog lanca, kompleksa I i III. Ono nastaje radi brzog porasta  $pO_2$  i ishemijskih oštećenja respiratornog lanca. ROS tijekom reperfuzije osim direktnog oštećenja stanice također potiče otvaranje MPTP. Na otvaranje MPTP djeluju i višak  $Ca^{2+}$ , manjak ATP-a i brza korekcija pH (slika 2). MPTP je neselektivna pora koja povećava propusnost mitohondrijskih membrana. Sama struktura pore, odnosno njen molekularni identitet još nije u potpunosti razjašnjen. Otvaranje MPTP-a rezultira depolarizacijom mitohondrijske membrane uz rasprezanje lanca oksidativne fosforilacije. Čitav taj proces je nazvan mitohondrijska permeabilizacijska tranzicija. Mitohondrijska permeabilizacijska pora se primarno otvara za vrijeme reperfuzije. Kroz MPTP iz mitohondrija izlaze  $Ca^{2+}$  i molekule molekularne mase manje od 1,5 kD, uključujući i različite čimbenike koji potiču apoptozu. Posljedična ruptura vanjske mitohondrijske membrane uslijed ulaska vode i bubrenja oslobađa i citokrom c koji također inicira apoptozu (slika 6).



Slika 6. Mitohondrijska permeabilna tranzicija (Gamulin S, 2011)

Molekule oslobođene uslijed nekroze stanica kemotaktičnim djelovanjem privlače neutrofile koji dodatno oštećuju stanice u području u kojemu je uspostavljena reperfuzija. Oni to čine mehanizmom MVO, otpuštanjem katalitičkih enzima i stvaranjem vlastitih molekula ROS-a koje se izlučuju u okolno tkivo.

#### **4.7 Istraživanja o metodama liječenja i prevencije ishemijsko-reperfuzijske ozljede**

Za primarnu prevenciju ishemijskog oštećenja miokarda važno je djelovati na etiološke čimbenike, posebice aterosklerozu kao vodeći uzrok nastanka IM. Tu je svakako važna edukacija o zdravoj prehrani, redovitoj tjelovježbi i kontroli tjelesne težine. U sekundarnoj prevenciji i liječenju IM važno je vrijeme od nastanka simptoma do postavljanja dijagnoze te vrijeme od postavljanja dijagnoze do PCI. Kliničke studije usmjerene ka ublažavanju reperfuzijske ozljede tretiranjem pacijenata antioksidansima poput trimetazidina (Downey JM, 1990) i superoksid dizmutaze (Flaherty i sur. 1994) nisu pokazale dobre rezultate kao slične studije u animalnim modelima. Razlozi za to se još istražuju, a mogli bi uključivati nemogućnost pravovremenog ulaska antioksidansa u stanicu. Kliničke studije koje su ispitivale sarkolemalni  $\text{Ca}^{2+}$  kanal ili mitohondrijski  $\text{Ca}^{2+}$  prijenosnik kao moguće mjesto intervencije koje bi spriječili djelovanje viška  $\text{Ca}^{2+}$  na otvaranje MPTP nisu pokazala veću korisnost tih lijekova (Boden WE i sur, 2000). Obećavajući u animalnim modelima su bili i lijekovi inhibitori  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivača kao kariporid koji bi usporili normalizaciju pH i tako smanjili otvaranje MPTP, ali klinička istraživanja nisu pokazala značajan učinak na veličinu infarkta ili kliničku sliku pacijenta (Theroux P i sur, 2000). Provedena su istraživanja sa inhibitorom MPTP - ciklosporinom A koji je u životinja smanjio veličinu infarkta 40-50% (Argaud L i sur, 2005). Klinička istraživanja kojima se pokušava ustanoviti korisnost ciklosporina A pri rutinskoj PCI su u tijeku. Istraživanja korištenja imunosupresivnih lijekova kao pexelizumaba u smanjenju upalnog oštećenja u reperfuziji također nisu pokazala korist (Armstrong i sur, 2007). Jedno od kliničkih istraživanja (Ishii i sur, 2005) koje je pokazalo manji mortalitet i manji broj komplikacija je intravenska primjena nikorandila. Nikorandil je lijek sa dualnim svojstvima nitrata i agonista  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanala. Stimulira gvanilat ciklazu koja producira cGMP. On aktivira protein kinazu G koja aktivira sarkolemalnu kalcijsku

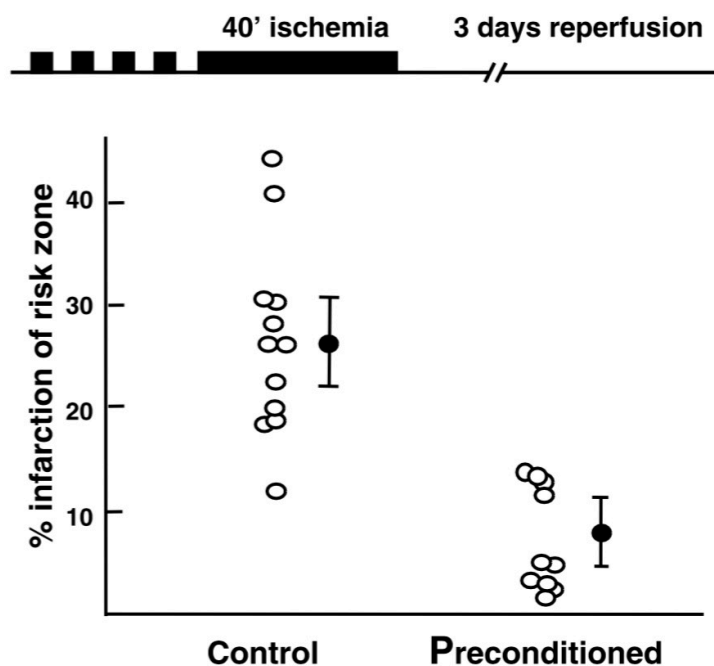
pumpu i dovodi do smanjenja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u stanici. Uz to, agonističko djelovanje na  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanale ima ulogu farmakološkog prekondicioniranja. Istraživanje primjene intravenskog magnezij sulfata (Woods i sur, 1992) je isto tako pokazalo smanjeni mortalitet i broj komplikacija. Čini se da magnezij blokira kalcijeve kanale koji pokreću otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazmatskog retikuluma. Jedna od značajnijih strategija ublažavanja IRI je prekondicioniranje, o čemu će biti riječ u idućem poglavlju.

## 5. Prekondicioniranje

### 5.1 Vrste prekondicioniranja

#### 5.1.1 Ishemijsko prekondicioniranje

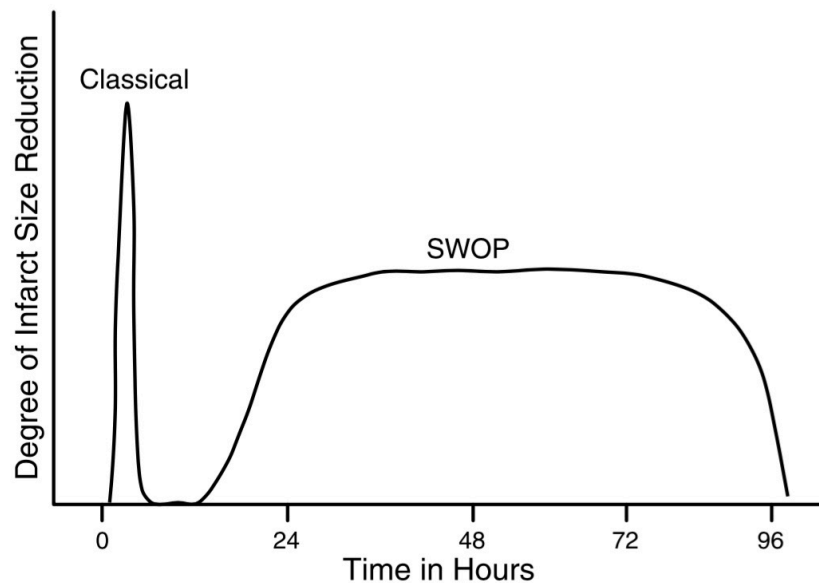
Ishemijsko prekondicioniranje (IPC) je prvi puta opisano 1986. godine na psu. Murry i sur. su ustanovili da četiri kratke epizode ishemije miokarda po 5 minuta, svaka praćena reperfuzijom od 5 minuta koje prethode infarktu uzrokovanom ishemijom od 40 minuta postižu smanjenje veličine infarkta od 75% (slika 7). Nakon 40 minuta ishemije ponovno je bila uspostavljena normalna perfuzija miokarda i za 3 dana je promatrana veličina infarkta na histološkim preparatima (Murry i sur, 1986).



Slika 7. Rezultati pokusa Murrya i sur. (Murry i sur, 1986)

Kasnija istraživanja su pokazala da postoje dva razdoblja protekcije miokarda nakon prekondicioniranja. Osim ranog razdoblja djelomične protekcije od IRI 1-2h nakon klasičnog ili ranog prekondicioniranja kojeg su otkrili Murry i sur. postoji i kasno razdoblje koje započinje otprilike 12-24h nakon početnog podražaja i traje 2-3 dana

(slika 8). To razdoblje je nazvano drugim prozorom ili kasnim prekondicioniranjem (Kuzuya i sur, 1993).



Slika 8. Vremenski nastup zaštite kod klasičnog i kasnog prekondicioniranja. SWOP od engl. second window of protection (Yellon DM i Downey JM, 2003)

### 5.1.2 Farmakološko prekondicioniranje

Za razliku od IPC, ovdje se farmakološkim putem, koristeći razne kemijske spojeve koji djeluju na neki od pretpostavljenih mehanizama nastanka prekondicioniranja, a bez stvarnog uzrokovanja ishemije, pokušava prekondicionirati stanicu. Za sada je upotreba inhalacijskih anestetika pri operacijama pacijenata sa rizikom od IM najbliže kliničkoj primjenljivosti ove metode o čemu će više riječi biti kasnije.

## 5.2 Postkondicioniranje

Postkondicioniranje je nastalo iz postupka polagane ili nježne (engl. gentle) reperfuzije kojom je bitno smanjena veličina IM u pasa postupnom reperfuzijom u trajanju 20 do 30min umjesto naglim otvaranjem žile (Sato i sur, 1997). Iz toga je izveden postupak postkondicioniranja u kojem se reperfuzija ne izvodi polagano i kontinuirano već slično kao kod prekondicioniranja ciklusima otvaranja i zatvaranja



okludirane žile. Bitna razlika u odnosu na prekondicioniranje je što se izvodi nakon IM pa se i lakše može primijeniti u kliničkoj praksi, međutim konačni efekt je u eksperimentalnim modelima dakako manji. Od smanjenja veličine IM IPC-om od 75% kojeg su opisali Murry i sur. ovdje je na psećem modelu postignuto smanjenje od 48% (Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME i sur, 2003).

### **5.3 Udaljeno prekondicioniranje**

Godine 1993. je otkriveno da 4 epizode petominutne ishemije i reperfuzije u području lijeve cirkumfleksne koronarne arterije psa nakon koje je učinjen infarkt područja lijeve prednje silazne koronarne arterije znatno smanjuju veličinu tog infarkta (Przyklenk K i sur, 1993). Taj fenomen u kojem ishemija jednog tkiva ili organa prekondicionira drugi je nazvan udaljenim prekondicioniranjem (RIPC). Kasnije je ustanovljeno da čak ciklusi ishemije i reperfuzije noge svinje manžetom tlakomjera prekondicioniraju njen miokard (Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA i sur, 2002). Osim udaljenog prekondicioniranja, koje se odvija prije totalne ishemije može se raditi i udaljeno perkondicioniranje, za vrijeme totalne ishemije te udaljeno postkondicioniranje za vrijeme reperfuzije (Aimo A i sur, 2015).

### **5.4 Molekularni mehanizmi prekondicioniranja**

Točan mehanizam kojim se stanice prekondicioniraju još uvijek nije poznat i predmet je brojnih istraživanja. Ovdje će biti opisane neke od značajnijih hipoteza.

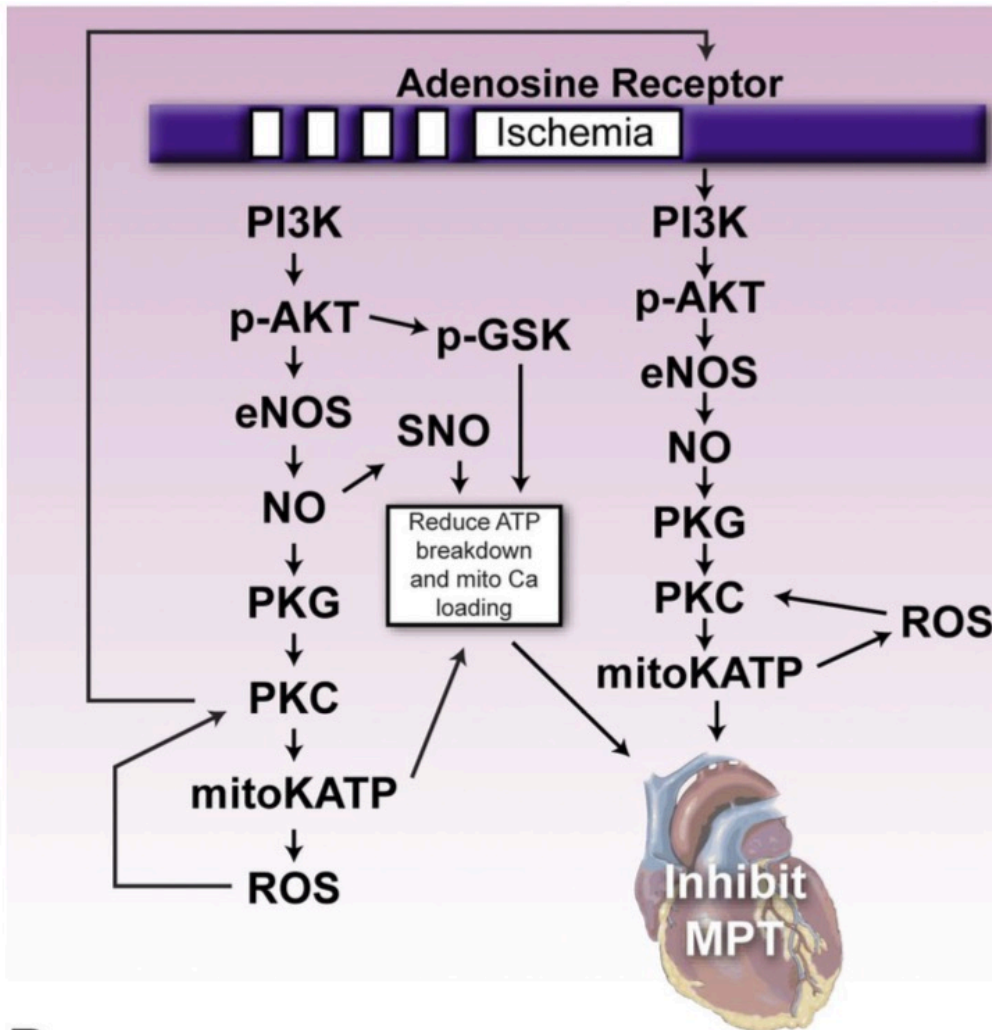
#### **5.4.1 Mehanizmi pokretanja prekondicioniranja**

Još 1991. godine je otkriveno da podraženi adenozijski A<sub>1</sub> receptori započinju kaskadu interakcija koja dovodi do prekondicioniranja stanica. Nedugo nakon toga ustanovljeno je da i noradrenalin preko  $\alpha$  receptora čini istu stvar. Zaključeno je da podraživanje bilo kojeg receptora sparnog sa G proteinom može dovesti do prekondicioniranja stanice i da zapravo postoje paralelni putevi aktivacije prekondicioniranja kako bi se ostvarila redundantnost. Tijekom kraćeg ishemijskog

podražaja, čini se da srce otpušta adenzin, bradikinin, noradrenalin i opioide. Svi oni mogu preko svojih receptora aktivirati G protein. Osim njih postoje i drugi receptori spregnuti s G proteinom kao što su angiotenzinski AT1, endotelinski ET1 i muskarinski. Podražaj tih receptora također može prekondicionirati stanicu, ali čini se da oni ne sudjeluju u procesu IPC jer ih miokard tijekom ishemije ne otpušta. Čini se također da i molekule ROS-a pokreću prekondicioniranje i to zaobilazeći membranske receptore i djelujući direktno na kinaze unutar stanice. Time, ovisno o koncentraciji, mogu ili smanjiti prag podražaja za IPC ili sami uzrokovati prekondicionirano stanje.

#### **5.4.2 Putevi prijenosa signala u prekondicioniranju**

Aktivirani G protein dalje aktivira fosfatidil-inozitol 3-kinazu (PI3K). Ona generira fosfatidil-inozitol 3,4,5-trifosfat koji olakšava fosforilaciju Akt proteina. Fosforilirani Akt dalje fosforilira i aktivira endotelnu dušik oksid sintetazu (eNOS) koja pojačano stvara NO i fosforilacijom inhibira protein kinazu GSK3. Inhibicija GSK3 djeluje antiapoptotično i koči otvaranje MPTP-a, a stvoreni NO preko protein kinaze G i protein kinaze C- $\epsilon$  otvara mitohondrijske  $K_{ATP}$  (mito $K_{ATP}$ ) kanale koji također koči otvaranje MPTP (slika 9). U ovom vrlo kompleksnom signalnom putu od membrane do mitohondrija kao najvjerojatnijeg ciljnog organela u prekondicioniranju ima mnogo toga još neistraženog i nedovoljno jasnog te će buduća istraživanja u tom smjeru zasigurno pomoći u razumijevanju prekondicioniranja (Murphy E, Steenbergen C, 2008).



Slika 9. Signalni put prekondicioniranja od membrane do mitohondrija (Murphy E, Steenbergen C, 2008)

### 5.4.3 Zbivanja u mitohondriju

Mitohondrij se u većini studija smatra ključnom organelom u prekondicioniranju stanice. Posebno se ističu zbivanja na membrani mitohondrija. Pretpostavlja se da  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  kanal ima vrlo bitnu ulogu. On je normalno inhibiran fiziološkim razinama ATP-a u mitohondriju, a kada razina ATP-a poraste on se otvara i propušta  $\text{K}^+$  u stanicu. Taj višak  $\text{K}^+$  djeluje na  $\text{H}^+-\text{K}^+$  izmjenjivač koji izbacuje  $\text{K}^+$  ione i ubacuje  $\text{H}^+$  ione. Tako  $\text{H}^+$  zaobilaze normalan put kroz ATP sintetazu kojim se generira energija potrebna za sintezu ATP-a. Time se količina sintetiziranog ATP-a, ali i potencijal membrane mitohondrija ( $\Delta\psi_m$ ) smanjuju (Yellon DM i Downey JM, 2003). Osim ATP-a,  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  kanal može biti aktiviran preko protein kinaze C- $\epsilon$  i NO-a kako je opisano

u poglavlju 5.4.2. Taj put aktivacije je povezan s prekondicioniranjem stanice i to tako što se mijenjanjem  $\Delta\psi_m$  smanjuje ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u mitohondrij preko  $\text{Ca}^{2+}$  uniportera koji je reguliran sa  $\Delta\psi_m$ . Višak  $\text{Ca}^{2+}$  u mitohondriju bi inače uzrokovao otvaranje MPTP i daljnje letalno reperfuzijsko oštećenje stanice kako je opisano u poglavlju 4.6.4. Osim djelovanja na  $\Delta\psi_m$ , čini se da otvaranje  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -a na neki način otpušta i mali broj signalnih ROS molekula koje mogu aktivirati protein kinazu C- $\epsilon$  i tako zatvoriti krug pozitivne povratne sprege koji dodatno pojačava prekondicioniranje stanice (Murphy E, Steenbergen C, 2008). Pretpostavljena ciljna molekula je MPTP. Inhibicija MPTP rezultira protekcijom stanice od IRI te su mnoga klinička istraživanja provedena s ciljem nalaženja tvari koja bi spriječila otvaranje te pore. Neka od njih će biti opisana u idućem poglavlju.

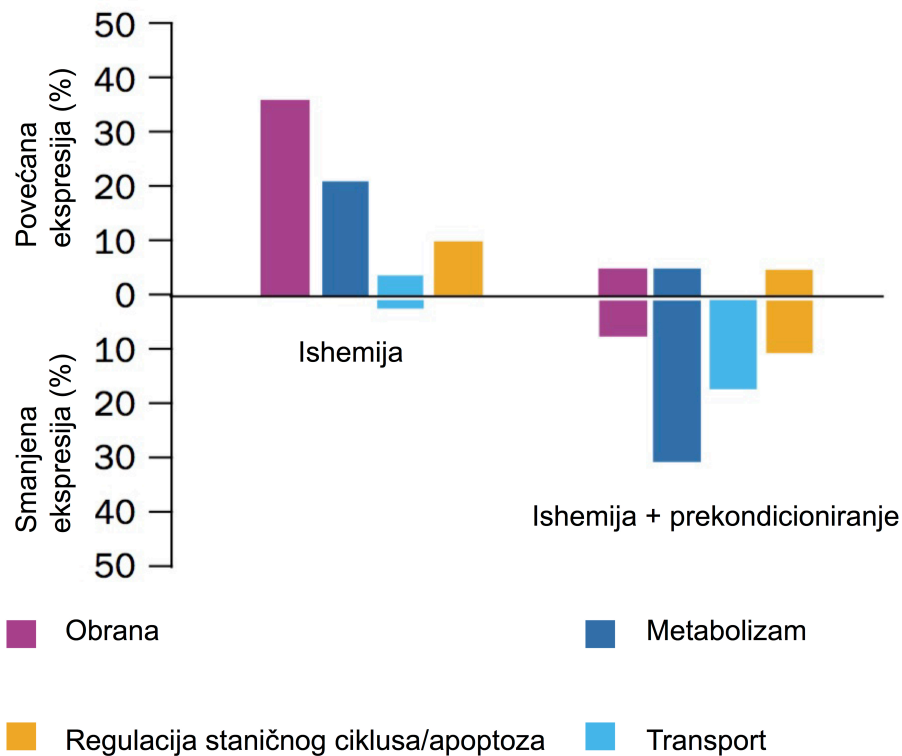
## **5.5 Genske i genomske promjene inducirane prekondicioniranjem**

Učinak ishemijskog prekondicioniranja nastupa već nakon nekoliko minuta i posredovan je najvjerojatnije receptorskim mehanizmom kako je opisano u poglavlju 5.4. Međutim, drugi ili kasni prozor (slika 8) nastupa tek 12-24 sata nakon početnog podražaja što je dovoljno vrijeme za promjene u genskoj ekspresiji. Mnoga su istraživanja usmjerena otkrivanju pojedinačnih gena aktiviranih u procesu prekondicioniranja. Primjer je istraživanje promjena u genskoj ekspresiji na kulturi stanica štakorskog hipokampusa nakon kratke deprivacije kisika i glukoze (Benardete EA I Bergold PJ, 2009). Određivani su pojedinačni geni kojima je promijenjena ekspresija 3, 6 i 12 sati nakon podražaja te su pomoću Kyoto enciklopedije gena i genoma (KEGG) sortirani u skupine po funkciji (tablica 2). Vidljivo je iz tablice 2 da većina gena čija je ekspresija promijenjena kodira proteine koji su uključeni u signalne puteve. Ti signalni putevi su bitni elementi mnogih funkcija stanice. MAPK signalni put je uključen u citokinsku signalizaciju i stanični odgovor na stres, Wnt signalni put je uključen u stanično preživljenje, VEGF signalni put je uključen u angioneogenezu itd.

Tablica 2. Promjene u genskoj ekspresiji nakon deprivacije kisika i glukoze u kulturi stanica štakorskog hipokampusa (modificirano prema Benardete EA I Bergold PJ, 2009)

Uloga	nakon 3h	nakon 6h	nakon 12h
TGF- $\beta$ signalni put	+	+	+
Apoptoza		+	+
Wnt signalni put	+		+
MAPK signalni put	+		
ErdB signalni put		+	
Stanični ciklus	+		+
Toll receptor signalni put		+	
VEGF signalni put	+		
Glikoliza/glukoneogeneza	+		
JAK-STAT signalni put		+	
GnRH signalni put		+	
Adipocitokinski signalni put			+
PI3K signalni put		+	

Slično istraživanje, provedeno na miševima in vivo okluzijom srednje cerebralne arterije pokazuje gotovo oprečnu ekspresiju gena za obranu, metabolizam i regulaciju staničnog ciklusa (Stenzel-Poore MP i sur, 2003). Rezultati su pokazali znatno smanjenje ekspresije gena uključenih u metaboličke puteve, transport, ali i apoptozu (slika 10). Stanica je nakon prekondicioniranja ušla u svojevrsnu hibernaciju. Geni koji kodiraju obrambene proteine su puno manje eksprimirani, vjerojatno sve u svrhu očuvanja energije. Stenzel-Poore MP i sur. sugeriraju da postoji veza između hibernacije koja je fiziološki proces u nekih životinja te prekondicioniranja stanice. Daljnja istraživanja u tom smjeru mogla bi razjasniti etiologiju fenomena prekondicioniranja.



Slika 10. Različita ekspresija gena nakon ishemije i ishemije kojoj je prethodilo prekondicioniranje (modificirano prema Stenzel-Poore MP i sur, 2003)

Prekondicioniranje nije vezano samo uz srce i mozak. Mnogi drugi organi mogu prekondicioniranjem biti zaštićeni od ishemije. Istraživanje na štakorima in vivo (Edmands SD, Ladow E i Hall AC, 2013) je pokazalo da nakon prekondicioniranja izofluranom postoji značajna, ali i različita promjena u genskoj ekspresiji stanica jetre, bubrega i srca (tablica 3). Iz ovih nekoliko istraživanja vidljivo je da su promjene genske ekspresije u istraživanjima vrlo kompleksne i uključuju mnogobrojne stanične puteve. Osim toga, ovdje nisu opisane posttranslacijske modifikacije koje bi također mogle imati ulogu u prekondicioniranju.

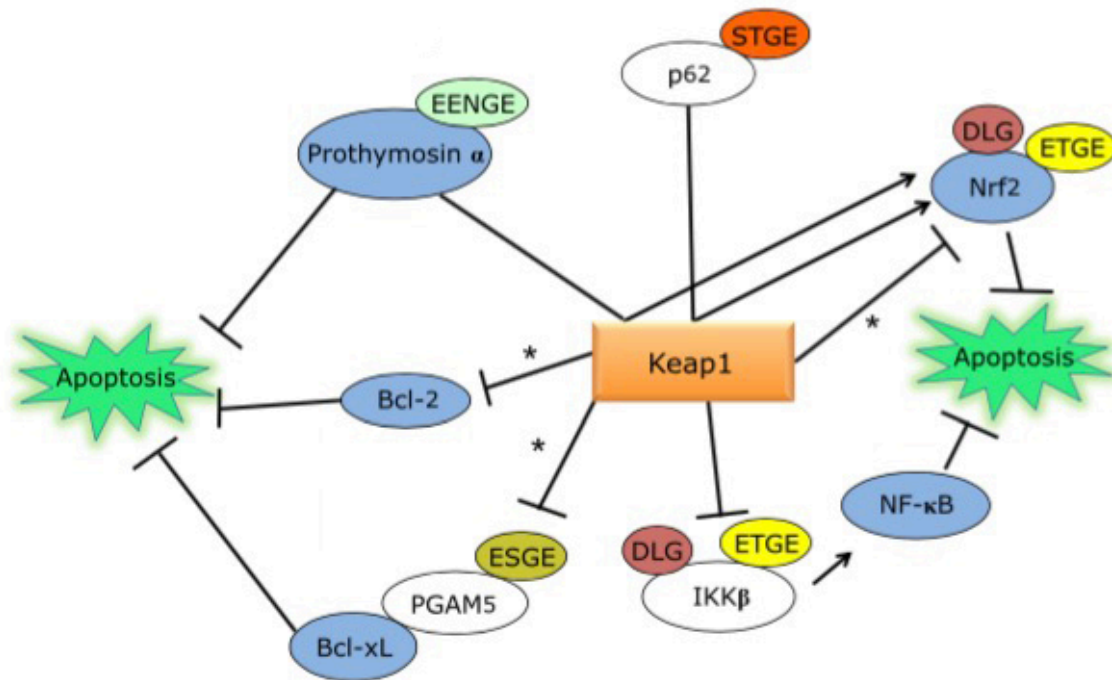
Tablica 3. Promjene ekspresije gena u jetri, bubrezima i srcu nakon prekondicioniranja izofluranom. (Modificirano prema Edmands SD, Ladow E i Hall AC, 2013.)

Gen	Uloga	Razina u jetri	Razina u bubregu	Razina u srcu
<b>Vdac2</b>	Apoptoza, nekroza, energijski metabolizam	1.53x	1.23x	Bez značajne promjene
<b>G6pc</b>	Energijski metabolizam	2.82x	1.43x	Bez značajne promjene
<b>Avpr1a</b>	Modulacija Ca <sup>2+</sup>	Bez značajne promjene	-1.29x	-1.24x
<b>Cyp4f1</b>	Upalni odgovor	1.61x	1.29x	Bez značajne promjene
<b>Pld1</b>	Stanična smrt, egzocitoza, stanična signalizacija	Bez značajne promjene	-1.20x	-1.53x
<b>Tceb2</b>	Regulacija transkripcije	1.23x	1.35x	Bez značajne promjene

### 5.5.1 Uloga Keap1-Nrf2 signalnog puta u prekondicioniranju

Nrf2 (nuclear factor-E2-related factor 2) je jedan od glavnih regulatora genske ekspresije staničnih antioksidansa. Povezan je s mnogim akutnim i kroničnim stanjima u kojima postoji disbalans u stvaranju i razgradnji ROS. U normalnim uvjetima veže se za Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) te se taj kompleks ubikvitinira i razgrađuje. U uvjetima oksidativnog stresa ne veže se za Keap1 nego odlazi u jezgru i tamo se veže za promotorsku regiju ARE (antioxidant response element) što aktivira gene s antioksidativnom ulogom. Kako su ROS jedan od bitnih medijatora u IRI i prekondicioniranju vjerojatno je da je i ovaj signalni put značajan za konačnu zaštitu stanice od IRI. Istraživanja su pokazala da ishemija i oksidativni stres doista aktiviraju Nrf2 u astrocitima miša in vitro i in vivo (Bell KFS i sur, 2011).

Disocijacija Keap1-Nrf2 kompleksa u uvjetima oksidativnog stresa je aktivirana PI3K signalnim putem koji je opisan u poglavlju 5.4.2. Daljnji učinak oslobođenog Nrf2 je sprječavanje apoptoze, direktno preko sinteze antiapoptotskih i antioksidativnih proteina i indirektno aktivacijom drugih antiapoptotskih mehanizama (slika 11).



Slika 11. Interakcija Keap1-Nrf2 sa drugim antiapoptotskim proteinima (Itoh K i sur, 2015)

## 5.6 Klinička primjena prekondicioniranja

Ishemijsko prekondicioniranje kakvo su prvo opisali Murry i sur. 1986. klinički je teško izvedivo jer ne postoji metoda kojom bi mogli predvidjeti infarkt u većini slučajeva. Klinička istraživanja su zato mnogo više orijentirana na farmakološko prekondicioniranje, udaljeno prekondicioniranje i postkondicioniranje. Najdalje u svakodnevnoj upotrebi su došli inhalacijski anestetici poput izoflurana, desflurana i sevoflurana koje American Heart Association i American College of Cardiology uključuju u smjernice za nekardijalne operacije u hemodinamski stabilnih pacijenata koji imaju rizik za ishemiju miokarda (Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA i sur,



2007). Neki od pretpostavljenih načina prekondicioniranja miokarda inhalacijskim anestetima opisani su u tablici 4.

*Tablica 4. Neke od ciljnih molekula na koje djeluju inhalacijski anestetici u kardiomiocitima (modificirano prema Kunst G i Klein AA, 2015)*

Molekula	Djelovanje	Ekperimentalni model	Anestetik
<b>PKC-ε</b>	aktivacija	srce štakora in vivo	Desfluran
	aktivacija	kardiomiociti štakora	Izofluran
<b>PI3K/Akt</b>	aktivacija	srce zeca in vivo	Izofluran
<b>NOS</b>	aktivacija	srce zeca in vivo	Desfluran
<b>ROS</b>	generiranje ROS iz transportnog lanca elektrona, kompleksa III	srce zeca in vivo	Izofluran
	generiranje ROS	trabekule ljudskog atrija	Sevofluran, Desfluran
<b>MPTP</b>	povećana otpornost na Ca <sup>2+</sup> inducirano otvaranje	srce zeca in vivo	Desfluran
	sporije otvaranje	kardiomiociti štakora	Izofluran
<b>mitoK<sub>ATP</sub></b>	aktivacija	srce zeca in vivo	Izofluran

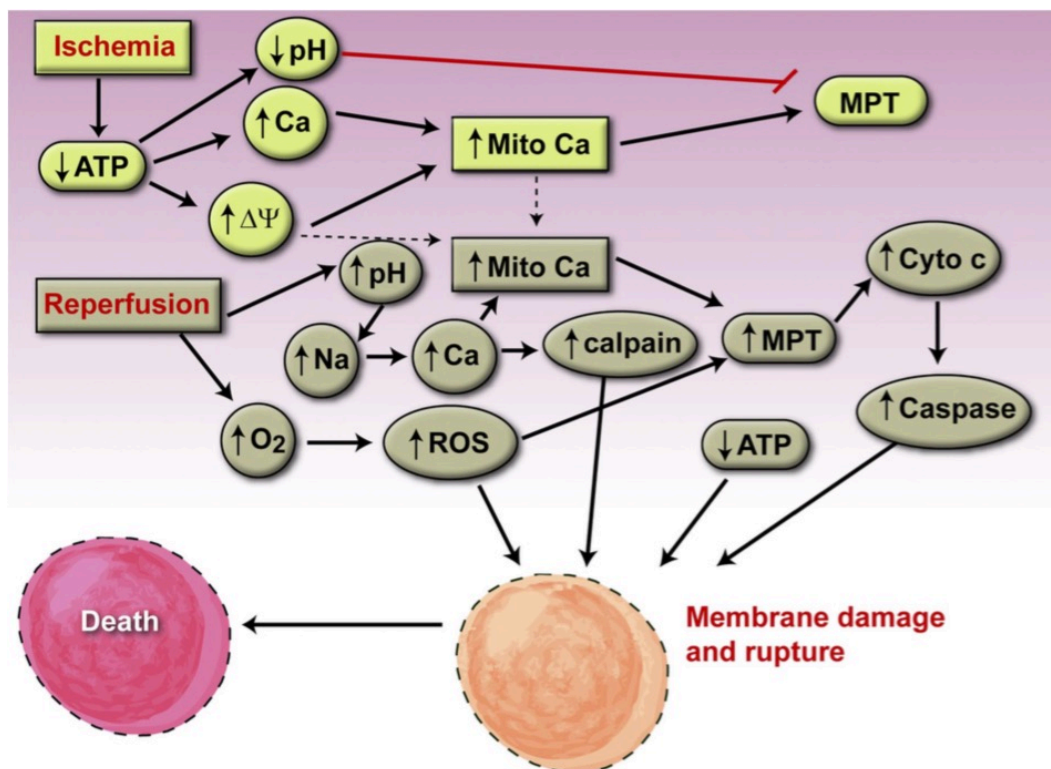
Osim prekondicioniranja inhalacijskim anestetima pri operacijama, veliki potencijal za kliničku primjenu ima i udaljeno kondicioniranje (RIPC). Klinička istraživanja kratkoročnih (Hoole i sur, 2009) i dugoročnih (Sloth i sur, 2014) posljedica nakon IM pokazuju znatno bolje ishode pacijenata koji su prije PCI prekondicionirani napuhavanjem manžete tlakomjera na ruci. Međutim postoje i oprečni rezultati koji ne

pokazuju bolju prognozu za takve pacijente (Prasad i sur, 2013). Problem je u neujednačenosti protokola prekondicioniranja među studijama te parametrima praćenja nakon PCI. Još uvijek nije ustanovljen standardni protokol kojim bi se svi služili. Rezultati studija koje su uspoređivale pacijente kojima je učinjen RIPC prije CABG operacije su također oprečni, ali metaanaliza (D'Ascenzo i sur, 2012) je pokazala značajno smanjenje kardijalnih troponina T i I u RIPC grupi. Kod tih studija je također problem prisutnost brojnih čimbenika zabune kao što su korištenje inhalacijskih anestetika za vrijeme operacije, beta blokatora koji možda mogu zaustaviti RIPC te brojnim drugim lijekovima koje ti pacijenti koriste.

## 6. Rasprava

### 6.1 Prepreke u istraživanjima prekonicioniranja u ljudi

Iako je IRI relativno dobro istražena, mnogobrojne su molekule u stanici odgovorne za taj proces (slika 12) i teško je pronaći jedan lijek kojim bi se IRI spriječila. U istraživanjima na životinjama, a i na ljudima uglavnom su ispitivani pojedinačni lijekovi koji djeluju na određene elemente kaskade IRI, a u zadnje vrijeme sve se više pozornosti daje kombiniranoj reperfuzijskoj terapiji s nekoliko lijekova (Albuquerque-béjar JJ, Barba I, Inverte J i sur, 2015).



Slika 12. Različiti putevi koji vode do smrti stanice tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede (Murphy E, Steenbergen C, 2008)

Osim razlika u građi i funkciji životinjske i ljudske stanice postoji i razlika u komorbiditetima. Eksperimentalne životinje su uglavnom prethodno zdrave i mlade dok su ljudi pogođeni kardiovaskularnim bolestima uglavnom stariji i sa mnogo komorbiditeta i lijekova koji mogu utjecati na ishode istraživanja. Isto tako, vrijeme

totalne ishemije u ljudi vrlo varira i nemoguće ga je točno izmjeriti uz činjenicu da je totalnu ishemiju u ljudi nemoguće predvidjeti. Nemali utjecaj ima i prehrana koja je u laboratorijskih životinja strogo kontrolirana, a u ljudi veoma varijabilna. Tako se čini da i nitriti iz hrane sudjeluju u protekciji od IRI (Bryan NS i sur, 2007). Genetski utjecaj isto nije zanemariv s obzirom da nosi velike razlike u metabolizmu lijekova, ali i ekspresiji različitih medijatora IRI i IPC. Istraživanje prekondicioniranja još od 1986. do danas nije ostvarilo ogromni potencijal koji nosi. Niti sam mehanizam nije do kraja razjašnjen. Vrlo je kompleksan i još se ne zna koje su definitivne ciljne molekule u prekondicioniranju, kako nastaje drugi prozor tj. kako stanica pamti ishemijsko-reperfuzijski podražaj. I ovdje je postoji relativno velika razlika u istraživanju na životinjama i ljudima pogotovo u praćenju rezultata nakon bilo koje vrste kondicioniranja. U životinja to su histološka mjerenja veličine infarkta, a u čovjeka je to nemoguće pa se koriste različiti biokemijski markeri poput kardijalnog troponina, srčane kreatin kinaze, slikovnih tehnika poput srčane MRI itd. Ni tu ne postoji slaganje među istraživačima koji je najbolji parametar praćenja pa je tako još teže uspoređivati različite studije koje često imaju oprečne rezultate. I sam protokol prekondicioniranja se razlikuje od studije do studije pa tako neki istraživači prekondicioniraju manžetom na ruci nekoliko minuta prije reperfuzije, neki za vrijeme reperfuzije, neki napuhuju manžetu na obje ruke, neki samo na jednoj. U svemu tome može postojati bitna razlika koja će odrediti krajnje rezultate istraživanja i učiniti studije neusporedivima.

## **6.2 Nove perspektive u liječenju infarkta miokarda vezane za prekondicioniranje**

Tretman matičnim stanicama u terapiji IM je također potencijalna terapija budućnosti. Radi se o transplantaciji matičnih stanica u infarcirani miokard koje se zatim diferenciraju u kardiomiocite i doprinose poboljšanju funkcije miokarda. U eksperimentalnim istraživanjima je dokazano da prekondicionirane matične stanice imaju znatno poboljšanu toleranciju i regenerativna svojstva te pokazuju bolje preživljenje, diferencijaciju i parakrine učinke. U kliničkim studijama još je mnogo nepoznanica i mjesta za napredak međutim čini se da je i ovdje prekondicioniranje veoma bitan proces u pripremi matičnih stanica za transplantaciju.

## 7. Zaključak

Razumijevanje patofiziologije ishemijsko-reperfuzijske ozljede je ključ za rješavanje mnogih najučestalijih bolesti danas. Iako znamo da reperfuzijska ozljeda može uzrokovati i do 50% ukupne veličine infarkta miokarda, još uvijek se dovoljno ne ističe njena važnost i ne postoji univerzalno primjenjiv način za njeno sprječavanje. Prekondicioniranje kao mehanizam protekcije od ishemijsko-reperfuzijske ozljede je unatoč dugogodišnjim istraživanjima još uvijek nedovoljno jasno. Brojna istraživanja su pokazala korist i ogroman potencijal nekog od oblika kondicioniranja, ali ima i određen broj istraživanja s oprečnim rezultatima. Iz tog razloga samo je jedan mali dio toga ušao u kliničku primjenu. S obzirom na sve veći morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti s kojima su prekondicioniranje i ishemijsko-reperfuzijska ozljeda usko povezani, vjerojatno će u budućnosti, s razvojem novih lijekova, protokola prekondicioniranja, rane detekcije infarkta miokarda i tehnologija praćenja tih pacijenata, prekondicioniranje naći svoj put u svakodnevnu kliničku praksu.

## 8. Zahvale

Zahvalio bih se prvenstveno mentoru doc.dr.sc. Filipu Sedliću, dr.med koji mi je svojim primjedbama, savjetima, znanjem i uložnim vremenom puno pomogao u pisanju ovoga rada, ali me i zainteresirao za područje patofiziologije ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Zahvaljujem također i prof.dr.sc. Jasenki Markeljević, dr.med te prof.dr.sc. Zdenku Kovaču, dr.med na vremenu uložnom za čitanje rada te posebno prof. Kovaču na organizaciji demonstratorskih predavanja koja su značajno doprinjela mome pogledu na znanost i razumijevanje medicine.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima, djevojci i prijateljima Antunu, Josipu, Luki i Pietru koji su uvijek bili tu kada je bilo potrebno.

## 9. Literatura

- Aimo A, Borrelli C, Giannoni A i sur. (2015) *Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences*, World J Cardiol. 7(10):621-32.
- Albuquerque-béjar JJ, Barba I, Inserte J i sur. (2015) *Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs* Cardiovasc Res. 107(2):246-54.
- Argaud L i sur (2005) *Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury*, J Mol Cell Cardiol. 38(2):367–374
- Armstrong PW, Granger CB, Adams PX i sur (2007) *Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*, JAMA 297:43-51
- Boden WE, van Gilst WH, Scheldewaert RG i sur. (2000) *Diltiazem in acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents: a randomised placebo-controlled trial*, Lancet 355:1751-6
- Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ (2007) *Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury* Proc Natl Acad Sci USA. 104(48):19144-9.
- D'ascenzo F, Cavallero E, Moretti C, i sur. (2012) *Remote ischaemic preconditioning in coronary artery bypass surgery: a meta-analysis* Heart 98(17):1267-71.
- Depre C, Vatner SF (2007) *Cardioprotection in stunned and hibernating myocardium*, Heart Fail Rev. 12(3-4):307-17.
- Downey JM (1990) *Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion*, Annu Rev Physiol 52:487-504
- Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW i sur. (1994) *Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction*, Circulation 89: 1982-91
- Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA i sur. (2007) *ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on*

*Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery*): developed in collaboration with the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, and Society for Vascular Surgery, *Circulation* 116(17):e418-99.

- Gamulin S (2011) Poremećaji građe i funkcije mitohondrija U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) *Patofiziologija*, knjiga prva, 7. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, str. 125-129
- Gamulin S, Kovač Z (2011) Načela patogenetskih mehanizama U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) *Patofiziologija*, knjiga prva, 7. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, str. 30-40
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2013) *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*, *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100
- Hoole SP, Heck PM, Sharples L i sur. (2009) *Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial* *Circulation.* 119(6):820-7.
- Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M i sur (2005) *Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction*, *Circulation* 112: 1284-8
- Kralj V, (Ur.) (2013) *Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj* Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo
- Krušlin B i Nola M (2011) *Bolesti srca* U: Damjanov I, Jukić S, Nola M. (Ur.) *Patologija* Zagreb, Medicinska naklada str. 329-384
- Krvavica S i Gamulin S (2011) Integralna reakcija stanice na ozljedu U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) *Patofiziologija*, knjiga prva, 7. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, str. 137-142
- Kunst G, Klein AA (2015) *Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection - cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac anaesthesia*, *Anaesthesia* 70(4):467-82.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N i sur. (1993) *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*, *Circulation Research* 72: 1293–9



- Manning AS i Hearse DJ (1984) *Reperfusion-induced arrhythmias: Mechanisms and prevention*, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Volume 16 , Issue 6 , 497 - 518
- Murphy E, Steenbergen C. (2008) *Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury*, Physiol Rev. 88(2):581-609.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*, Circulation 74: 1124–36.
- Prasad A, Gössl M, Hoyt J i sur. (2013) *Remote ischemic preconditioning immediately before percutaneous coronary intervention does not impact myocardial necrosis, inflammatory response, and circulating endothelial progenitor cell counts: a single center randomized sham controlled trial* Catheter Cardiovasc Interv. 81(6):930-6.
- Reiner Ž, (2012) *Ateroskleroza - bolest od koje umire svaki drugi Hrvat* Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi, 1(2012), str. 169-174
- Sato H, Jordan JE, Zhao ZQ, Sarvotham SS, Vinten-johansen J. (1997) *Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation*, Ann Thorac Surg. 64(4):1099-107.
- Sloth AD, Schmidt MR, Munk K i sur. (2014) *Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention* Eur Heart J. 35(3):168-75.
- Šmalcelj A i Duraković Z (2011) *Poremećaji koronarnog krvotoka U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. (Ur.) Patofiziologija, knjiga prva, 7. izdanje Zagreb, Medicinska naklada, str. 891-901*
- Théroux P, Chaitman BR, Danchin N i sur (2000) *Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations: main results of the GUARDIAN trial*, Circulation 102:3032-8
- Woods KL, Fletcher S, Roffe C, Haider Y (1992) *Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2)*, Lancet 339:1553-8
- Yellon DM, Downey JM (2003) *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*, Physiol Rev. 83(4):1113-51.

- Yellon DM, Hausenloy DJ (2007) *Myocardial reperfusion injury*, N Engl J Med 357:1121–35
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME i sur. (2003) *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 285(2):H579-88.
- Edmands SD, Ladow E, Hall AC (2013) *Microarray analyses of genes regulated by isoflurane anesthesia in vivo: a novel approach to identifying potential preconditioning mechanisms*, Anesth Analg. 116(3):589-95.
- Jaworowski Z. (2010) *Observations on the Chernobyl Disaster and LNT. Dose Response* 8(2):148-71.
- Mccay CM, Crowell MF, Maynard LA. (1989) *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size, 1935*. Nutrition, 5(3):155-71.
- Hayes AW, Kruger CL (2014) *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*, CRC Press; str. 92
- Benardete EA, Bergold PJ (2009) *Genomic analysis of ischemic preconditioning in adult rat hippocampal slice cultures*. Brain Res. 1292:107-22.
- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z i sur. (2003) *Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states*, Lancet. 362(9389):1028-37.
- Bell KFS, Fowler JH, Al-Mubarak B, Horsburgh K i Hardingham GE (2011) *Activation of Nrf2-Regulated Glutathione Pathway Genes by Ischemic Preconditioning*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2011:689524.
- Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T (2015) *Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria*, J Clin Biochem Nutr. 56(2):91-7.

## 10. Životopis

Rođen sam 1991. godine u Zagrebu. Pohađao sam OŠ Josipa Račića, a zatim sam završio zagrebačku XV. gimnaziju s odličnim uspjehom. 2010. godine sam upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine sam bio stipendist Nacionalne zaklade za potporu učeničkom i studentskom standardu na temelju rezultata državne mature. Od prve godine fakulteta uključen sam u rad za studentski časopis "Medicinar". Prvo kao fotograf, a unazad dvije godine kao urednik fotografije i zamjenik glavne urednice. Također sam od početka studija sudjelovao u projektu Bolnica za medvjediće EMSA-e Zagreb (European Medical Students' Association), a unazad tri godine i kao organizator. Demonstrator sam na Katedri za patofiziologiju od četvrte godine studija. Na petoj godini održao sam predavanje demonstratorima na temu "Etiopatogenetska uloga M1/M2 polarizacije makrofaga." Nakon 5. godine proveo sam 2 tjedna na razmjeni u Leidenu, u Nizozemskoj, u sklopu projekta Twinning EMSA-e Zagreb. Tečno govorim engleski i francuski, pohađao sam tečaj francuskog jezika u Francuskoj alijansi od 2011.-2015. godine. U slobodno vrijeme bavim se fotografijom, dizajnom, sviram klavir i gitaru.