

# Koncentracija cirkulirajućeg oksidiranog LDL-a (oxLDL) i protutijela na oxLDL u koronarnih bolesnika prije i nakon revaskularizacije

---

**Starčević, Boris**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2007**

*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:105:207634>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-21**



*Repository / Repozitorij:*

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Starčević, Boris (2007) *Koncentracija cirkulirajućeg oksidiranog LDL-a (oxLDL) i protutijela na oxLDL u koronarnih bolesnika prije i nakon revaskularizacije.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/556>

**Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet**

**Boris Starčević**

**Koncentracija cirkulirajućeg oksidiranog LDL-a (oxLDL) i  
protutijela na oxLDL u koronarnih bolesnika prije i nakon  
revaskularizacije**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2006.**

**Rad je izrađen na Zavodu za kardiologiju i Zavodu za kardiokirurgiju**

**Kliničke bolnice «Dubrava»**

**Zahvaljujem se svojoj obitelji na strpljenju i podršci pri izradi ovog rada, te svom mentoru prof.dr.sc. Željku Sutliću za podršku i savjete u cijelokupnom procesu nastanka ove doktorske disertacije.**

**Voditelj rada:**

**Prof.dr.sc. Željko Sutlić**

**Popis kratica i znakova:**

LDL-engl. low density lipoprotein

HDL- engl. high density lipoprotein

NO- engl. nitric oxide

VCAM-1- engl.vascular cellular adhesive molecule

ICAM-1- engl.intracellular adhesive molecule

oxLDL- oksidirani LDL

ROS- engl. reactive oxygen species

TNF- engl. tumor necrosis factor

CRP- engl. C reactive protein

RNS- engl. reactive nitrogen species

SOD- superksid dismutaza

CAT-katalaza

GPX- glutation peroksidaza

MRI- engl.magnetic resonance imaging

EBC- engl.electron beam computerized tomography

MDA- malondialdehid

IL- interleukin

MCP- monocitni kemoatraktantni protein

PAPP- engl.pregnancy associated plasma protein

HNE- hidroksinonetal

PTCA- perkutana transluminalna koronarna angioplastika

ACBP-aortokoronarno premoštenje

CK- kreatinin kinaza

OLAB-protutijela na oxLD

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>6</b>
<b>1.1.</b>	<b>Slobodni radikali i oksidacijski stres</b>	<b>9</b>
<b>1.2.</b>	<b>Lipidna peroksidacija</b>	<b>11</b>
<b>1.3.</b>	<b>Ateroskleroza-upalni proces</b>	<b>12</b>
<b>1.4.</b>	<b>Aterogeneza i oksidirani LDL</b>	<b>24</b>
<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>ISPITANICI I METODE</b>	<b>29</b>
<b>3.1.</b>	<b>Uzimanje krvi i laboratorijske pretrage</b>	<b>31</b>
<b>3.2.</b>	<b>Statistička obrada podataka</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>108</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>130</b>
<b>11.</b>	<b>PUBLIKACIJE AUTORA</b>	<b>133</b>

## 1. Uvod

Ateroskleroza velikih krvnih žila vodeći je uzrok pobola i smrtnosti u svijetu, a prezentira se kao bolest aorte i njenih ogranaka, perifernih krvnih žila, cerebrovaskularna bolest te prvenstveno kao bolest koronarnih arterija-ishemička bolest srca (1,2).

Kardiovaskularne bolesti su i u Hrvatskoj vodeći uzrok pobola, tako da je u 2002.godini 13,8% svih bolesnika, odnosno 1692/100 000 hospitalizirano zbog kardiovaskularnih bolesti, a 52.8% svih smrtnih slučajeva posljedica je srčanih bolesti (najčešće komplikacija aterosklerotske bolesti srca) (3).

Povijesna teorija odgovora na ozljedu endotela (4,5), danas nadopunjena teorijom endotelne disfunkcije i kronične upalne reakcije, od masnih pruga do razvoja kompleksnih nestabilnih plakova u akutnom koronarnom sindromu, obuhvaća sve stadije aterosklerotske bolesti (6,7).

Poznati rizični faktori, uzroci endotelne disfunkcije i okidači kronične upalne reakcije u procesu aterogeneze primarno su dislipoproteinemije. Prvenstveno su karakterizirane povišenim vrijednostima low-density lipoproteina (LDL) kolesterola i njegovih modificiranih formi dobivenih oksidacijom, glikacijom, agregacijom, udruživanjem s proteglikanima i inkorporacijom u imune komplekse, ali i sniženim vrijednostima high-density lipoproteina (HDL) kolesterola, kao protektivnog faktora u procesu aterogeneze (5,6). Drugi čimbenici rizika bitni u patogenezi ateroskleroze su nikotinizam, hipertenzija, šećerna bolest, genetska predispozicija, homocistein (5,6).

Nikotinizam kao važan faktor rizika za razvoj ateroskleroze kod aktivnih pušača nosi i do 80% povećan rizik za koronarnu bolest, još više zabrinjava jest 30% veći rizik prisutan i kod pasivnih pušača (8). Patofiziološki, pušenje utječe na zgrušavanje, upalne procese i modifikaciju lipida, te dovodi do vazomotorne disfunkcije, a sve četiri komponente osnova su razvoja aterosklerotskog procesa (6,8). Vazomotorna disfunkcija posljedica je negativnog utjecaja nikotina i ostalih komponenti duhanskog dima na produkciju i funkciju nitričnog oksida (NO), slobodnog radikala. Važno je istaknuti da NO nije samo glavni spoj vazomotorne regulacije, već promjene njegovih koncentracija utječu i na imunološke reakcije i aterotrombotske procese. Važno je istaknuti i činjenicu da nikotin osim tog posrednog (preko produkcije slobodnih radikala) ima i neposredan utjecaj na

razvoj upale i zgrušavanje krvi (9). Naime, poznato je da su u pušača povišene vrijednosti leukocita i drugih inflamatornih markera, kao što su C-reaktivni protein, interleukin-6, te tumor nekrotizirajući faktor alfa, te snižena aktivnost antioksidansa (10). Također je nađena značajno povišena adhezivnost i migracija monocita posljedično pojačanoj aktivnosti VCAM-1 i ICAM-1 molekula, te selektina i integrina, a što sve zajedno čini osnovu upalnog aterosklerotskog procesa (10,11). Koagulacijski status je također kod pušača značajno poremećen. Agregacija trombocita je pojačana, što uz povišene vrijednosti fibrinogena, hematokrita, viskoziteta krvi i aktivnosti tkivnog faktora, te reduciranu aktivnost inhibitora tkivnog faktora i fibrinolize dovodi do protrobombotskog stanja u pušača (12,13).

Posebno je potrebno opisati utjecaj pušenja na lipoproteinski status, te oksidativnu modifikaciju lipoproteina. Pušači imaju povišene koncentracije kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida, te snižene vrijednosti HDL-kolesterola (14). Osim dislipoproteinemije u pušača je nađena i povišena aktivnost endogenih izvora slobodnih radikala, koja uzrokuje razvoj oksidativnog stresa, a to uz smanjenu aktivnost protektivnih molekula kao što je paraoksonaza dovodi do oksidacije lipoproteina (15). Stoga su nađene povišene vrijednosti ox-LDL-a i protutijela na ox-LDL, a što je od interesa u ovom radu (16).

Hipertenzija je važan faktor rizika za razvoj ateroskleroze kod koje djelovanjem povišenih vrijednosti angiotenzina II, snažnog vazokonstriktora dolazi i do proliferacije glatkih mišićnih stanica. Naime, angiotenzin II vezanjem na specifične receptore na glatkim mišićnim stanicama, potiče aktivaciju fosfolipaze C, koja povećava intracelularnu koncentraciju kalcija, kontrakciju glatkih mišićnih stanica, sintezu proteina i hipertrofiju glatkih mišićnih stanica (14,17). Angiotenzin II veže se i na specifične AT1 receptore prisutne na membrani makrofaga, što aktivira staničnu lipooksigenazu koja je direktno odgovorna za oksidativnu transformaciju LDL-a i produkciju oksidiranih oblika LDL-a. Jedna od prvih stepenica u razvoju ateroskleroze je vezanje monocita za endotelne stanice, a važan posrednik adhezije nisu samo VCAM-1 i ICAM-1 molekule (kao što će kasnije biti objašnjeno), već ponovno angiotenzin II, te se i kroz ovaj mehanizam pokazuje važnost hipertenzije u razvitku aterosklerotskog procesa (18). U hipertenzivnih bolesnika povećana je aktivnost i lipooksigenaze



glatkih mišićnih stanica, te produkcija hidrogen peroksida i slobodnih radikala, te tako hipertenzija i kroz oksidativni stres ima proinflamatorni, aterogenetski učinak (19).

Šećerna bolest pogađa preko 150 milijuna ljudi u svijetu, a smatra se da će svaki treći rođeni nakon 2000. godine oboliti od dijabetesa, te će im se time očekivani životni vijek smanjiti za 30% i to u preko 80% njih zbog aterosklerotske bolesti i njenih posljedica (20). Šećerna bolest je jedan od osnovnih modela kojim se ukazuje na značaj oksidativnog stresa i upale u nastanku i progresiji ateroskleroze. Oksidativni stres u dijabetičara se očituje kroz povećanu produkciju reaktivnih oksidativnih spojeva (ROS), cirkulirajućih mononukleara, povećanu lipidnu peroksidaciju, karbonilaciju proteina, formiranje nitrotirozina, te oštećenja DNK (21). Što se tiče upalnih faktora, nađene su povišene koncentracije interleukina-6, TNF-alfa, CRP-a, a da u patofiziologiji uz upalu ima značaj i poremećaj koagulacije potvrđuje nalaz povišenih koncentracija inhibitora aktivatora plazminogena, te cirkulirajućeg tkivnog faktora koagulacije (21). Što se tiče samih koncentracija oksidiranih formi lipoproteina i protutijela na njih, rezultati su kontroverzni i definitivno ovise o trajanju same šećerne bolesti i razvijenosti komplikacija, kao što je ateroskleroza (22,23).

Genetski čimbenici su važan faktor rizika za razvoj ateroskleroze, u nekim studijama i u 50% ispitanika, a važno je istaknuti da multifaktorijalnost ateroskleroze predmijeva i upletenost mnogih gena u razvoj bolesti (24). Uz studije na životinjama, najvažnija su ispitivanja gena (najčešće polimorfnića jednog nukleotida) u populaciji s povećanom ili smanjenom incidencijom ateroskleroze (25). Najvažniji primjer takvih studija su mutacije gena odgovornih za produkciju *Toll-like-receptor 4-a*, koji utječe na lipopolisaharidni prijenos signala, proinflamatornu komponentu bakterijskog zida, važnu za započinjanje upalne reakcije. Nađena varijacija tog receptora, kao posljedica ekspresije manje inflamatornih alela korelira sa odloženom progresijom aterosklerotskih promjena, te ukazuje na važnost genetskih ispitivanja za detekciju osoba sa smanjenim (u ovom slučaju) ili povećanim rizikom od ateroskleroze (26).

Povišene vrijednosti homocisteina su toksične za endotel, uzrokuju povišenu proizvodnju kolagena, djeluju protrombotski i smanjuju bioraspoloživost

nitričnog oksida, te time povećavaju rizik ateroskleroze, a eventualno je moguća prevencija folnom kiselinom (27).

Mikroorganizmi kao herpes virusi i *Chlamydia pneumoniae* su nađeni u aterosklerotskim plakovima, ali nije sa sigurnošću dokazana njihova direktna povezanost sa inflamatornom bolešću kod ateroskleroze (6).

Najvažniji patogenetski čimbenik endotelne lezije i disfunkcije je ipak modificirani oksidirani LDL kolesterol (oxLDL), koji se stvara tijekom oksidativnog stresa, te nakon toga pokreće upalnu reakciju u stijenci krvne žile, nastanak i progresiju aterosklerotskog procesa, te time ujedinjuje dva najvažnija predložena patofiziološka mehanizma; oksidativni stres (leziju) i upalu, a to je bit ateroskleroze (5,6) , a što obrađujem u sljedeća dva poglavlja.

### 1.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres

Svi aerobni organizmi posjeduju obrambeni sustav koji uklanja reaktivne kisikove spojeve koji nastaju kao posljedica aerobne respiracije i oksidacije supstrata (28). Pod utjecajem unutarnjih i vanjskih čimbenika, u aerobnom organizmu nastaju male količine reaktivnih kisikovih spojeva poput jako reaktivnih hidroksilnih radikala ( $\cdot\text{OH}$ ), ili nešto manje reaktivnih superoksidnih aniona ( $\text{O}_2^-$ ) i hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (29,30,31,32).

Slobodni radikal je svaka kemijska vrsta sposobna za samostalan život, ma koliko on kratko trajao, koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona. Sve slobodne radikale karakterizira iznimno visoka reaktivnost, što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu, odnosno spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju (33).

Biokemijski su najznačajniji: reaktivni oblici kisika (engl. *reactive oxygen species* - ROS), što je zajednički naziv za radikale kisika (superoksidni, hidroksilni, peroksilni) kao i reaktivne neradikalne derivate kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, singletni kisik), te reaktivni oblici dušika (engl. *reactive nitrogen species* – RNS), u koje ubrajamo slobodne radikale dušika (dušikov (II)-oksid, dušikov (IV)-oksid) i spojeve i molekule kao peroksinitrit, nitrozilni kation (Tablica 1. i 2.) Proces nastanka radikala u stanicama je neprekidan, “slučajan”, vezan uz normalne metaboličke reakcije, npr. respiracijski lanac u mitohondrijima ili uz autooksidacijske reakcije gdje kateholamin,

tetrahidrofolat i reducirani flavini direktno reagiraju s  $O_2$  pri čemu nastaje superoksidni radikal, no može biti i “namjeran” kao pri stvaranju  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  aktivacijom neutrofila, djelovanjem oksidaza (ksantin oksidaze, glikolat oksidaze), te oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima (33,34).

Tablica 1. Reaktivni oblici kisika – **ROS**

Neradikali	Radikali
Vodikov peroksid, $H_2O_2$	superoksidni, $O_2^-$
hipokloritna kiselina, HOCl	hidroksilni, $\cdot OH$
ozon, $O_3$	peroksilni, $R\cdot O_2$
singletni kisik, $^1\Delta_g O_2$	alkoksilni, $R\cdot O$
peroksinitrit, $ONOO^-$	hidroperoksilni, $H\cdot O_2$

Tablica 2. Reaktivni oblici dušika – **RNS**

Neradikali	Radikali
nitritna kiselina, $HNO_2$	dušikov (II) oksid, $\cdot NO$
Dušikov (III) oksid, $N_2O_3$	dušikov (IV) oksid, $\cdot NO_2$
nitronium ion, $NO^{2+}$	
peroksinitrit, $ONOO^-$	
peroksinitritna kis., $ONOOH$	
alkil peroksinitrit, $ROONO$	
Nitroksilni anion, $NO^-$	
nitrozilni kation, $NO^+$	
nitrilni klorid, $NO_2Cl$	

Manje količine reaktivnih kisikovih radikala neophodne su u mnogim biokemijskim procesima uključujući i unutarstaničnu signalizaciju pri

diferencijaciji, progresiji i apoptozi stanica, te obrani od mikroorganizama (35,36). Velike količine i/ili neprikladno uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva rezultira oksidativnim stresom koji može uzrokovati teške metaboličke poremećaje i oštetiti biološke makromolekule (37,38,39).

Oksidacijski stres se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Radi se o prekomjernom stvaranju slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti određene stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica (40).

Drugim riječima, oksidacijski stres je oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidacijskoga sistema (41). Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), a što u konačnici rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja (42).

Prirodni antioksidansi u plazmi, međustaničnom prostoru i samim stanicama štite lipoproteine i stanicu od oksidacije (43,44,45,46). U borbi protiv oksidativnog stresa sudjeluje antioksidativni obrambeni sustav koji kontrolira količinu reaktivnih spojeva kisika (47). Enzimaska detoksifikacija uključuje elemente u tragovima (bakar, mangan, selenij i cink) koji se nalaze u aktivnim centrima enzima poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPX). Poznati ne-enzimski antioksidansi uključuju askorbinsku kiselinu (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), vitamin A i u manjoj mjeri  $\beta$ -karoten (47).

## 1.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekularne strukture (48,49). S obzirom da su oštećeni lipidi sastavni dio bioloških membrana, dolazi do poremećaja strukturne organizacije i uređenja lipidnog dvosloja (50).

Zbog mnogostrukih nezasićenih dvostrukih veza, polinezasićene masne kiseline izvrsne su ciljne molekule za napad slobodnih radikala. Ova vrsta oksidacije neophodna je za stvaranje ateroskleroznih plakova. Mehanizam stvaranja plakova uključuje oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL), fagocitozu tih čestica u subendotelnom prostoru od strane makrofaga, i naposljetku, nakupljanje fagocita u subendotelnom prostoru gdje se potiče stvaranje ateroskleroznih plakova (51).

Testovi *in vitro* pokazali su da postoje tri međusobno povezana procesa lipidne peroksidacije: inicijalizacija, propagacija i terminacija. Stadij inicijalizacije započinje stvaranjem konjugiranih dienskih veza nastalih odvlačenjem vodikovih atoma. Prisustvo redoks - aktivnih metala poput željeza ili bakra olakšava proces inicijalizacije. Propagacija lipidne peroksidacije ovisi o interakciji molekularnog kisika sa slobodnim radikalima ugljika pri čemu nastaju lipidni hidroperoksidi. Raspadanje hidroperoksida rezultira nastajanjem alkoksil ili peroksil radikala koji ulaze u daljnje reakcije lipidne peroksidacije (52).

Posljedica peroksidacije membranskih fosfolipida je gubitak funkcije kanala i gubitak integriteta membrane. Fragmentacija ili poremećaj permeabilnosti membrane dovodi do unosa velikih količina  $Ca^{2+}$  i uništenja stanice.

Sprečavanje lipidne peroksidacije je osnovni proces u aerobnim organizmima jer lipidna peroksidacija osim gore navedenog može uzrokovati oštećenje DNK (43,44,46,53). Osim uništenja lipidnih membrana, lipidna peroksidacija je glavni izvor citotoksičnih produkata poput aldehida koji nastaju raspadanjem lipidnih hidroperoksida (54). Nastali aldehidi su biološki aktivni, odnosno citotoksični, te mogu dovesti do stvaranja unakrsnih veza proteina što dovodi do inaktivacije mnogih sastavnih dijelova stanice, uključujući membrane i enzime (55). Kao zaštitu od potencijalne citotoksičnosti stanice su razvile mehanizme uklanjanja ovih aldehida (56). Stvoreni peroksidi izazivaju preuredbu acilnih lanaca usmjeravajući polarne hidroperoksidge prema površini membrane. Fosfolipaza  $A_2$ , koja je vezana za membranu aktivira se peroksidacijom i cijepa peroksidirane lance. Nakon toga glutation peroksidaza (GPX) u okolnim tekućinama reducira oslobođene aldehide u alkohole. Popravak se završava reacilacijom s acil koenzimom A (57). Dobar primjer detoksifikacijskog procesa

je mitohondrijska oksidacija malondialdehida uz pomoć aldehyd-dehidrogenaze (56).

### 1.3 Ateroskleroza-upalni proces

U prethodnim poglavljima je objašnjen mehanizam oksidativnog stresa, koji trigerira i podržava disfunkciju endotela i upalni proces tijekom aterogeneze, te faktori rizika (naročito dislipoproteinemije) koji su svi odreda signifikantno povezani s oksidativnim stresom.

Četiri kardinalna znaka upale; **rubor, calor, dolor i tumor**, opisao je još u I st. naše ere rimljanin Cornelius Celsus (nemedicinar) u djelu «De re medicina», a peti, **functio laesa** dodao je Rudolf Virchow. Svi su oni prisutni u aterosklerotskom plaku.

#### Rubor

Aterosklerotski, vulnerabilni plak pojačanom angiogenezom vasa vasorum dramatično povećava cirkulaciju u samom plaku i time povećan dotok stanica i substrata ozljede, što ubrzava upalni proces i imunološku reakciju na granici ekstracelularnog matriksa i endotela i povećava vulnerabilnost plaka (58,59).

#### Color

Nove dijagnostičke metode su u humanoj medicini dokazali da vulnerabilni plakovi, sa jako aktivnom upalnom reakcijom imaju višu temperaturu, te ih je modernim tehnologijama moguće detektirati (8,9,10,60,61,62,63).

#### Dolor

Ateroskleroza je definitivno tihi ubojica, jer endotel nema inervacije, te sam inflamatorni aterosklerotski proces ne izaziva bolove, i dugo je asimptomatičan (8). Međutim, ishemičke promjene, pogotovo u sklopu akutnog koronarnog sindroma su sigurno bolan rezultat aterosklerotskog procesa.

#### Tumor

Aterosklerotski plak je tumorska izraslina na krvnoj zili, koja je mijenja, zadebljava, u početku kroz «pozitivnu remodelaciju» bez promjena lumena i smetnji protoku krvi (11,66). S vremenom se povećanje plaka više ne može

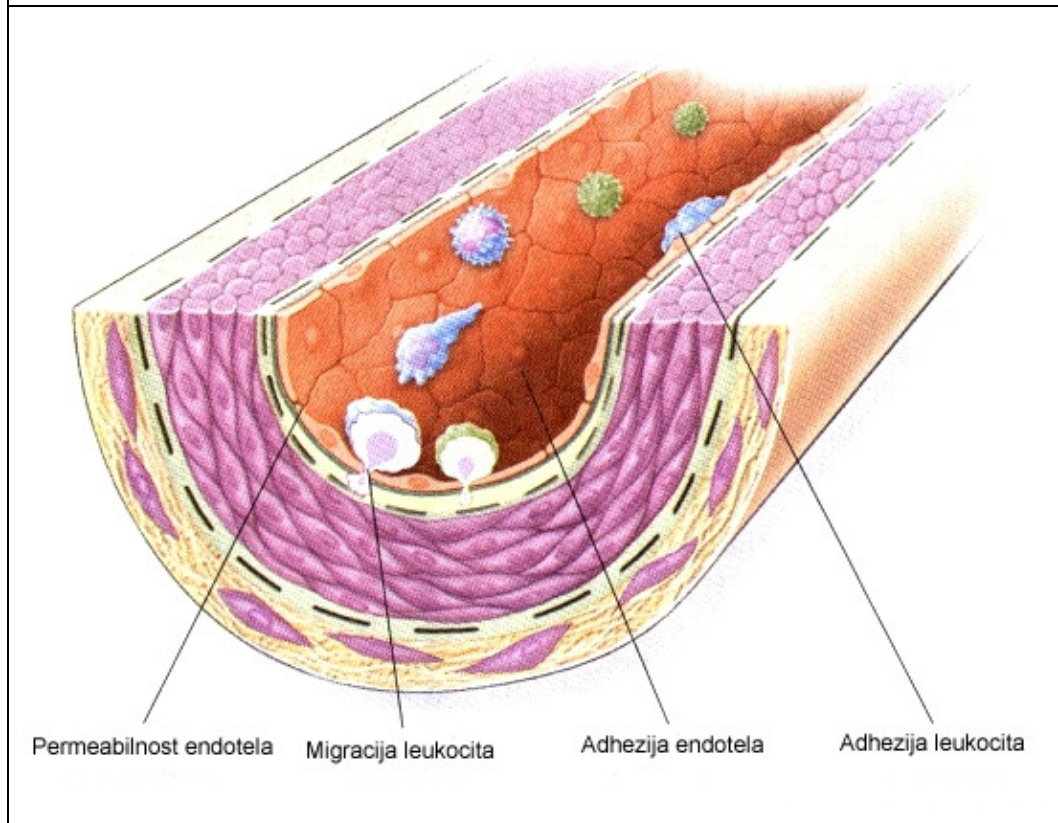
kompenzirati dilatacijom žile, te dolazi do «negativne remodelacije» i njegove protruzije u lumen, te ometanja normalnog protoka.

#### Functio laesa

Može se primijeniti na već spomenutu disfunkciju endotela, vazomotornu disfunkciju aterosklerotski promijenjene krvne žile (12,13,66,67), te disfunkciju tkiva i organa koja krvlju opskrbljuju aterosklerotski promijenjene krvne žile.

Na bifurkacijama, zavojima i ograncima krvnih žila dolazi do povećane turbulencije krvi, te na tim mjestima prvenstveno dolazi do disfunkcije epitela, povećanja njegove permeabilnosti i pojačanog lučenja molekula koje su odgovorne za adheziju, migraciju i akumulaciju monocita i T-limfocita (68). Pojačana permeabilnost endotela je upravljana nitričnim oksidom, prostaciklinom, trombocitnim faktorom rasta, angiotenzinom II i endotelinom. Adhezijske molekule, koje su zapravo receptori za glikokonjugate i integrine na monocitima i T limfocitima uključuju neke selektine, intercelularne adhezijske molekule i vaskularne adhezijske molekule (69). Molekule koje upravljaju migracijom leukocita kroz endotel su trombocitno-endotelne adhezijske molekule, a djeluju zajedno sa kemoatraktantima proizvedenim u endotelnim stanicama, glatkim mišićnim stanicama i monocitima-monocitno kemotaktičnim proteinom 1, ostoeopontinom i modificiranim LDL-om, tako da dovode do nakupljanja monocita i T limfocita u stijenci krvne žile (70,71,72). Dakle na mjestima promijenjenog toka krvi dolazi do pojačane ekspresije adhezijskih molekula na monocitima, limfocitima i samom endotelu, te dolazi do lokalizacije upalnog aterosklerotskog procesa na tim mjestima. Aktivacija monocita i T limfocita ne samo da dovodi do njihovog pojačanog nakupljanja, već i do njihove proliferacije (Slika 1.).

Slika 1.



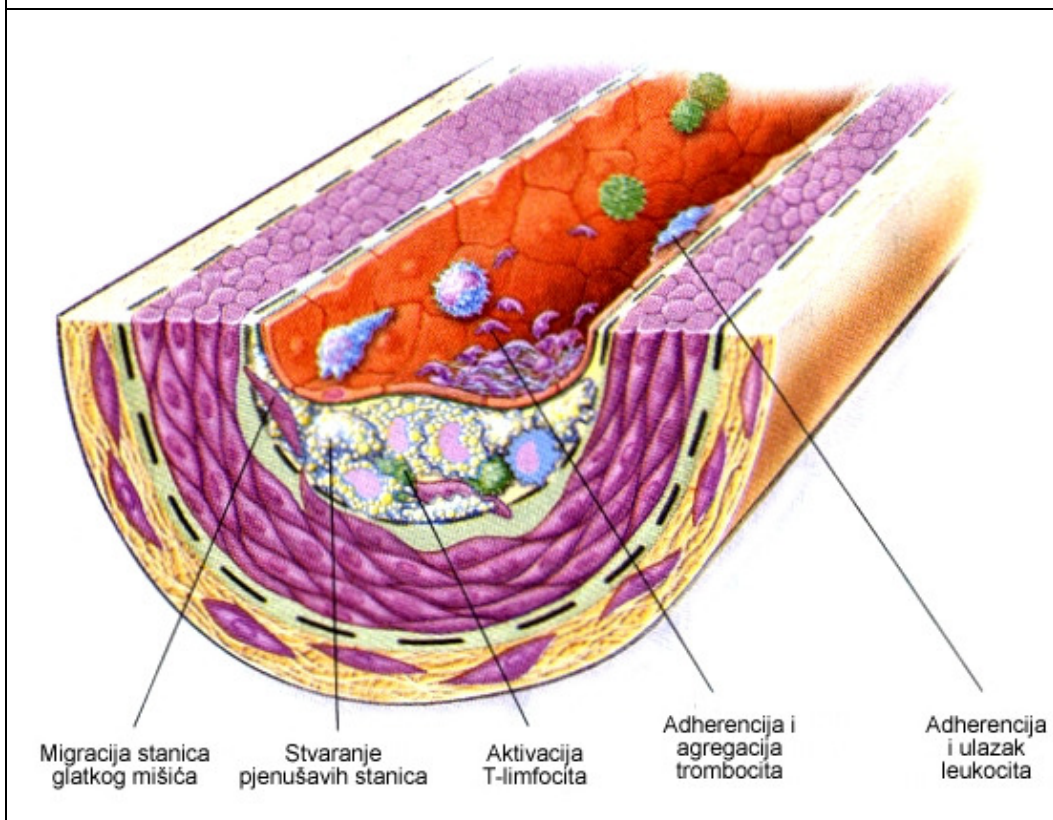
### **Slika 1. Disfunkcija endotela u aterosklerozi**

Najranije promjene koje prethode formiranju lezija u aterosklerozi zbivaju se u endotelu. Te promjene uključuju povećanu permeabilnost endotela za lipoproteine i druge sastojke plazme, što je posredovano dušikovim oksidom, prostaciklinom, trombocitnim čimbenikom rasta, angiotenzinom II i endotelinom; *up-regulacijom* leukocitnih adhezijskih molekula, uključujući L-selektin, integrine i trombocitno-endotelnu adhezijsku molekulu 1, *up-regulacijom* endotelnih adhezijskih molekula, koje uključuju E-selektin, P-selektin, intracelularnu adhezijsku molekulu 1, i vaskularno-staničnu adhezijsku molekulu 1; i migracijom leukocita u stijenku arterije, što je posredovano oksidiranim lipoproteinom niske gustoće (LDL-om), monocitnim kemotaktičnim proteinom 1, interleukinom 8, trombocitnim čimbenikom rasta, faktorom stimulacije kolonija makrofaga i osteopontinom.

U formiranju masnih pruga, prve lezije uočene u procesu ateroskleroze, dokazana je također esencijalna uloga raznih kemokina (69) (Slika 2).



Slika 2.



**Slika 2. Formiranje masnih pruga u aterosklerozi**

Masne pruge se u početku sastoje od monocita i makrofaga ispunjenih lipidima (pjenušave stanice) zajedno sa T-limfocitima. Kasnije im se pridružuju i raznobrojne stanice glatkog mišića. Koraci koji dovode do toga uključuju migraciju stanica glatkog mišića, koja je stimulirana trombocitnim čimbenikom rasta, čimbenikom rasta fibroblasta 2, i transformirajućim čimbenikom rasta  $\beta$ ; aktivaciju T-limfocita, koja je posredovana čimbenikom nekroze tumora  $\alpha$ , interleukinom 2 i čimbenikom stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija; formiranje pjenušavih stanica koje je posredovano oksidiranim lipoproteinom niske gustoće (oxLDL-om), čimbenikom stimulacije kolonija makrofaga, čimbenikom nekroze tumora  $\alpha$  i interleukinom 1; i adherencija i agregacija trombocita, koje su stimulirane integrinima, P-selektinom, fibrinom, tromboksanom  $A_2$ , tkivnim čimbenikom i čimbenicima opisanima u Slici 1. koji su odgovorni za adherenciju i migraciju leukocita.

Od mnogih animalnih modela ateroskleroze izdvajam dva važna istraživanja na genetički modificiranim miševima sa deficiencijom apolipoproteina E, te posljedičnom hiperholesterolemijom i aterosklerotskim promjenama. Naime, istraživanjima na tim životinjama su nadjene povišene koncentracije intercelularne adhezijske molekule-1 i vaskularne adhezijske

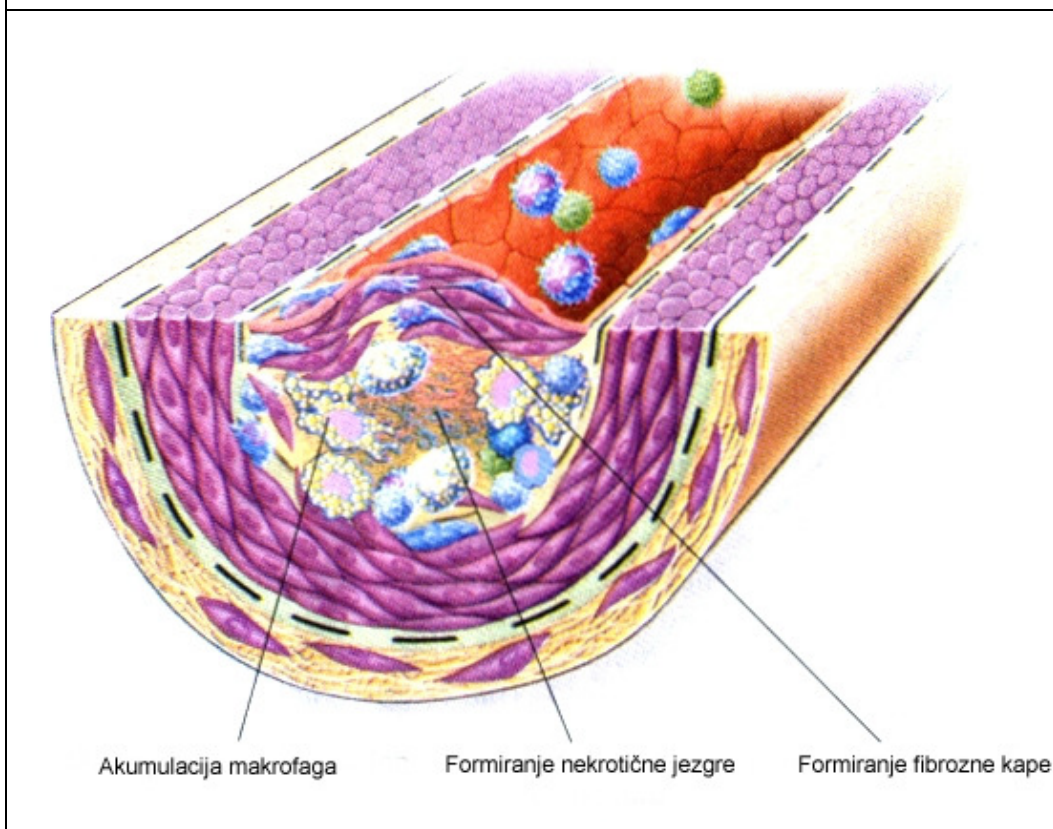
molekule-1 na mjestima aterosklerotskih plakova, koje djeluju zajedno sa kemotaktičnim molekulama, kao što su monocitni kemotaktični protein 1, interleukin 8 i modificirani LDL i tako dovode do progresije inflamatornog procesa (73). *Vice versa*, kod miševa deficijentnih za intercelularnu adhezijsku molekulu 1, P-selectin ili CD-18, značajno je smanjena progresija aterosklerotskih plakova, usprkos hiperlipidnoj alimentaciji (74).

Iz šume ovih molekula, odgovornih za početak aterosklerotskog procesa, na modelu humanih staničnih linija izdvojeni su dizintegrini, nazvani metaloproteinazama-sličnim, dizintegrinima-sličnim, cisteinom bogatim proteinima (MDCs), koje su pronađene u endotelnim, glatkim mišićnim stanicama i makrofagima. Ti transmembranski proteini su izuzetno važni u međustaničnim komunikacijama, a svi sadrže metaloproteinaze u vanstaničnom segmentu, koje mogu aktivirati molekule, kao što je čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ), važne u upalnom procesu (75). Važno je napomenuti i da je podskupina MDC15 nađena u aterosklerotskim plakovima *in vivo*. Osim toga metaloproteinaze mogu cijepati adhezijske molekule poput L-selektina sa površine aktiviranih leukocita, čija se koncentracija lako mjeri u krvi, te mogu poslužiti kao markeri aktivne upalne reakcije, u raznim upalnim procesima i aterosklerozi. Jedna od tih novije otkrivenih imunoregulatornih molekula je i CD40 ligand sa njezinim receptorom, također nađena na endotelnim, glatkim mišićnim stanicama, limfocitima i makrofazima u aterosklerotskim lezijama, a potiče imunološku reakciju i eventualnu nestabilnost plaka (76). U miševa je uspješna redukcija aterosklerotskih lezija, blokiranjem CD40 povezanog prijenosa signala među stanicama (77).

Unutar krvne žile u samom začetku stvaranja aterosklerotskog plaka i masnih pruga, primarne su glatke mišićne stanice, te nakupljeni monociti kao stanice prekursori makrofaga, makrofazi i T limfociti (78). U upalnom procesu važna je uloga makrofaga kao stanica čistača, ali i stanica koje, isto kao i glatke mišićne stanice, na svojoj površini tijekom aktivacije prezentiraju HLA-DR antigene. Njihovom se prezentacijom uz prezentaciju stranih antigena na površini stanice, koje prepoznaju T i B limfociti, potiče stanična i humoralna imunost. U svim stadijima aterosklerotskog procesa u plakovima su nađeni CD4 i CD8 T limfociti (79). Antigenima aktivirani T limfociti luče citokine, kao što je

interferon- $\gamma$  i tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$  i  $\beta$  koji ubrzavaju imunološku reakciju (80). Osim prezentacije antigena i fagocitoze, i makrofazi luče mnoge citokine, kao što su tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$ , interleukin-1 i transformirajući faktor rasta  $\beta$ . Također makrofazi luče proteolitičke enzime, kao već spomenute metaloproteinaze, a od faktora rasta trombocitni faktor rasta i inzulinu slični faktor rasta 1.

Slika 3.



**Slika 3. Formiranje uznapredovale, komplicirane aterosklerotske lezije**

Kako masne pruge napreduju prema intermedijarnim i uznapredovalim lezijama, sklone su formiranju fibrozne kape koja odvaja leziju od lumena krve žile. To predstavlja jedan oblik cijeljenja ili fibroznog odgovora na ozljedu. Fibrozna kapa prekriva mješavinu leukocita, lipida i ostalog sadržaja, stvarajući nekrotičnu jezgru. Ove lezije se šire na svojim rubovima pomoću kontinuirane adhezije i ulaza leukocita uzrokovane istim čimbenicima koji su navedeni na Slikama 1 i 2. Glavni čimbenici povezani sa nakupljanjem makrofaga uključuju stimulirajući čimbenik kolonija makrofaga, monocitni kemotaktični protein 1 i oksidirani lipoprotein niske gustoće (ox-LDL). Nekrotična jezgra nastaje kao rezultat apoptoze i nekroze, pojačane proteolitičke aktivnosti i nakupljanja lipida. Fibrozna kapa nastaje kao rezultat pojačane aktivnosti trombocitnog čimbenika rasta, transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$ , interleukina 1, čimbenika nekroze tumora  $\alpha$ , osteopontina i smanjene degradacije vezivnog tkiva.

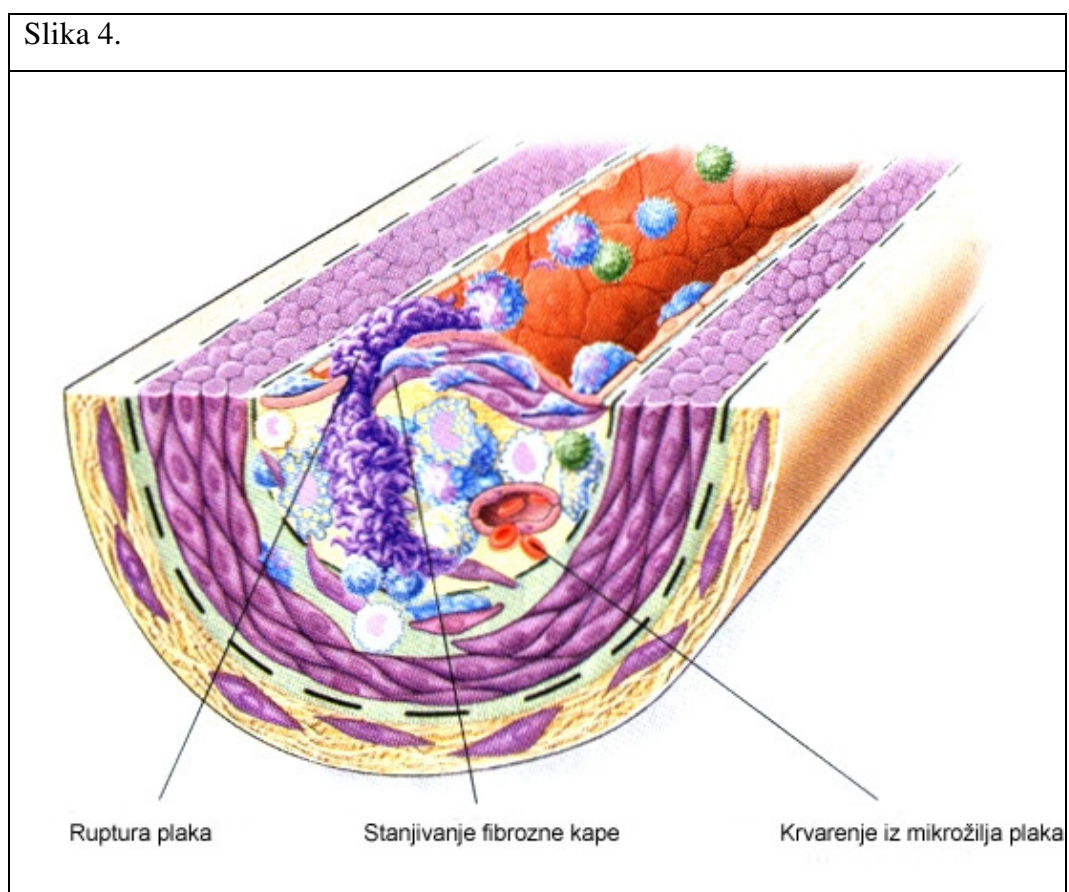
Multiplikaciju samih makrofaga unutar lezije potiču makrofagni stimulator rasta i granulocitno-makrofagni stimulator rasta, a dijeljenje limfocita interleukin-2, dok interferon- $\gamma$  osim aktivacije makrofaga, može u određenim okolnostima uzrokovati i njihovu programiranu smrt procesom apoptoze, što je dokazano u nestabilnim aterosklerotskim lezijama s nekrotičnom jezgrom (slika 3.)

Osim disfunkcije endotela, imunoloških stanica i glatkih mišićnih stanica, u nastanku i progresiji ateroskleroze, trombociti imaju važnu ulogu. Važni inače u održavanju integriteta krvožilja i sprečavanju spontanih hemoragija, trombociti mogu adherirati na promijenjeni endotel, ekspanirani kolagen i makrofage na mjestu lezije. Time se trombociti aktiviraju i iz granula luče čitav niz citokina, faktora rasta i trombin, koji utječu na migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih stanica i monocita (81). A od ranije je poznato da se iz arahidonske kiseline stvaraju prostaglandini kao što je tromboxan  $A_2$ , jedan od najsnažnijih vazokonstriktornih supstanci i faktor agregacije trombocita, te leukotrieni što sve može ubrzati aterosklerotski inflamacijski proces i dovesti do ruptуре plaka i tromboze, kao posljednjeg događaja u procesu aterogeneze i osnovnog patogenetskog mehanizma u akutnom koronarnom sindromu (nestabilnoj angini pektoris, infarktu miokarda). Na blokiranju stvaranja tromboxana  $A_2$ , temelji se povijesna terapija ateroskleroze tj. njenih komplikacija acetilsalicilnom kiselinom (82). U novije vrijeme je tu i nova skupina lijekova, tienopiridini (klopidogrel i tiklopidin), koji sprečavaju ekspresiju glikoprotein (GP) IIb/IIIa receptora, koji spada u obitelj integrinskih adhezijskih molekula-receptora na površini trombocita, a sudjeluju u procesu trombogenezе, te se upotrebljavaju prvenstveno kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, te za sprečavanje tromboze endoproteza nakon vaskularnih intervencija. Postoje i sintetski proizvedeni antagonisti GP IIb/IIIa receptora, te specifična protutijela na te receptore koji mogu dramatično utjecati na trombotski proces unutar krvne žile (83).

Uz stanice involvirane u aterosklerotski proces, potrebno je izdvojiti i intercelularni matriks. Tako je najvažnija komponenta matriksa zdrave medije fibrilarni kolagen tip I i III, dok se na mjestu aterosklerotskih lezija prvenstveno sastoji od proteoglikana. Osim toga matriks koji okružuje stanice nije neutralan, te je dokazano da kolagen u fibrilarnoj formi sprečava prekomjernu proliferaciju

glatkih mišićnih stanica u staničnim kulturama (84). I druge molekule matriksa, kao fibronektin i heparan sulfat također mogu kočiti proliferaciju stanica, a s druge strane interakcija stanica i okolnog matriksa može utjecati i na povećanu ekspresiju kemokina, što sve bitno utječe na upalni i fibroproliferativni aterosklerotski proces (85)

Sve bliže smo odgovoru zašto aterosklerotski kronični proces može brzo progredirati, a do tada stabilni plak rupturirati, te se danas zna da u to nisu uključene samo ekstrinzičke sile koje djeluju na površinu plaka, već svakako intrinzički upalni proces (86,87). Patohistološke studije su pokazale da su nestabilni plakovi mekši i imaju veću lipidno-nekrotičku jezgru, tanju fibroznju kapu, te da su dobro neovaskularizirani s vasa vasorum i infiltrirani s velikim brojem upalnih stanica (88,89), a uz daljnu progresiju dolazi i do adherencije i aktivacije trombocita i razvitka trombotskog procesa (slika 4.).



#### **Slika 4. Nestabilni fibrozni plak u aterosklerozi**

Ruptura fibrozne kape ili ulceracija fibroznog plaka može naglo dovesti do tromboze i to se obično događa na mjestima stanjenja fibrozne kape koja pokriva uznapređovalu leziju. Stanjenje fibrozne kape se zbiva zbog kontinuiranog dotjecanja i aktivacije makrofaga, koji oslobađaju metaloproteinaze i druge proteolitičke enzime na ovim mjestima. Ti enzimi uzrokuju degradaciju matriksa, što može dovesti do krvarenja iz vasa vasorum ili iz lumena arterije i može rezultirati formiranjem tromba i okluzijom arterije.

Otkrivanje pacijenata s povećanim rizikom jedan je od esencijalnih problema moderne kardiologije. Njihov probir je važan ne samo zbog adekvatnog i pravovremenog terapijskog pristupa, već i zbog prevencije očekivanih komplikacija tijekom i nakon revasularizacijskih zahvata u takvih pacijenata, a što je izuzetno važno u kardiokirurgiji i interventnoj kardiologiji. Ispituju se mnoge neinvazivne i invazivne metode detekcije vulnerabilnih plakova in situ, kao što je magnetska rezonanca (engl. *magnetic resonance imaging*) (MRI), EBCT (engl. *electron beam computerized tomography*), elastografija, intravaskularna termografija, fotonska spektroskopija i optička koherentna tomografija (1). Rezultati su obećavajući, ali su veliki problem cijene pretraga i dostupnost aparature, te su periferni, prvenstveno upalni markeri i dalje jedini logičan izbor u probiru pacijenata. U mojem radu posebno ću se baviti C-reaktivnim proteinom, MDA, oxLDL-om i antitijelima na oksidirani LDL.

Od molekula čija bi detekcija i mjerenje bili važni u procjeni težine i nestabilnosti koronarne bolesti, a već su spomenute u patogenezi ateroskleroze izdvajam stanične adhezijske molekule iz obitelji selektina i integrina, kao što su intercelularne stanične adhezijske molekule-1 i 2 (ICAM-1 i ICAM-2) i vaskularne stanične adhezijske molekule-1 (VCAM-1) koje se pojavljuju na endotelnim i glatkomišićnim stanicama, te leukocitima i trombocitima, a njihovu ekspresiju potiču proinflammatorni citokini (IL-1, IL-4, IL-8, INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) (90). U serumu su nađene povišene koncentracije solubilne forme VCAM-1 receptora u bolesnika s aterosklerozom, a njihove koncentracije koreliraju s proširenošću bolesti (91). I u zdravih bolesnika s povećanim rizikom akutnog infarkta miokarda su nađene povišene koncentracije solubilne forme ICAM-1 molekula, a njihove koncentracije su obrnuto proporcionalne s koncentracijama HDL-a (92). U bolesnika s nestabilnom slikom koronarne bolesti nađene su i povišene serumske

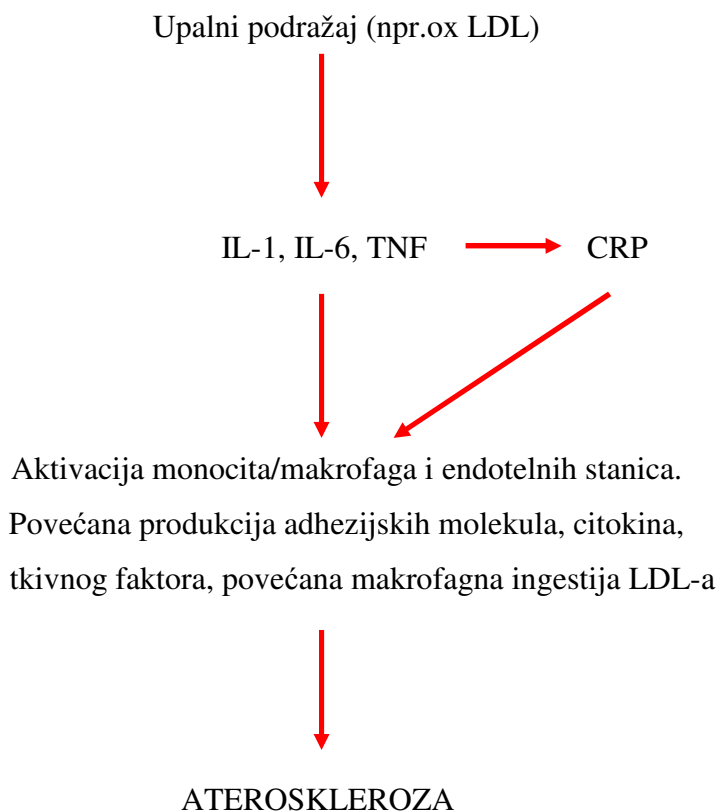
koncentracije P-selektina i CD40-liganda, također važnih transmembranskih proteina angažiranih u upalnom procesu (93,94).

Od inflamatornih citokina, posebno su izdvojeni IL-6, TNF- $\alpha$ , i MCP-1. Važnost određivanja serumskih koncentracija IL-6 je pokazana u 65% redukciji mortaliteta u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i povišenim koncentracijama IL-6, ako su podvrgnuti urgentnom revaskularizacijskom zahvatu, dok se kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i normalnim koncentracijam IL-6 prognoza ne poboljšava hitnim intervencijskim pristupom (95). Serumске koncentracije TNF- $\alpha$  koreliraju sa progresijom aterosklerotske bolesti, a što je još važnije, bolesnici s povišenim vrijednostima TNF- $\alpha$  nakon preboljelog infarkta miokarda imaju povećani rizik ponovnih koronarnih incidenata, a najvjerojatnije zbog njegovog ranije spomenutog proinflatarnog i protrombotskog učinka (96). Slično, povišene koncentracije monocitnog kemoatraktantnog proteina (MCP-1), odgovornog za nakupljanje makrofaga na mjesto upalnog procesa, nađene su ne samo u bolesnika s infarktom miokarda i kardijalnom dekompenzacijom, već i u bolesnika s povećanim rizikom za budući koronarni incident (97). Iz familije metaloproteinaza, koje razgrađuju ekstracelularni matrix, posebno mjesto u dijagnostici nestabilne aterosklerotske bolesti zauzima tzv. plazmatski protein povezan s trudnoćom (Pregnancy Associated Plasma Protein, PAPP-A). Nađena je povišena koncentracija PAPP-A u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (98).

Kao reaktant akutne faze, čija se serumска koncentracija lahko određuje, posebno mjesto u inflamatornoj patogenezi ateroskleroze zauzima C-reaktivni protein (CRP). Otkriven je još prije 70 godina, kao plazmatski protein, koji se veže na C-polisaharid pneumokoka. CRP se mora promatrati kao jednostavni nespecifični produkt inflamatornog procesa, bilo gdje u tijelu, jer bilo koji upalni proces, koji uzrokuje otpuštanje IL-1, IL-6 ili TNF- $\alpha$ , preko tih citokina uzrokuje i povećanu jetrenu produkciju CRP-a. Stoga, njegovo određivanje može potvrditi postojanje momentalno aktivnog upalnog procesa. Međutim, to je pojednostavljeno gledanje na problem, jer CRP nije samo produkt upale, već aktivni sudionik i mnogim je eksperimentima dokazana njegova proinflatarna aktivnost.. CRP stimulira endotelne stanice na ekspresiju adhezijskih proteina, ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina, a uzrokuje i produkciju monocitnog

kemotaktičkog proteina 1 (MCP-1), IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ingestiju LDL-a, a time i započinjanje i perpetuaciju kompletne upalne kaskade u ranije opisanoj inflamatornoj teoriji ateroskleroze (slika 5.) (99).

Slika 5.



Važna uloga u procesu aterogeneze dokazana je i mnogim studijama na koronarnim bolesnicima. Tako su povišene koncentracije CRP-a nađene u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i lošim ishodom bolesti (100). No važna su i istraživanja, da i kod zdravih bolesnika, može poslužiti kao značajan faktor rizika, uz povišene lipide, za predviđanje budućih neželjenih kardiovaskularnih događanja (101).



#### 1.4. Aterogeneza i oksidirani LDL

U procesu aterogeneze najvažniji patogenetski mehanizam je akumulacija lipida unutar pjenastih stanica i struktura stijenke krvnih žila (102), a oksidirani LDL (oxLDL) je ključna molekula (103).

Oksidirani *low-density lipoprotein* (oxLDL) u biti je generički pojam koji opisuje niz modifikacija kako lipidnog tako i proteinskog dijela LDL čestice (104). Predloženo je više mehanizama oksidacije LDL-a, a stupanj do kojeg su uznapredovale promjene varira (105). Do oksidativne modifikacije LDL-a može doći u ovisnosti o peroksidaciji lipida, a tada dolazi do stvaranja oksidiranog LDL-a. Međutim oksidativna modifikacija se može potaći i endotelnom lezijom, egzulceracijom nestabilnog aterosklerotskog plaka, povezanog s produkcijom slobodnih radikala tijekom oksidativnog stresa, te povećanom sintezom prostaglandina i aktivacijom/adhezijom trombocita. Na taj način dolazi i do produkcije aldehida, malondialdehida (MDA) neovisno o peroksidaciji lipida, te stvaranja malondialdehid modificiranog LDL-a, kao jedne od formi oxLDL-a (106). Dakle, oksidirani LDL može potjecati od jake, metalnim ionima inducirane oksidacije LDL-a, ali također može nastati iz MDA oslobođenog oksidacijom arahidonske kiseline prisutne u LDL-u, te je njegova uloga u aterosklerotskom procesu možda različita od drugih oksidiranih formi (59,107,108).

Oksidacija LDL-a *in vitro* rezultira oslobađanjem hidroperoksida koji se konvertiraju u reaktivne aldehide (malondialdehid - MDA, 4-hidroksinonetal - 4-HNE) (109). Interakcija ovih aldehida s lizinskim ostacima u apolipoprotein B-100 čini LDL negativnije nabijenim, što rezultira smanjenim afinitetom za LDL receptore i povećanim afinitetom za receptore čistače (engl. *scavenger*) na makrofagima, endotelnim i glatkomišićnim stanicama (11,110). U tim stanicama dolazi do nekontroliranog nakupljanja takvog oksidiranog LDL-a, jer preko tih receptora nema negativnog povratnog mehanizma, a također se potencira akumulacija kolesteril estera, te dolazi do formiranja «pjenastih stanica» (110). To je inicijalno pozitivna reakcija, jer odstranjivanje i sekvestracija oksidiranih formi LDL-a, može spriječiti njihovu značajnu proinflamatornu aktivnost, te daljnju direktnu leziju endotela i progresiju aterosklerotskog procesa (111). Osim toga, mnogi peroksidirani produkti lipida, pogotovo hidroperoksidi, 4-HNE, i MDA, sudjeluju u unakrsnom vezanju strukturnih proteina i modifikaciji DNA molekula,

što dovodi do mutacija (112). Osim opisane funkcije makrofaga, kao «čistača» i antioksidansi (kao npr. Vitamin E) mogu imati protuupalno djelovanje, sprečavanjem oksidacije LDL-a, ali i utjecajem na ekspresiju adhezijskih molekula (113,114). Čak je u nekim preliminarnim istraživanjima pokazano da primjena E vitamina dovodi do redukcije koronarnih incidenata (114), dok primjena nekih drugih antioksidanta, kao npr. beta karotena nema nikakvog utjecaja (112).

Uloga oksidiranih formi LDL-a u upalnoj hipotezi aterosklerotskog procesa, dokazana je mnogim istraživanjima. Oksidirani LDL ispoljava citotoksične učinke, te oštećuje intimu arterije *in vivo* i time remeti homeostazu endotelne stanice i dovodi do njene disfunkcije. Naime, vjeruje se da se oksidacija LDL-a primarno zbiva u stijenci krvne žile, jer kao što je poznato plazma je bogata antioksidansima (115). Shodno tome povećava se permeabilnost endotela, te njegova adhezivnost za leukocite i trombocite. Prevladava prokoagulantna, umjesto antikoagulantne aktivnosti endotela, a i oksidirani LDL potiče agregaciju trombocita više od nativnog LDL-a (116). Luče se mnoge vazoaktivne molekule, citokini i faktori rasta, važni za započinjanje i perpetuiranje upalnog procesa, odnosno aterogeneze (105,117). Tako se na endotelnim stanicama pod utjecajem modificiranog LDL-a pojačava ekspresija gena za faktor koji stimulira rast kolonija makrofaga i granulocita (*macrophage colony-stimulating factor*, *granulocyte colony-stimulating factor*) (118), a također i produkcija monocitnog kemotaktičkog proteina (*monocyte chemoattractant protein-1*) (119). Osim toga i sam oksidirani LDL djeluje kemotaktično na monocite (119). Opisana promjena proteinske strukture oksidacijom čini LDL još više imunogenim, te oksidirani LDL može potaknuti i celularni i humoralni imuni odgovor. (120). Potiče se stvaranje antitijela na oxLDL, koja mogu imati važnu ulogu u inflamatornom aterosklerotskom procesu (121), a dokazano je i da limfociti iz ljudskih aterosklerotskih naslaga *in vitro* prepoznaju oksidirani LDL (122).

Sam upalni proces ima i *vice versa* značajan utjecaj na kretanje lipoproteina unutar stijenki arterija, te na stvaranje promijenjenih formi lipoproteina. Tako, mijeloperoksidaza, koju secerniraju aktivirani fagociti, može biti katalizator za početak lipidne peroksidacije u LDL-u neovisno o slobodnim metalnim ionima (123), a endotelne stanice, monociti, makrofagi, limfociti i

stanice glatkih mišića in vitro su sve sposobne pojačavati brzinu oksidacije LDL-a inducirane metalnim ionima (124), a u cijeli proces mogu biti uključeni razni enzimi (125). Medijatori upale, kao TNF- $\alpha$ , IL-1 i stimulator rasta kolonija makrofaga pojačavaju vezanje LDL-a na endotelne i glatke mišićne stanice, a i značajno pozitivno utječu na transkripciju gena za LDL receptore (126). Ponavljanje tog začaranog kruga lipidne modifikacije, te upale, pa još više potenciranje lipidne modifikacije, govori o značaju izmijenjenih formi lipoproteina, a naročito oksidiranog LDL-a u nastanku i progresiji upalnog aterosklerotskog procesa.

Zbog toga su u plazmi bolesnika sa stabilnom anginom pectoris i angiografski dokazanom koronarnom bolešću nađene povišene koncentracije oksidiranog LDL-a, ali i MDA modificiranog LDL-a (127). Nije nađena sigurna povezanost sa proširenosti koronarne ateroskleroze ili pridruženom perifernom aterosklerotskom bolesti. Pronađena je i negativna korelacija s HDL kolesterolom, koji djeluje protektivno (127,128,129), te pozitivna korelacija s dobi, ali bez signifikantne korelacije sa koncentracijama triglicerida, ukupnog i LDL kolesterola. Također je oksidativno izmijenjen LDL u povećanim koncentracijama nađen i u bolesnika sa šećernom bolešću i intolerancijom glukoze, a što je u skladu s izraženim oksidativnim stresom (130). Od ostalih faktora rizika kod kojeg je nađena povišena koncentracija oxLDL-a izdvaja se nikotinizam, kod kojeg u progresiji ateroskleroze također značajnu ulogu ima oksidativni stres i oksidacija lipida (131).

U bolesnika s nestabilnom anginom pectoris u odnosu na bolesnike sa stabilnom kliničkom slikom, koncentracija oksidiranog LDL-a je značajno viša, a naročito malondialdehid modificiranog LDL-a (127). Naime, patogenetski mehanizam nastanka akutnog koronarnog sindroma (nestabilne angine pectoris i akutnog infarkta miokarda) je ruptura nestabilnog plaka, a što uz oksidativni stres i produkciju slobodnih radikala utječe prvenstveno na povećanu produkciju malondialdehida i malondialdehid modificiranog LDL-a (132). Stoga je koncentracija malondialdehida i malondialdehid modificiranog LDL-a visoka naročito u bolesnika u kojih se razvije akutni infarkt miokarda (133,134), gdje je oksidativni stres i produkcija slobodnih radikala još izraženija, nego u bolesnika sa nestabilnom anginom pectoris. S obzirom na važnost određivanja troponina u

dijagnostici lezije miokarda u akutnom koronarnom sindromu, odnosno u razlikovanju infarkta miokarda i nestabilne angine pektoris, korelirane su koncentracije malondialdehid modificiranog LDL-a i troponina, te oxLDL-a i troponina, te je nađena značajna pozitivna korelacija (134,135). Nakon svega, važno je istaknuti da postoje i kontradiktorni podaci o koncentracijama i drugih formi oxLDL-a u akutnom koronarnom sindromu, ali i u stabilnoj angini pektoris, te su potrebna i daljnja istraživanja, prvenstveno uz bolji probir ispitanika (definicija stabilne angine pektoris i akutnog koronarnog sindroma), te standardizaciju metoda određivanja oksidiranih formi LDL-a (135).

Osim određivanja oksidativnih formi LDL-a i malondialdehida, posljednjih godina se u istraživanjima patogeneze aterosklerotske koronarne bolesti i akutnog koronarnog sindroma istražuju i antitijela na različite forme oksidiranog LDL-a (136). No njihova uloga u patofiziologiji aterogeneze je kontroverzna. Po nekim autorima IgM protutijela na oxLDL imaju protektivnu ulogu pri razvoju ateroskleroze. No po drugim, IgG protutijela na oxLDL ne samo da su asocirana sa razvojem kardiovaskularne bolesti već imaju svojstvo prediktora neželjenog srčanog događaja (137). Vjeruje se da je glavni razlog inkonzistencije u rezultatima razlike između kohorti, nedostatak standardizacije antigena i eseja, te razlike u procjeni tipova anti-oxLDL protutijela. (104). S druge strane imunološka reakcija, odnosno produkcija antitijela na oxLDL može značiti i bolji klirens potencijalno opasnog oksidiranog LDL-a iz krvi pacijenta. Eventualnu potvrdu te činjenice se nalazi u radovima u kojima se našla obrnuta korelacija koncentracija oxLDL-a i antitijela na oxLDL u zdravih bolesnika (137,138). Međutim, antitijela na oksidirani LDL nađena su povišena u bolesnika sa stabilnom anginom pektoris, perifernom aterosklerotskom bolesti (za razliku od samog oxLDL-a, koji nije nađen značajnije povišen u perifernoj aterosklerozi) i cerebrovaskularnom bolešću, a očekivano je nađena značajna korelacija s nikotinizmom i šećernom bolesti (139,140,141), uz napomenu da dijabetičari mogu imati povišene imune komplekse iz više razloga uključujući i reakcije glikiranih proteina koji su također imunogeni (142). HDL se i ovdje pokazao kao moguć značajni protektivni faktor. U akutnom koronarnom sindromu, porast titra antitijela sigurno je potvrđen samo kod antitijela na malondiladehid modificirani LDL, što je i očekivano s obzirom na ranije objašnjenu patogenezu i povišenu koncentraciju malondialdehida u

oksidativnom stresu (143). S antitijelima na druge oblike oksidiranog LDL-a su podaci kontradiktorni (139,140).

Uloga imunih kompleksa koji nastaju kao posljedica reakcije oxLDL-a i protutijela usmjernih protiv antigena na površini oxLDL još je nejasnija. Dvije studije su pokazale da imuni kompleksi mogu predvidjeti vjerovatnost infarkta miokarda (144), i prisutnost koronarne bolesti srca kod pacijenata oboljelih od šećerne bolesti (145). No na temelju tih oskudnih podataka ne može se ništa sa sigurnošću potvrditi. Za definitivnije zaključke trebalo bi provesti istraživanja ispitujući oxLDL, antitijela na oxLDL i imune komplekse kod istih pacijenata.

Revaskularizacija srca, bilo kirurška ili nekirurška, dilatacijom putem balon katetera (endoproteza-«stentova») izaziva značajnu leziju krvne žile (endotela), akutnu ishemiju, te nakon toga reperfuzijsku leziju, a što sve izaziva oksidativni stres (19,41,105) Sve to utječe na uspjeh operativnog zahvata, a do sada izvršena istraživanja kod kirurške revaskularizacije srca pokazala su značajno manji oksidativni stres tijekom operacije bez upotrebe kardiopulmonalnog premoštenja (tzv. «off-pump» operacija), no kod operacija s upotrebom kardiopulmonalnog premoštenja (tzv. «on-pump» operacija ), te su rezultati očekivano bolji (146,147,148,149). Kod revaskularizacije balon kateterima također su nađene povišene koncentracije malonaldehida nakon zahvata, a što je koleriralo značajno sa postotkom restenoza, te je ukazalo na eventualnu korist antioksidativne terapije perioperativno (146). Značajno je istaknuti da se kod dilatacija u akutnom infarktu miokarda neočekivano zabilježio značajan pad koncentracije malonaldehida, što je suprotan rezultat i od reperfuzije postignute fibrinolizom, te za sada nema objašnjenja tih rezultata (150,151). Značajan je i podatak o akutnom porastu oksidiranog LDL-a neposredno nakon dilatacija bolesnika sa stabilnom i nestabilnom anginom pektoris, a što bi mogao biti i jedan od uzroka brže progresije aterosklerotskog procesa nakon inače uspješnog zahvata, te brzog recidiva bolesti (127,134).

## **2. Ciljevi istraživanja i hipoteza**

Pratiti postoperativne promjene koncentracije oxLDL-a i antitijela na oxLDL i korelirati s načinom revaskularizacije (PTCA; kirurška revaskularizacija), njenim neposrednim uspjehom i perioperativnim komplikacijama.

Korelirati uspjeh postupaka revaskularizacije nakon tridesetdnevnog praćenja, u ovisnosti o preoperativnim i perioperativnim koncentracijama oxLDL-a i antitijela na oxLDL, ali i koncentracijama na završetku studije.

Provjeriti pretpostavku da su bolesnici s višim koncentracijama oxLDL-a i antitijela na oxLDL preoperativno, rizičniji za postupke revaskularizacije.

### **Hipoteza**

Promjene koncentracija oxLDL-a i imunološki odgovor stvaranjem protutijela na oxLDL nakon postupaka revaskularizacije, ovise o načinu revaskularizacije, perioperativnim komplikacijama i uspješnosti zahvata.

## **3. Ispitanici i metode**

U ovu studiju uključeno je 62 bolesnika s poznatom koronarnom bolesti, a nakon učinjene invazivne kardiološke obrade, koronarografije i ventrikulografije, koji su hospitalizirani radi predviđenog postupka revaskularizacije. Kriterij za signifikantnu koronarnu bolest je stenoza najmanje jedne koronarne arterije veća od 75%. Kriterij za jednožilnu, dvožilnu ili višežilnu bolest, ovisi o broju signifikantno suženih koronarnih arterija. Od početne grupe, trideset i jednom bolesniku (31) je učinjena kirurška revaskularizacija (9 bolesnika «on-pump» revaskularizacija i 22 bolesnika «off-pump» revaskularizacija miokarda) i trideset i jednom (31) je učinjena perkutana transluminalna koronarna angioplastika (PTCA). Način revaskularizacije odredio je kardiokirurški konzilij, uzimajući u obzir optimalan način revaskularizacije za svakog ispitanika, neovisno o ovom istraživanju. U studiju su uključeni svi bolesnici koji su došli na revaskularizaciju,

sukcesivno, do ispunjenja broja, ako nisu imali jedan od kriterija za isključivanje iz studije.

Isključeni su bolesnici sa značajnom redukcijom sistoličke funkcije LV (ejekcijskom frakcijom ispod 40%), te signifikantnom valvularnom bolesti, kod koje je potrebno kirurški intervenirati. Također su iz studije isključeni bolesnici sa ranije učinjenom kirurškom revaskularizacijom ili PTCA, te bolesnici s nekom drugom težom kroničnom upalnom bolesti, imunološkom, hematološkom ili malignom bolesti, te većom traumom unazad tri mjeseca, a što bi sve moglo utjecati na oksidativni stres i oksidaciju lipoproteina. Od akutnog infarkta miokarda, do revaskularizacije moralo je proći najmanje tri mjeseca. Standardna kardiološka terapija se nije mijenjala.

Svim bolesnicima je se preoperativno učinjen UZV i dopler karotida, abdominalne aorte i donjih ekstremiteta, a radi procjene proširenosti aterosklerotskog procesa. U slučaju urednog nalaza ili nesignifikantnih promjena na sva tri vaskularna područja, smatralo se da je bolest ograničena prvenstveno na koronarne arterije, te da nema periferne vaskularne bolesti (grupa - izolirana koronarna aterosklerotska bolest). Ako su postojale značajne aterosklerotske promjene na jednoj ili više perifernih arterija, koje je potrebno aktivno liječiti (dilatirati, operirati, intenzivno pratiti uz medikamentoznu terapiju), smatralo se da je aterosklerotski proces generaliziran, te da uz koronarnu bolest postoji i značajna periferna vaskularna bolest (grupa - generalizirana kardiovaskularna aterosklerotska bolest).

Svakom bolesniku se prije zahvata, u izrađeni formular s pristankom za ulazak u studiju, upisalo da li je pozitivna ili negativna obiteljska anamneza za koronarnu bolest, spol, dob, pušačke navike, sistolički i dijastolički tlak, laboratorijski nalazi (CK, CRP, GUK, kreatinin, ukupni kolesterol, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol), EKG i UZV srca neposredno prije zahvata. Također se prije zahvata uzela i krv za određivanje oxLDL-a i antitijela na oxLDL. Neposredno nakon zahvata, po dolasku u intenzivnu skrb, uzeo se ponovno uzorak krvi za kontrolne laboratorijske nalaze (CK, CRP, oxLDL i anti-oxLDL), te elektrokardiogram. Isti nalazi će se ponoviti drugi, treći i sedmi postoperativni dan.

Trideset dana nakon zahvata ispitanici su bili pozvani na kontrolni pregled, EKG, ergometriju, UZV srca i kontrolne laboratorijske nalaze kao i kod ulaska u studiju, a to je i zadnji dan praćenja bolesnika u ovoj studiji.

Bolesnici bez komplikacija su smatrani oni koji nisu perioperativno imali signifikantan porast kardioselektivnih enzima, značajne promjene u elektrokardiogramu ili novonastale segmentalne poremećaje gibanja na UZV srca nakon mjesec dana, ili signifikantne promjene tijekom ergometrijskog testiranja, te bilo koje druge perioperativne nekardiološke komplikacije, odnosno produžen postoperativni oporavak. Iz daljnje studije su isključeni bolesnici sa perioperativnim infektom.

### 3.1. Uzimanje krvi i laboratorijske pretrage

Svi uzorci krvi uzeti su natašte. Krv je centrifugirana 15 minuta na 3500 okretaja, te su nakon toga, metodama rutinskim u KB "Dubrava", iz seruma određeni CK, C-reaktivni protein (CRP), glukoza i kreatinin, kao i ukupni kolesterol, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol. Ostatak seruma pohranjen je na -80 °C, te su naknadno određene koncentracije homocisteina, oxLDL i protutijela na oxLDL. Troponin, MB-CPK nisu dio ovog istraživanja i nisu određivani sukcesivno, već samo u cilju potvrde dijagnoze lezije miokarda.

Koncentracija protutijela na oxLDL (OLAB) određena je enzim-immunoanalizom, Ox-LDL IgG ELISA test kitom tvrtke Biodesign International (Saco, Maine, USA). Metoda se zasniva na specifičnom vezanju OLAB-a iz seruma na antigen vezan za jažicu mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja, prisutnost auto-protutijela detektira se pomoću antihumanih IgG protutijela konjugiranih s peroksidazom. Nevezani konjugat se ispire, a dodatkom tetrametilbenzidina kvantitativno određuje koncentracija prisutnih protutijela na oxLDL. Nastali produkt je obojen, a intenzitet boje je izravno proporcionalan koncentraciji protutijela u uzorku (152).

Koncentracija oxLDL određena je ELISA tehnikom, Mercodia Oxidized LDL ELISA testom (Mercodia, Uppsala, Sweden). Korištene su mikrotitarske jažice obložene protutijelima na oxLDL. Nakon inkubacije, oxLDL iz seruma veže se s protutijelima, a suvišak nevezanog oxLDL-a uklanja se ispiranjem.



Postupak završava dodatkom konjugata koji je zapravo kompleks sekundarnih protutijela (antihumani apolipoprotein B) i enzima (peroksidaza). Nakon toga se ispiranjem uklanjaju nevezana sekundarna protutijela s enzimom. Reakcija se može mjeriti (postaje vidljiva) nakon dodatka kromogena. Dodatkom kiseline reakcija se zaustavlja, a količina stvorenog kromogena, izmjerena spektrofotometrijski na 450 nm proporcionalna je koncentraciji oxLDL-a u serumu (152).

Kolesterol je određen enzimskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru koristeći reagens istog proizvođača (Tokio, Japan). Kolesterol esteraza hidrolizira kolesterol estere u uzorku. Nakon toga, kolesterol oksidaza oksidira slobodni kolesterol u kolester-3-on s usporednim stvaranjem hidrogen peroksida. Hidrogen peroksid se oksidativno veže s 4-aminoantipirinom i fenolom uz prisustvo peroksidaze, te nastaje crveno obojani kinonimin koji se može mjeriti spektrofotometrijski (153, 154).

HDL-kolesterol određen je na Olympus AU2700 analizatoru, s reagensom proizvođača Herbos Dijagnostika (Sisak, Hrvatska). LDL, VLDL i hilomikroni inhibirani su adsorpcijom na površinu deterdženta koji otapa samo HDL frakcije. Oslobođeni HDL-kolesterol u reakciji s kolesterol-esterazom, kolesterol-oksidadom i kromogenom tvori obojani kompleks koji se mjeri spektrofotometrijski (155).

LDL-kolesterol određen je na Olympus AU2700 analizatoru koristeći reagens od Thermo Electron Corporation (Melbourne, Australia). HDL, VLDL i hilomikroni su uklonjeni selektivnom reakcijom s kolesterol esterazom i kolesterol oksidadom koja završava stvaranjem bezbojnog kompleksa preko razgradnje peroksidnog bioproducta katalazom. U drugom se koraku katalaza inhibira, a preostali LDL-kolesterol specifično reagira s kolesterol esterazom i kolesterol oksidadom. U prisustvu peroksidaze, peroksidni bioproduct reagira s 4-aminoantipirinom i N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanilinom (TOOS) te se stvara kinonska boja koja se mjeri spektrofotometrijski (156).

Trigliceridi su određeni kolorencijskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru uz reagens proizvođača Herbos Dijagnostika. Lipoprotein lipaza hidrolizira trigliceride na glicerol i masne kiseline. Nakon toga, glicerol kinaza fosforilira oslobođeni glicerol u glicerol-3-fosfat uz prisustvo ATP-a i

magnezijevih iona. U slijedećem koraku glicerol-3-fosfat oksidaza uz prisustvo O<sub>2</sub> oksidira glicerol-3-fosfat pri čemu nastaju dihidroksiaceton-fosfat i hidrogen peroksid. Hidrogen peroksid u slijedećem koraku reagira s 4-aminoantipirinom i fenolnim derivatom pri čemu nastaje obojani produkt koji se mjeri spektrofotometrijski (157).

Kreatinin je određen kinetičkim kolorimetrijskim testom (Jafféova metoda) na Olympus AU2700 analizatoru s reagensom istog proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji kreatinina i pikrinske kiseline u alkalnom mediju pri čemu nastaje žuto-narančasto obojani kompleks. Brzina promjene apsorbancije proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku (158).

C-reaktivni protein određen je imunoturbidimetrijskom metodom na Olympus AU2700 analizatoru s reagensom istog proizvođača. Uzorak se pomiješa s puferom i otopinom antiseruma pri čemu CRP specifično reagira s anti-humanim CRP protutijelima s kojima stvara netopive agregate. Apsorbancija agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku (159).

Glukoza je određena enzimskim UV testom (metoda s heksokinazom) na Olympus AU2700 analizatoru s reagensom istog proizvođača. Metoda se temelji na fosforilaciji glukoze uz pomoć heksokinaze u prisustvu adenzin trifosfata (ATP) i iona magnezija pri čemu nastaju glukoza-6-fosfat i adenzin difosfat (ADP). Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza specifično oksidira glukoza-6-fosfat u glukonat-6-fosfat uz usporednu redukciju nikotinamid adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>) u njegov reducirani oblik (NADH). Povećanje apsorbancije proporcionalno je koncentraciji glukoze u uzorku (160).

Katalitička aktivnost kreatin kinaze određena je na Olympus AU2700 analizatoru uz reagens istog proizvođača. Reakcija se provodi uz N-acetilcistein (NAC) kao aktivator. Kreatin kinaza reverzibilno katalizira prijenos fosfatne skupine s kreatin fosfata na adenzin difosfat (ADP) što dovodi do nastajanja adenzin trifosfata (ATP). Nastali ATP se koristi za stvaranje glukoza-6-fosfata i ADP-a iz glukoze. Reakcija se odvija pod utjecajem heksokinaze za čiju su maksimalnu aktivnost potrebni magnezijevi ioni. Nastala glukoza-6-fosfat se oksidira djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze sa simultanom reakcijom koenzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP<sup>+</sup>) pri čemu nastaju 6-fosfoglukonat i reducirani oblik koenzima (NADPH). Povećanje apsorbancije

zbog stvaranja NADPH izravno je proporcionalno aktivnosti kreatin kinaze u uzorku (161).

### 3.2 Statistička obrada podataka

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Distribucija ključnih varijabli je unutar grupe i u jedinici vremena testirana na normalnost. Ovisno o rezultatima testiranja, u daljnoj analizi značajnosti razlike koncentracija oxLDL-a i antitijela na oxLDL, primijenjeni su parametrijski (t-test, t-test za zavisne uzorke) ili neparametrijski testovi (Mann-Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test). Za testiranje povezanosti oxLDL-a i anti oxLDL-a sa drugim faktorima rizika i težinom koronarne i aterosklerotske bolesti, odnosno u nestabilnoj angini pektoris i nakon revaskularizacije sa koncentracijama troponina, CRP i CK-MB koristila se multipla regresijska analiza, odnosno prema potrebi analiza logističke regresije. P vrijednost manja od 0.05 se smatrala statistički značajnom.

#### 4. Rezultati

U istraživanju je sudjelovalo 62 bolesnika sa stabilnom anginom pektoris (AP) predviđenih za jednu od metoda revaskularizacije. 31 bolesnik za perkutanu koronarnu dilataciju uz implantaciju endoproteza (*stenta*) i 31 bolesnik za kiruršku revaskularizaciju. Podjelom kardiokirurških bolesnika na *off-pump* i *on-pump* tehniku revaskularizacije, konačno smo dobili tri skupine bolesnika:

- A) 31 bolesnik sa stabilnom AP kojima je učinjena PTCA-implantacija endoproteze ( u svih bolesnika je u lezije predviđene za PTCA implantiran i «stent»).
- B) 22 bolesnika sa stabilnom AP kojima je učinjena «off-pump» kirurška revaskularizacija.
- C) 9 bolesnika sa stabilnom AP kojima je učinjena «on-pump» kirurška revaskularizacija.

Od 62 bolesnika bilo je 48 muškaraca i 14 žena, a po spolu se statistički značajno ne razlikuju skupine podvrgnute kardiokirurškom zahvatu ili perkutanoj transluminalnoj koronarnoj angioplastici, a također ni *off-pump* i *on-pump* skupine međusobno.

Tablica 1. Spol ispitanika u grupama podvrgnutim kardiokirurškom zahvatu ili PTCA (perkutanu transluminalna koronarna angioplastika)

Spol	PTCA	Kardiokirurgija	Ukupno
Muškarci	23	24	47
% kolumna	74.2%	76.4%	
% redak	48.9%	51.1%	
Žene	8	7	15
% kolumna	25.8%	23.6%	
% redak	53.3%	46.7%	
Ukupno	31	31	62

Pearson Chi-square 0.0055947, df=1, p=0.94038

Prosječna dob bolesnika bila je  $62\pm 9$  godina, a bolesnici podvrgnuti kardiokirurškom zahvatu su tek malo stariji od bolesnika podvrgnutih PTCA. Međutim, ove dvije skupine bolesnika se ipak statistički značajno razlikuju po dobi. Nema statistički značajne razlike unutar skupine kardiokirurških bolesnika.

Tablica 2. Prosječna dob ispitanika podvrgnutih kardiokirurškom zahvatu ili PTCA

Skupine	Broj ispitanika	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijan	Min.	Max.
PTCA	31	58	9	57	37	73
Kardiokirurgija	31	64	9	66	41	78
Ukupno	62	52	9	65	37	78

Mann-Whitney U test,  $p=0.03$ .

Sve skupine bolesnika statistički se ne razlikuju s obzirom na faktore rizika: dijabetes, pušenje i hipertenziju.

Tablica 3. Incidencija dijabetičara u pojedinoj skupini bolesnika

Dijabetes	PTCA	<i>Off-pump</i> *	<i>On-pump</i> †	Ukupno
Ne	23	14	7	44
% kolumna	74.2%	63.6%	77.8%	
% redak	52.3%	31.8%	15.9%	
Da	8	8	2	18
% kolumna	25.8%	36.4%	22.2%	
% redak	44.4%	44.4%	11.2%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 0.9330680,  $df=2$ ,  $p=0.62717$

\* kardiokirurška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokirurška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Tablica 4. Incidencija pušača u pojedinoj skupini bolesnika

Pušenje	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
Ne	11	10	5	26
% kolumna	35.5%	45.5%	55.6%	
% redak	42.3%	38.5%	19.2%	
Da	20	12	4	36
% kolumna	64.5%	54.5%	44.4%	
% redak	55.5%	33.3%	11.2%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 1.327463, df=2, p=0.51493

\* kardiokiruška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokiruška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Tablica 5. Incidencija bolesnika sa arterijskom hipertenzijom u pojedinoj skupini bolesnika

Hipertenzija	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
Ne	10	8	2	20
% kolumna	32.3%	36.4%	22.2%	
% redak	50%	40%	10%	
Da	21	14	7	42
% kolumna	67.7%	63.6%	77.8%	
% redak	50%	33.3%	16.7%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 0.5845118, df=2, p=0.74658

\* kardiokiruška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokiruška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Također se ove tri skupine bolesnika statistički značajno ne razlikuju po incidenciji signifikantnih aterosklerotskih promjena na periferiji. Međutim uočljivo je visok postotak bolesnika sa značajnim perifernim vaskularnim aterosklerotskim promjenama u skupini koja je podvrgnuta kirurškoj revaskularizaciji uz pomoć stroja za izvantijelesni krvotok, te bi vjerovatno povećanjem broja bolesnika u toj grupi bila postignuta statistička značajnost.

Tablica 6. Incidencija bolesnika sa perifernom aterosklerotskom bolesti

Periferija	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
Ne	16	13	4	33
% kolumna	51.6%	59.1%	44.4%	
% redak	48,5%	39.4%	12.1%	
Da	15	9	5	29
% kolumna	48.4%	40.9%	55.6%	
% redak	51.7%	31.1%	17.2%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 3.467743, df=2, p=0.17660

\* kardiokiruška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokiruška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Ta statistički nesignifikantno povećana incidencija generalizirane ateroskleroze u skupini *on-pump* bolesnika ipak postavlja pitanje usporedivosti serumskih koncentracija lipoproteina, njihovih oksidativnih formi i protutijela prvenstveno između bolesnika podvrgnutih kirurškoj i nekirurškoj revaskularizaciji. Stoga su uspoređene te tri skupine bolesnika po ozbiljnosti kliničke slike koronarne bolesti sa ciljem razrješenja te dvojbe. U tablici 7. pokazano je da se one statistički bitno ne razlikuju po CCSC klasifikaciji težine bolesti.

Tablica 7. Težina koronarne bolesti po CCSC klasifikaciji u pojedinoj skupini bolesnika

CCSC	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
CCSC I/II	17	16	7	40
% kolumna	54.8%	72.7%	77.8%	
% redak	42.5%	40.0%	17.5%	
CCSC III/IV	14	6	2	22
% kolumna	45.2%	27.3%	22.2%	
% redak	63.6%	27.3%	9.1%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 2.608, df=2, p=0.2715

\* kardiokiruška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokiruška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Međutim, kao što je bio slučaj sa raširenosti aterosklerotskog procesa na periferiju i velike krvne žile vrata, po broju zahvaćenih koronarnih krvnih žila statistički se značajno razlikuju bolesnici podvrgnuti kirurškoj revaskularizaciji u odnosu na bolesnike kojima je učinjena perkutana transluminalna koronarna angioplastika (prvenstveno bolesnici predviđeni za «on pump» kardiokirurgiju), tablica 8.

Tablica 8. Broj žila sa signifikantnim stenozama u pojedinoj skupini

Broj žila	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
I	12	2	0	14
% kolumna	38.7%	9.1%	0.0%	
% redak	85.7%	14.3%	0.0%	
II	11	10	1	22
% kolumna	35.5%	45.5%	11.1%	
% redak	50.0%	45.5%	4.5%	
III	8	10	8	26
% kolumna	25.8%	45.5%	88.9%	
% redak	30.8%	38.5%	30.7%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 16.21918, df=4, p=0.00274

\* kardiokirurška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokirurška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

Stoga i ne čudi statistički značajno veći broj revaskulariziranih žila, u bolesnika podvrgnutih kardiokirurškoj revaskularizaciji s posebnim naglaskom na bolesnike u *on-pump* skupini. Dakle, u ovoj studiji bolesnici sa većom raširenosti aterosklerotskog procesa su slani na kardiokiruršku revaskularizaciju, a ponavljam da sama klinička slika, te klinička stabilnost/nestabilnost koronarne bolesti nije odlučivala o metodi revaskularizacije.



Tablica 9. Broj revaskulariziranih žila tijekom postupaka revaskularizacije

Broj žila	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
I	16	4	1	21
% kolumna	51.6%	18.2%	11.1%	
% redak	76.2%	19.1%	4.7%	
II	11	10	3	24
% kolumna	35.5%	45.5%	33.3%	
% redak	45.8%	41.7%	12.5%	
III	3	8	5	16
% kolumna	9.7%	36.4%	55.6%	
% redak	18.8%	50.0%	31.2%	
IV	1	0	0	1
% kolumna	3.23%	0.0%	0.0%	
% redak	100%	0.0%	0.0%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 14.42689, df=6, p=0.02522

\* kardiokirurška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokirurška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

S obzirom na neposredni i 30-dnevni uspjeh revaskularizacijskog postupka, odnosno ishod bez neželjenih događanja (perioperativni infarkt, redukcija sistoličke funkcije i popuštanje srca, anginozne tegobe i pozitivna ergometrija nakon 30 dana, te drugi neželjeni događaj, osim teškog perioperativnog infekta) nema statistički značajne razlike između ta tri postupka. Međutim jasno se vidi tendencija da je u bolesnika kojima je učinjena PTCA manje neželjenih događanja perioperativno, te tijekom 30-dnevnog praćenja. To je prvenstveno stoga što je u bolesnika podvrgnutih kirurškoj revaskularizaciji nešto veća incidencija manjih koronarnih incidenata (zabilježenih elektrokardiografski, značajnim porastom kardiospecifičnih enzima i ehokardiografski), ali i s obzirom na ranije spomenutu veću generaliziranost aterosklerotskog procesa u kirurških bolesnika, zabilježena je i tranzitorna cerebralna ishemička ataka u jednog kardiokirurškog bolesnika, te značajan porast kreatinina u dva operirana bolesnika. Nije bilo letalnog ishoda ni u jednoj skupini bolesnika.

Tablica 10. Neposredan ishod revaskularizacijskog postupka, te ishod tijekom 30-dnevnog praćenja

Ishod	PTCA	<i>Off-pump</i> *	<i>On-pump</i> †	Ukupno
Bez neželjenih događanja	28	14	6	48
% kolumna	90.3%	63.6%	66.7%	
% redak	58.3%	29.2%	12.5%	
Sa neželjenim događajem	3	8	3	14
% kolumna	9.7%	36.4%	33.3%	
% redak	21.4%	57.2%	21.4%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square 5.938312, df=2, p=0.05135

\* kardiokirurška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokirurška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

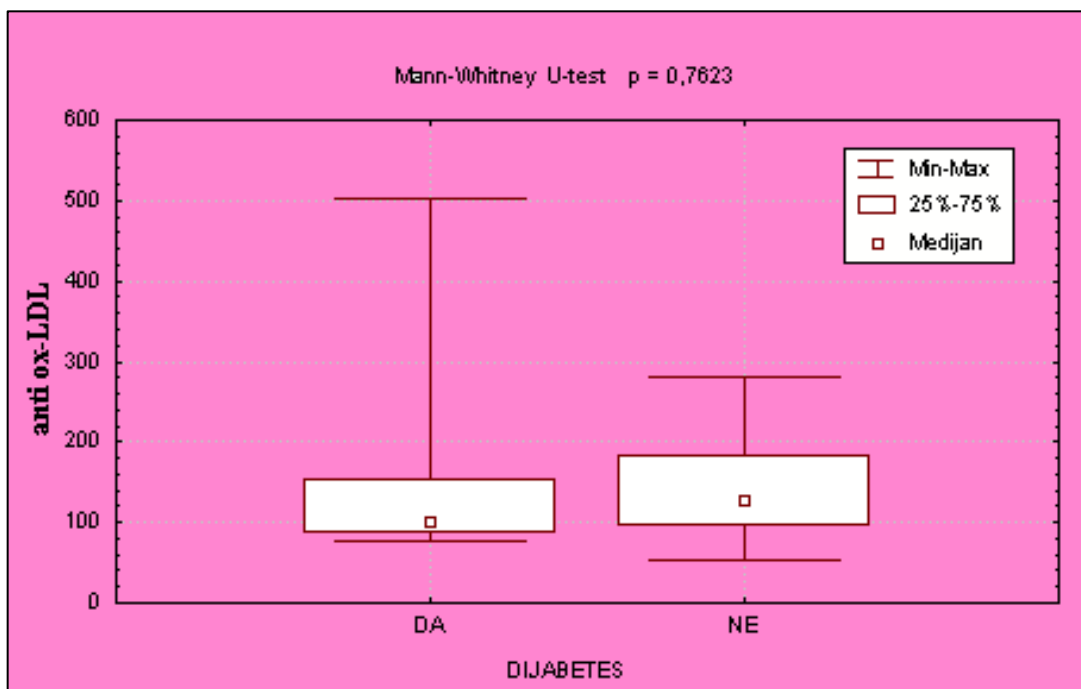
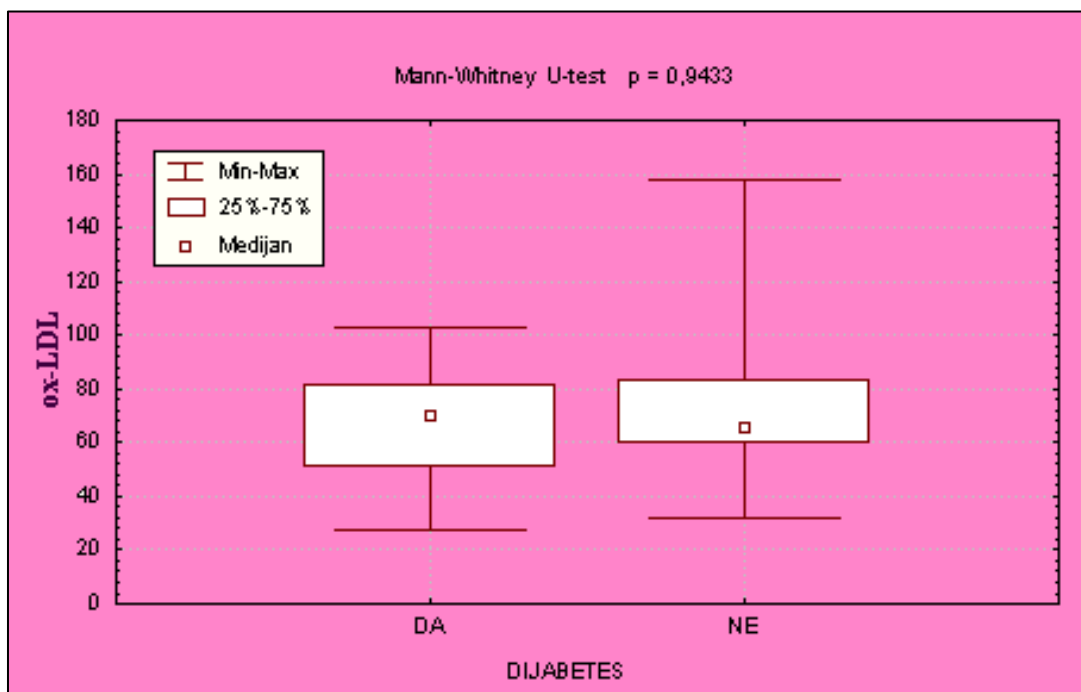
Osim po dobi, raširenosti aterosklerotskog procesa, broju zahvaćenih krvnih žila značajnom koronarnom bolesti, te broju revaskulariziranih žila (granično signifikantno po komplikacijama tijekom i nakon zahvata), važno je izdvojiti da se grupe bolesnika podvrgnute kardiokirurškoj revaskularizaciji, odnosno PTCA statistički značajno razlikuju i terapijski. Naime, dok je tek oko polovine bolesnika prije upućivanja na PTCA bilo na hipolipemičkoj terapiji (uglavnom statinima), gotovo 80% bolesnika koji su došli na kardiokiruršku revaskularizaciju je na toj terapiji (Tbl.11. Pearson Chi-square 6.305024, df=1, p=0.01204).

Tablica 11. Liječenje hipolipemicima prije postupka revaskularizacije

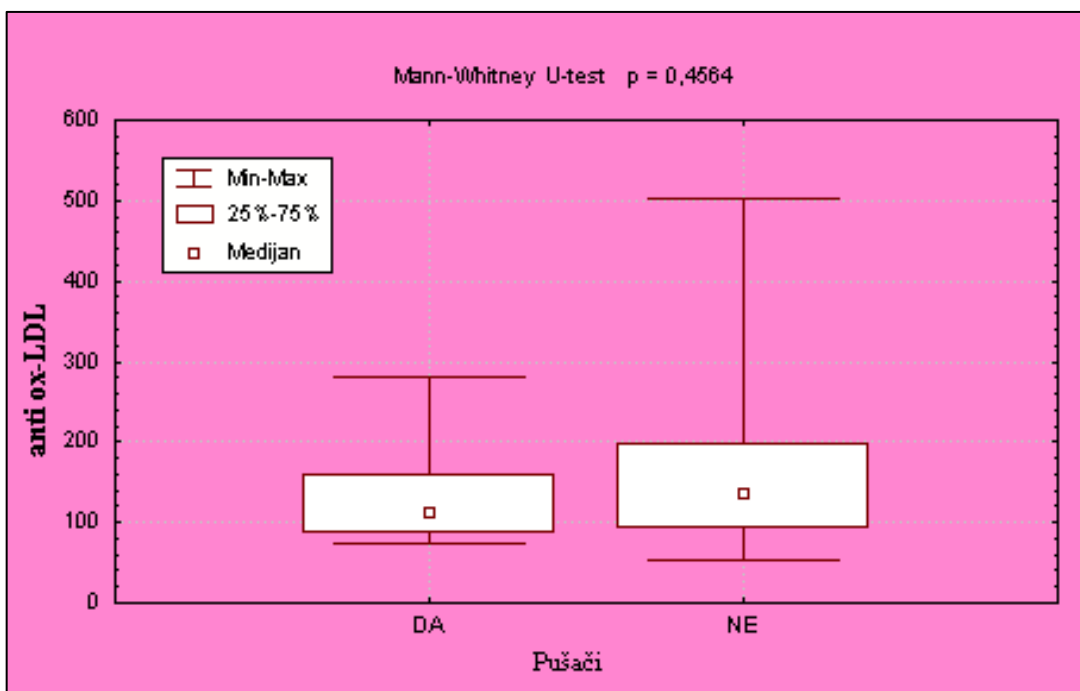
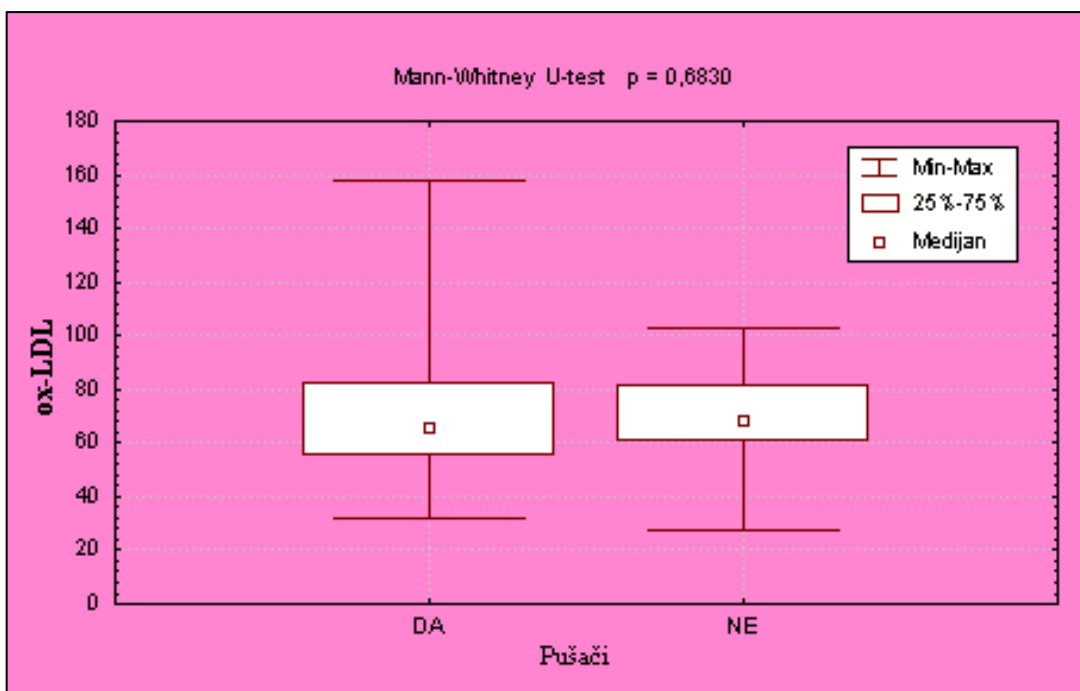
Primjena statina	PTCA	Kardiokirurgija	Ukupno
DA	13	24	37
% kolumna	41.9%	77.4%	
% redak	35.1%	64.9%	
NE	18	7	25
% kolumna	58.1%	22.6%	
% redak	72%	28%	
Ukupno	31	31	62

Dalje su određivane preoperativne serumske koncentracije ox-LDL ili protutijela na ox-LDL u pojedinim skupinama bolesnika. U dijabetičara i pušača nema signifikantne razlike u serumskim koncentracijama ispitivanih parametara (slike 6,7,8,9), međutim važno je izdvojiti signifikantno znatno više serumske koncentracije protutijela na ox-LDL u bolesnika sa arterijskom hipertenzijom, dok u koncentracijama samog ox-LDL nema razlika (slike 10,11).

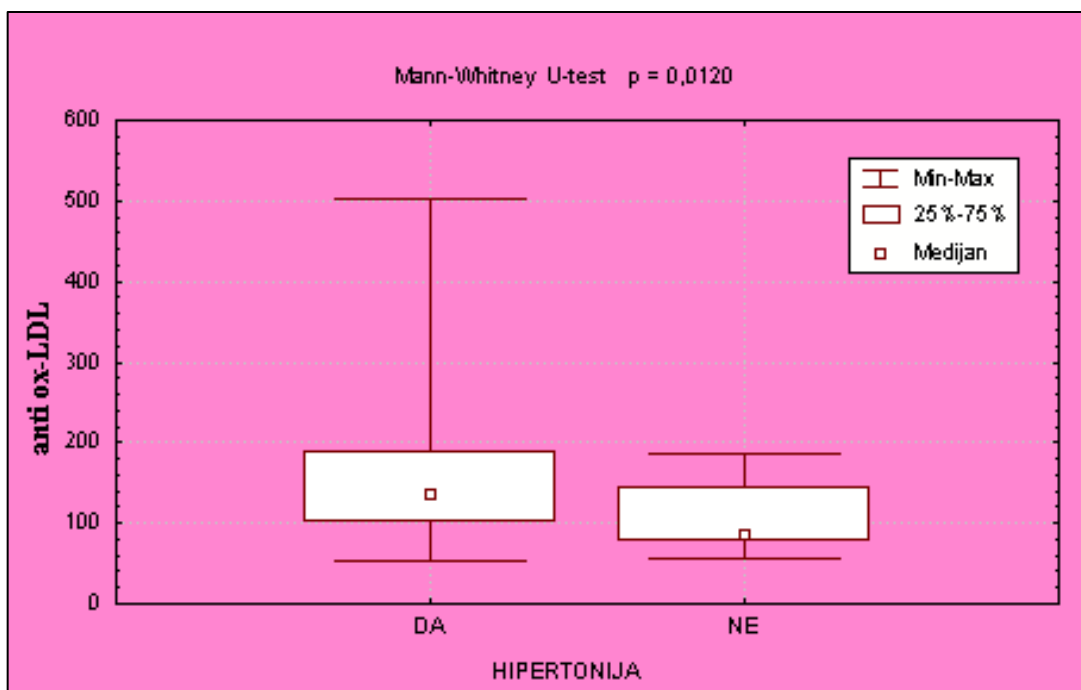
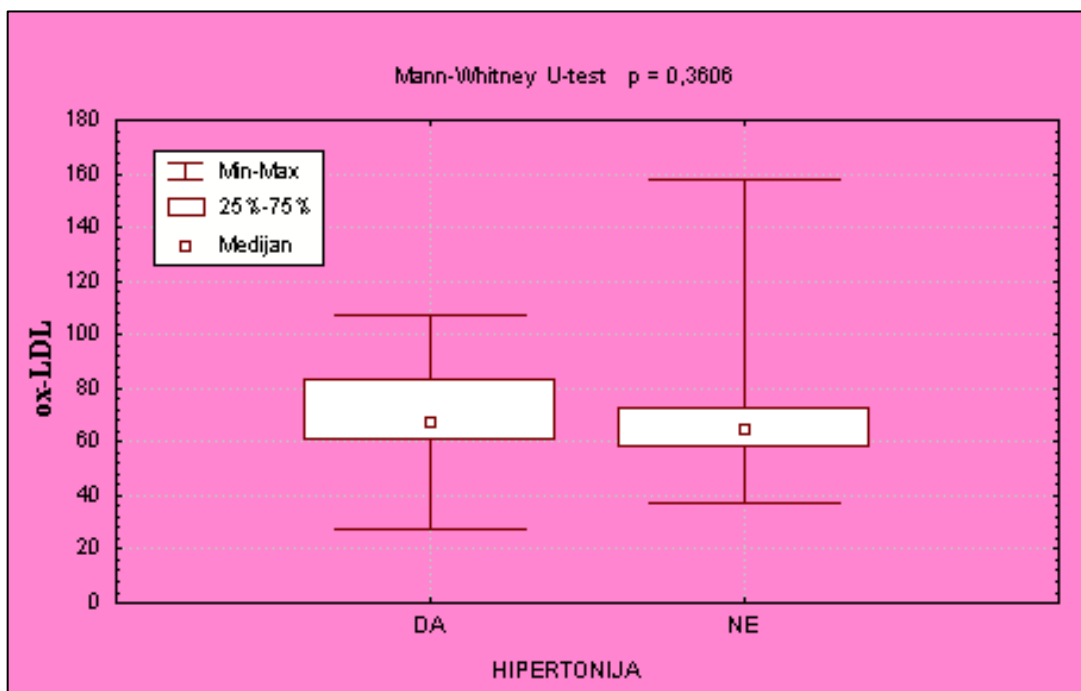
Slika 6. i 7. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL u bolesnika sa i bez šećerne bolesti



Slika 8. i 9. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL u pušača i nepušača

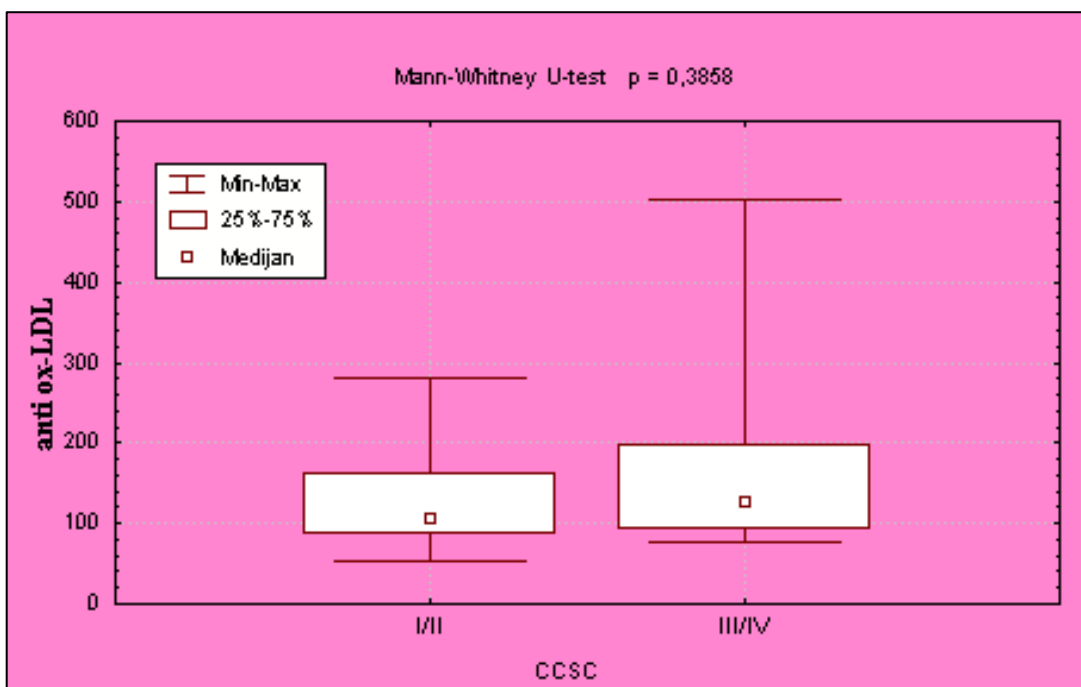
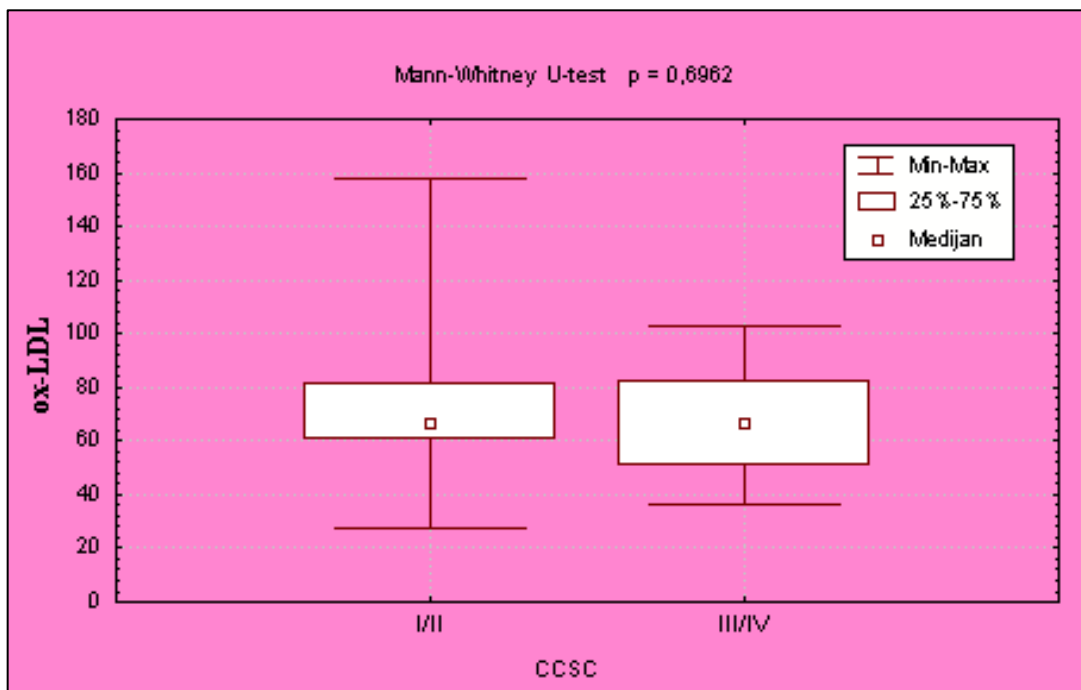


Slika 10. i 11. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL u hipertoničara

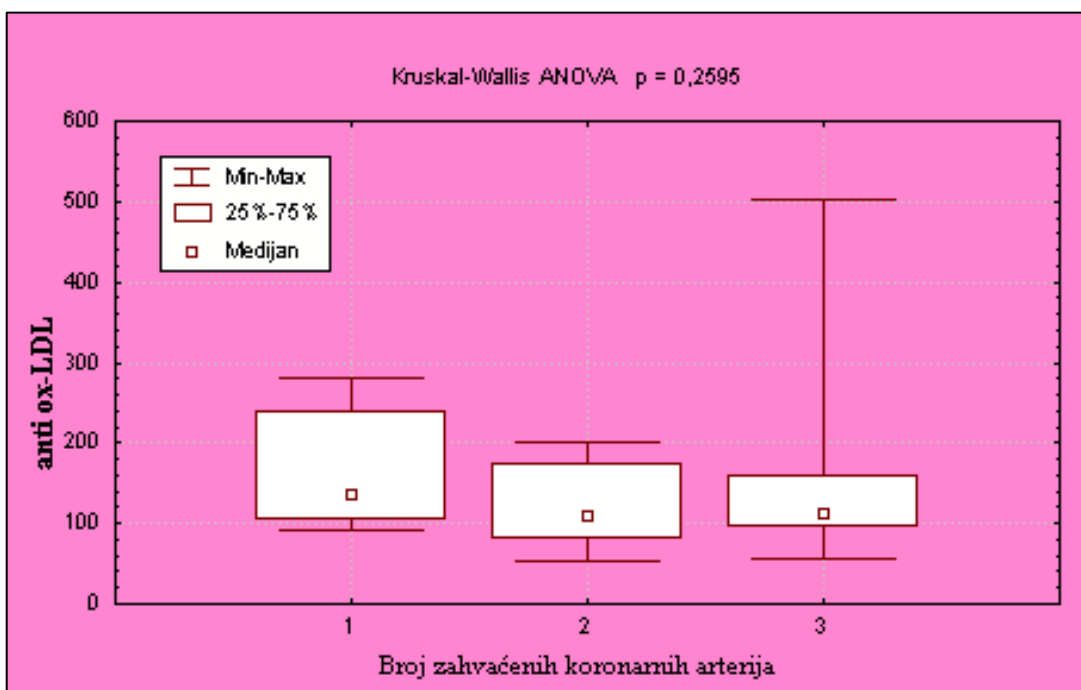
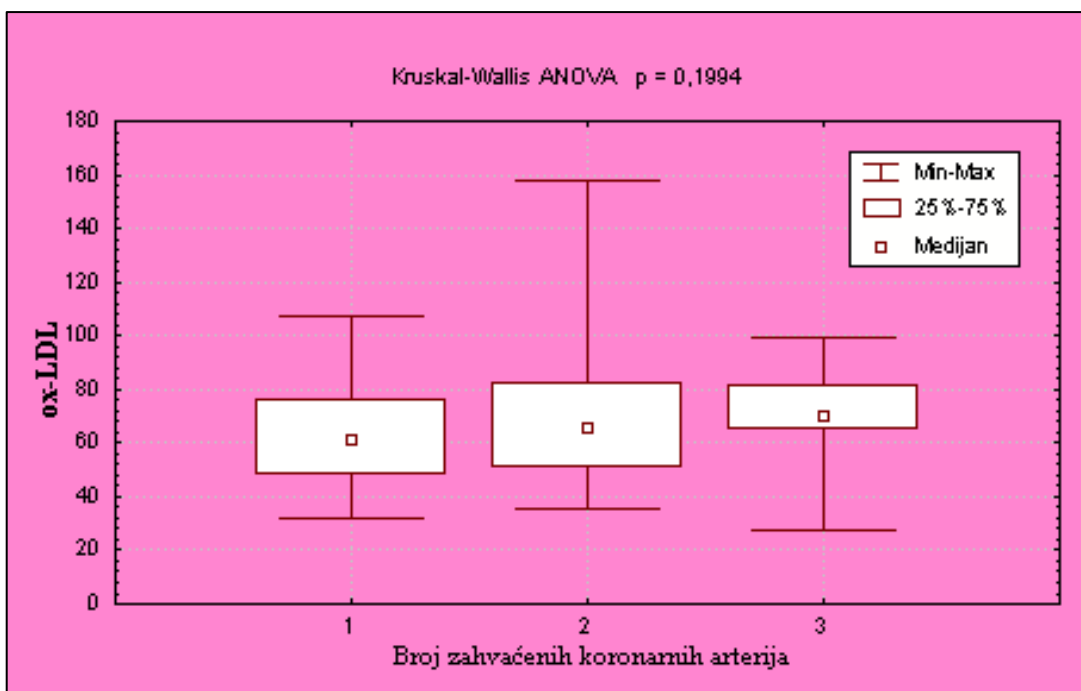


Nije nađena statistički signifikantna razlika u koncentracijama ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na kliničku sliku (slika 12 i 13), težinu koronarne bolesti (slika 14 i 15) i perifernu aterosklerotsku bolest (slika 16 i 17).

Slika 12. i 13. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na kliničku sliku bolesti (CCSC I/II i III/IV)

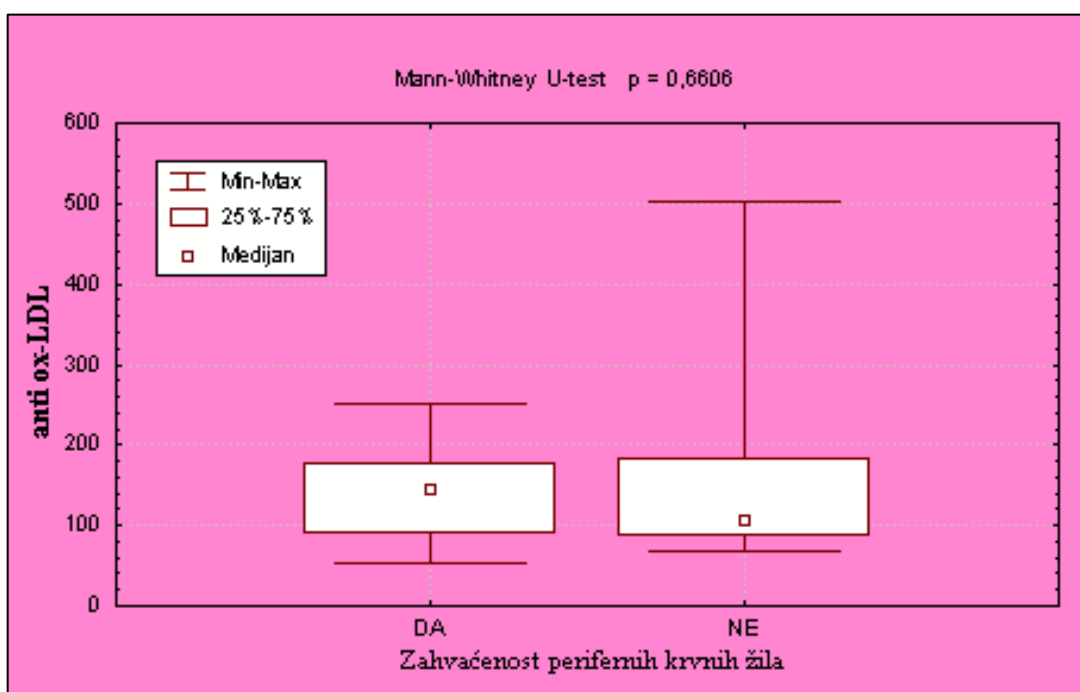
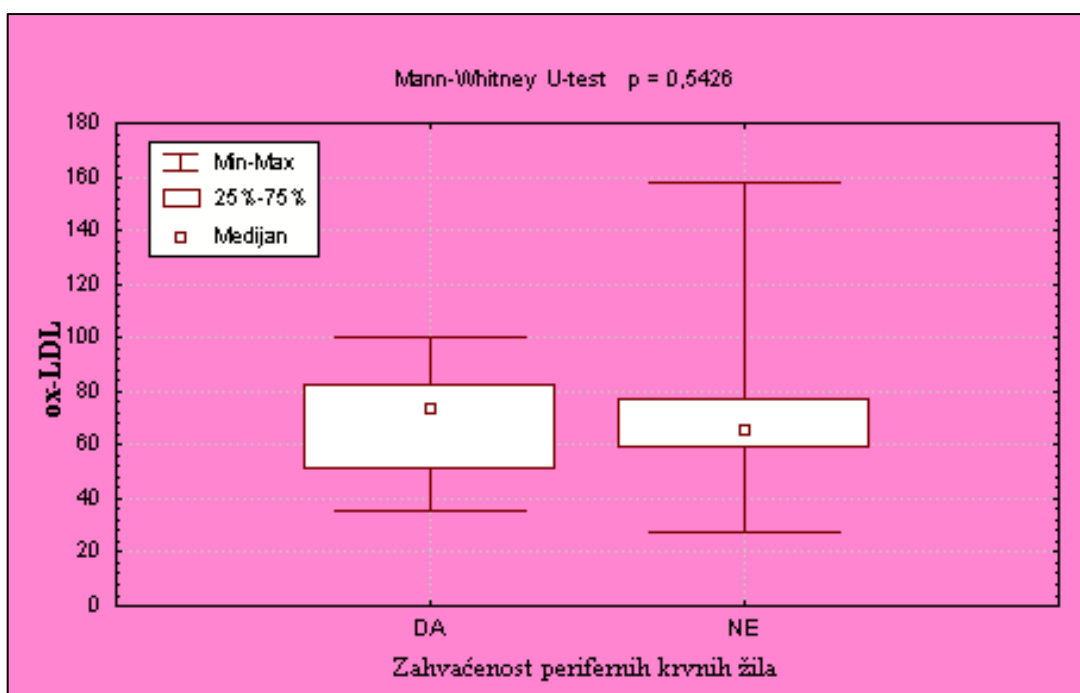


Slika 14. i 15. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na broj zahvaćenih koronarnih arterija





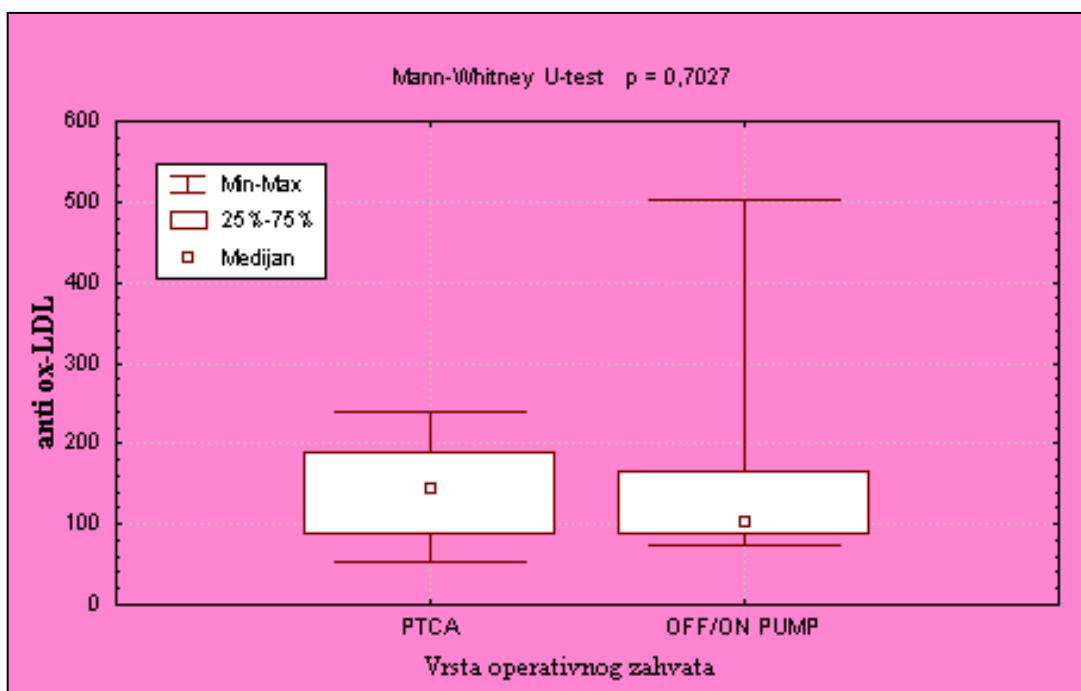
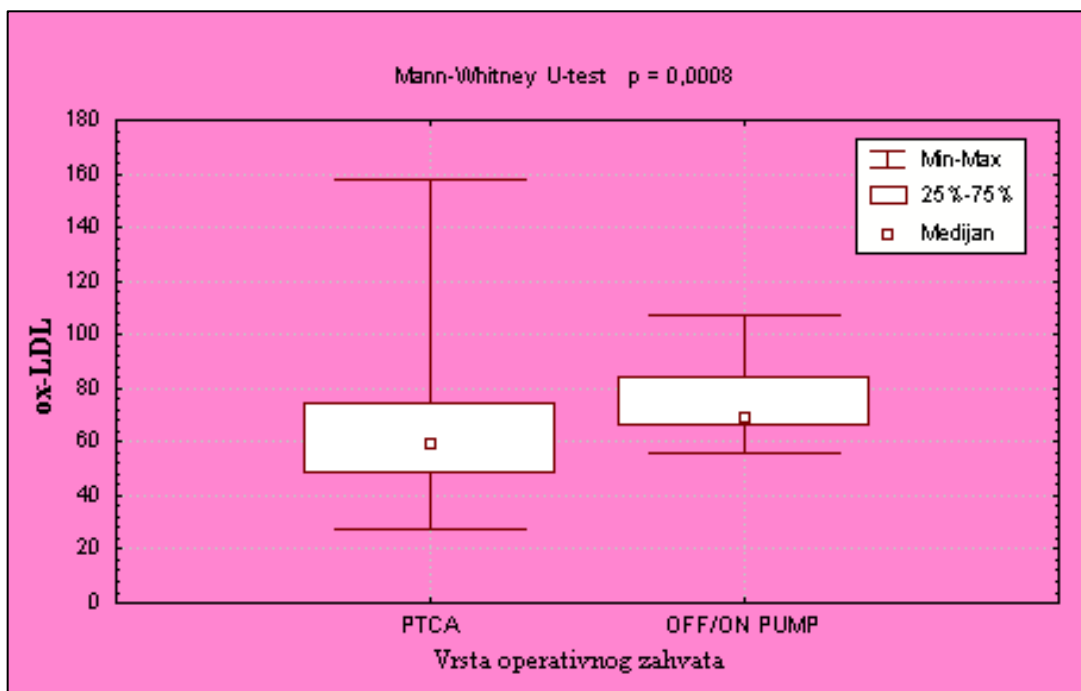
Slika 16. i 17. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na zahvaćenost perifernih krvnih žila.



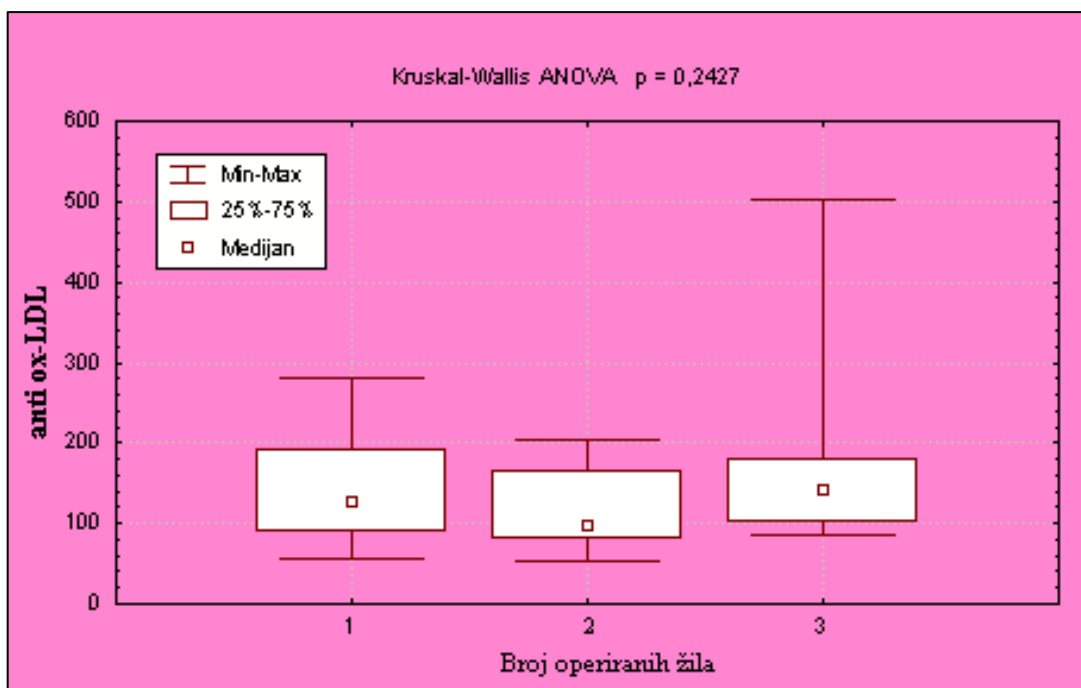
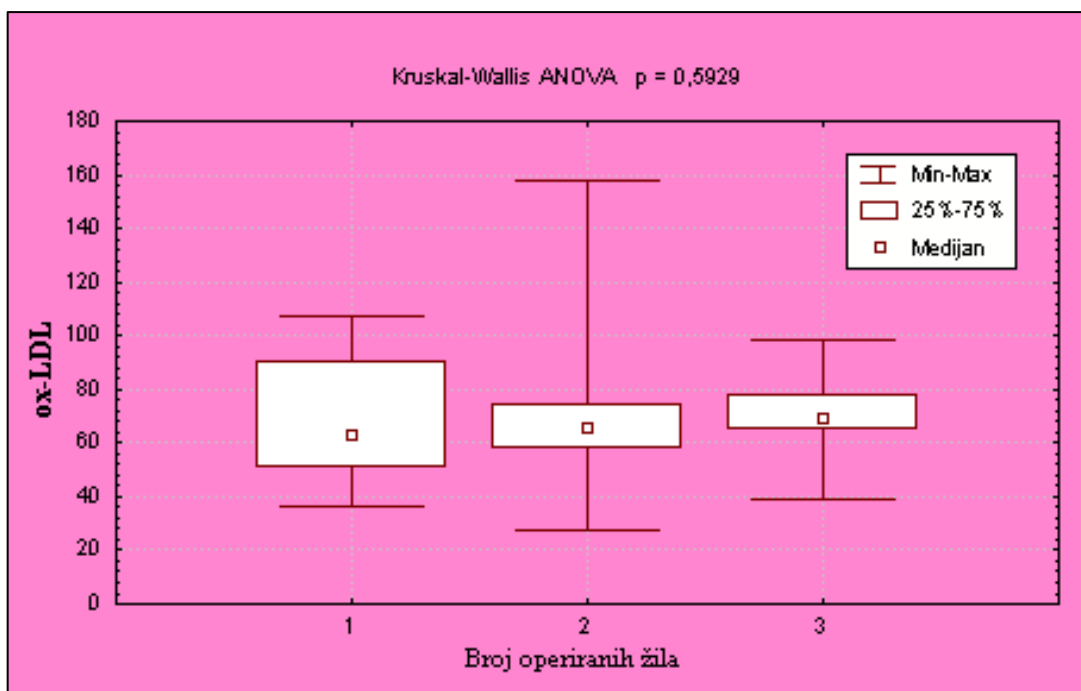
Važno je izdvojiti da su koncentracije oxLDL-a statistički značajno više u bolesnika podvrgnutih kirurškoj revaskularizaciji no PTCA, dok nema statistički značajne razlike u koncentraciji protutijela na oxLDL (slika 18 i 19). Koncentracije oxLDL-a i protutijela se ne razlikuju s obzirom na broj operiranih

žila (slika 20 i 21), a također ni konačan ishod revaskularizacijskog postupka nije ovisio o bazalnim koncentracijama ox-LDL-a i protutijela na ox-LDL (slika 22 i 23).

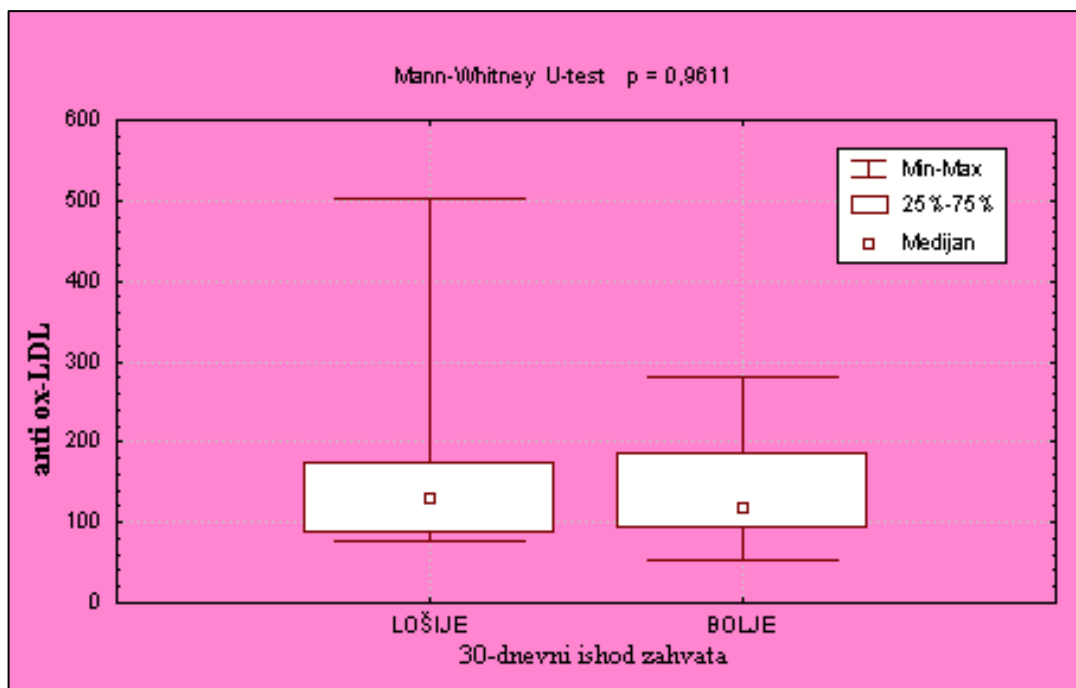
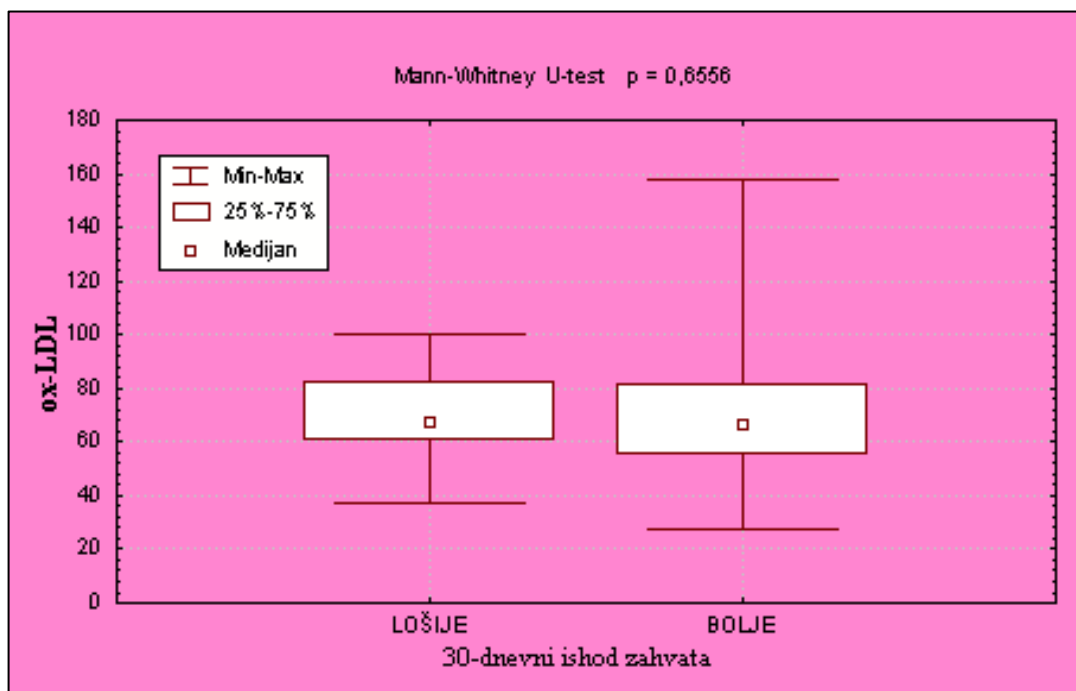
Slika 18. i 19. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na vrstu operativnog zahvata (PTCA, *off/on-pump* kirurška revaskularizacija)



Slika 20. i 21. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na broj revaskulariziranih žila



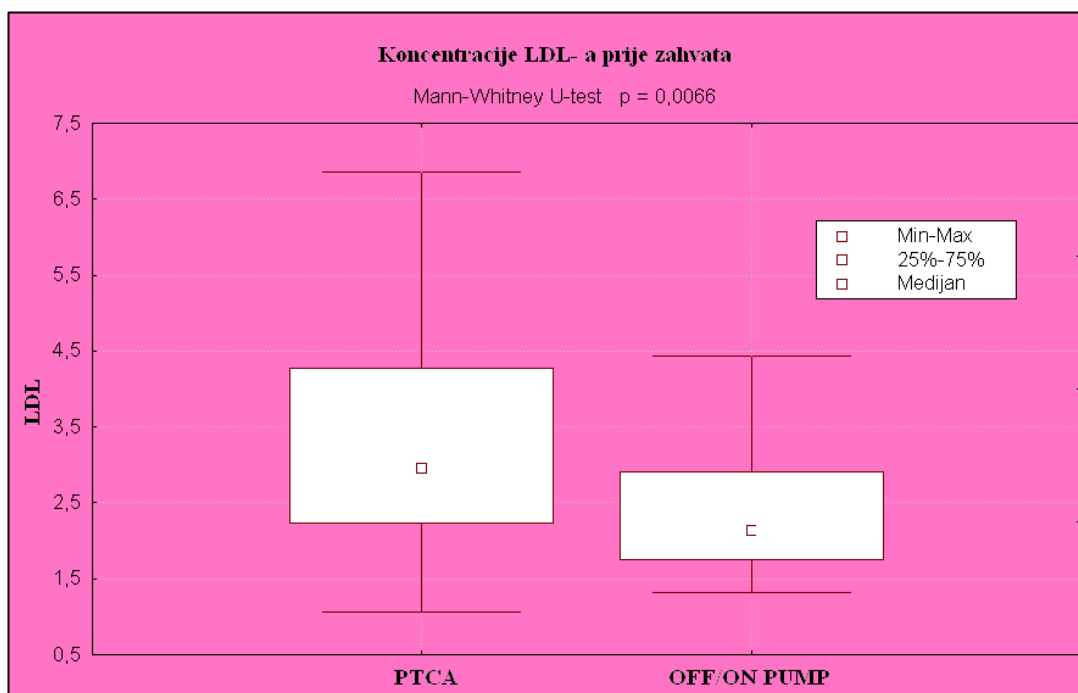
Slika 22 i 23. Preoperativne koncentracije ox-LDL i protutijela na ox-LDL s obzirom na ishod revaskularizacijskog postupka



Ako se preoperativno promatraju koncentracije drugih lipoproteina nije nađena statistički značajna razlika u dijabetičara, pušača, hipertoničara, s obzirom na kliničku sliku i opsežnost koronarne bolesti ili zahvaćenost periferije. Također preoperativne koncentracije nisu utjecale na ishod operativnog zahvata.

Međutim, kao i kod oxLDL-a, preoperativne koncentracije LDL-a statistički značajno razlikuju ovisno da li su bolesnici predviđeni za PTCA ili kiruršku revaskularizaciju, ali ovoga puta obrnuto, tako da su koncentracije LDL-a niže u bolesnika podvrgnutih kirurškoj revaskularizaciji (slika 24). S obzirom na broj revaskulariziranih žila nema razlika ni u jednom parametru.

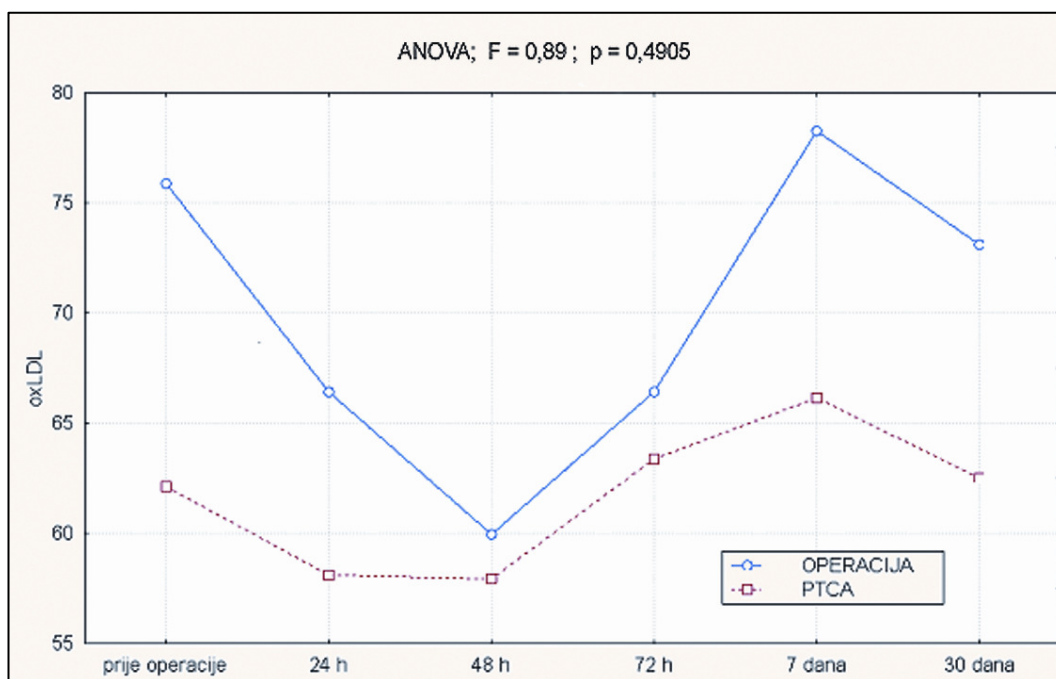
Slika 24. Preoperativne koncentracije LDL-a s obzirom na vrstu operativnog zahvata (PTCA, *off/on-pump* kirurška revaskularizacija)



Dalje sam promatrao kretanje koncentracija pojedinih biokemijskih parametara 24, 48 i 72 sata, te 7 i 30 dana postoperativno u ovisnosti da li su bili podvrgnuti kirurškoj revaskularizaciji ili PTCA.

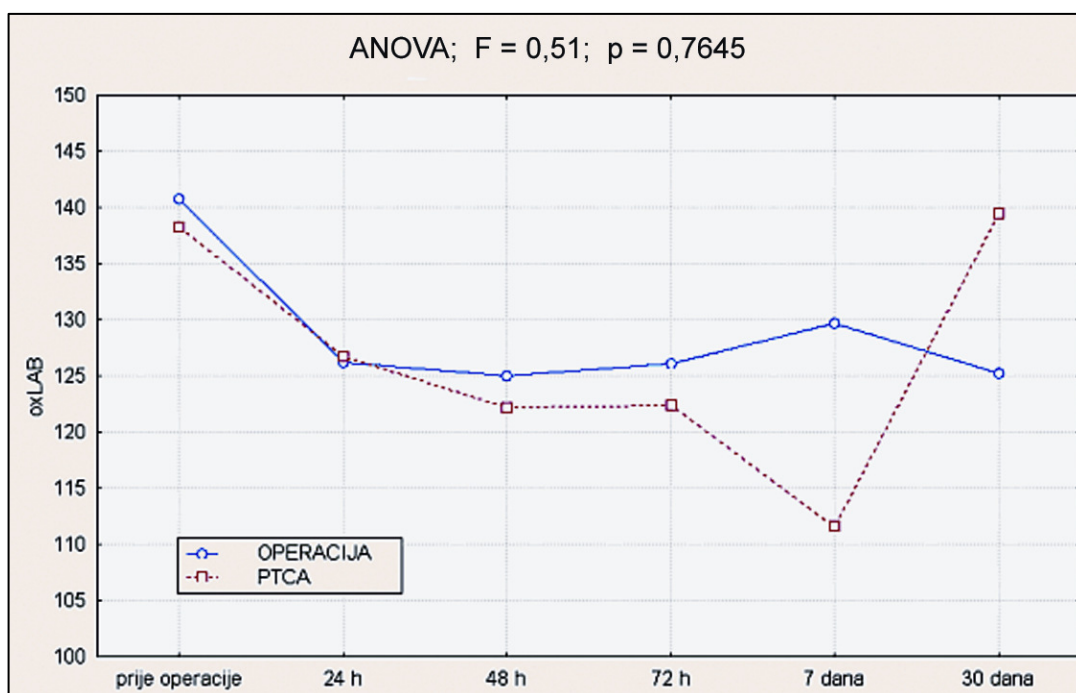
Za oxLDL je primijećen postepen pad koncentracije postoperativno u obje skupine, sa maksimumom 48-og sata, te ponovni rast koncentracija do 7-og dana, kada je koncentracija čak viša no preoperativno, a normalizira se trideseti dan. Oblik krivulja je dakle identičan, ali su koncentracije statistički značajno više već preoperativno u kardiokirurških bolesnika, te u svim točkama tijekom praćenja, osim 48-mi sat kada je zbog značajnijeg pada koncentracije oxLDL u kardiokirurških bolesnika isti kao i u bolesnika kojima je učinjena PTCA (slika 25).

Slika 25. Kretanje koncentracija oxLDL-a postoperativno u bolesnika koji su podvrgnuti kardiokirurškom zahvatu ili PTCA



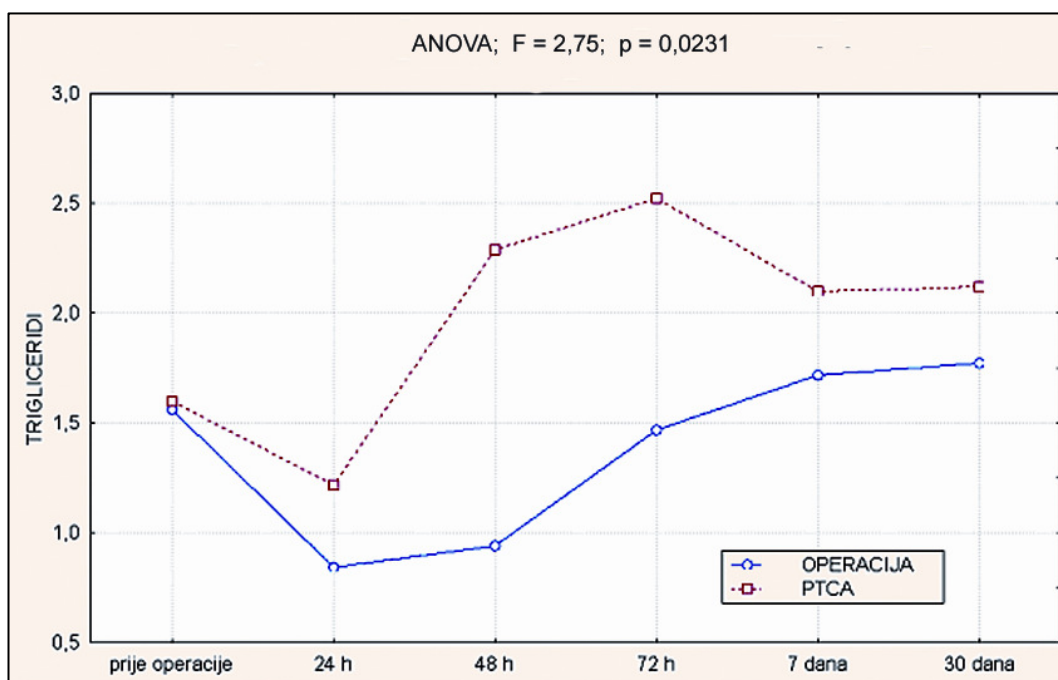
Kod protutijela na oxLDL također je zabilježen pad koncentracija nakon zahvata i to za razliku od oxLDL-a s maksimumom odmah nakon 24 sata. Krivulje su gotovo identične kod kardiokirurških bolesnika i bolesnika podvrgnutih PTCA. Međutim, 30-tog dana kod kardiokirurških bolesnika ne dolazi do potpunog oporavka koncentracija protutijela, a potpuni povratak na koncentracije prije zahvata se dogodi samo kod bolesnika podvrgnutih PTCA. Zbog toga su 30-ti dan nakon operacije koncentracije protutijela na oxLDL statistički značajnije više u bolesnika podvrgnutih PTCA (slika 26).

Slika 26. Kretanje koncentracija protutijela na oxLDL postoperativno u bolesnika koji su podvrgnuti kardiokirurškom zahvatu ili PTCA

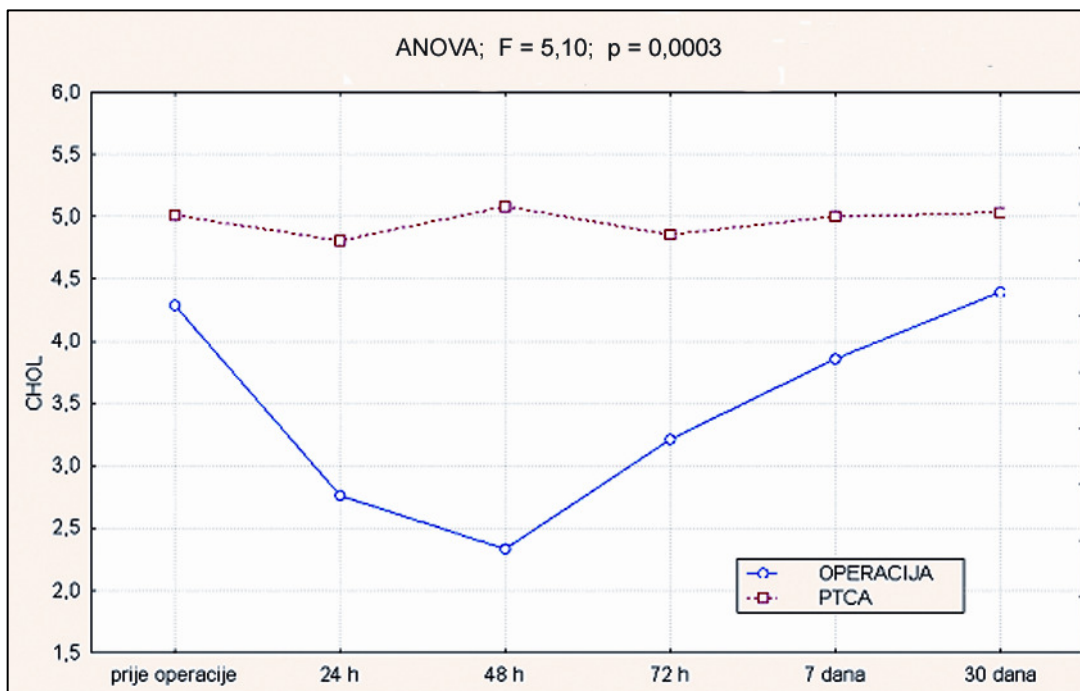


Izuzetno je zanimljivo da se koncentracije ostalih lipoproteina ne mijenjaju nakon učinjene PTCA, dok nakon učinjenog kardiokirurškog zahvata kod svih varijabli dolazi do značajnijeg pada koncentracije već unutar 24 sata, sa najbržim oporavkom koncentracija triglicerida već nakon 72 sata, ukupnog holesterola i LDL holesterola nakon 7 dana, a HDL holesterola tek nakon mjesec dana (slika 27,28,29,30).

Slika 27. Prosječne vrijednosti triglicerida s obzirom na način revaskularizacije

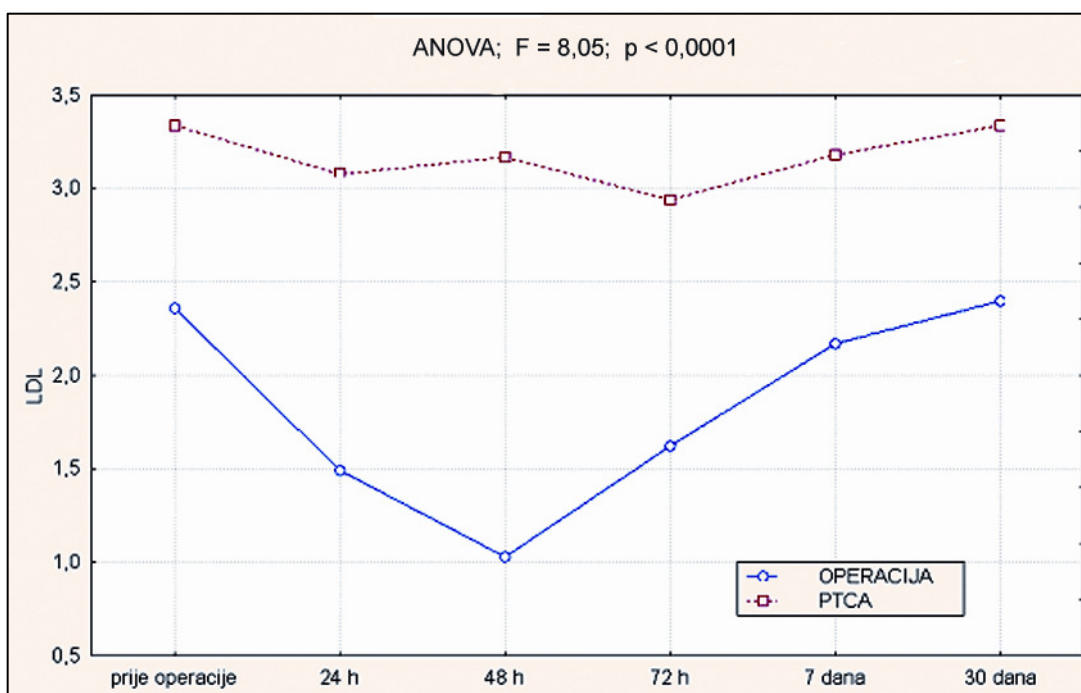


Slika 28. Prosječne vrijednosti ukupnog kolesterola s obzirom na način revaskularizacije

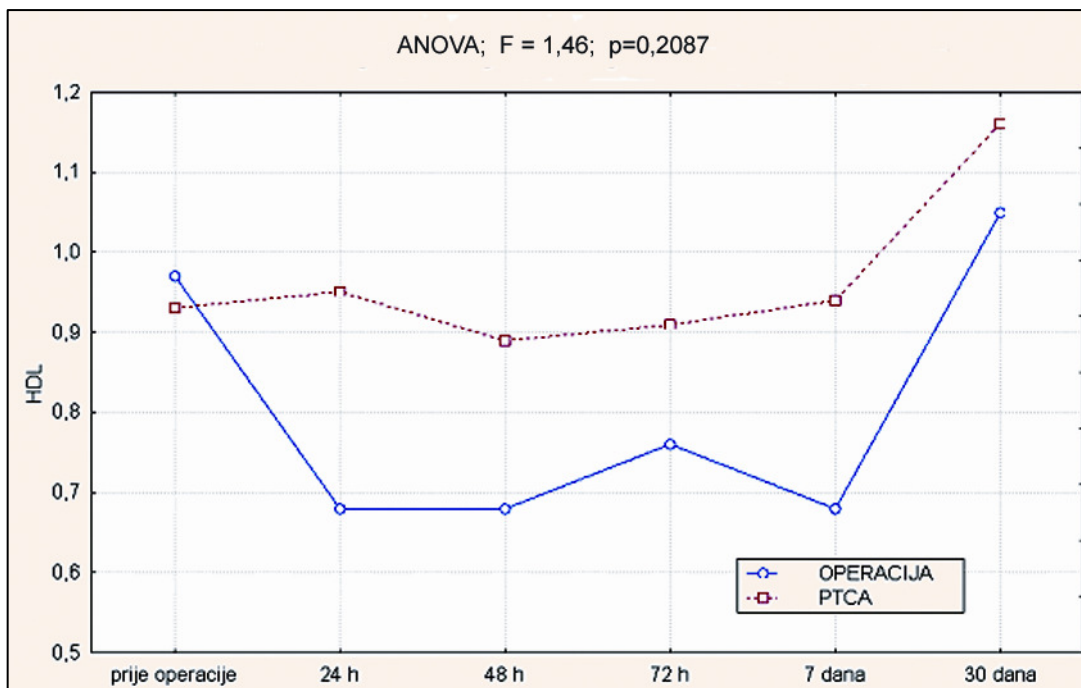




Slika 29. Prosječne vrijednosti LDL kolesterola s obzirom na način revaskularizacije

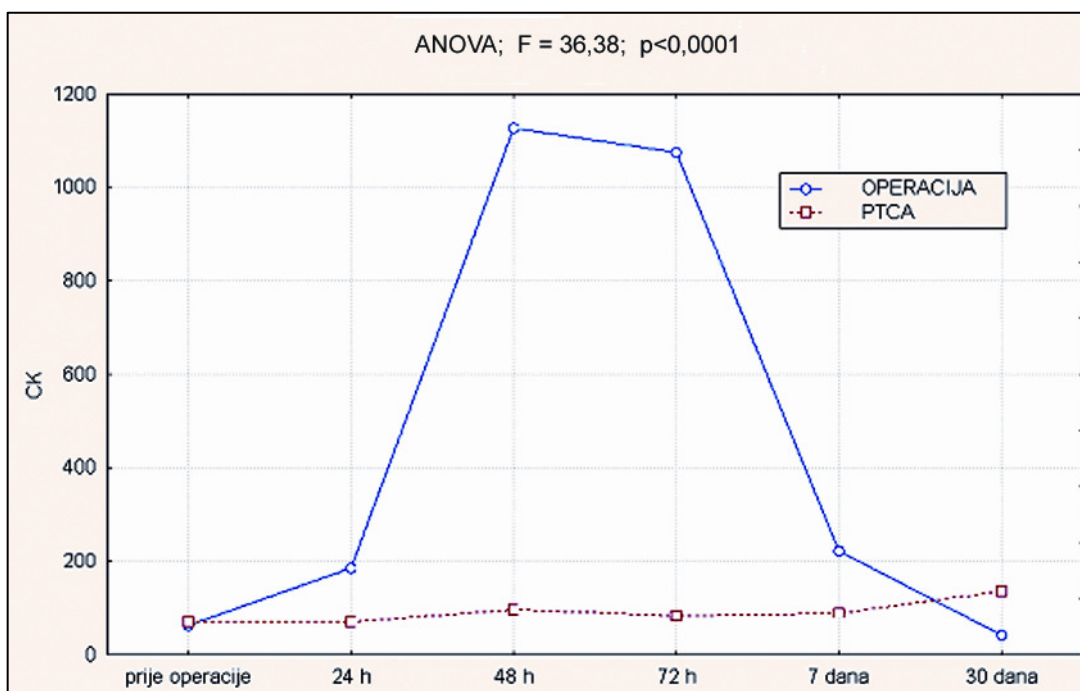


Slika 30. Prosječne vrijednosti HDL kolesterola s obzirom na način revaskularizacije

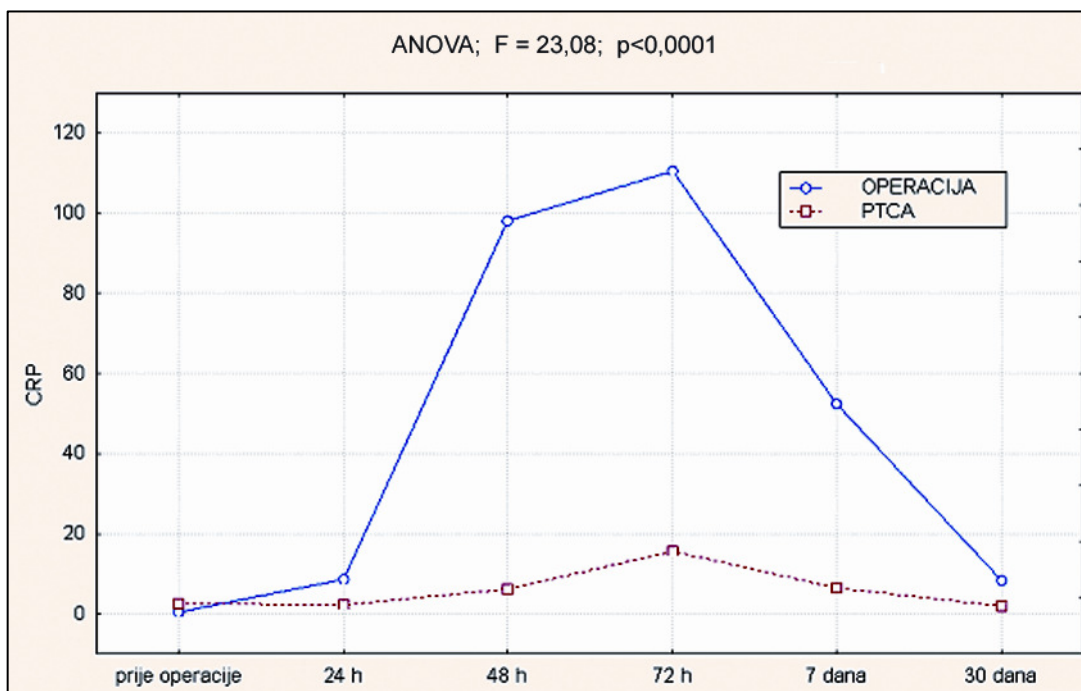


Određivane su vrijednosti CRP i ukupnog CK postoperativno u svih bolesnika (troponin i MB CPK samo kod sumnje na perioperativni koronarni incident, zbog manjka reagensa) u svim vremenima praćenja. Značajno je napomenuti da su krivulje koncentracija oblikom potpuno obrnute krivuljama koncentracija lipoproteina bolesnika podvrgnutih kardiokirurškom zahvatu. Postoperativno dakle dolazi do značajnog porasta koncentracija CK i CRP, sa maksimumom 72 sata i 48 sati ponaosob, a koncentracije se vraćaju na preoperativne 7 dana kod CK, te 30 dana kod CRP. Dakle nešto brži i kraći odgovor na mutilaciju tijekom operativnog zahvata CK, nego CRP. Kod bolesnika podvrgnutih PTCA značajno je reći da nema nikakvih promjena u koncentracijama CK i CRP (slika 31,32).

Slika 31. Prosječne vrijednosti CK s obzirom na način revaskularizacije

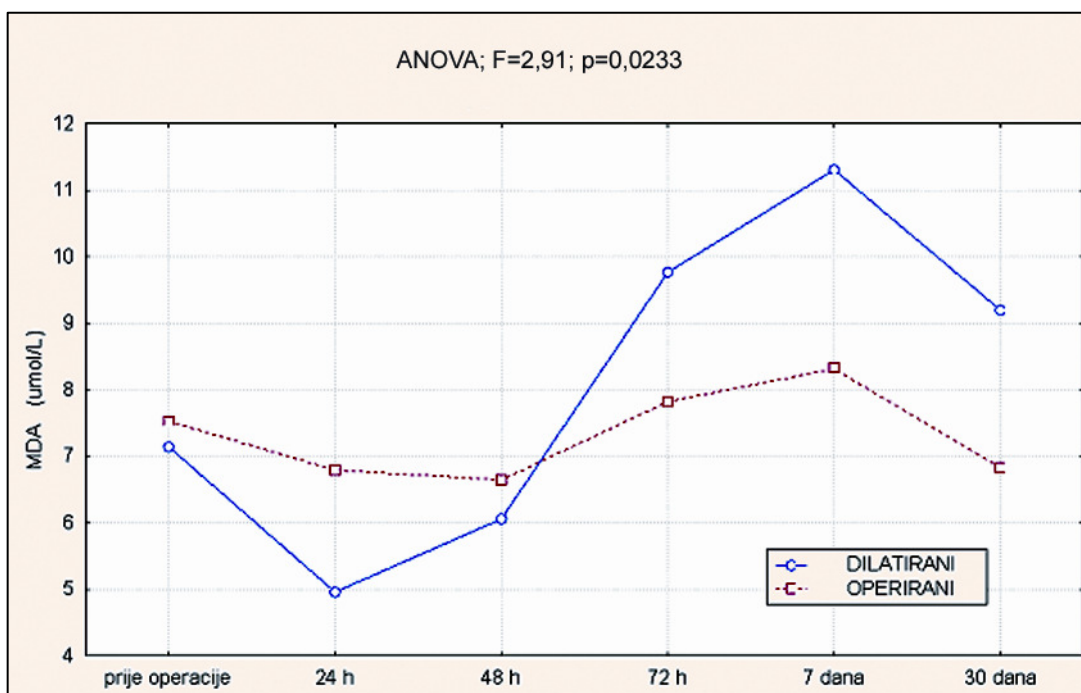


Slika 32. Prosječne vrijednosti CRP s obzirom na način revaskularizacije



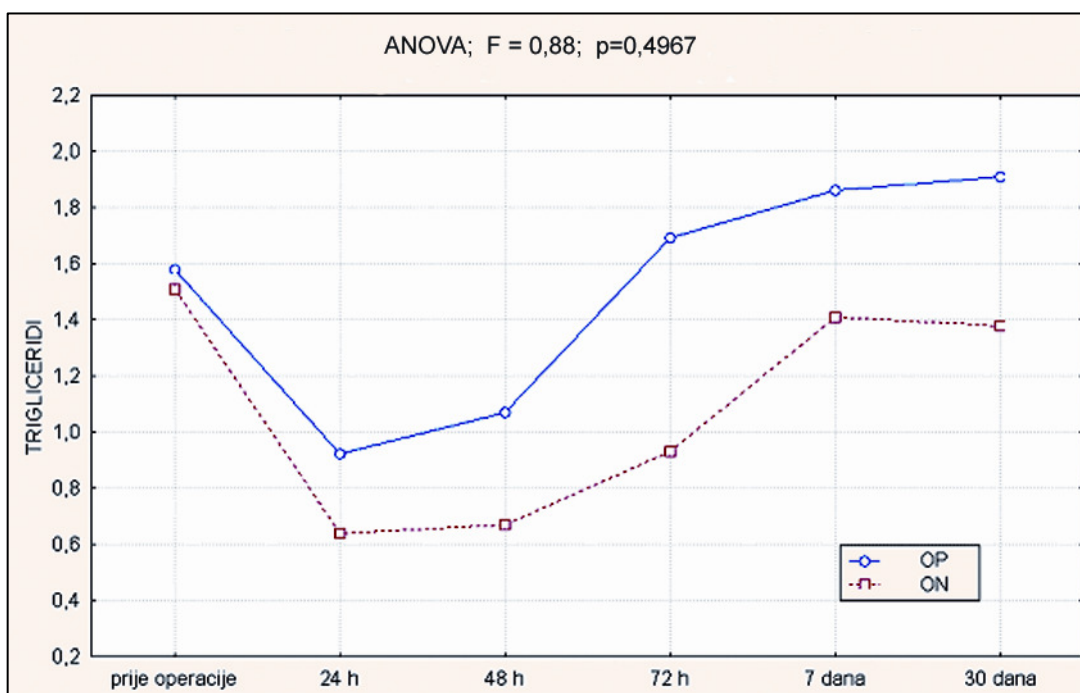
Nešto drugo se dešava ako određujemo MDA (kao mjerilo oksidativnog stresa) postoperativno, tako da je u bolesnika podvrgnutih PTCA statistički značajniji pad koncentracija zabilježen u prvih 48 sati, no u kardiokirurških bolesnika. Međutim od trećeg do 30-tog dana koncentracija MDA premašila je bazalne vrijednosti u dilatiranih bolesnika, a u kardiokirurških se samo vratila na preoperativne (slika 33.).

Slika 33. Prosječne vrijednosti MDA s obzirom na način revaskularizacije

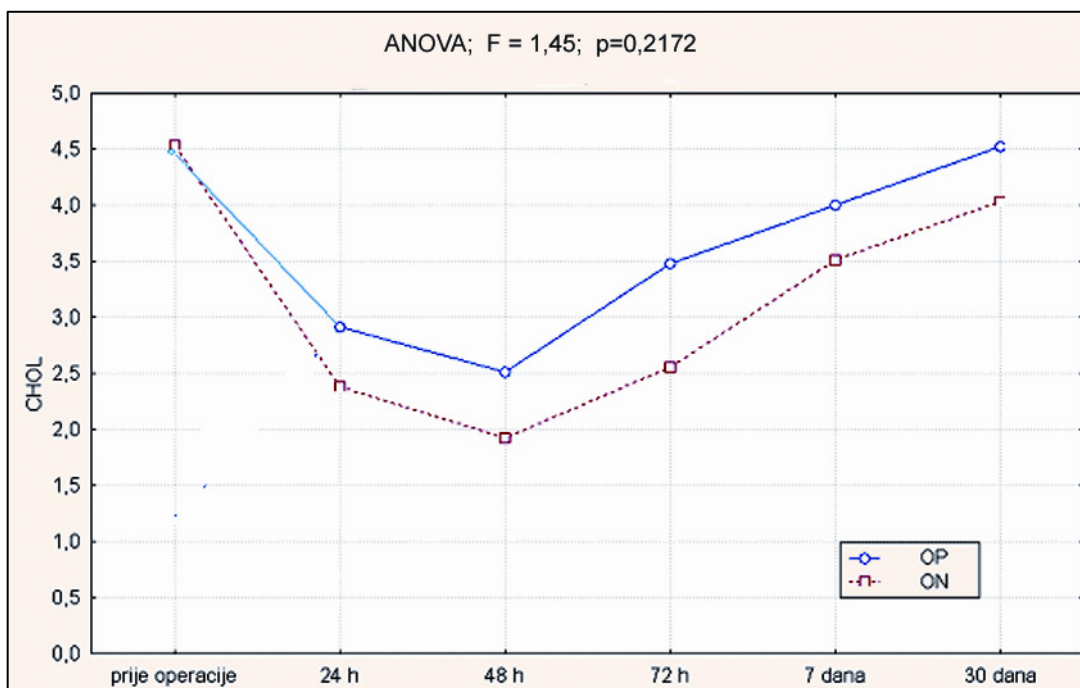


Ako postoperativno uspoređujemo pacijente operirane *on-pump* i *off-pump*, samo je kod triglicerida i kolesterola zabilježen statistički signifikantniji pad koncentracija bolesnika koji su rađeni *on-pump*, dok kod ox-LDL, protutijela na ox-LDL, HDL i LDL, kolesterola, CK i CRP nema statistički signifikantne razlike između te dvije skupine (slika 34,35). Nije tražena razlika između ove skupine u MDA, jer nije bilo dovoljno uzoraka.

Slika 34. Prosječne vrijednosti triglicerida s obzirom na način revaskularizacije (*off-pump* (OP) i *on-pump* (ON))

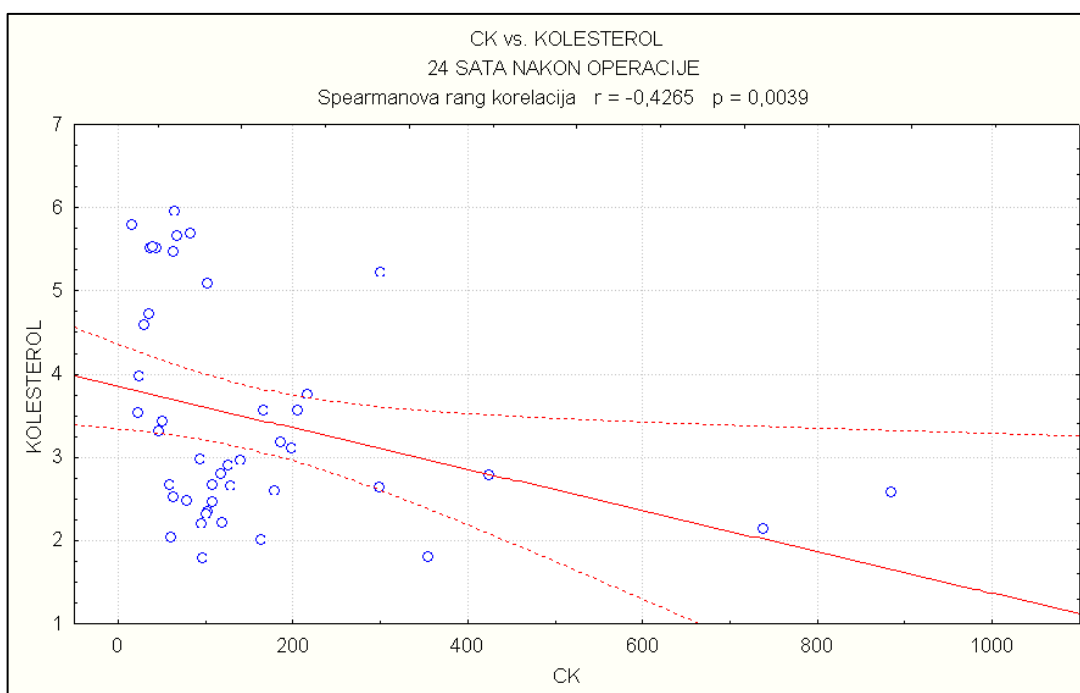


Slika 35. Prosječne vrijednosti triglicerida s obzirom na način revaskularizacije (*off-pump* (OP) i *on-pump* (ON))

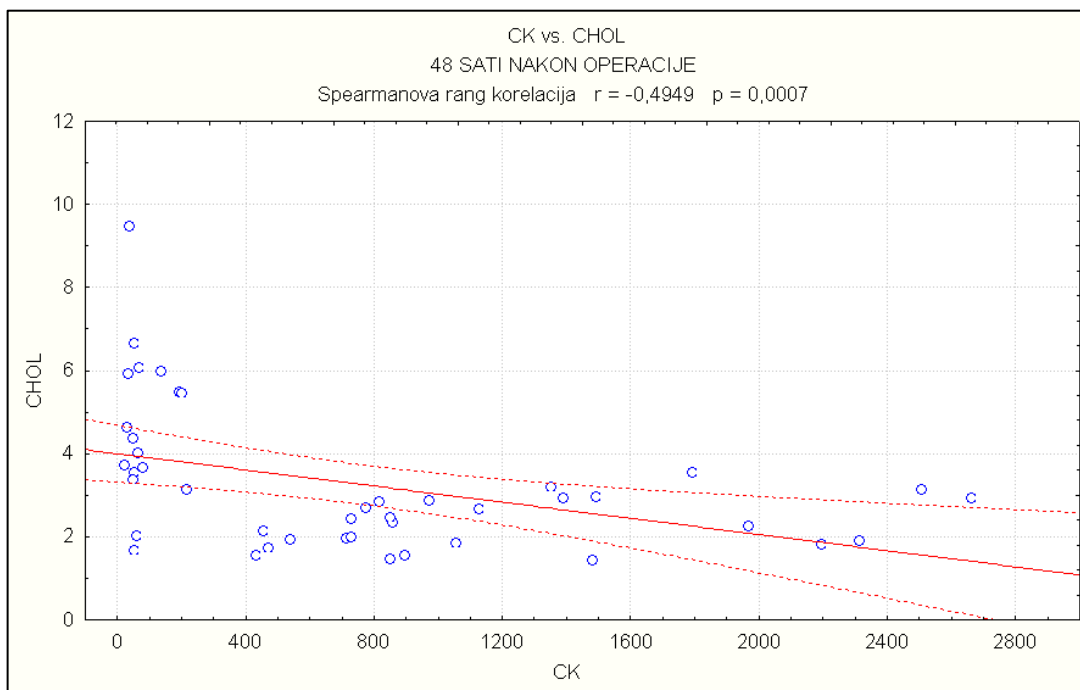


Na kraju, Spearman rank testom nađene su statistički signifikantne negativne korelacije kretanja koncentracija kreatinin kinaze (CK) postoperativno sa ukupnim kolesterolom i LDL-om, te trigliceridima, dok sa koncentracijama ox-LDL-a, protutijela na ox-LDL, HDL nema signifikantne korelacije (slike 36-44). Dakle, što su bile više koncentracije CK, bio je veći pad koncentracija ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida i to već 24 sata nakon operativnog zahvata.

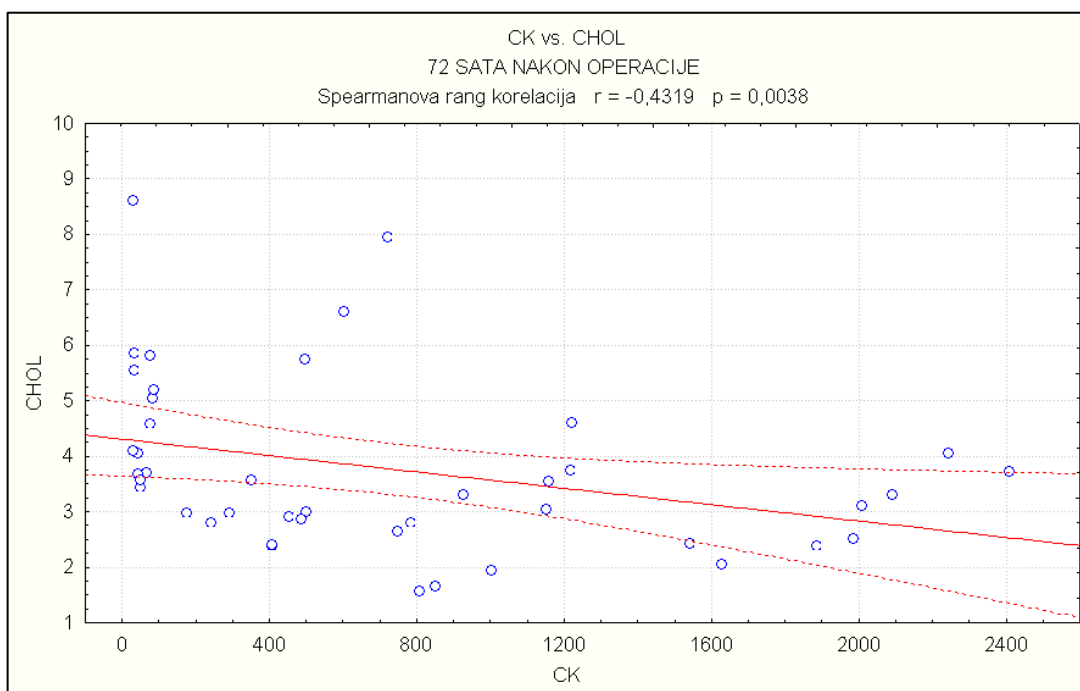
Slika 36. Korelacija između kreatin kinaze i kolesterola, 24h nakon operativnog zahvata



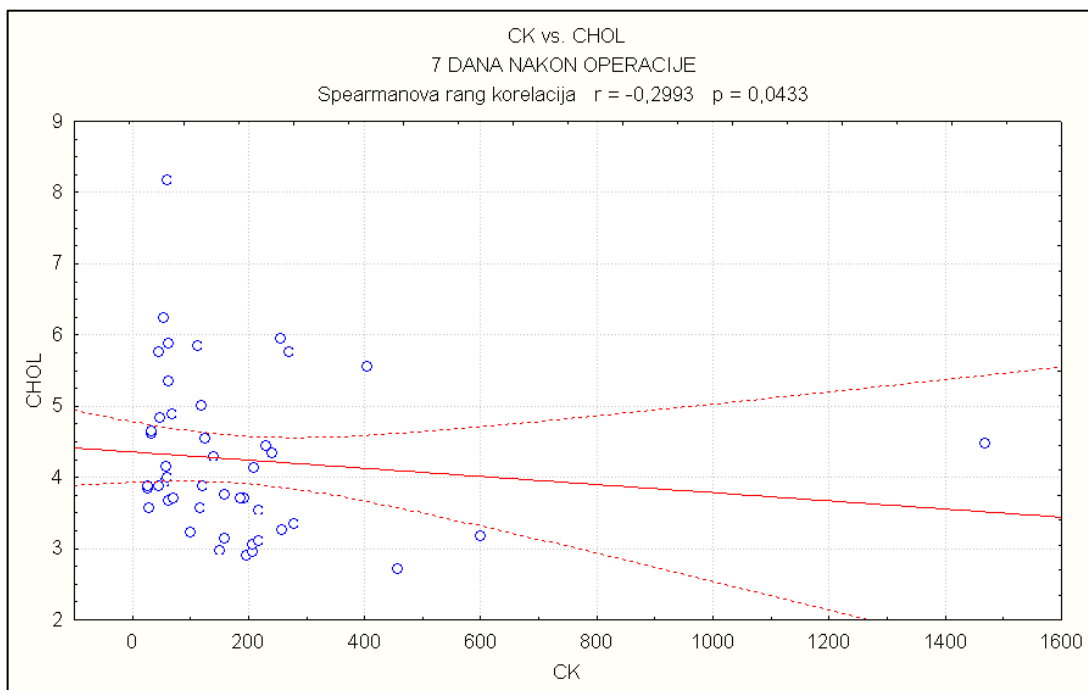
Slika 37. Korelacija između kreatin kinaze i kolesterola, 48h nakon operativnog zahvata



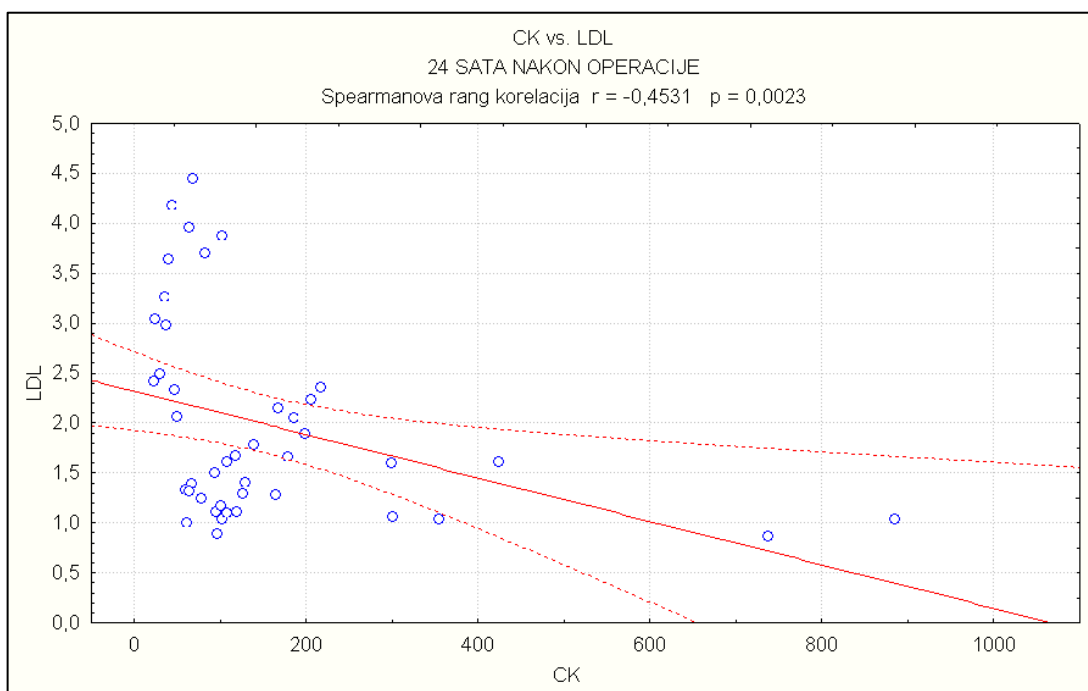
Slika 38. Korelacija između kreatin kinaze i kolesterola, 72h nakon operativnog zahvata



Slika 39. Korelacija između kreatin kinaze i kolesterola, 7 dana nakon operativnog zahvata

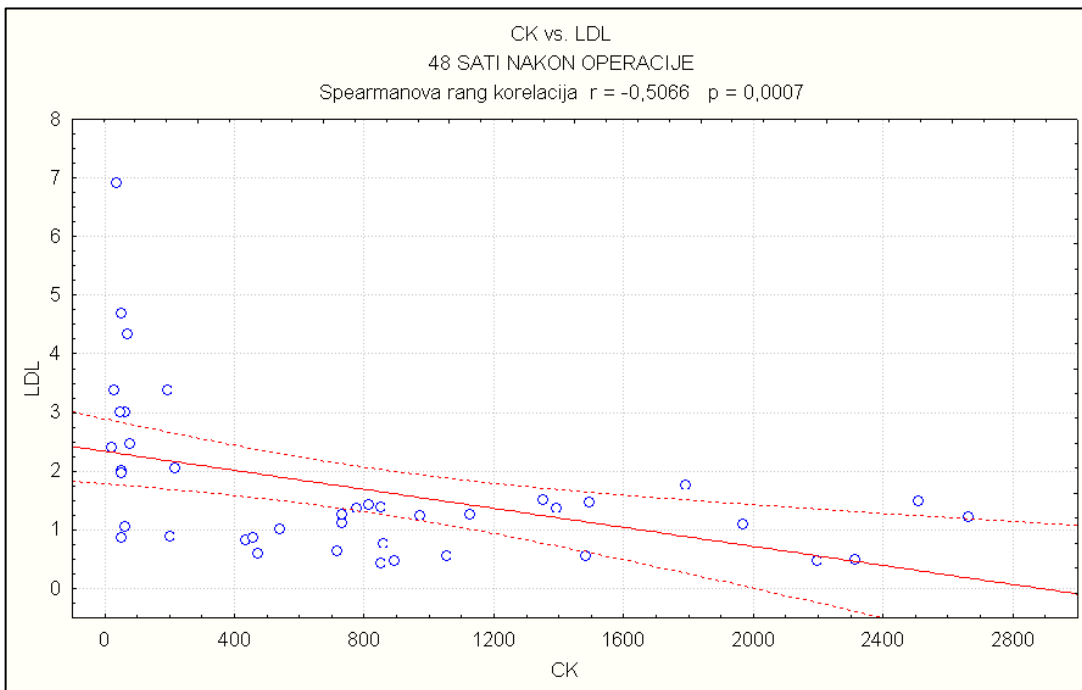


Slika 40. Korelacija između kreatin kinaze i LDL-a, 24h nakon operativnog zahvata

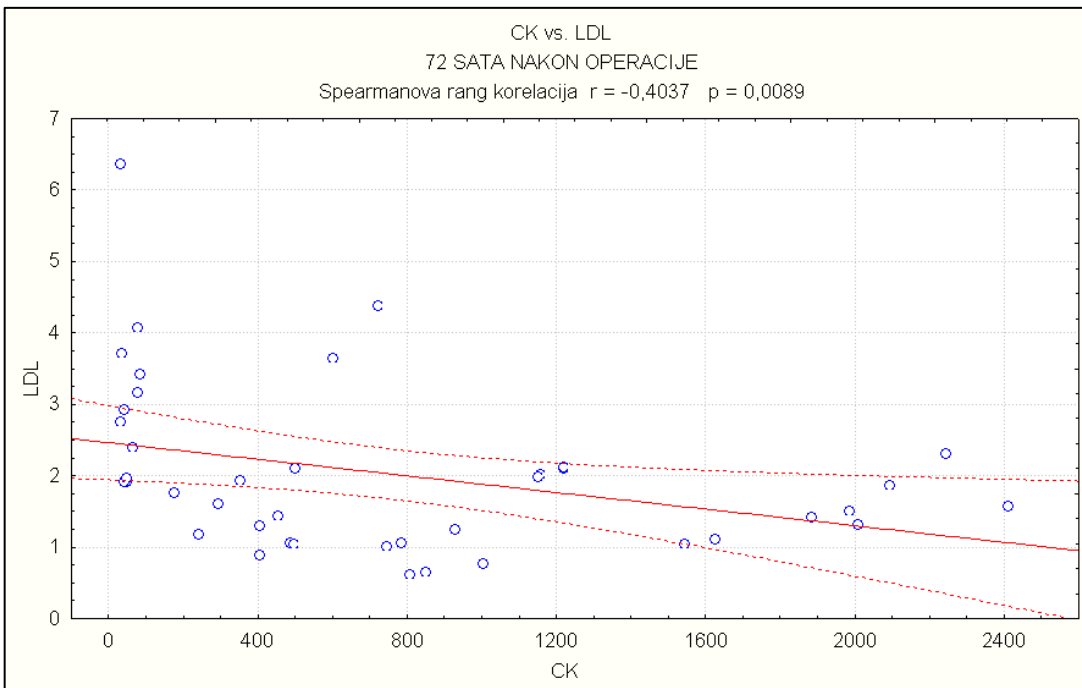




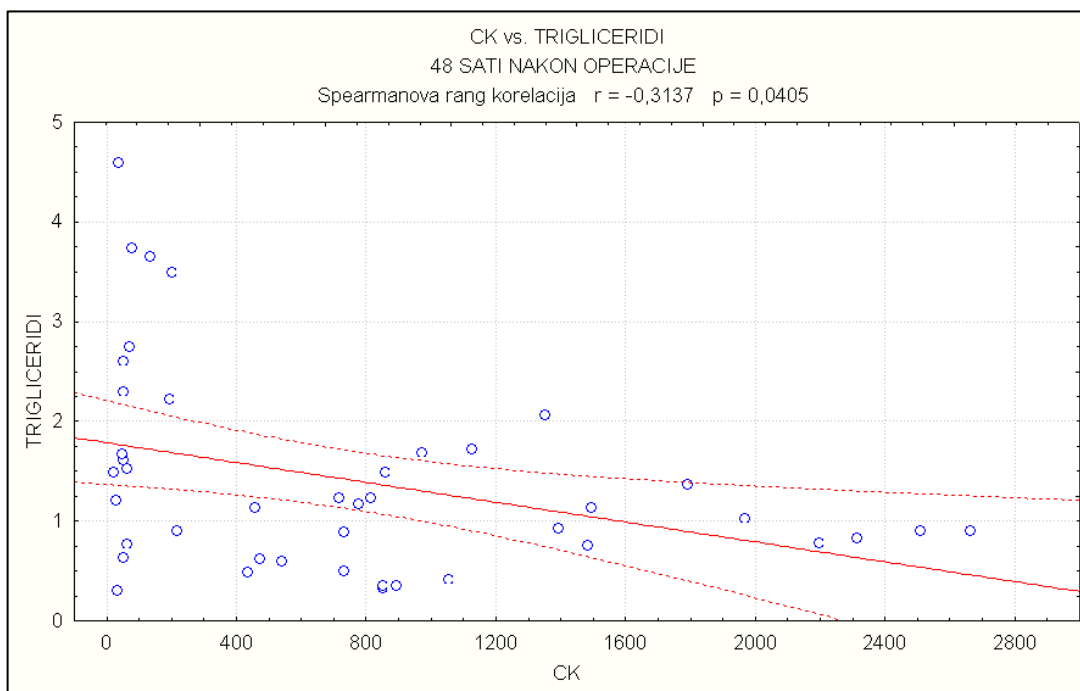
Slika 41. Korelacija između kreatin kinaze i LDL-a, 48h nakon operativnog zahvata



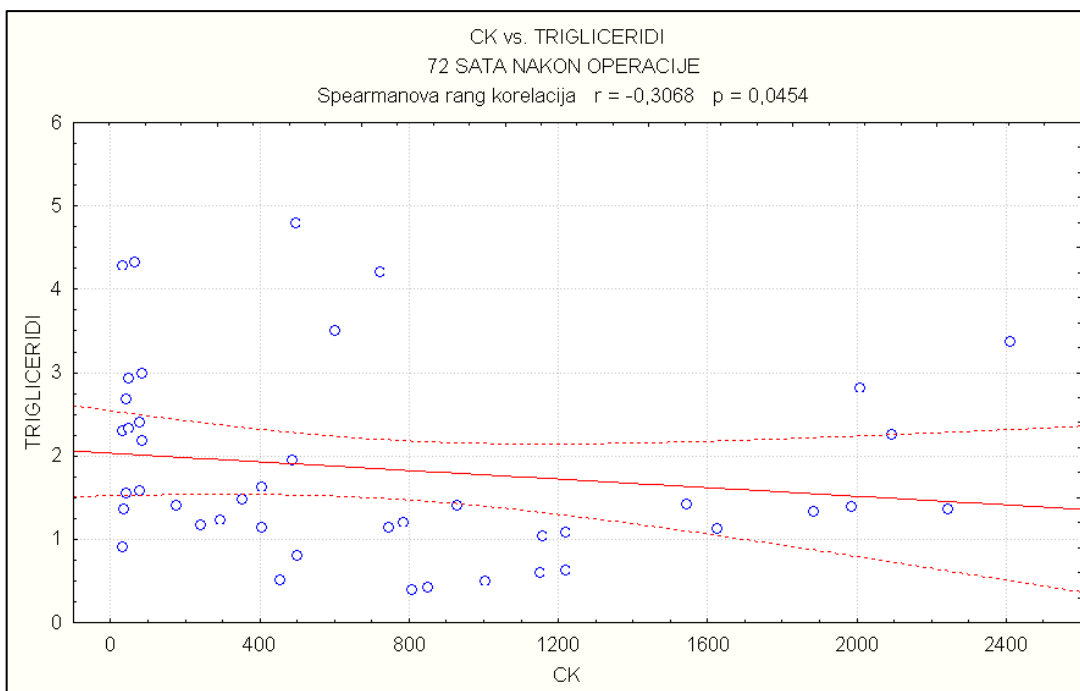
Slika 42. Korelacija između kreatin kinaze i LDL-a, 72h nakon operativnog zahvata



Slika 43. Korelacija između kreatin kinaze i triglicerida, 48h nakon operativnog zahvata

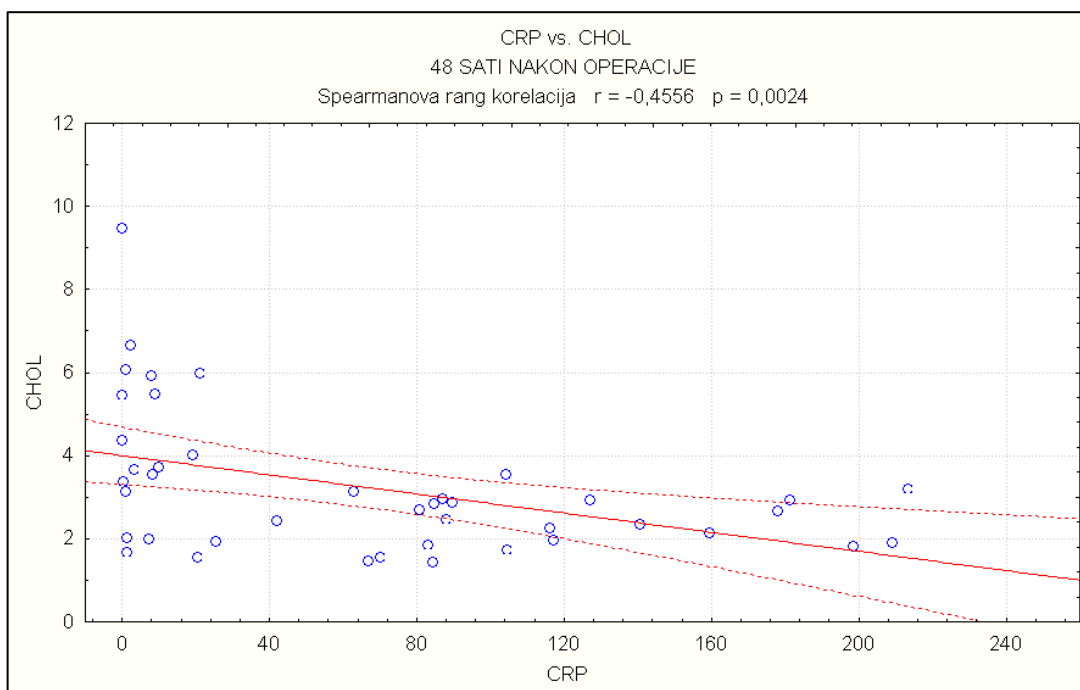


Slika 44. Korelacija između kreatin kinaze i triglicerida, 72h nakon operativnog zahvata

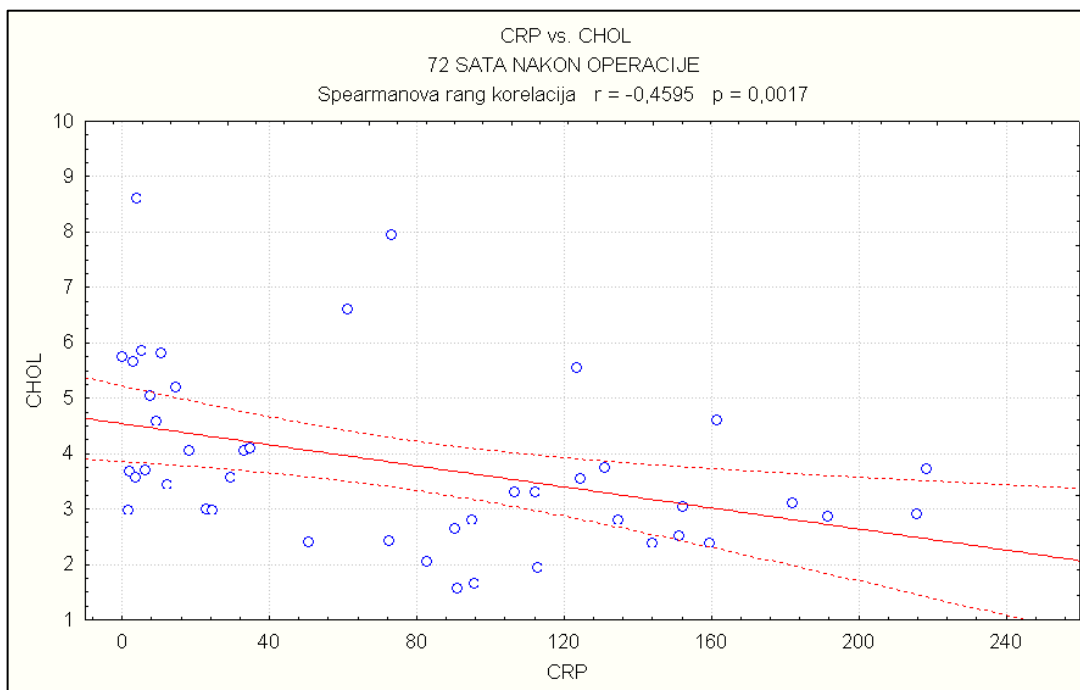


Slične negativne korelacije su zamijećene i sa koncentracijama CRP-a u odnosu na rečena tri parametra, ali su signifikantne korelacije zapažene sa zadržkom od 24 sata, tako da su najveće sa ukupnim holesterolom i LDL holesterolom 48. sat postoperativno, te su signifikantne i nakon mjesec dana nakon operativnog zahvata, odnosno što veće koncentracije CRP-a, niže koncentracije ukupnog i LDL holesterola (slike 45-52). Očekivano signifikantno negativne korelacije CRP-a s trigliceridima zapažene su 72 sata i 7 dana nakon operativnog zahvata (slike 53,54).

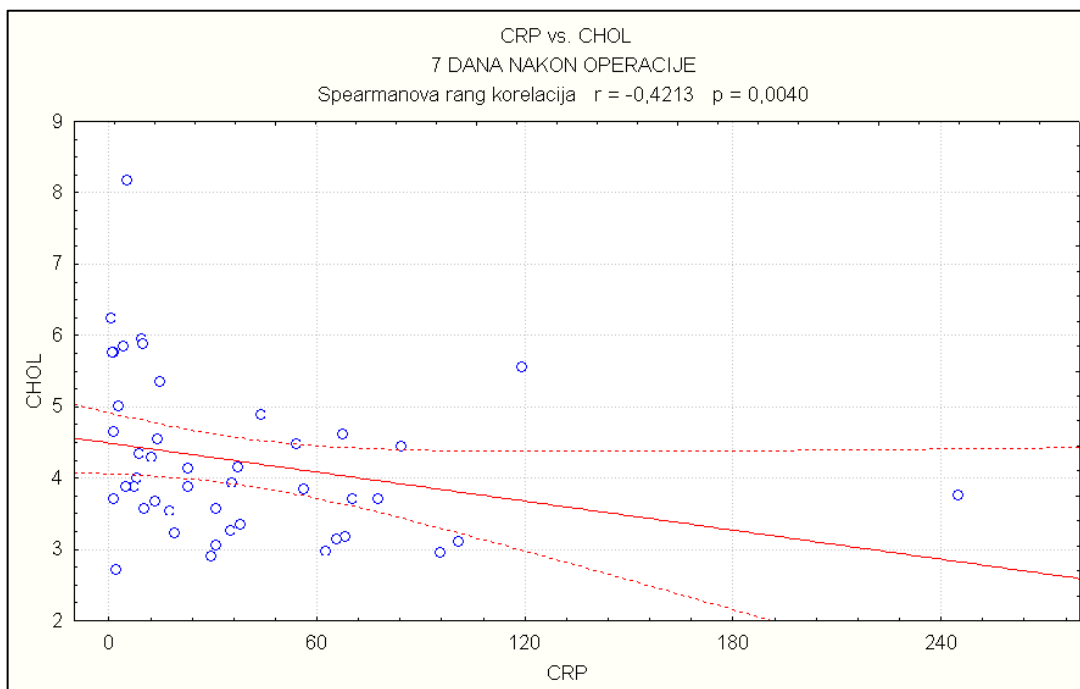
Slika 45. Korelacija između C-reaktivnog proteina i kolesterola, 48h nakon operativnog zahvata



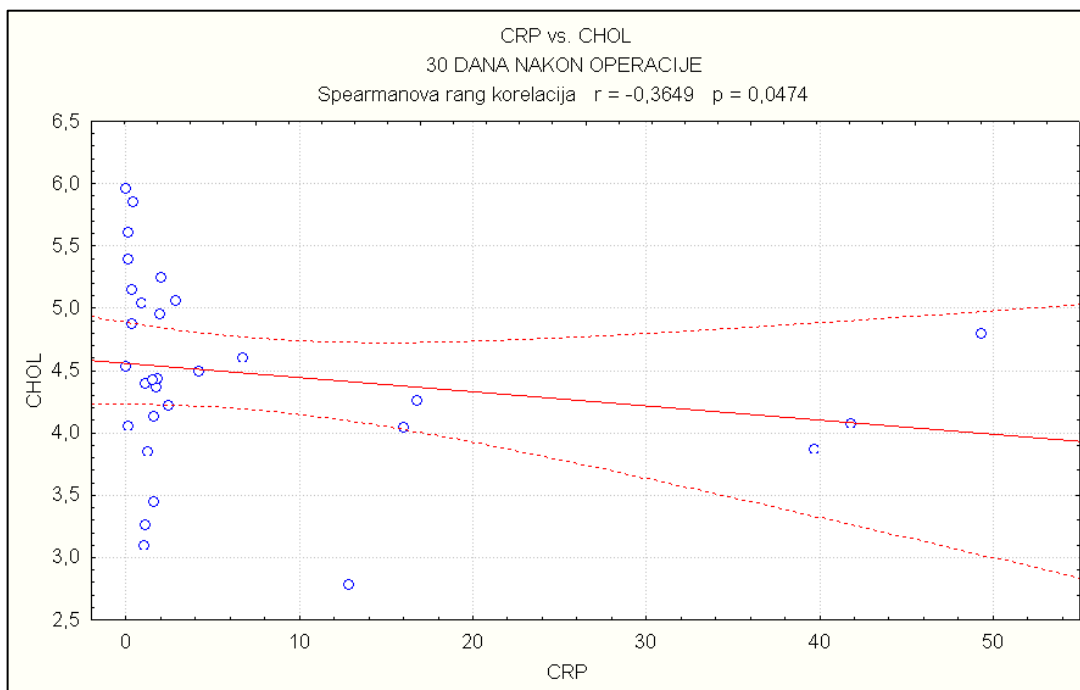
Slika 46. Korelacija između C-reaktivnog proteina i kolesterola, 72h nakon operativnog zahvata



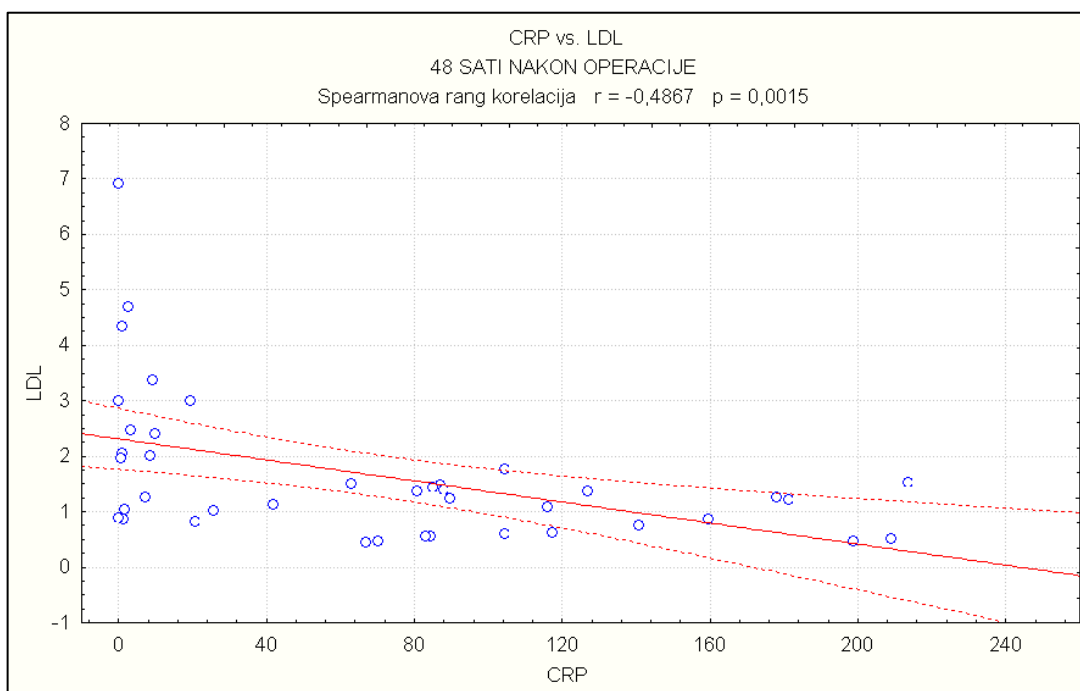
Slika 47. Korelacija između C-reaktivnog proteina i kolesterola, 7 dana nakon operativnog zahvata



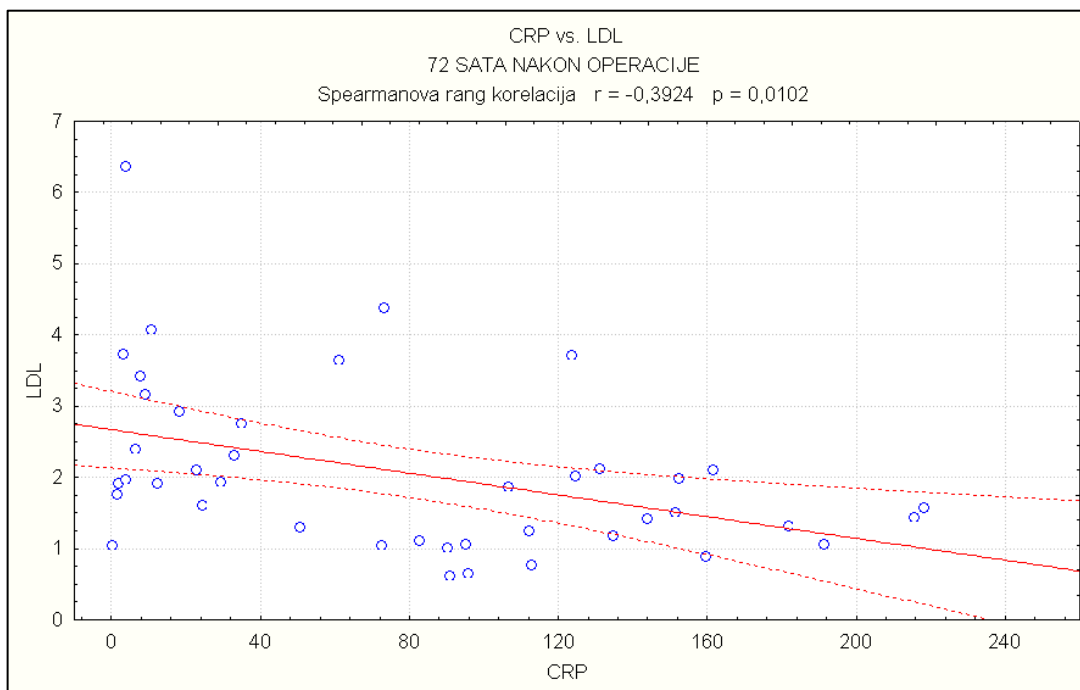
Slika 48. Korelacija između C-reaktivnog proteina i kolesterola, 30 dana nakon operativnog zahvata



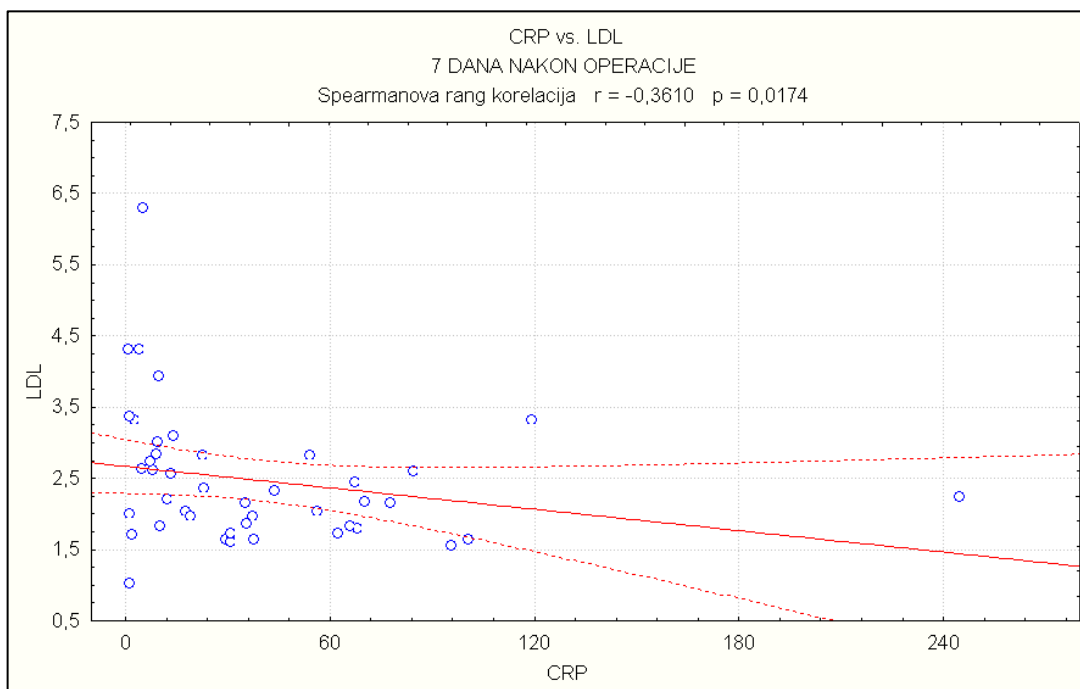
Slika 49. Korelacija između C-reaktivnog proteina i LDL-a, 48h nakon operativnog zahvata



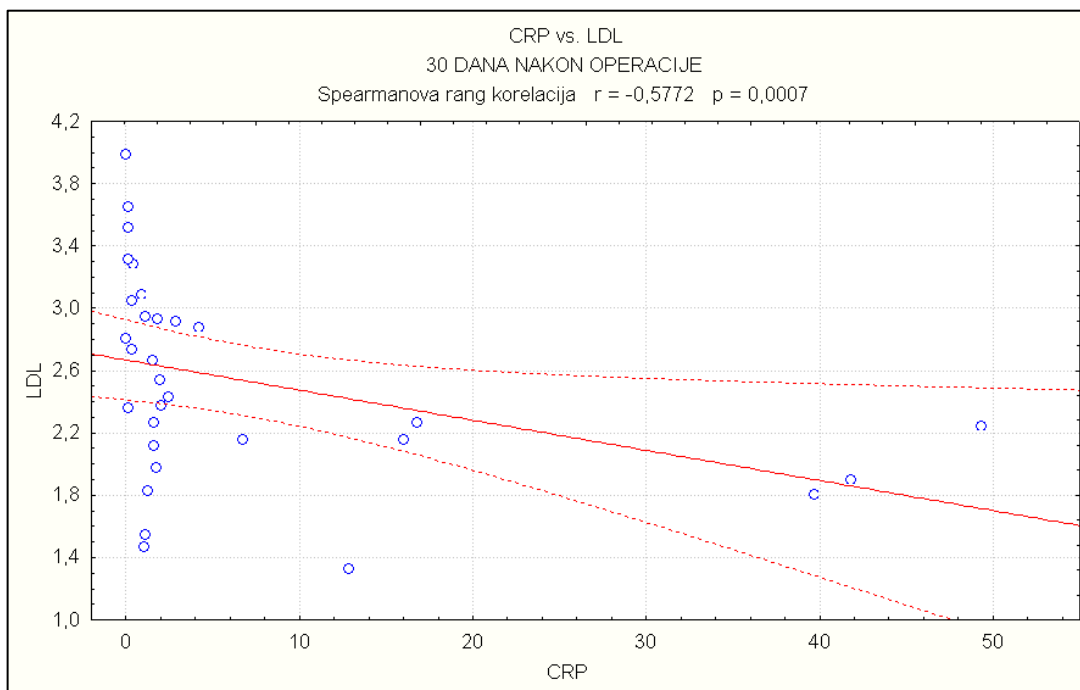
Slika 50. Korelacija između C-reaktivnog proteina i LDL-a, 72h nakon operativnog zahvata



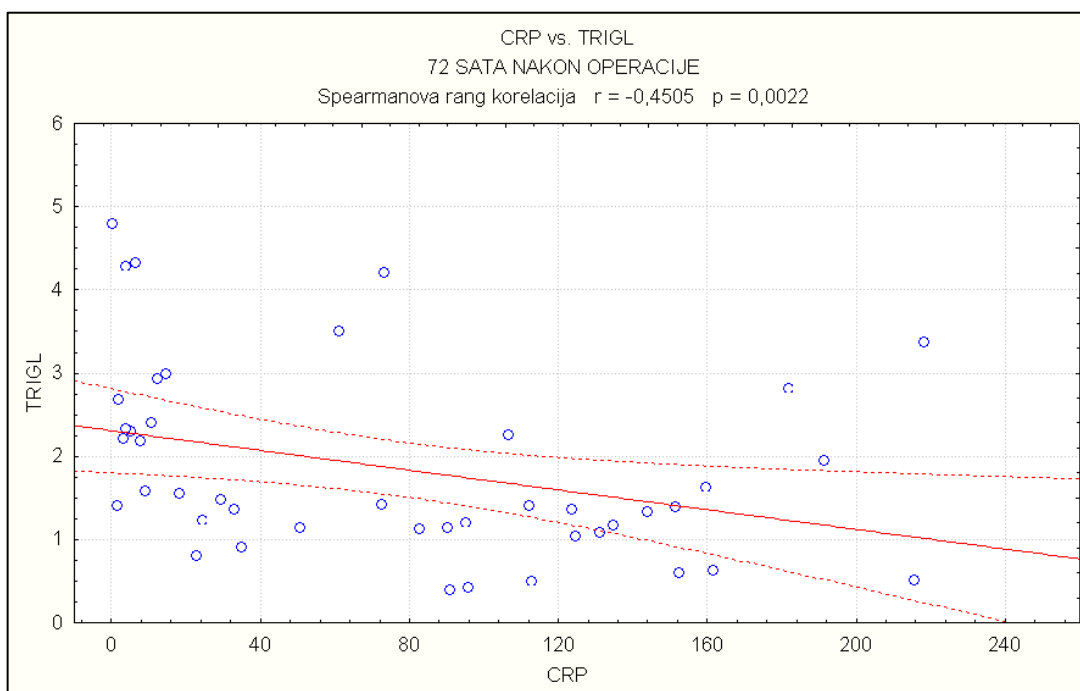
Slika 51. Korelacija između C-reaktivnog proteina i LDL-a, 7 dana nakon operativnog zahvata



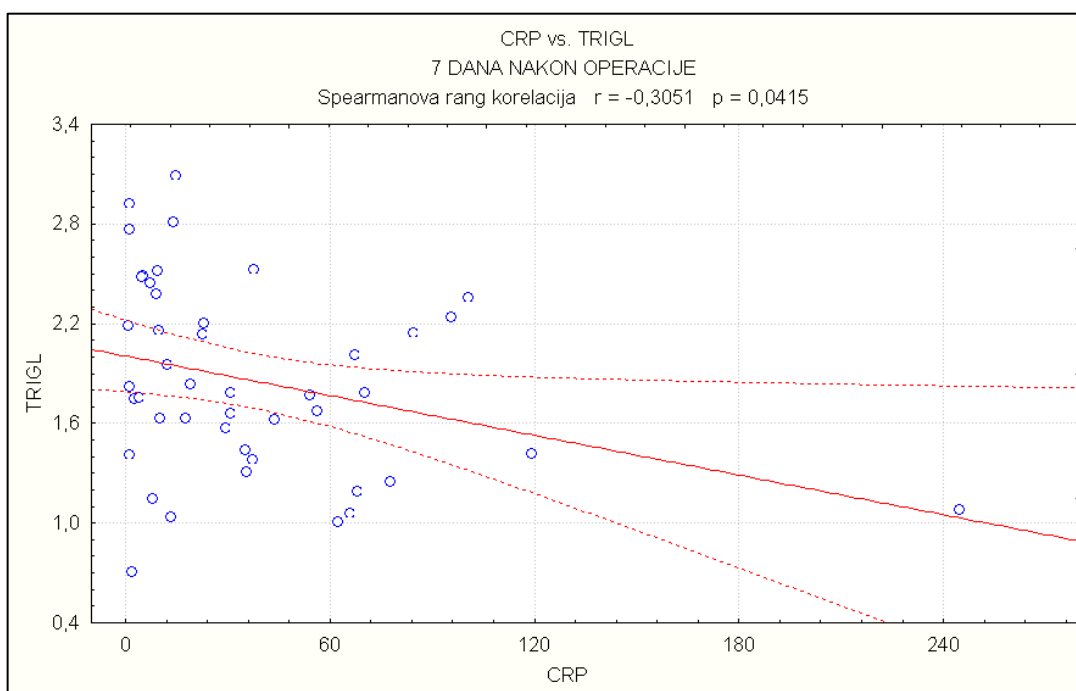
Slika 52. Korelacija između C-reaktivnog proteina i LDL-a, 30 dana nakon operativnog zahvata



Slika 53. Korelacija između C-reaktivnog proteina i triglicerida, 72h nakon operativnog zahvata



Slika 54. Korelacija između C-reaktivnog proteina i triglicerida, 7 dana nakon operativnog zahvata

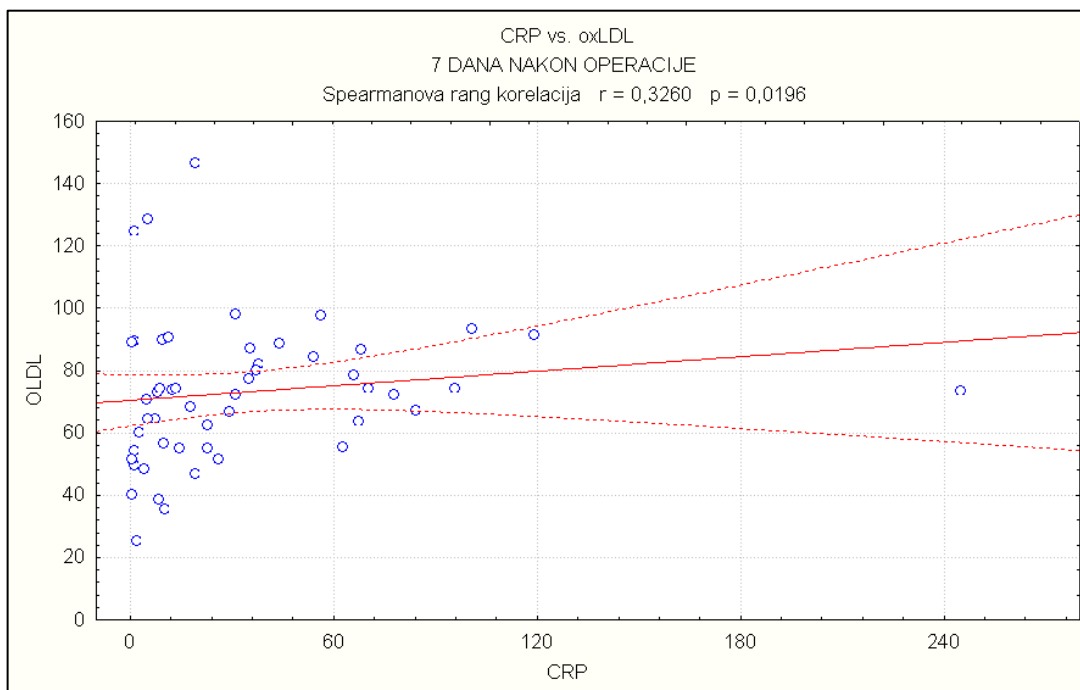


Nema korelacija između kretanja CRP-a postoperativno, a isto tako nema nikakve korelacije sa protutijelima na oxLDL. Što se tiče samog oksidiranog LDL-a sedmi dan postoperativno nađene su signifikantne ali pozitivne korelacije sa CRP-om. Dakle, za razliku od ostalih lipoproteina, što je viša koncentracija CRP-a sedmi dan, viša je i koncentracija oxLDL-a (slika 53).

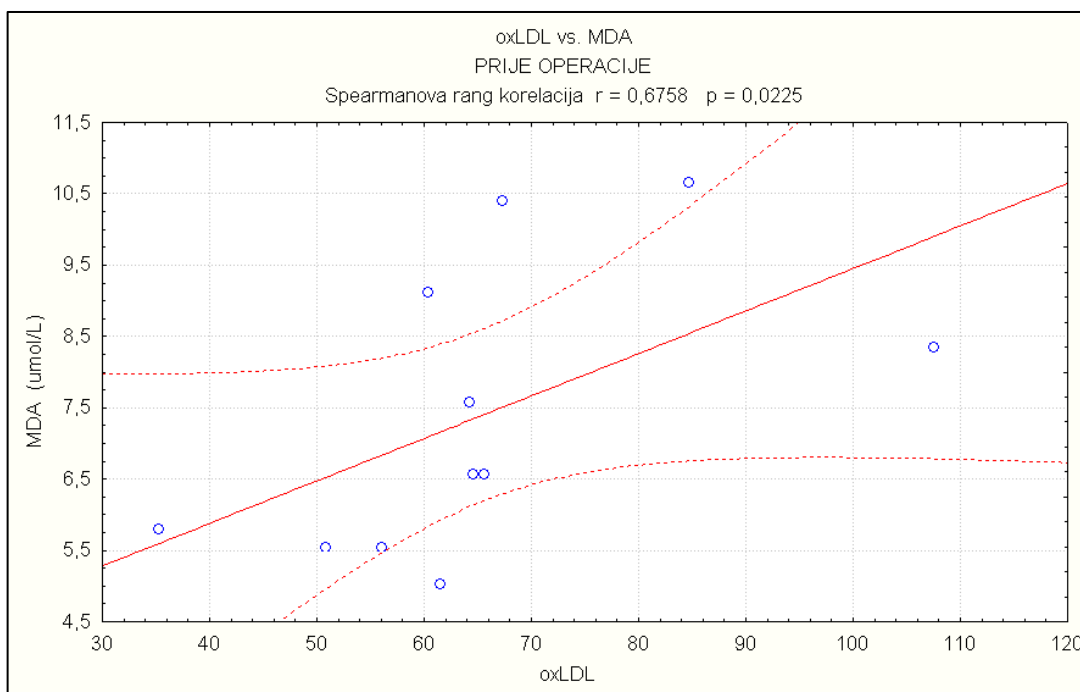
Što se tiče MDA Spearman rang testom statički signifikantna, sada pozitivna korelacija, nalazi se baš sa ox-LDL u bazalnoj točki ( Spearman R 0.68,  $p < 0.02$ ), nakon 24 sata (Spearman R 0.61,  $p < 0.05$ ), te 48 sati nakon zahvata (Spearman R 0.75,  $p < 0.01$ ) (slika 54-56).



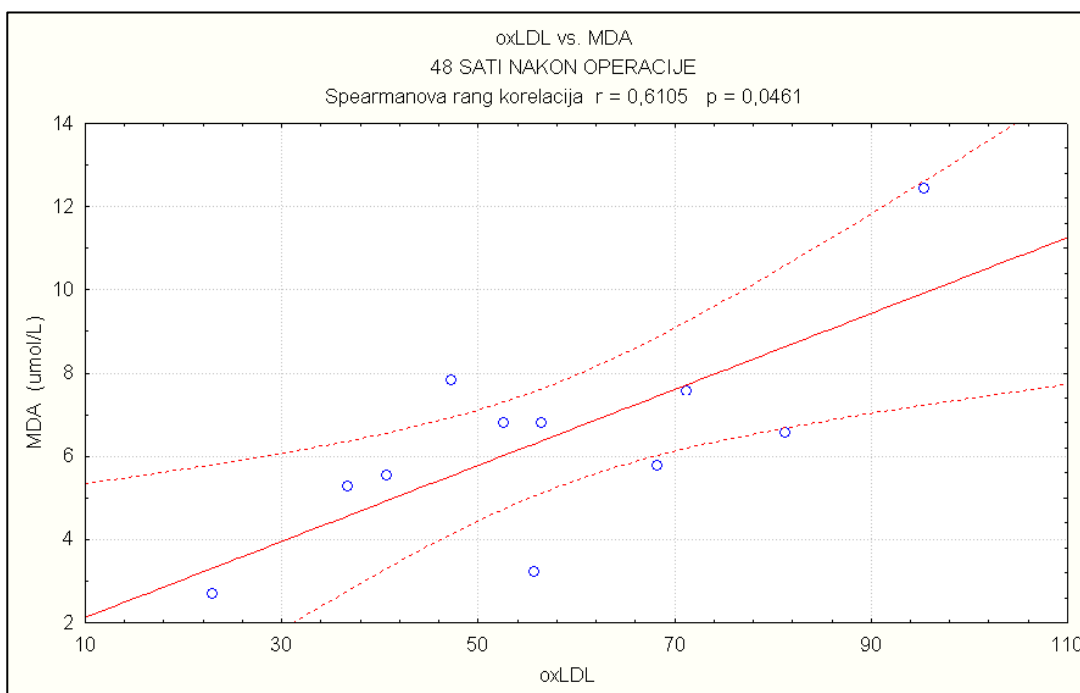
Slika 53. Korelacija između C-reaktivnog proteina i oxLDL-a, 7 dana nakon operativnog zahvata



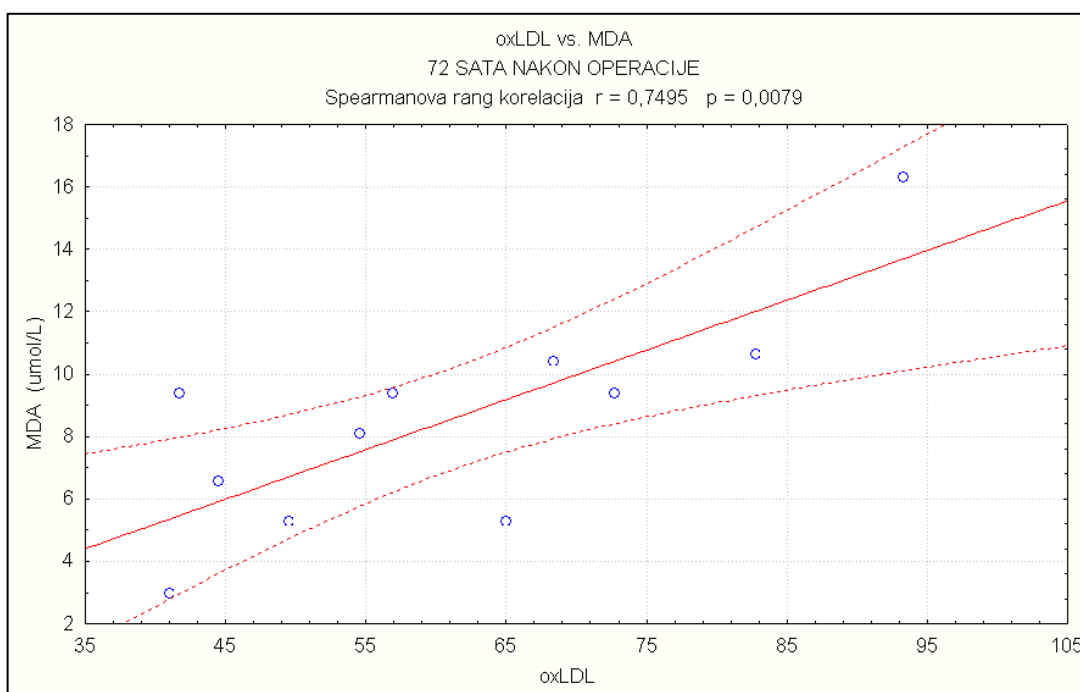
Slika 54. Korelacija oxLDL sa MDA prije operacije



Slika 55. Korelacija oxLDL sa MDA 48h nakon operativnog zahvata

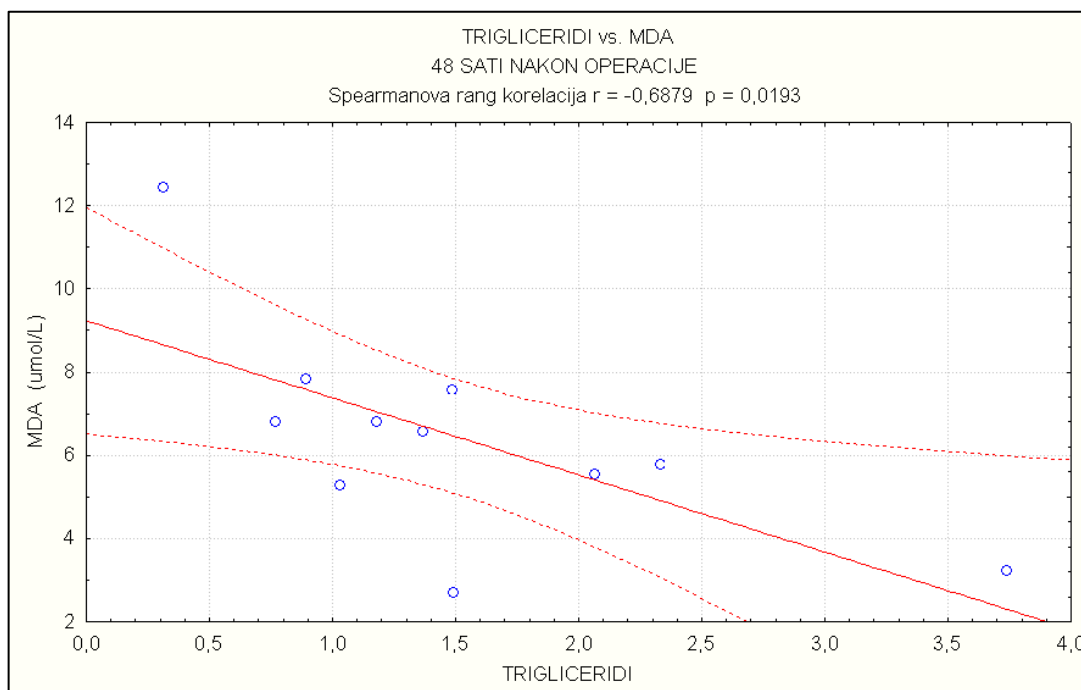


Slika 56. Korelacija oxLDL sa MDA 72h nakon operativnog zahvata



Koncentracije MDA također statistički signifikantno koreliraju sa trigliceridima (48 sati postoperativno), ali je u ovom slučaju korelacija negativnog predznaka (slika 57), kao što je nađeno korelirajući postoperativno kretanje lipoproteina sa CRP-om i CK. Sa koncentracijama ukupnog holesterola i LDL holesterola nema nikakve korelacije.

Slika 57. Korelacija triglicerida sa MDA 48h nakon operativnog zahvata



Dalje su promatrane krivulje kretanja koncentracija ispitivanih parametara s obzirom na rani ishod operativnog zahvata, te testirane na signifikantnost (Friedman ANOVA). Kao što je ranije rečeno, bolesnici sa lošijim ishodom su smatrani oni koji su imali jednu od perioperativnih komplikacija (vidi u bolesnici i metode), isključujući bolesnike sa perioperativnim infektom.

Prije prikaza rezultata praćenja koncentracija lipoproteina, ispitani su i drugi parametri koji bi mogli utjecati na ishod. Tako je nađeno da na ishod ne utječu drugi poznati faktori rizika, kao što je šećerna bolest, hipertenzija i pušenje (tablica 12,13,14).

Tablica 12. Neželjeni događaji i dijabetes

Ishod	DIABETES +	DIABETES -	Ukupno
Bez neželjenih događanja	13	35	48
% kolumna	72.2%	79.6%	
% redak	27.1%	72.9%	
Sa neželjenim događajem	5	9	14
% kolumna	27.8%	20.4%	
% redak	35.7%	64.3%	
Ukupno	18	44	62

Pearson Chi-square p=0.53131

Tablica 13. Neželjeni događaji i pušenje

Ishod	PUŠENJE +	PUŠENJE -	Ukupno
Bez neželjenih događanja	27	21	48
% kolumna	75.0%	80.8%	
% redak	56.3%	43.7%	
Sa neželjenim događajem	9	5	14
% kolumna	25.0%	19.2%	
% redak	64.3%	35.7%	
Ukupno	36	26	62

Pearson Chi-square p=0.59187

Tablica 14. Neželjeni događaji i hipertenzija

Ishod	HIPERTENZIJA+	HIPERTENZIJA-	Ukupno
Bez neželjenih događanja	35	13	48
% kolumna	83.3%	65.0%	
% redak	72.9%	27.1%	
Sa neželjenim događajem	7	7	14
% kolumna	16.7%	35.0%	
% redak	50.0%	50.0%	
Ukupno	42	20	62

Pearson Chi-square p=0.10654

Na ishod ne utječe ni preoperativna klinička slika (CCSC), broj zahvaćenih i operiranih koronarnih arterija, te vrsta operacije (nešto bolje, međutim statistički nesignifikantno, tijekom 30-dnevnog praćenja prolaze bolesnici podvrgnuti PTCA) (tablica 15-18). Jedino zahvaćenost periferije i velikih krvnih žila vrata ukazuje na moguće rane postoperativne komplikacije (tablica 19).

Tablica 15. Neželjeni događaji s obzirom na kliničku sliku (CCSC I-IV).

Ishod	I	II	III	IV	Ukupno
Bez neželjenih događanja	4	28	7	9	48
% kolumna	66.8%	82.4%	58.3%	90.0%	
% redak	8.3%	58.3%	14.6%	18.8%	
Sa neželjenim događajem	2	6	5	1	14
% kolumna	33.3%	17.7%	41.7%	10.0%	
% redak	14.3%	42.9%	35.7%	7.14%	
Ukupno	6	34	12	10	62

Pearson Chi-square p=0.23316

Tablica 16. Neželjeni događaji s obzirom na broj zahvaćenih koronarnih arterija

Ishod	I	II	III	Ukupno
Bez neželjenih događanja	14	15	19	48
% kolumna	100.0%	68.2%	73.1%	
% redak	29.2%	31.3%	39.6%	
Sa neželjenim događajem	0	7	7	14
% kolumna	0.0%	31.8%	26.9%	
% redak	0.0%	50.0%	50.0%	
Ukupno	14	22	26	62

Pearson Chi-square p=0.06596

Tablica 17. Neželjeni događaji s obzirom na broj revaskulariziranih žila

Ishod	I	II	III	IV	Ukupno
Bez neželjenih događanja	19	18	10	1	48
% kolumna	90.5%	75.0%	62.5%	100.0%	
% redak	39.6%	37.5%	20.8%	2.1%	
Sa neželjenim događajem	2	6	6	0	14
% kolumna	9.5%	25.0%	37.5%	0.0%	
% redak	14.3%	42.9%	42.9%	0.0%	
Ukupno	21	24	16	1	62

Pearson Chi-square p=0.21615

Tablica 18. Neželjeni događaji s obzirom na vrstu zahvata

Ishod	PTCA	<i>Off-pump</i> <sup>*</sup>	<i>On-pump</i> <sup>†</sup>	Ukupno
Bez neželjenih događanja	28	14	6	48
% kolumna	90.3%	63.6%	66.7%	
% redak	58.3%	29.2%	12.5%	
Sa neželjenim događajem	3	8	3	14
% kolumna	9.7%	36.4%	33.3%	
% redak	21.4%	57.2%	21.4%	
Ukupno	31	22	9	62

Pearson Chi-square p=0.05135

\* kardiokiruška revaskularizacija bez stroja za izvantijelesni krvotok

† kardiokiruška revaskularizacija sa strojem za izvantijelesni krvotok

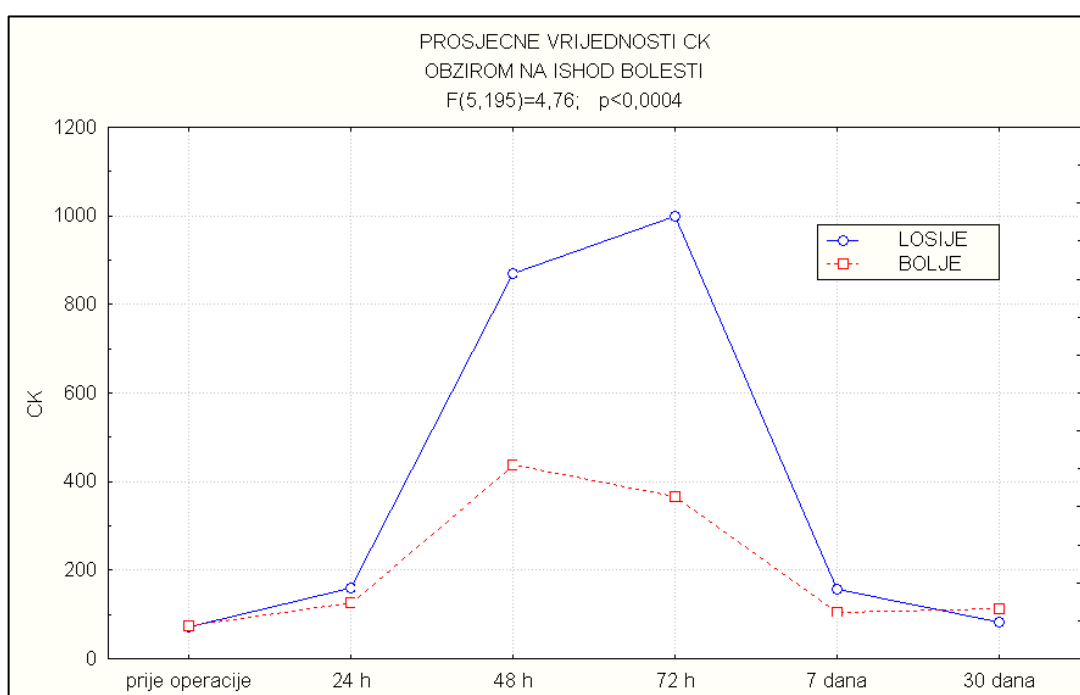
Tablica 19. Neželjeni događaji s obzirom na zahvaćenost periferije aterosklerozom

Ishod	PERIFERIJA -	PERIFERIJA+	Ukupno
Bez neželjenih događanja	40	8	48
% kolumna	83.3%	57.1%	
% redak	83.3%	16.7%	
Sa neželjenim događajem	8	6	14
% kolumna	16.7%	42.9%	
% redak	57.1%	42.9%	
Ukupno	48	14	62

Pearson Chi-square p=0.03919

Od biokemijskih parametara prvo izdvajam vrijednosti kreatinin kinaze, gdje je zabilježen statistički značajniji porast CK u bolesnika sa lošijim ishodom (ANOVA  $F(5,195)=4.76$ ,  $p<0.0004$ ). Testiranjem razlika koncentracija u točno određenim intervalima postoperativno nađene su statistički značajno više koncentracije CK kod bolesnika s lošijim ishodom 48 i 72 sata postoperativno (Mann-Whitney U test) (slika 58).

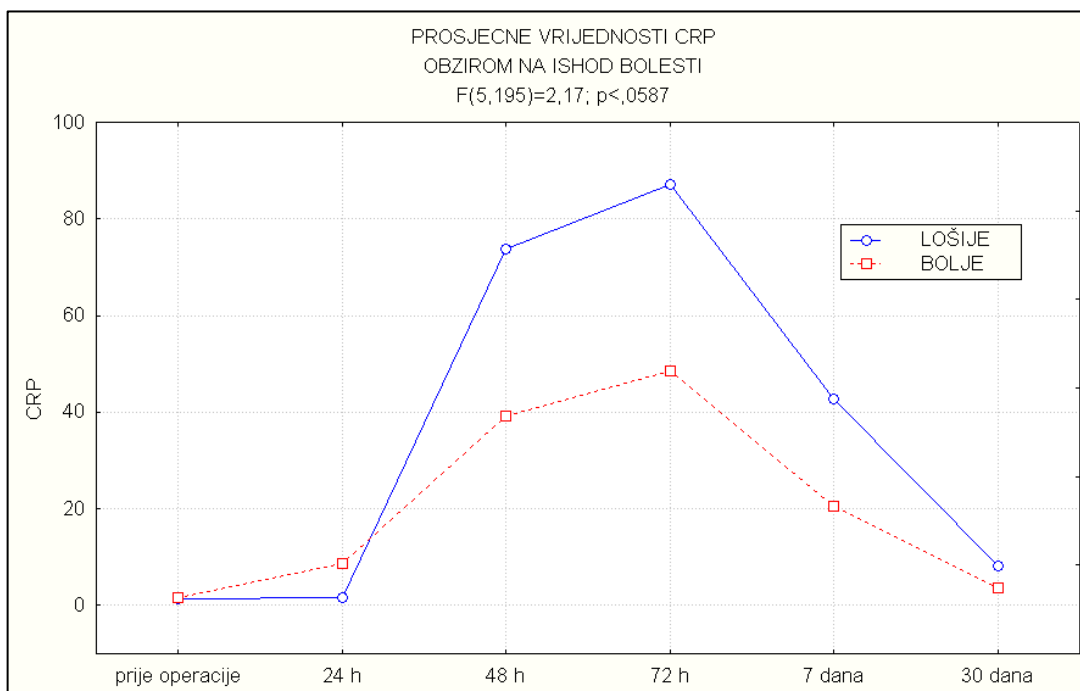
Slika 58. Prosječne vrijednosti CK s obzirom na ishod bolesti



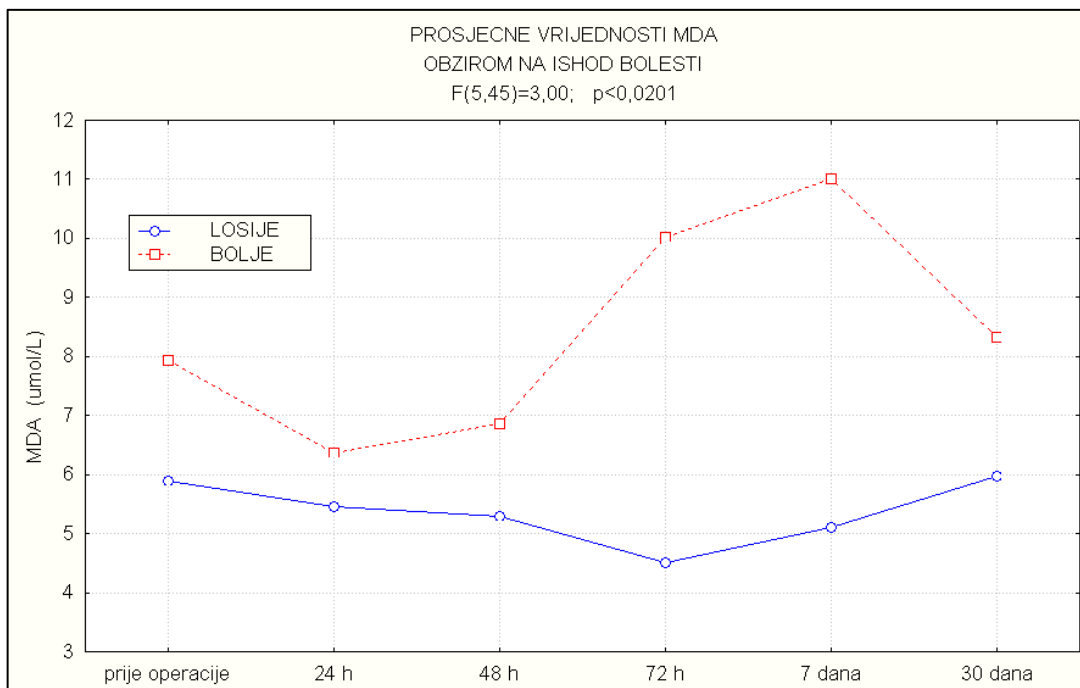
Ako se promatraju koncentracije CRP-a, one su također više 48, 72 sata i 7 dana postoperativno u bolesnika s lošijim ranim postoperativnim ishodom (Mann-Whitney U testom statistički značajno 48 sati nakon zahvata), a testiranjem ove dvije krivulje ANOVA testom, dobije se granično signifikantna razlika (slika 59).



Slika 59. Prosječne vrijednosti CRP-a s obzirom na ishod bolesti



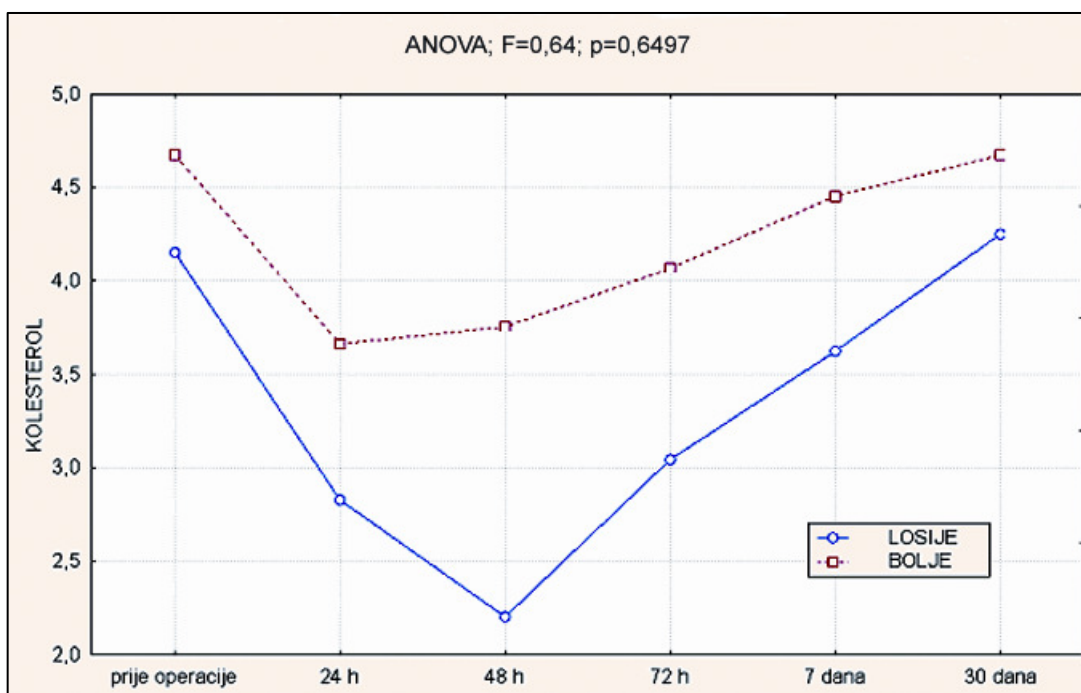
Slika 60. Prosječne vrijednosti MDA s obzirom na ishod bolesti



Koncentracije MDA su od samog početka više u bolesnika s boljim ishodom, a vidi se da one rastu 72 sata postoperativno, postižu maksimum nakon 7 dana, a nakon 30 dana se vraćaju na preoperativne vrijednosti. U bolesnika s lošijim ishodom se praktički ne mijenjaju vrijednosti MDA. ANOVA testom se ove dvije krivulje stoga statistički značajno razlikuju (slika 60).

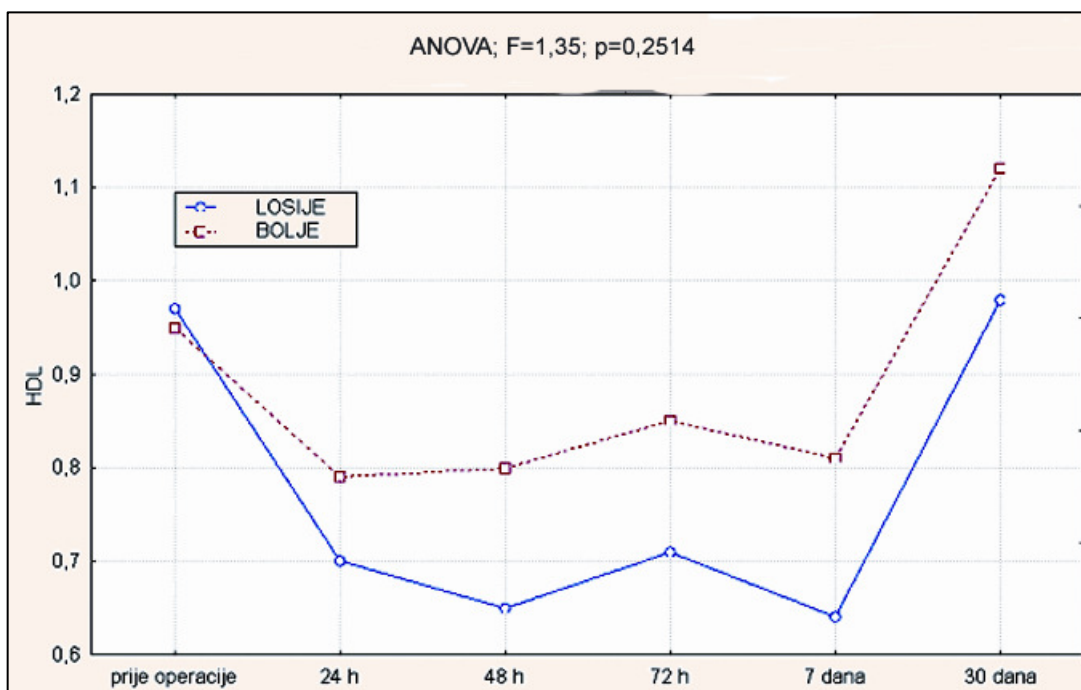
Uspoređujući kretanje koncentracija ukupnog holesterola, vidi se značajniji postoperativni pad serumskih koncentracija u bolesnika koji su imali jedan od neželjenih ishoda. Ako se uspoređuju pojedine vremenske točke Mann-Whitney U testom, bolesnici sa lošijim ishodom imaju statistički značajno niže koncentracije ukupnog holesterola od 48-og sata do 7-og dana postoperativno, a tridesetog dana praćenja koncentracije se izjednačuju, te po holesterolu više ne možemo predmijevati konačni ishod revaskularizacije (slika 61). ANOVA analizom se te dvije krivulje statistički ne razlikuju, kao ni krivulje kretanja koncentracija drugih lipoproteina.

Slika 61. Prosječne vrijednosti ukupnog kolesterola s obzirom na rani ishod revaskularizacije



Kod HDL holesterola je takodjer uočen značajniji pad u bolesnika s lošijim ishodom, a usporedbom u pojedinim vremenskim intervalima, krivulje se značajnije razlikuju takodjer od 48-og sata do 7-og dana, nakon revaskularizacije (slika 62).

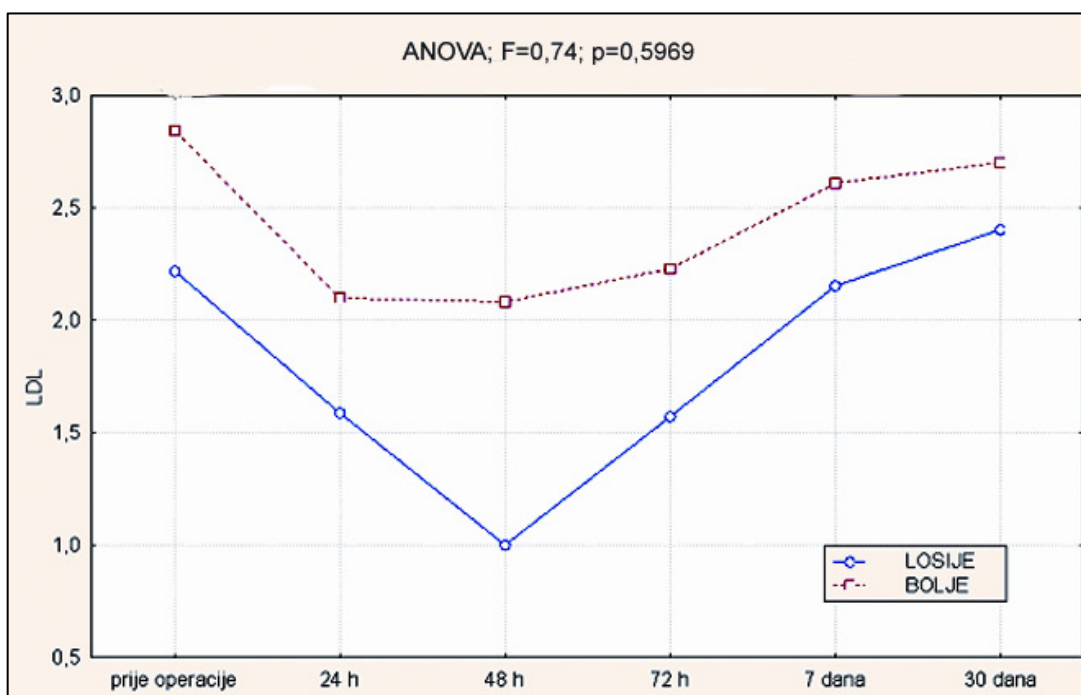
Slika 62. Prosječne vrijednosti HDL kolesterola s obzirom na rani ishod revaskularizacije



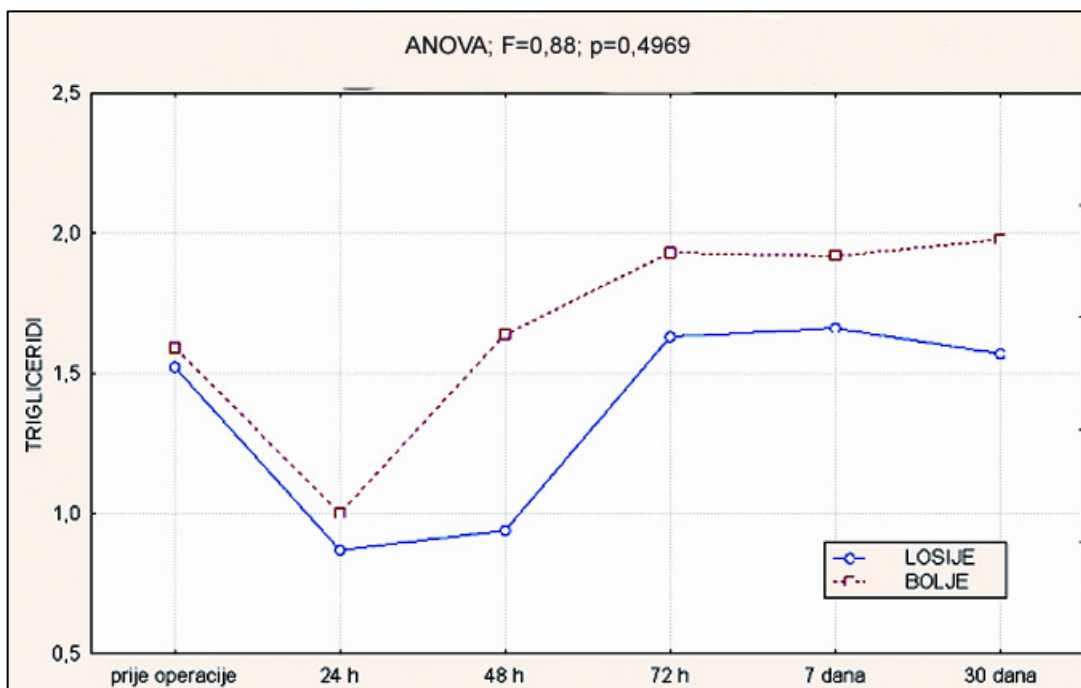
Zanimljive su krivulje kretanja LDL holesterola, gdje je evidentna razlika maksimalna zbog daljnjeg pada koncentracija 48-og sata nakon revaskularizacije u bolesnika s lošijim ishodom, dok se u bolesnika sa boljim ishodom zadržavaju vrijednosti LDL holesterola na razini kao i nakon 24 sata, a obje krivulje se vraćaju na početne vrijednosti sedmog dana (slika 63).

Kod triglicerida je zanimljivo da kod bolesnika sa boljim ishodom dolazi do bržeg oporavka koncentracija, tako da je već 48-og sata kao i preoperativno, a u bolesnika s lošijim ishodom oporavak slijedi nakon još 24 sata. (slika 64).

Slika 63. Prosječne vrijednosti LDL kolesterola s obzirom na rani ishod revaskularizacije



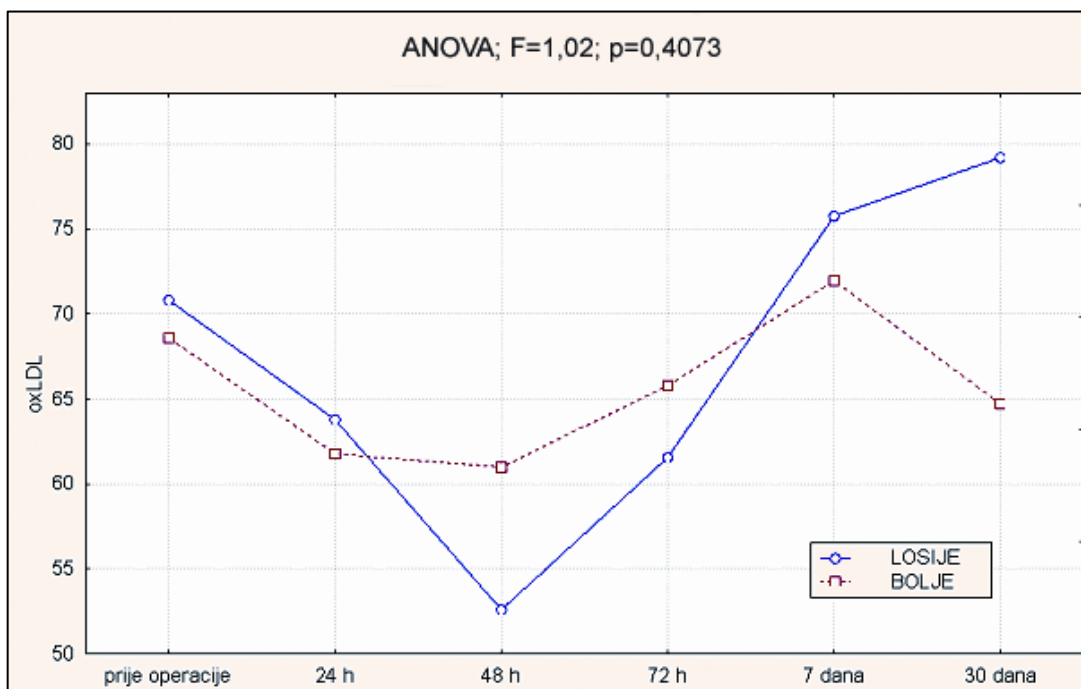
Slika 64. Prosječne vrijednosti triglicerida s obzirom na rani ishod revaskularizacije



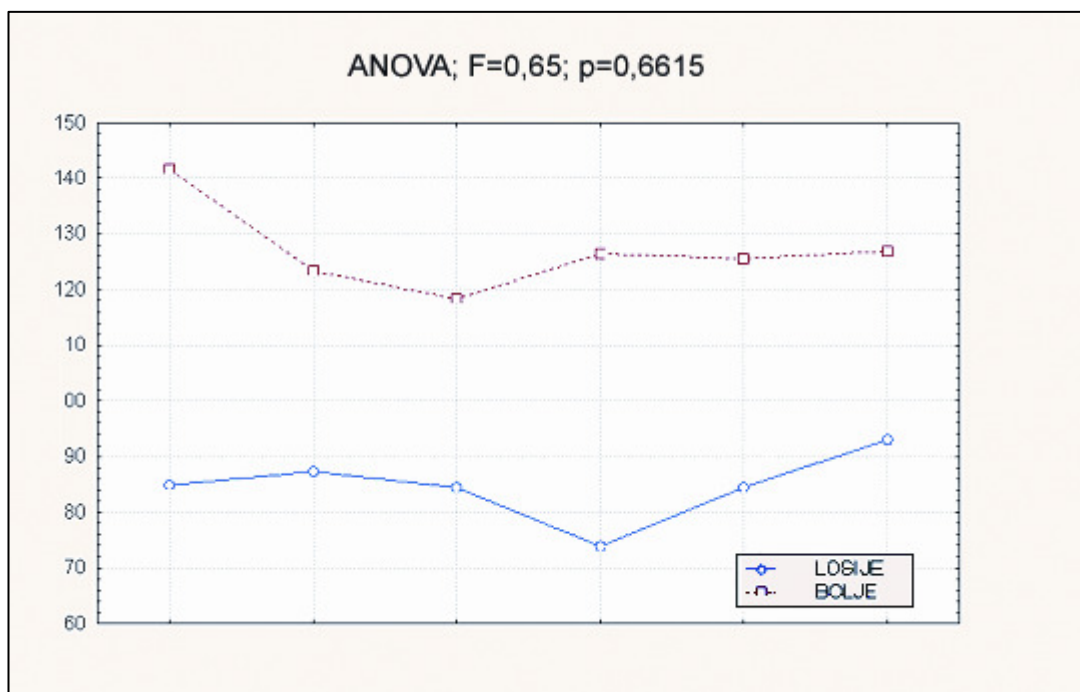
Ako gledamo kretanje koncentracija oksidiranog LDL i antitijela na oksidirani LDL, u prvom slučaju nema statističkih značajnijih razlika u krivuljama s obzirom na ishod, makar je u bolesnika s ranim postoperativnim komplikacijama pad koncentracija izrazitiji 48-i sat, a nakon 30 dana koncentracije statistički signifikantno premašuju one preoperativno, dok se u bolesnika s dobrim ishodom vraćaju na preoperativne (slika 65).

Kod protutijela od samog početka su koncentracije više u bolesnika sa lošijim ishodom, pa rano postoperativno dolazi do statistički značajnijeg pada koncentracija protutijela u odnosu na preoperativne vrijednosti u bolesnika sa lošijim ishodom. S obzirom na ionako niže preoperativne vrijednosti protutijela kod bolesnika s boljim ishodom nije rano postoperativno postignut statistički značajniji pad koncentracija. Također se usporedbom ove dvije krivulje ni usporedbom pojedinih točaka ni ANOVOM ne dobije statistički značajna razlika (slika 66).

Slika 65. Prosječne vrijednosti ox-LDL-a s obzirom na rani ishod revaskularizacije



Slika 66. Prosječne vrijednosti protutijela na oxLDL s obzirom na ishod revaskularizacije



## 5. Rasprava

Ovim mojim istraživanjem u osnovi su uspoređivane dvije skupine bolesnika. Bolesnici podvrgnuti perkutanoj transluminalnoj koronarnoj angioplastici (PTCA) sa implantacijom endoproteza (stentova) i kirurškoj metodi revaskularizacije premosnicama sa ili bez korištenja pumpe.

Kako cilj istraživanja nije bio usporedba uspješnosti ova dva revaskularizacijska postupka, već njihov utjecaj prvenstveno na oksidativni stres i oksidaciju lipoproteina, ali i same promjene u koncentracijama lipoproteina, ispitivanje je provedeno na nerandomiziranim bolesnicima, koji su u našu ustanovu došli na perkutani ili kirurški revaskularizacijski postupak. Međutim, važno je istaknuti da su čak i dvije najcitatiranije novije studije koji uspoređuju uspješnost ova dva revaskularizacijska postupka ARTS I i ARTS II također nerandomizirane (162,163). Razlog tome leži svakako u činjenici da je randomiziran probir bolesnika u dva u osnovi različita revaskularizacijska postupka otežan, tim više što je kirurška revaskularizacija već etablirana i u svom zenitu, dok su perkutane metode još uvijek u tehnološkom napretku i traženju najoptimalnijeg postupka i širenju svojih indikacija. Tako je pojava DES-a (engl. *drug eluting stents*- stentova prekrivenih aktivnim lijekom) značajno smanjila incidenciju ponovnog javljanja suženja na mjestu ranijeg zahvata i time definitivno pomakla mogućnosti perkutanih metoda i u najtežih bolesnika, te ih primakla zlatnom standardu revaskularizacije - kardiokirurgiji (164).

Ako usporedimo demografske podatke iz tih studija, studije TASPIC na populaciji koronarnih bolesnika u Hrvatskoj i demografske podatke u ovom radu, prosječna dob bolesnika je oko 60 godina sa identičnom standardnom devijacijom, s tim da su naši kardiokirurški bolesnici ipak nešto stariji, što je značajno u odnosu na našu grupu perkutano revaskulariziranih bolesnika (tablica 2). To će imati implikacija na težinu aterosklerotskog procesa i način revaskularizacije, što ću u daljnjoj diskusiji i pokazati.

Kao i u ovim, pa i u drugim svjetskim serijama nerandomiziranih i randomiziranih bolesnika i u našoj populaciji je značajno manje revaskulariziranih žena tj. manje od trećine bolesnika (tablica 1). To naravno nije samo posljedica povećane incidencije aterosklerotskih bolesti u muškaraca, što je krasno izdvojeno u novijoj studiji na 2000 mladih asimptomatskih ispitanika

(165), već i manjeg upućivanja žena na dijagnostičke i intervencijske kardiološke i kardiokirurške zahvate, a što nije samo posljedica kliničke slike, niti se time ni ne može u potpunosti opravdati, već potpuno drugačijeg socioekonomskog statusa žena i u naprednijim i ekonomski bogatijim društvima (166). Rezultat je i ovdje identičan sa hrvatskom TASPIC studijom, gdje je oko tek oko trećina žena među bolesnicima hospitaliziranim zbog koronarne bolesti (stabilne angine pectoris i akutnog koronarnog sindroma), što je najvjerojatnije većinom uzrokovano manjom incidencijom koronarne bolesti u toj populaciji, ali kao što je i ranije rečeno, i u ovoj studiji se našlo značajno manje žena među bolesnicima podvrgnutim revaskularizaciji (dva i pol puta manje), što bi sve moglo ukazivati i na njihov potpuno drugačiji socioekonomski status u Hrvatskoj (164).

Po zastupljenosti dijabetičara (tablica 3) naša skupina bolesnika je identična sa postocima u ARTS II (163), Eurospire (167) i TASPIC studiji (164), koja je signifikantno viša no u starijoj ARTS I studiji (162). Inače je zabilježen trend u svjetskoj literaturi, da se u novije revaskularizacijske studije uključuju sve teži bolesnici, a to u svakom slučaju uključuje dijabetičare i to u postotku kao i u ukupnoj populaciji koronarnih bolesnika, tzv. *real life* studije; zato se ni moja studija kao ni ARTS II bitnije ne razlikuju po postotku dijabetičara u odnosu na epidemiološke TASPIC i Eurospire. Mora se i posebno naglasiti da kod dijabetičara nije samo problem težina koronarne bolesti (20), već su i rezultati revaskularizacije signifikantno lošiji u multivarijantnim analizama, naročito ako se bolesnici podvrgnu perkutanoj koronarnoj revaskularizaciji. To se prvenstveno odnosi na potrebu za ponovnom revaskularizacijom unutar godine dana po zahvatu, gdje su u dijabetičara zabilježeni lošiji rezultati u multižilnoj bolesti usprkos upotrebi stentova. Čak ni upotreba DES-a tj. stentova prekrivenih aktivnom supstancom, citostatikom (u ovim studijama sirolimusom), koji signifikantno reducira postotak restenoza u odnosu na samu balon dilataciju i upotrebu klasičnih stentova nije u potpunosti riješila problem restenoza. Stoga je u dijabetičara kardiokirurška revaskularizacija, naročito u višežilnoj, difuznoj bolesti još uvijek zlatni standard, jer su svi ti faktori rizik za neuspjeh perkutanog revaskularizacijskog zahvata (162,163).

Hipertenzija je značajan faktor rizika za koronarnu bolest, te je u svim istraživanjima, kao i u mojem nađena u dvije trećine bolesnika (162,163,164).



Važno je izdvojiti porazan podatak da je u našoj populaciji značajno viši postotak pušača i to 2 do 3 puta, odnosno čak 60% pušača, u odnosu na 30% bolesnika u starijim publikacijama u razvijenim zemljama, odnosno 33% bolesnika u TASPIC studiji (164). Zašto je signifikantno viši postotak pušača u ovoj studiji u odnosu na TASPIC teško je objasniti jer se radi o istoj populaciji u Hrvatskoj, te taj podatak ukazuje da su se u ovoj studiji za revaskularizaciju probrali s većom vjerojatnošću pušači, te ih je zato duplo više u odnosu na ukupnu populaciju svih hospitaliziranih koronarnih bolesnika. Važno je istaknuti i da se u novijim istraživanjima postotak pušača u razvijenom svijetu smanjuje i na ispod 20% (163). Dakle, pušenje je kod nas još uvijek značajan javnozdravstveni problem, za sada po ovom istraživanju bez bitnije tendencije ka smanjivanju. Makar je potrebno napomenuti da sa pozicije intervencijske kardiologije pušači imaju signifikantno nižu incidenciju značajnih kardiovaskularnih događanja nakon učinjene perkutane revaskularizacije u akutnom koronarnom sindromu, što je zabilježeno i nakon fibrinolize, a i u nekim radovima i smanjenju incidenciju restenoze (168,169). Međutim taj *pušački paradoks* je gotovo sigurno posljedica bržeg razvoja aterosklerotskog procesa, te se manifestna koronarna bolest kod pušača nažalost javlja i dekadu ranije, pa ti bolesnici nemaju druge faktore koji utječu na brzi razvoj teške ateroskleroze. Koronarni bolesnici koji puše su dakle mlađe dobi, muškarci, sa manjom incidencijom teške hipertenzivne bolesti, dijabetesa, difuznih aterosklerotskih promjena na koronarnim žilama, te u multivarijantnim analizama, uzimajući u obzir i druge osnovne faktore rizika ni u kom slučaju nemaju bolju prognozu nakon učinjene revaskularizacije (170,171,172). Isti slučaj je i sa bolesnicima koji su kirurški revaskularizirani, gdje je dokazano da imaju češće postoperativne respiratorne komplikacije (173), a i signifikantno veću smrtnost i ponovne revaskularizacijske procedure dugogodišnjim praćenjem u bolesnika koji su i nakon aortokoronarnog premoštenja nastavili pušiti (174).

Hiperlipoproteinemija je zabilježena i u naših bolesnika, sa istom incidencijom kao i u ARTS I i II studiji (oko 60% bolesnika) (162,163). Nije bilo signifikantne razlike u koncentracijama ukupnog kolesterola, triglicerida i HDL kolesterola između bolesnika podvrgnutih kardiokirurškoj ili perkutanoj revaskularizaciji, dok su koncentracije LDL-a bile značajnije više u bolesnika

predviđenih za PTCA. Za LDL bi se to moglo objasniti jer je čak 2x više kirurških pacijenata preoperativno bilo na terapiji statinima (oko 80% kirurških, a 40% kardioloških pacijenata je uzimalo statine), a navjerovatnije zbog toga što je većina kardiokirurških bolesnika ipak prošla kardiološku obradu prije upućivanja na zahvat, dok je veći dio bolesnika predviđenih za interventni kardiološki zahvat zbog jednostavnosti učinjeno u istom boravku kad je i dijagnosticirano, te su došli uglavnom bez prethodne detaljne kardiološke obrade i terapije, iz hitne službe ili upućeni od liječnika primarne zdravstvene zaštite. I u ovoj izabranoj maloj populaciji bolesnika dobili smo zanimljive podatke o terapiji statinima, gdje postotak bolesnika na statinima koji su predviđeni za PTCA odgovara europskoj Eurospire studiji, dok je niži od postotka TASPIC pacijenata (40% moja studija, 42% Eurospire, 57% TASPIC). Zanimljivu visoku incidenciju uzimanja statina (oko 80%) u kardiokirurškoj skupini se može objasniti boljim *compliance*-om bolesnika kojima predstoji veliki operativni zahvat, a to definitivno ohrabruje, kad se zna za njihovu veliku važnost u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarne bolesti (175). Ponovno bi istaknuo i važnost podatka da je od svih lipoproteina, samo koncentracija LDL-a signifikantno niža u kardiokirurških bolesnika, dok su ostali lipoproteini isti i u bolesnika kojima je učinjen PTCA i aortokoronarno premoštenje, bez obzira na duplo veći broj bolesnika na terapiji statinima kirurških bolesnika. To je zapravo jedan od dokaza da dosadašnja terapija relativno nižim dozama statina utječe samo na signifikantnu redukciju koncentracija jednog od lipoproteina tj. LDL-a, a novija istraživanja ukazuju da su za utjecaj na druge komponente lipoproteina, a pogotovo za antiinflamatorni efekt potrebne definitivno više doze statina, što naravno nosi i neke rizike (176).

Prije diskusije rezultata preoperativnih koncentracija oksidiranog LDL-a i protutijela na oksidirani LDL, važno je istaknuti da su se skupine bolesnika s obzirom na način revaskularizacije statistički značajno razlikovale po broju zahvaćenih krvnih žila, gdje je razlika između *on-pump* bolesnika i bolesnika za PTCA najveća, a što bi ukazivalo na trend da se teži bolesnici ako ih strogo ne randomiziramo, upućuju na kardiokiruršku revaskularizaciju, te je naša praksa u skladu s modernim uputstvima upućivanja bolesnika na revaskularizacijske postupke (177). To je i uzrokovalo da je PTCA u preko 50% bolesnika učinjena na jednoj koronarnoj arteriji, dok je u *off-pump* i *on-pump* kirurgiji u preko 50%

bolesnika revaskularizirano dvije ili tri žile, ponaosob (Tablica 8,9). Težina koronarne bolesti po kanadskoj klasifikaciji se ne razlikuje statistički signifikantno u pojedinoj grupi bolesnika, čak su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom (u ovom slučaju nestabilnom anginom pectoris) češće revaskularizirani perkutano, tj. gotovo pola bolesnika predviđenih za PCI ima težu simptomatologiju (CCSC III/IV), a tek trećina kirurških revaskulariziranih bolesnika, makar ta razlika ne dostiže statističku signifikantnost (Tablica 7). Što se tiče ishoda revaskularizacije u ranom postoperativnom periodu i tridesetdnevnom praćenju, kardiokirurški bolesnici su očekivano signifikantno imali više neželjenih događaja, što zbog načina revaskularizacije koji je više traumatičan, ali i definitivno, kao što je navedeno ranije, zato što su ti bolesnici teži, sa difuznom koronarnom bolesti, a u *on-pump* grupi i signifikantnim difuznim aterosklerotskim promjenama i na drugim velikim krvnim žilama. Viši postotak neželjenih događaja u ovoj grupi bolesnika u ranom postoperativnom periodu u odnosu na bolesnike iz ARTS studija se može objasniti strožim kriterijem za neželjene događaje. Naime u ARTS studiji su neželjeni događaji samo smrt, akutni infarkt miokarda i cerebrovaskularni incident (162,163), dok su u naših bolesnika to i ehokardiografske/elektrokardiografske promjene, tj. i minimalne segmentalne promjene sistoličke funkcije lijevog ventrikla, postoperativna kardijalna dekompenzacija, respiratorna insuficijencija, početna renalna disfunkcija, gastrointestinalna krvarenja, reoperacije zbog operativnih komplikacija i sl., osim infekcija. Važno je reći da je i u ARTS II studiji incidencija neželjenih događanja neposredno postoperativno i u prvih trideset dana signifikantno viša u kardiokirurških bolesnika, bez obzira što je u tim studijama i pacijentima kojima su implantirani stentovi intervencija uvijek učinjena na više žila kao i u kardiokirurških bolesnika (162,163). To naravno dokazuje činjenicu da je za razliku od dugogodišnjeg praćenja, gdje u revaskularizaciji višežilne koronarne bolesti za sada kardiokirurgija ima veliku prednost, neposredan perioperativni i kratkotrajni postoperativni tijek definitivno je sa manje rizika u bolesnika kojima je učinjena perkutana koronarna revaskularizacija.

Važan podatak u ovom istraživanju je da je u populaciji naših hipertoničnih bolesnika, sa već razvijenom teškom koronarnom aterosklerotskom

bolesti nađena signifikantno viša koncentracija protutijela na ox-LDL, dok su koncentracije samog ox-LDL-a nesignifikantno povišene u usporedbi s normotenzivnim bolesnicima (Slika 10).

Naime u mnogim dosadašnjim istraživanjima je dokazano da je hipertenzija čvrsto povezana s oksidativnim stresom, te da su mnogi patofiziološki procesi u toj bolesti posljedica oksidativnog stresa, a ne samo povišenih tlakova i reološki efekt u krvožilju (19,178,179). Tijekom oksidativnog stresa dolazi i do pojačane oksidacije lipoproteina, odnosno produkcije ox-LDL-a, kao jedne od najvažnije molekule u nastanku i progresiji aterosklerotske bolesti (180). Povećana produkcija ox-LDL-a je u hipertenziji dijelom i posljedica povišenih koncentracija angiotezina II u plazmi i tkivima, koji preko AT1 receptora na makrofazima stimulira aktivnost lipoksigenaze i oksidaciju lipoproteina (18,181). Zanimljivo je da se taj utjecaj angiotenzina II može spriječiti blokatorima AT1 receptora, ali ne ACE inhibitorima, a postoje i dva istraživanja (VAL-PREST i VALVACE) gdje je dokazana prevencija restenoze primjenom AT1 blokatora valsartana, ali ne i ACE inhibicijom (182,183). Zašto se u grupi naših bolesnika nije našla signifikantno povišena koncentracija ox-LDL, kao u većini istraživanja sa hipertoničnim bolesnicima (184), može se objasniti time što je ovo odabrana grupa bolesnika sa stabilnom i nestabilnom slikom i već difuznom koronarnom bolešću u kojoj je već ionako povišena koncentracija oksidiranog LDL-a, a što je u skladu s dosadašnjom literaturom (127). Stoga u toj grupi bolesnika tek nešto povišene koncentracije ox-LDL-a u hipertoničara u odnosu na normotenzivne nisu dostigle signifikantnost. Osim toga svi naši bolesnici su već duže vrijeme na antihipertenzivnoj terapiji, a što bi djelomično moglo utjecati na momentalne koncentracije oksidiranih formi lipoproteina, a naročito terapija valsartanom, blokatorom AT1 receptora (182,183).

Što se tiče terapije statinima, bez obzira što je bilo puno bolesnika s difuznom, teškom koronarnom aterosklerotskom bolešću i hipertenzijom, kod kojih bi se baš očekivale signifikantno povišene koncentracije oksidiranih formi LDL-a, baš ti bolesnici su u 80% slučajeva bili na terapiji statinima, što je definitivno utjecalo na nešto niže koncentracije LDL-a (što je i nađeno u ovoj grupi bolesnika), ali i ox-LDL-a, u skladu s nekim dosadašnjim istraživanjima (185,193), makar ima i kontradiktornih rezultata, čak i tranzitorno povišenih

vrijednosti oxLDL-a nakon terapije statinima, a što će biti opisano kasnije (192). Da bi se dostigla željena signifikantnost, grupe bolesnika bi trebale biti puno veće, randomizirane, sa strogom kontrolom terapijskih utjecaja antihipertenziva i statina multivarijantnim analizama u odvojenim istraživanjima za pojedine lijekove.

Druga stvar je s protutijelima na oksidirane forme lipoproteina u hipertoničnih bolesnika. Naime imunološki proces nije podložan kratkotrajnim utjecajima terapije, a i potrebno je duže vrijeme da hipertenzivna bolest uzokuje promjene na krvožilju, te prema tome povoljna stvar u analizama koncentracija protutijela je njihova veća stabilnost kroz vrijeme (186). Prije analize rezultata i utjecaja hipertenzije na imunološki proces u koronarnoj bolesti, važno je još napomenuti da u svim dosadašnjim eksperimentima osim što postoje različite forme oksidiranih lipoproteina, sama molekula ox-LDL-a ima mnoštvo epitopa, a time naravno i mnoštvo različitih protutijela na oksidirani LDL, sa mogućnošću unakrsne reakcije, te je teško standardizirati njihovu analizu i uspoređivati rezultate različitih istraživanja (187). Ta činjenica otežava istraživanja utjecaja protutijela na razvitak i progresiju aterosklerotske bolesti. Međutim, bez obzira na različite forme, definitivno je dokazana njihova uloga u oksidativnom stresu, oksidaciji lipoproteina, poremećenoj vazodilataciji, te njihova proinflamatorna uloga, što je sve, kao što je i istaknuto u uvodu, osnova patofiziologije aterosklerotskog procesa (186). Dakle, poznato je da u uznapredovaloj hipertenzivnoj bolesti dolazi do značajnih promjena u imunološkom odgovoru, kao što je smanjeni odgovor T-stanica, smanjena funkcija komplementa, te povećane koncentracije imunoglobulina (148,149). Promjene su nađene čak i u blagoj, graničnoj hipertenziji, kao što su povećane koncentracije protutijela na endotelne stanice, faktor aktivacije trombocita, heat-shock protein 65 (2,150).

S obzirom da su u hipertenzivnih bolesnika nađene povišene vrijednosti oksidiranog LDL, kao posljedica imunološkog odgovora, očekivala bi se i povišena koncentracija protutijela na ox-LDL. Izuzetno je zanimljivo da je baš na hipertenzivnoj bolesti pokazano da koncentracija protutijela ovisi o težini bolesti, neovisno o aterosklerozi (7). Tako su kod granične hipertenzije nađene normalne vrijednosti ox-LDL-a, ali zanimljivo snižene vrijednosti protutijela na ox-LDL (7). Kod umjerene hipertenzije su nađene povišene vrijednosti oksidiranog LDL-a, ali nisu nađene promjene u koncentracijama protutijela na oksidirane forme

lipoproteina. Također koncentracija oksidiranog LDL-a i protutijela nije ovisila o aterosklerotskim promjenama na velikim krvnim žilama vrata, te je i to dokaz da hipertenzija neovisno o aterosklerotskom procesu dovodi do oksidativnih promjena u lipoproteinima (184). I na kraju, kod hipertoničara s već razvijenom, dugotrajnom hipertenzivnom bolesti, u nekim radovima, osim povišenih koncentracija ox-LDL-a, nađene su i signifikantno povišene koncentracije protutijela na oksidirane forme LDL-a (188).

I u ovom istraživanju, bez obzira na težinu aterosklerotske koronarne bolesti i raširenost aterosklerotskog procesa i na druge krvne žile, u hipertoničnih bolesnika je nađena signifikantno viša koncentracija protutijela na ox-LDL, u odnosu na grupu normotenzivnih bolesnika sa koronarnom bolesti. Dakle bez obzira na očekivano više koncentracije protutijela u teškoj, klinički signifikantnoj aterosklerotskoj bolesti srca u kojoj bi se mogle očekivati promjene koje ukazuju na povećanu produkciju oksidiranih formi LDL-a, te imunološke promjene koje bi ukazivale na proinflatonu prirodu ateroskleroze, hipertenzija dodatno utječe na povećanu produkciju protutijela na ox-LDL-a. Njihovu ulogu u samom aterosklerotskom procesu možemo baš objasniti navedenim istraživanjima gdje su nađene različite koncentracije protutijela u raznim fazama hipertenzivne bolesti. Tako bi u početku niže, odnosno normalne koncentracije protutijela ukazivale na njihov pojačani klirens, ali i klirens oksidiranih formi lipoproteina za koji se vežu, te tako djeluju protektivno u razvoju aterosklerotskog procesa,. To je i u skladu s istraživanjima da eksperimentalne životinje imunizirane na ox-LDL imaju povišene koncentracije protutijela, tj. klirens ox-LDL-a i stoga inhibiciju nastanka ateroskleroze (9,189). Naprotiv, u uznapređaloj hipertenzivnoj i aterosklerotskoj bolesti srca protutijela mogu imati baš proinflatornu funkciju i ponašati se slično kao i druga antifosfolipidna, tj. utjecati značajno na progresiju aterosklerotskog procesa (64). U takvu skupinu spadaju najvjerojatnije i naši bolesnici.

Preoperativne koncentracije ox-LDL-a i antitijela na ox-LDL u ovoj studiji se nisu razlikovale s obzirom da li su bolesnici bili dijabetičari ili pušači, u odnosu na one bez tih faktora rizika, makar su u nekim studijama nađene povišene vrijednosti ox-LDL i anti ox-LDL-a (130,131,139,141), ali nađeni su i kontroverzni rezultati (142,190,191) . To i ne iznenađuje, jer su mnoga novija

istraživanja jasno ukazala, da je za koncentracije oksidiranih formi lipoproteina i protutijela na oksidirani LDL, naročito u dijabetičara izrazito bitan stadij bolesti, a naročito konkomitantne bolesti (190,191), a svi naši bolesnici su sa izrazito uznapredovalom aterosklerotskom koronarnom bolesti.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je i promatranje koncentracija ox-LDL-a i protutijela na ox-LDL, ne samo u odnosu na druge faktore rizika, kao što je do sada izneseno, već svakako i utjecaj stabilnosti i nestabilnosti kliničke slike koronarne bolesti, te utjecaj raširenosti aterosklerotskog procesa na lipidnu peroksidaciju i imunološki odgovor na nju.

Prvo, nije nađena razlika ni u koncentracijama samog oksidiranog LDL-a ni protutijela, bez obzira da li su bolesnici imali stabilnu anginu pektoris sa simptomima samo u većem naporu (po kanadskoj klasifikaciji CCSC I i II) ili anginu pektoris i u manjem naporu, odnosno nestabilnu anginu pektoris (po kanadskoj klasifikaciji III i IV) (Slika 12 i 13). Razlog tomu svakako leži s obzirom na podvrstu ox-LDL-a i protutijela koje su određivane u ovoj studiji. Naime po literaturnim podacima u akutnom koronarnom sindromu nađene su značajno više koncentracije samo malondialdehid modificiranog LDL-a (127,132,133) koje su čak korelirale sa serumskim koncentracijama troponina (134,135) te povišene koncentracije protutijela na MDA modificiranog LDL-a (143), dok u odnosu na druge forme ox-LDL-a i protutijela kao i u ovom radu, uglavnom nije nađeno značajnijih promjena s obzirom na kliničku nestabilnost koronarne bolesti (135,139,140).

Statistički značajno više preoperativne koncentracije oxLDL prisutne kod bolesnika koji su podvrgnuti kiruškoj revaskularizaciji u odnosu na PTCA mogu se djelomično objasniti starijom životnom dobi bolesnika podvrgnutih kardiokiruškom zahvatu poznavajući pozitivnu korelaciju porasta oxLDL-a sa dobi (127,128,129,170,175,176), većom raširenosti aterosklerotske bolesti odnosno prisutnošću nestabilnih aterosklerotskih plakova koji su potencijalni izvor oxLDL-a (115), no čini se da bi i tu mogao biti prisutan i utjecaj terapije statinima, koji iako smanjuju koncentraciju LDL-a kao prekursorske čestice za nastanak oxLDL-a, po novijim istraživanjima, na još uvijek neobjašnjiv način mogu uzrokovati tranzitorno povećanje određenih formi oxLDL-a (192). U najvećoj prospektivnoj studiji do sada (*In The Myocardial Ischemia Reduction*

with Aggressive Cholesterol Lowering (*MIRACL*) Trial) u kojoj su se ispitivali utjecaji statina na oxLDL, kod 2341 pacijenta određivan je oxLDL-E06 (kao oxPL/apoB) na početku i nakon 16 tjedana terapije sa 80mg/d atorvastatinom ili placeboom i dokazan je 10% porast oxLDL-a (kao oxPL/apoB) zajedno sa 30% padom LDL kolesterola kod pacijenata koji su bili na terapiji atorvastatinom u odnosu na početne vrijednosti. Također primjećen je 25% porast oxLDL-a (kao oxPL/apoB) kod pacijenata koji su bili na dijeti sa malo masti (192). Iako dugoročno gledano terapija statinima uzrokuje apsolutni pad apoB-OxPL, čini se da u početnom radzoblju dolazi do mobilizacije oxLDL-a iz nestabilnih plakova i prijelaz u plazmu, te vezanje za apoB sa ciljem ostvarivanja klirensa oxLDL iz organizma (192). Vjerujem da je upravo kombinacija navedenih čimbenika značajno utjecala na preoperativno veće koncentracije oxLDL-a kod pacijenata koji su išli na kirušku revaskularizaciju. Manje studije istražujući istu problematiku pokazale su kontradiktorne rezultate od navedenih (193). Autori navode statistički značajan pad oxLDL/LDL kod pacijenata koji su na terapiji statinima, a imaju angiografski dokazanu višežilnu koronarnu bolest u odnosu na pacijente koji nisu na terapiji. Kako se u tim studijama ne navode koncentracije oxLDL/LDL prije započinjanja terapije statinima, definitivni zaključci na temelju tih rezultata se ne mogu izvesti.

Nadalje, značajan pad koncentracije oxLDL-a i protutijela na oxLDL poslije revaskularizacije, prisutan u obje grupe ispitanika može se na temelju velikog broja empirijskih dokaza pripisati aktivaciji imunološkog sustava i sustavnog upalnog odgovora koja nastaje kao posljedica zahvata, o čemu ću diskutirati kasnije. No neočekivana diversifikacija rezultata u izostanku statistički značajne preoperativne razlike kod protutijela na oxLDL, u odnosu na PTCA i kirušku revaskularizaciju iako postoji statistički značajna razlika na oxLDL postaje posebno zanimljiva ako se u obzir uzmu imunomodulacijska svojstva statina (194). Recentna istraživanja pokazuju da statini *in vitro* učinkovito smanjuju ekspresiju MHC-II molekula koji su stimulirani INF-gama, štoviše ta je represija strogo ograničena na iducibilne forme MHC-II molekula i ne zahvaća konstitutivno eksprimirane MHC-II na dendritičkim stanicama ili limfocitima B. (195). Na temelju iznesenog sugerirao bi da su statini preko svog imunomodulacijskog djelovanja značajno utjecali na relativno niže koncentracije



protutijela protiv epitopa ox-LDL kod pacijenata koji su bili predviđeni za kirušku revaskularizaciju (80% na terapiji statinima) modulirajući imuni odgovor preko MHC II molekula, te bi daljnja istraživanja koristeći prospektivne, randomizirane studije svakako ponudila dodatna objašnjenja u tom području, te potvrdili ili odbacili iznesenu hipotezu.

Pad protutijela na oxLDL prisutan kod kardiokirurških bolesnika kao i kod bolesnika podvrgnutim PTCA (slika 26.) neposredno odmah nakon zahvata vjerovatno je posljedica akutnog formiranja imunih kompleksa (196). Ako pretpostavimo da je pri zahvatu prisutan akutni porast oxLDL čestica koji nastaje kao posljedica oksidativnog stresa koji je prisutan u obje vrste revaskularizacijskog zahvata, također je sigurno pretpostaviti da dolazi do reakcije spajanja epitopa oxLDL-a sa komplementarnim protutijelima na oxLDL što za posljedicu ima smanjenje koncentracije cirkulirajućih protutijela i samog oxLDL-a. Štoviše neki autori sugeriraju da je upravo ta reakcija dokaz pozitivnog djelovanja tih antitijela (196), koji činom formiranja imunih kompleksa štite endotel od štetnog djelovanja oxLDL čestica. Porast koncentracije protutijela na oxLDL koji se vidi nakon 7 dana kod bolesnika podvrgnutih PTCA vjerovatno predstavlja anamnestički odgovor ili čak sintezu potpuno novih protutijela na druge epitope oxLDL-a ciljano specifičan za PTCA bolesnike. Da li je uloga tih protutijela na oxLDL protektivna ili štetna po organizam još uvijek ostaje nejasno, iako studije na animalnim modelima ukazuju da imunizacija životinja sa oxLDL dovodi do porasta antitijela na oxLDL, pruža zaštitu od ateroskleroze (189).

Razlike između preoperativnih koncentracija oxLDL-a u odnosu na broj revaskulariziranih žila nije bilo, što podržava tezu da proširenost koronarne ateroskleroze ne mora sigurno značiti i povišenje koncentracije oxLDL-a, a što je u skladu sa navodima iz literature (135).

Iako se primarno radi o dva različita revaskularizacijska postupka rezultati mog istraživanja pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između bolesnika podvrgnutih PTCA ili kiruškoj revaskularizaciji u postoperativnom toku kretanja koncentracija oxLDL i protutijela na oxLDL (slika 25. i 26.) ukazujući da vrsta revaskularizacijskog zahvata ne uzrokuje razliku između koncentracija oxLDL i posljedičnog imunog odgovora. Iako su neke studije pokazale porast oxLDL-a i protutijela usmjerenih na epitope oxLDL-a nakon PCI zahvata (196),

taj porast se ne pokazuje u našoj studiji. Vjerovatni razlog tome je primjena različite metodologije i različiti vremenski intervali uzimanja uzoraka. Tsimikas et al. su pokazali da postoji porast oxLDL-a unutar 6h nakon kojeg slijedi pad i povratak na početne vrijednosti unutar 24h. No nedostatak te studije leži u činjenici da nije rađena korelacija kretanja oxLDL-a i protutijela na oxLDL sa pojavnosti neželjenih srčanih događanja tako da nije moguća potpuna usporedba rezultata. Interpretirajući moje rezultate moguće je zaključiti da iako operativni zahvat predstavlja veću traumu tkiva i producira veće količine oksidativnog stresa u odnosu na PTCA, nema utjecaj na produkciju oxLDL i protutijela na oxLDL tako da nastanu statistički značajne razlike u odnosu na PTCA. Objašnjenje tog fenomena najvjerovatnije leži u činjenici da niti kirurška revaskularizacija niti PTCA u suštini ne mijenjaju stupanj proširenosti aterosklerotske bolesti, a koja je ključan čimbenik u produkciji oxLDL-a, a i poznato je da su nestabilni aterosklerotski plakovi glavni izvor oxLDL-a. (197). Iako je nedvojbeno dokazano da za vrijeme kirurškog revaskularizacijskog postupka (CABG) dolazi do značajnog porasta oksidacijskog stresa (radikala) za vrijeme intermitentne ishemije-reperfuzije (198), što je i bila osnova za formiranje moje hipoteze, tek su najnovija istraživanja ukazala da iako lipidi plazme i lipoproteini za vrijeme CABG operacije prolaze kroz niz oksidativnih modifikacija, da se velika većina oksidativne modifikacija i produkcije oxLDL-a ipak odvija u stjenci krvne žile, a ne u plazmi (115,199). Nadalje, poznata je jaka antioksidativna aktivnost plazme, koja je bogata antioksidansima i može znatno utjecati na proizvodnju oksidativnih formi-radikala (115). Shodno tome, iako možemo pretpostaviti da je oksidativni stres puno veći kod CABG operacije u odnosu na PTCA, on je primarno prisutan u plazmi i vrlo brzo se neutralizira antioksidativnim djelovanjem plazmatskih molekula, te kao takav nema utjecaja na oksidativnu modifikaciju LDL-a, koja se primarno odvija u stjenci krvne žile (115,199). Vjerujem da je upravo to razlog zašto nije bio statistički značajne razlike u post revaskularizacijskom kretanju koncentracija oxLDL-a i anti-oxLDL-a između CABG operacije i PTCA.

Moji rezultati također ukazuju da se oxLDL i protutijela na oxLDL ne mogu smatrati prognostičkim čimbenicima ranog ishoda revaskularizacijskog zahvata, neovisno o metodi revaskularizacijskog postupka, kao što ni lošiji rani ishod zahvata ne potencira pušenje, šećerna bolest i hipertenzija, kao ni CCSC

klasifikacija težine koronarne bolesti, pa ni broj zahvaćenih i operiranih koronarnih krvnih žila. Ali moji rezultati definitivno pokazuju veliku signifikantnost proširenosti periferne aterosklerotske bolesti i značajnost zahvaćenosti velikih krvnih žila vrata na rani postoperativni tijek, što je u skladu s podacima iz literature (200), te nepohodnost preoperativne ultrazvučne dijagnostike perifernih krvnih žila, aorte i velikih krvnih žila vrata, koja se doduše rutinski provodi gotovo u svih naših kirurških bolesnika, ali ne i u bolesnika planiranih za perkutane metode (Tbl.12-19).

Jedna od većih studija koja se je bavila prognostičkom značajnosti periferne aterosklerotske bolesti pokazala je da pacijenti sa koronarnom bolesti i klinički evidentnom nekoronarnom aterosklerozom predstavljaju skupinu visokog rizika i veću mogućnost lošijeg konačnog ishoda u odnosu na pacijente sa izoliranom koronarnom bolesti (200). Ti pacijenti u pravilu češće imaju šećernu bolest, hipertenziju i u većem obujmu puše. Iako naši rezultati ne pokazuju značajnost pušenja, hipertenzije i šećerne bolesti kao prediktora lošijeg ranog ishoda nakon revaskularizacijskog zahvata, jasno je da je koronarna i nekoronarna periferna aterosklerotska bolest zajednička posljedica svih navedenih čimbenika rizika (6). Naši pacijenti sa prisutnom nekoronarnom aterosklerotskom bolesti su statistički značajno starije životne dobi, shodno tome i slabijeg općeg stanja te je i mogućnost ranih komplikacija kod njih veća. Upravo naglašenost periferne aterosklerotske bolesti u mojim rezultatima kao jedinog značajnog prediktora mogućih ranih komplikacija ukazuje na veći utjecaj posljedice djelovanja čimbenika rizika nego samih čimbenika u incidenciji ranih neželjenih srčanih događanja. Izneseno sugerira da bi se daljnja istraživanja prognostičke značajnosti upravo trebala usmjeriti na međudnos oxLDL i periferne aterosklerotske bolesti, koja se navodi i kao izvor oxLDL čestica te biokemijskih markera karakterističnih i specifičnih za aterosklerotsku bolest.

Iako su preoperativno koncentracije LDL-a bile statistički značajno niže kod bolesnika predviđenih za kardiokirurški zahvat, što sam već objasnio boljom preoperativnom pripremom i adekvatnom medikacijom statinima tih bolesnika, poslijeoperativni tijek se neovisno o tome značajno razlikuje između te dvije skupine. Jasno je da sam kardiokirurški zahvat predstavlja značajno veću traumu organizma od PTCA i aktivira u puno većem opsegu kaskadu cijeljenja tkiva, koja

je po svojim fiziološkim karakteristikama i aktivaciji kaskade citokina slična upali te shodno tome i dolazi i do značajnijeg postoperativnog pada svih plazmatskih varijabli (LDL, trigliceridi, kolesterol) koji imaju ulogu izvora energije i strukturnih elemenata stanice, te porast CK i CRP, sukladno traumi tkiva i opsegu upalne reakcije što jednostavno objašnjava negativnu korelaciju kreatin kinaze (CK) i ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL-a.

Štoviše prethodne studije koje su se bavile problematikom postoperativnog pada triglicerida i LDL kolesterola nakon kiruške revaskularizacije sa ciljem definiranja minimalnog postoperativnog perioda za dijagnosticiranje dislipoproteinemija navode emotivni preoperativni stres i akutne bolesti i stanja kao glavne uzroke postoperativnog pada LDL-a, triglicerida i HDL-a tipično karakterističan za kiruške bolesnike (201). Kako je većina pacijenata koji su bili podvrgnuti PTCA bilo urgentnih, bez prethodne kardiološke obrade i spoznaje ozbiljnosti njihova stanja jasno je zašto taj pad nije uočen kod pacijenata podvrgnutim PTCA. Nadalje, u usporedbi PTCA i kiruške revaskularizacije jasno je da je PTCA metoda značajno manje opterećujuća za organizam, izaziva manje traume tkiva, a oporavak traje kraće u odnosu na kirušku revaskularizaciju (164). Značajnost mojih rezultata post-PTCA kretanja ukupnog kolesterola i LDL-a u odnosu na kirušku revaskularizaciju (tbl.24,25,26) i pre-PTCA koncentracije leži u činjenici da se i rane koncentracije neposredno nakon zahvata kod pacijenata podvrgnutim PTCA mogu smatrati relevantnima za postavljanje dijagnoze dislipoproteinemije što omogućuje rano uvođenje statina u terapiju rizičnih bolesnika, a što nije moguće kod kiruških pacijenata. Naime poznato je da u kiruških bolesnika koncentracije LDL-a i HDL-a minimalno 7 dana, optimalno 4 tjedna nakon operacije postaju relevantni za postavljanje ispravne dijagnoze dislipoproteinemije i uvođenje statina kod rizičnih pacijenata (201).

Od biokemijskih markera statistički značajan rast CK i CRP prisutan je u bolesnika sa lošijim ranim ishodom revaskularizacijskog zahvata 24h, 48h i 72h nakon zahvata (slika 58. i 59.), ukazujući na negativnu prognostičku vrijednost porasta CK i CRP. Retrospektivne studije i *post hoc* analize sugeriraju da porast CK-MB frakcije nakon PCI je povezan sa većom incidencijom smrtnog ishoda u dugoročnom praćenju (202).

Štoviše peterostruki porast CK-MB i nakon uspješnog PTCA-a zahvata sa postavljanjem stenta sa sobom nosi značajan rizik iznenadne smrti i pojavnost velikih neželjenih srčanih događanja (203).

Pobliže objašnjeno, porast CK-MB izoenzima koji se može naći i kod inače nekomplikiranog perkutanog zahvata nastaje kao posljedica nekroze miocita (204), te se sukladno novim smjericama smatra infarktom miokarda (205), a kao takav značajno utječe na dvogodišnji mortalitet. Rezultati ove studije sugeriraju da je i rani porast CK statistički značajno povezan sa lošijim ranim postoperativnim ishodom i većom incidencijom neželjenih srčanih događaja, te kao takav identificira porast CK prognostički nepovoljnim markerom.

Razradom uloge kreatin kinaze (CK), kojeg možemo interpretirati kao markera mišićne, ali i moždane traume (srčanog mišića, ali u kardiokirurškim zahvatima i ostalih mišića), odnosno CK-MB kao specifičnog markera nekroze miokarda (204) i C-reaktivnog proteina (CRP) kao markera nespecifičnog upalnog odgovora jasno je zašto se ta dva biokemijska markera nameću kao značajni biokemijski prognostički čimbenici lošijeg ishoda kod revaskularizacijskih zahvata (slika 58. i 59.), sugerirajući da se prekomjerna ishemijska trauma miokarda, kao i jaki nespecifični upalni odgovor organizma nameću kao ključni čimbenici neželjenog ishoda revaskularizacijskog zahvata, sa dokumentiranom negativnom prediktivnom vrijednosti u odnosu na preživljenje, odnosno na dužinu razdoblja bez neželjenih srčanih događanja (206).

Upalni procesi proizvode oksidativne produkte, koji svojim djelovanjem mogu inducirati proizvodnju oxLDL-a (115). Uz to, oxLDL može inducirati proizvodnju kemotaktičnog proteina-1 i monocite-colony stimulating factora i dovesti do upalnog odgovora u endotelu krvnih žila (207). Upala, koja je karakterizirana porastom cirkulirajućih upalnih markera kao što je C-reaktivni protein, asocirana je sa incidencijom koronarne aterosklerotske bolesti (208), što bi moglo objasniti vezu između CRP-a i oxLDL, no naši rezultati pokazuju da se pozitivna korelacije između CRP-a i oxLDL javlja tek 7 dan poslije zahvata potvrđujući nalaze iz literature da upala, odnosno sistemski upalni odgovor nije ključni čimbenik koji je odgovoran za porast koncentracije oxLDL-a (209).

Malondialdehid (MDA), konačni produkt u procesu lipidne peroksidacije, često se koristi kao marker proizvodnje slobodnih kisikovih radikala (210). Naši

rezultati kretanja koncentracija MDA poslje zahvata pokazuju da u prvih 24 sata kod bolesnika koji su podvrgnuti PTCA zahvatu dolazi do pada koncentracije MDA nakon PTCA, statistički značajno više nego kod kardiokirurških bolesnika (slika 33.). Iako ovi rezultati možda ne slijede teoretsko-hipotetski porast koncentracije MDA, kao markera oksidativnog stresa nakon revaskularizacije, naši rezultati su u skladu sa literaturom, u kojoj se također navodi pad MDA, iako razlozi još uvijek nisu u potpunosti jasni (151). Štoviše, Rajakumar AR et al. predložili su hipotezu da je razlog pada MDA posljedica protektivnog djelovanja lopamidola, vodotopivog kontrasta koji se koristi pri PTCA-a zahvatu (211). Još uvijek nerazjašnjena etiologija pada MDA, dovodi u pitanje ulogu MDA kao markera oksidativnog stresa nakon PTCA zahvata (212)

Iako se MDA ubraja u potencijalno štetne molekule koje mogu oštetiti ekstracelularne i celularne komponente, te posebno membranu stanice preko mehanizma lipidne peroksidacije i tako dovesti do disfunkcije endotelne stanice (213,214), pri fiziološkom pH, MDA se nalazi u formi enolat aniona i ima nisku kemijsku reaktivnost (215). Štoviše, naši rezultati pokazuju da bolesnici koji 48 sati nakon zahvata pokazuju porast MDA imaju statistički značajno bolji ishod liječenja (slika 60.), te sukladno tome sugerirao bi da povećana produkcija MDA koja se javlja 48h nakon PTCA nastaje kao posljedica uspješne reperfuzije ishemičnog miokarda, koji započinje svoje normalno funkcioniranje, što je praćeno porastom MDA, odnosno oksidativnog stresa. Nadalje, korelacija MDA sa ishodom liječenja ukazuje da porast MDA ima pozitivan predznak te se porast nakon 48 sati može smatrati pozitivnim prognostičkim parametrom ishoda liječenja. Upravo ovi rezultati pokazuju da MDA, odnosno oksidativni stres koji nastaje nakon reperfuzije ishemičnog miokarda (216), ne mora nužno biti štetan, već predstavlja dio normalnog oporavka miokarda, ali vjerovatno samo do određene koncentracije.

Korelacije CK sa kolesterolom, LDL-om i trigliceridima (slika 36.do 44.) ukazuju da i se na temelju kretanja kolesterola, LDL-a i triglicerida također može pretpostaviti mogućnost pojave komplikacija i negativnog ishoda bolesti. Naime, porast kreatin kinaze ukazuje na lošiji ishod bolesti nakon revaskularizacije (slika 58.), a negativna korelacija sa kolesterolom, LDL-om i trigliceridima ukazuje na međusobnu povezanost tih biokemijskih markera, i identificira njihov pad kao

lošiji prognostički parameter. Sve zajedno se može pojednostavljeno objasniti zaključkom, što je veća ozljeda to je lošiji ishod (217).

## 6. Zaključak

1. U našoj populaciji nije nađena povišena koncentracija oxLDL i protutijela na oxLDL u dijabetičara i pušača (usprkos predmijevanom oksidativnom stresu), U literaturi podaci su kontradiktorni, a vjerovatno ovise o formama oxLDL i protutijela koja se određuju, te populaciji dijabetičara i pušača koji se ispituju, te nisu nužno bolesnici sa ekstenzivnom koronarnom i aterosklerotskom bolešću kao u bolesnika podvrgnutih revaskularizaciji, u ovoj studiji.
2. Signifikantno viša koncentracija protutijela na ox-LDL nađena u hipertoničara, ukazuje na značaj oksidativnog stresa, te njihovu proinflatornu, a ne protektivnu funkciju u populaciji s tim faktorom rizika, bez obzira na već uznapredovalu koronarnu aterosklerotsku bolest. Dakle, kao i u literaturi nađene su povišene vrijednosti protutijela u uznapredovalo hipertenzivnoj bolesti, sa posljedicama, ali ne nužno i samog oxLDL-a, čiji je klirens u plazmi veći, dok se o koncentracijama u stijenci krvnih žila malo zna i moguće je da je različita od plazmatske. Laboratorijskim ispitivanjima u ranijim studijama, dokazano je da povišene koncentracije angiotenzina II u plazmi i tkivima hipertoničara, preko AT1 receptora na makrofazima stimuliraju aktivnost lipoksigenaze i oksidaciju lipoproteina, a da se taj utjecaj angiotenzina II može spriječiti samo blokatorima AT1 receptora, ali ne i ACE inhibitorima. Ta ispitivanja i rezultati ove studije bi ukazale na značaj terapije teških koronarnih bolesnika sa hipertenzijom blokatorima AT1 receptora.
3. Važno je izdvojiti da su koncentracije oxLDL-a, ali ne i protutijela na oxLDL statistički značajno više u bolesnika podvrgnutih kirurškoj revaskularizaciji no PTCA, a što je najvjerovatnije posljedica veće raširenosti aterosklerotske bolesti u kardiokirurških bolesnika. Naime ti bolesnici su stariji, sa više raširenom koronarnom bolesti i zahvaćenim perifernim krvnim žilama i makar su nađene povišene vrijednosti koje nisu postigle statističku značajnost ako se gleda svaki faktor posebno, udruženo (kod kardiokirurških bolesnika) i u ovom manjem uzorku bolesnika dostižu statističku značajnost. Također,



terapija statinima, može uzrokovati tranzitorno više koncentracije oxLDL-a, mijenjati imunološki odgovor (razlog izostanka povišenih koncentracija protutijela na oxLDL?), a kirurški bolesnici u ovoj studiji su gotovo svi bili na terapiji, dok je samo polovina bolesnika podvrgnutih perkutanoj revaskularizaciji bilo na hipolipemiku. Vice versa, niže koncentracije neoksidiranog LDL-a u kardiokirurških bolesnika baš su posljedica značajne razlike u terapiji statinima, ove dvije grupe bolesnika.

4. Klinička slika, odnosno nestabilnost koronarne bolesti, nije utjecala na koncentraciju oxLDL-a i protutijela, a uzrok je vrsta oksidiranog LDL-a i protutijela koji su određivani, jer i u literaturi, porast u akutnom koronarnom sindromu je zabilježen samo kod malondialdehid modificiranog LDL-a i protutijela na te epitope, a ne kod drugih.
5. Nađen je značajan pad koncentracija oxLDL-a i protutijela nakon revaskularizacije, a značajno je da i nema razlike u odnosu na način revaskularizacije, osim nešto bržeg oporavka koncentracije protutijela u perkutano revaskulariziranih bolesnika. To je vjerovatno posljedica snažne imunološke reakcije postoperativno i akutnog formiranja imunih kompleksa, što za posljedicu ima smanjenje koncentracije cirkulirajućih protutijela i samog oxLDL-a. Predmijevan porast koncentracija u plazmi, te razlike između ova dva načina revaskularizacije, nije nađena zbog ove imunološke reakcije, koja je vjerovatno protektivna (sprečava štetno djelovanje oksidativnih formi lipoproteina akutno postoperativno) ali i zbog prirodnih antioksidansa u plazmi, kao protektivnog faktora. Ponavljam, možda su u stijenkama krvnih žila koncentracije drugačije.
6. Koncentracije serumskih lipoproteina neposredno nakon perkutane transluminalne koronarne angioplastike se ne mijenjaju i relevantne su za postavljenje dijagnoze dislipoproteinemije i uvođenje terapije statinima kao važne sekundarne prevencije u rizičnoj skupini bolesnika. To je važan podatak, jer mnogo bolesnika podvrgnutih angioplastici nema preoperativne vrijednosti lipoproteina. U kardiokirurških bolesnika dolazi do značajnijeg

pada serumskih koncentracija lipoproteina (naročito kod «on.pump» bolesnika) postoperativno, te u svrhu postavljanja dijagnoze dislipoproteinemije unutar 30 dana postoperativno nema smisla određivati te koncentracije.

7. Hipertenzija, dijabetes, pušenje, preoperativne serumske koncentracije lipoproteina, oksidiranih formi lipoproteina i protutijela nisu prognostički čimbenici ranog postoperativnog ishoda. U ovom istraživanju, jedino dob i zahvaćenost krvnih žila vrata, aorte i periferije značajano utječu na neposredan ishod revaskularizacije i morali bi se preoperativno dijagnosticirati u svih bolesnika prije zahvata, bez obzira ACBP ili PTCA.
8. U ovoj studiji je zabilježen pad koncentracija MDA u svih bolesnika akutno postoperativno (odgovara literaturi), uz vrlo brzi oporavak u bolesnika s povoljnim ishodom revaskularizacije, a to bi čak ukazivalo da oksidativni stres (mjereno ovom metodom) kao posljedica ishemije-reperfuzije tijekom operacije ne mora biti nužno negativan proces.
9. Praćenjem kretanja koncentracija lipoproteina postoperativno, nađen je njihov značajniji pad u bolesnika s lošijim ishodom, te njihova statistički signifikantna negativna korelacija sa koncentracijama kreatinin kinaze i CRP-a, kao biokemijskim parametrima koji su značajnije porasli u tih bolesnika. Oksidirani LDL također značajnije pada 48 sati nakon zahvata kod bolesnika s lošijim ishodom, makar ne statistički značajno (veličina uzorka), međutim u toj točki korelira statistički značajno negativno s CRP-om. Protutijela ne pokazuju nikakav trend kretanja postoperativno s obzirom na ishod, makar su u bolesnika s povoljnijim ishodom čitavo vrijeme više koncentracije, međutim nije dostignuta statistička značajnost (velike standardne devijacije). Potrebna su daljnja istraživanja samo u populaciji kardiokirurških bolesnika, makar će i tu s obzirom na rijetke rane postoperativne komplikacije, njihovu različitu definiciju (i u literaturi) biti teško postići adekvatno velik i reprezentativan uzorak.

## 7. Sažetak

### Uvod

Teorija odgovora endotela na ozljedu i upala u potpunosti povezuju patofiziološke mehanizme ateroskleroze sa oksidativnim stresom i hiperlipoproteinemijama, a naročito sa oksidiranim formama lipoproteina (oxLDL), kao ključnih molekula u akumulaciji lipida unutar plakova. Također imunološki odgovor na aterosklerotski upalni proces i pojava protutijela na oxLDL imaju važnu ulogu u aterogenezi, međutim ne može se zanemariti ni njihov potencijalni protektivni faktor. Obje molekule su u povišenim koncentracijama nađene u plazmi bolesnika, koji boluju od ateroskleroze, ali nije poblizje ispitivano kretanje njihovih koncentracija nakon koronarne revaskularizacije (PTCA ili ACBP), a što je cilj ovog rada

### Ispitanici i metode

U ovu studiju uključeno je 62 koronarnih bolesnika sa stabilnom i nestabilnom kliničkom slikom, koronarografiranih, čime se odredila raširenost koronarne bolesti, te uputilo na revaskularizaciju, kardiokiruršku (31 bol.) ili PTCA (31 bol.). Raširenost ateroskleroze se ispitala UZV velikih krvnih žila. Preoperativno, te postoperativno unutar 7 dana, u pravilnim vremenskim razmacima, te 30.-ti dan je određena koncentracija lipoproteina, oxLDL i protutijela na oxLDL, te MDA kao mjera oksidativnog stresa. Bolesnicima je rani uspjeh operativnog zahvata procijenjen kliničkom slikom, serijskim snimanjem EKG-a, UZV srca i standardnim biokemijskim parametrima.

### Rezultati

U koronarnih bolesnika preoperativno su nađene povišene vrijednosti protutijela na oxLDL u hipertoničnih bolesnika, ali ne u dijabetičara i pušača. Nijedan od ova tri faktora rizika za koronarnu bolest nije utjecao na koncentracije samog oxLDL-a. Bolesnici predviđeni za ACBP imali su statistički značajnije više koncentracije oxLDL-a, od bolesnika predviđenih za PTCA, dok se preoperativno koncentracije protutijela nisu razlikovale. U klinički nestabilnih pacijenata nisu nađene povišene vrijednosti oxLDL-a, niti protutijela. Postoperativno i u dilatiranih i u operiranih dolazi do značajnog pada koncentracija protutijela i oxLDL-a, a između ove dvije grupe nema razlike. Rani postoperativni ishod nije značajnije utjecao na serumske koncentracije oxLDL-a, jedino je 48 sati nakon zahvata u bolesnika s lošijim ranim ishodom zabilježen statistički značajniji pad koncentracija, koji korelira s koncentracijama CRP-a. Ishod zahvata ne utječe na kretanje koncentracija protutijela.

### Zaključak

Preoperativne serumske koncentracije oxLDL-a i protutijela ne utječu na uspjeh operativnog zahvata, a povišene koncentracije oxLDL-a su nađene u kardiokirurških u odnosu na dilatirane bolesnike. Hipertenzivna bolest značajno utječe na povišenje koncentracija serumskih protutijela na oxLDL-a u populaciji koronarnih bolesnika. Postoperativno dolazi do značajnog pada koncentracija oxLDL-a i protutijela na oxLDL, ali serumske koncentracije ne ovise značajnije o vrsti revaskularizacije ili ranom postoperativnom ishodu.

## 8. Summary

### Introduction

Endotel injury response theory and inflammation completely interconnect pathophysiological mechanisms of atherosclerosis with oxidative stress and hyperlipoproteinemias, especially with oxidative forms of lipoproteins (oxLDL), indicating them as key molecules in a lipid accumulation inside atherosclerotic plaque. Furthermore, immunological responses to atherosclerotic inflammation process and production of antibodies against oxLDL have an important role in atherogenesis, but one can not disregard their potentially protective effect. Both molecules have been found in elevated concentrations in plasma at patients with atherosclerosis, but it has not been tested whether their concentration dynamics depend on type of revascularization procedure (PTCA or CABG).

### Patients and methods

In this study we included 62 coronary artery disease positive patients with stable and unstable angina, which were assessed with coronarography, and then distributed to surgical (CABAG) or PTCA revascularization. Distribution of atherosclerosis was assessed with ultrasound examination of great vessels. Preoperative and postoperative, within 7 days, in regular time intervals, and on the 30th day, we determined concentrations of standard lipoproteins, oxLDL and antibodies against oxLDL, and MDA as a measurement of oxidative stress. Early success of vascularization procedure was assessed with clinical appearance, serial EKG, heart ultrasound, and standard biochemical markers.

### Results

In our patients we have found preoperative elevated concentrations of antibodies against oxLDL in hypertension positive patients, but not in diabetics and smokers. None of the risk factors listed had any influence on oxLDL concentrations. Patients who were distributed to CABG had statistically higher oxLDL concentrations, compared to patients who were on PTCA; while preoperative we found no difference in antibodies against oxLDL between these two groups. In clinically unstable patients we did not found elevated oxLDL or antibodies against LDL. After revascularization we had a decrease in concentrations of oxLDL and related antibodies in both groups (PTCA vs. CABG), but there were no statistically significant difference in dynamics between these two groups. Early postoperative outcome did not have a statistically important influence on oxLDL concentrations, only 48h after revascularization at patients with worse clinical outcome we had a statistically significant decrease, which correlated with CRP concentrations. Outcome of procedure did not have any influence on plasma antibodies against oxLDL concentrations.

### Conclusion

Preoperative serum concentrations of oxLDL and antibodies against oxLDL does not affect on success of revascularization procedure, and elevated concentrations of oxLDL have been found in surgically revascularized patients in comparison to patients who have undergone PTCA. Hypertension has a significant influence on elevation of concentrations of antibodies against oxLDL. Even though both revascularizations procedures have a negative effect on concentrations of oxLDL and antibodies, there is no difference among them, according to the type of procedure.

## 10. Literatura

1. Braunwald E. Shattuck Lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337:1360-1369.
2. Wu R, Lemne C, De Faire U, Frostegard J. Antibodies to platelet-activating factor are associated with borderline hypertension, early atherosclerosis and the metabolic syndrome. *J Intern Med* 1999; 246:389-397.
3. Croatian Health Service Yearbook. Croatian National Institute of Public Health, Zagreb; 2004, pp 7, 66-68.
4. Frostegard J, Lemne C, Andersson B, Van der Zee R, Kiessling R, De Faire U. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertensio* 1997; 29: 40-44.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
6. Ross R. Atherosclerosis-an inflamatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
7. Wu R, De Faire U, Lemne C, Witztum JL, Frostegard J. Autoantibodies to oxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 53-59.
8. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Environmental tobacco smoke exposure and ishaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ* 1997;315: 973-980.
9. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5: 88-97.
10. Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defenses. *Clin Sci* 1995; 88; 485-489.
11. Shen Z, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocyte *Am J Physiol* 1996; 270: 1624-1633.

12. Sambola A, Osende J, Hathcock J. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003; 107: 973-977.
13. Newby DE, Wright RA, Labinjoh C, et al. Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 1411-1415.
14. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* 1989; 298: 784-788.
15. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 289-293.
16. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia: role of oxidized LDL. *Circulation* 1996; 9: 1346-1353.
17. Chobanian AV, Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 237-242.
18. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226: 862-8.
19. Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96: 3264-3275.
20. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *JACC* 2004; 44: 2293-2300.
21. Dandona P, Aljada A. A rationale approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2002; 90: 27-33.

22. Lopes-Virella MF, Virella G. The role of immune and inflammatory processes in the development of macrovascular disease in diabetes. *Front Biosci.* 2003 Sep 1;8:s750-68.
23. Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 653-657.
24. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1986;6: 357–377.
25. Sorenson TI, Neilsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med.* 1988;318: 727–732.
26. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med.* 2002;347: 185–192.
27. Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky GA. Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocystein. *Circulation* 1998; 97: 421-424.
28. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999 Nov;32(8):595-603.
29. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11):1287-312.
30. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class theta glutathione transferase T2-2. *Biochem Soc Trans.* 1997 Nov;25(4):S559.
31. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J.* 1998 Oct 1;335 ( Pt 1): 85-94.
32. Mills EM, Takeda K, Yu ZX, Ferrans V, Katagiri Y, Jiang H, Lavigne MC, Leto TL, Guroff G. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 28;273(35): 2165-8.
33. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996 Feb;46(1):15-32.

34. Galli F, Floridi A, Buoncristiani U. Oxidant stress in hemodialysis patients. *Contrib Nephrol.* 2002(137): 371-8.
35. Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22): 13182-7.
36. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5294-9.
37. Chopra S, Wallace HM. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 1998 Apr 1;55(7):1119-23.
38. Czene S, Tiback M, Harms-Ringdahl M. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J.* 1997 Apr 15;323 ( Pt 2): 337-41.
39. Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 1997 Mar 15;322 ( Pt 3): 681-92.
40. Lončarić I, Čipak A. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa, Zagreb, Medicinska naklada, 2001.
41. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S.
42. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16(4): 241-8.
43. Da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.* 1998 Jul 3;430(3): 405-8.
44. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 Oct;13(4): 341-90.
45. Meyer DF, Nealis AS, Macphee CH, Groot PH, Suckling KE, Bruckdorfer KR, Perkins SJ. Time-course studies by synchrotron X-ray



- solution scattering of the structure of human low-density lipoprotein during Cu(2+)-induced oxidation in relation to changes in lipid composition. *Biochem J.* 1996 Oct 1;319 ( Pt 1): 217-27.
46. Patterson RA, Leake DS. Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH. *FEBS Lett.* 1998 Sep 4;434(3): 317-21.
  47. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998 Aug;80 Suppl 1: S77-112.
  48. Tyler DD. Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes. *FEBS Lett.* 1975 Mar 1;51(1): 180-3.
  49. Yu BP, Suescun EA, Yang SY. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev.* 1992 Aug;65(1): 17-33.
  50. Grinna LS. Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech Ageing Dev.* 1977 May-Jun;6(3): 197-205.
  51. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *ree Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11): 1287-312.
  52. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994 Jan;74(1):139-62. *Physiol Rev* 1995 Jan;75(1).
  53. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class theta glutathione transferase T2-2. *Biochem Soc Trans.* 1997 Nov;25(4):S559.
  54. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J.* 1982 Oct 15;208(1):129-40.
  55. Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):215-8.

56. Siu GM, Draper HH. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*. 1982 May;17(5):349-55.
57. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. 1996 Feb;46(1):15-32.
58. Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R, Biedermann BC. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Nov 2;110(18): 2843-50.
59. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 821-825.
60. Naghavi M, Madjid M, Khan MR, Mohammadi RM, Willerson JT, Casscells SW: New developments in the detection of vulnerable plaque. *Curr Atheroscler Rep* 2001,3(2): 125-135.
61. Naghavi M, John R, Naguib S, Siadaty MS, Grasu R, Kurian KC, vanWinkle WB, Soller B, Litovsky S, Madjid M, Willerson JT, Casscells W: pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque. *Atherosclerosis* 2002,164(1): 27-35.
62. Wang J, Geng YJ, Guo B, Klima T, Lal BN, Willerson JT, Casscells W: Near-infrared spectroscopic characterization of human advanced atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39(8): 1305-1313.
63. Casscells W, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, Bearman G, Willerson JT: Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet* 1996, 347(9013): 1447-1451.
64. Vaarala O, Manttari M, Manninen V. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged man. *Circulation* 1995;91: 23-27.
65. Glasgow S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371-1375.

66. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol.* 1997 Nov 6;80(9A):111-161.
67. Britten MB, Zeiher AM, Schaschinger V. Clinical importance of coronary artery vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Int Med* 1999; 245: 315-327.
68. Gotlieb AI, Langille BI. The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease. Vol.1.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 595-606.
69. Springer TA, Cybulsky MI. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease. Vol.1.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 511-538.
70. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 34: 254-257.
71. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*; 178: 449-460.
72. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Path* 1998; 152: 353-358.
73. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 ICAM-1 at atherosclerotic-prone sites on the endothelium in the ApoE deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 842-851.
74. Hynes RO, Wagner DD. Genetic manipulation of vascular adhesion molecule in mice *J Clin Invest* 1996; 98:2193-2195.
75. Herren B, Raines EW, Ross R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. *FASEB J* 1997; 11: 173-180.
76. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by

- T lymphocytes: a role for CD40 in plaque rupture? *Circ Res* 1997; 81: 448-454.
77. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. *Nature* 1998; 394: 200-203.
  78. Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 680-687.
  79. Hansson GK, Libby P. The role of the lymphocyte. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 557-568.
  80. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 567-578.
  81. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha$ ,  $\beta_3$ , integrin and GPIb $\alpha$ . *J Exp Med* 1998; 187: 329-339.
  82. Weksler BB, Tack-Goldman K, Subramanian VA, Gay WA Jr. Cumulative inhibitory effect of low-dose aspirin on vascular prostacyclin and platelet thromboxane production in patients with atherosclerosis. *Circulation*. 1985 Feb;71(2): 332-40.
  83. Bungard TJ. An overview of commonly used antiplatelet agents. *Can J Cardiovasc Nurs*. 1998;9(3): 38-46.
  84. Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* 1996; 87:1069-1078.
  85. Smith RE, Hogaboam CM, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 612-619.
  86. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
  87. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-671.

88. Davies MJ. The composition of coronary-artery plaques. *N Engl J Med* 1997; 336:1312-1314.
89. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002; 15: 439-446.
90. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999; 106: 467-476.
91. De Caterina R, Basta G, Lazzarini G et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2646-2654.
92. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351: 88-92.
93. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103: 491-495.
94. Aukrust P, Muller F, Ueland T et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD-40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T-lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100: 614-620.
95. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relation between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive and noninvasive strategy. *Jama* 2001; 286: 2107-2113.
96. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacke F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-2153.
97. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 690-695.

98. Bayes-Genis A, Conover Ca, Overgaard MT et al. Pregnancy associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001; 345:1022-1029.
99. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation* 2002; 105: 2019-2023.
100. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid protein in a severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-424.
101. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557-1565.
102. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increases in atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320: 915-924.
103. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1785-1792.
104. Tsimikas S. Oxidized Low-density Lipoprotein...*Current Atherosclerosis Reports* 2006.8: 55-61.
105. Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96:3264-3265.
106. Chen CH, Nguyen HH, Weilbaecher D, Luo S, Gotto AM Jr, Henry PD. Basic fibroblast growth factor reverses atherosclerotic impairment of human coronary angiogenesis-like responses in vitro. *Atherosclerosis.* 1995 Aug;116(2):261-8
107. Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem.* 1984 Sep 25;259(18):11305-11.
108. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987 May;28(5):495-509.

109. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-61.
110. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD 36. *J Biol Chem* 1997; 272: 21654-21659.
111. Jain SK. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J Biol Chem.* 1984 Mar 25;259(6):3391-4.
112. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasaraty S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans: protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 590-600.
113. Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W. Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1 and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1289-1302.
114. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study. *Lancet* 1996; 347: 781-786.
115. Tsimikas S, Witztum JL: Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001.103:1930-32.
116. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989 Apr 6;320(14):915-24.
117. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factor by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 254-247.
118. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990; 11: 97-101.

119. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophage during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-2998.
120. Harduin P, Tailleux A, Lestavel S, Clavey V, Fruchart JC, Fievet C. Immunological and functional properties of in vitro oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1995 May;36(5): 919-30.
121. Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtis LK et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apo E-deficient mice: demonstration of epitopes of oxidized LDL in human plasma. *J Clin Invest* 1996; 98: 800-814.
122. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9): 3893-7.
123. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1994 Aug 12;269(32): 20394-400.
124. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J.* 1982 Oct 15;208(1):129-40.
125. Ravalli S, Marboe CC, D'Agati VD, Michler RE, Sigal E, Cannon PJ. Immunohistochemical demonstration of 15-lipoxygenase in transplant coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Mar;15(3): 340-8.
126. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells: molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 1997; 272: 22975-22978.
127. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyd-modified LDL in patients with acute coronary



- syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98: 1487-1494.
128. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084.
  129. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104: 129-135.
  130. Kopprasch S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurktchiev T, Hanefeld M, Kuhne H, Julius U, Graessler J. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2002; 51: 3102-3106.
  131. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 1996; 93:1346-1353.
  132. Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Thromb Haemostasis* 1999; 3: 287-293.
  133. Jain AP, Mohan A, Gupta OP, Jajoo UN, Kalantri SP, Srivastava LM. Role of oxygen free radicals in causing endothelial damage in acute myocardial infarction. *J Assoc Physicians India* 2000; 48: 478-480.
  134. Holvoet P, Collen D, Van de Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. *JAMA* 1999; 281:1718-1721.
  135. Fujii H, Shimizu M, Ino H, Yamaguchi M, Yasuda F, Fujino N, Mabuchi H, Michishita I, Genda A. Acute increases in plasma oxidized low-density lipoprotein immediately after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 2001; 87: 102-103.
  136. Shaw PX, Horkko S, Tsimikas S, et al. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1333-1339.
  137. Shoenfeld Y. Antibodies against oxidized LDL as a positive predictors of clinical outcome. *Circulation* 2004.110:2552-2558.

138. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, Emoto M, Kawagishi T, Morii H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis*. 2000 Jan;148(1):171-7.
139. Lehtimaki T, Lehtine S, Solakivi T et al. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteina in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1999; 19: 23-27.
140. Inoue T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Hayashi T, Morooka S. Clinical significance of antibody against oxidized low density lipoprotein i patients with atherosclerotic coronary artery disease. *JACC* 2001; 37: 775-779.
141. Monaco C, Crea F, Niccoli G, Summaria F, Cianflone D, Bordone R, Bellomo G, Maseri A. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease. *Eur Hear J* 2001; 22: 1572-1577.
142. Uusitupa MI, Niskanen L, Luoma J, Vilja P, Mercuri M, Rauramaa R, Yla-Herttuala S. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Oct;16(10): 1236-42.
143. Kihwan K, Hyuck MK, Bum-Kee H, et al. Autosntibody against malondialdehyde-modified low density lipoproteina in patients with non-diabetic unstable angina: A potential role in immunologic reaction of plaque instability. *Yonsei Med J* 2002; 43: 203-210.
144. Mustafa A, Nityanand S, Berglund L, et al. Circulatin immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 2000.102:2576-2581.
145. Lopes-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, et. al. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol* 1999. 90:165-172

146. Imai K, Matsubara T, Kanashiro M, Ochimiya S, Hotta N. Lipid peroxidation may predict restenosis after coronary ballon angioplasty. *Jpn Circ J* 2001; 65:495-499.
147. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FR. Oxidative stress as signaling mechanism of the vascular response injury: the reox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res* 2000; 18:436-445.
148. Fu ML. Do immune system changes have a role in hypertension? *J Hypert* 1995;13: 1259-1265.
149. Dzielak DJ. The immune system and hypertension. *Hypertension* 1992; 19: 136-144.
150. Frostegard J, Wu R, Gillis-Haegerstrand C, Lemne C, De Faire U. *Circulation* 1998; 98: 1092-1098.
151. Astrom Olsson K, Harnek J, Ohlin AK, Pavlidis N, Thorvinger B, Ohlin H. No increase of plasma malondialdehyde after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Scand cardiovasc J* 2002; 36: 237-240.
152. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res.* 1996;37:45-53.
153. Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem.* 1995;41:991-994.
154. Kattemann R, Jaworek D, Moller et al. Multicentre study of a new enzymatic method of cholesterol determination. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 245-51.
155. Warnick R, Wood P. National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High Density Lipoproteins Cholesterol; Executive Summary, *Clin Chem.* 1995;41(10).
156. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without

- use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun; 18(6): 499-502.
157. Cole TG, Klotzch SG, McNamara MJ. Measurement of triglyceride concentration. U: Rifai N, Warnick RG, Dominiczak H, ur. *Handbook of lipoprotein testing.* AACCC Press, Washington 1997; 115-25.
  158. Thomas L. Creatinine. In: Thomas L., ed. *Clinical laboratory diagnostic. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 366-371.
  159. Whicher J. C-reactive protein (CRP). In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostic. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:700-706.
  160. Thomas L. Blood Glucose. In: Thomas L., ed. *Clinical laboratory diagnostic. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:131-137.
  161. Schumann G, Klauke R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum; preliminary upper reference limits obtained in hospitalised subjects. *Clin Chem Acta* 2003;327;69-79.
  162. Legrand VM, Serruys PW, Unger F, van Hout BA, Vrolix MC, Franssen GM, Nielsen TT, Paulsen PK, Gomes RS, de Queiroz e Melo JM, Neves JP, Lindeboom W, Backx B; Arterial Revascularization Therapy Study (ARTS) Investigators. Three-year outcome after coronary stenting versus bypass surgery for the treatment of multivessel disease. *Circulation.* 2004 Mar 9;109(9):1114-20. Epub 2004 Mar 1.
  163. Serruys PW, Ong AT, van Herwerden LA, Sousa JE, Jatene A, Bonnier JJ, Schonberger JP, Buller N, Bonser R, Disco C, Backx B, Hugenholtz PG, Firth BG, Unger F. Five-year outcomes after coronary stenting versus bypass surgery for the treatment of multivessel disease: the final analysis of the Arterial Revascularization Therapies Study (ARTS) randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Aug 16;46(4):575-81.
  164. Reiner Z, Mihatov S, Milicic D, Bergovec M, Planinc D; TASPIC-CRO Study Group. Treatment and secondary prevention of ischemic coronary

- events in Croatia (TASPIC-CRO study). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006 Aug;13(4):646-54.
165. Taylor AJ, Arora NS, Bindeman J, Bhattari S, Feuerstein IM, O'Malley PG. Conventional, emerging, heredity, lifestyle, and psychosocial coronary risk factors: relationships to subclinical atherosclerosis. *Prev Cardiol*. 2006; 9(1):25-32.
166. Gaffney B, Kee F. Predictors for waiting time for coronary angioplasty in a high risk population. *Qual Health Care*. 1995 Dec;4(4):244-9.
167. EUROASPIRE Study Group. EUROASPIRE: A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: Principal results. *Eur Heart J* 1997; 18: 1569-1582.
168. Melkert R., Violaris AG, Serruys PW. Luminal narrowing after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A multivariate analysis of clinical, procedural and lesion related factors affecting long-term angiographic outcome in the PARK study. *Journal of Invasive Cardiology* 1994; 6: 160-171.
169. Arora RR, Konrad K, Badhwar K et al. Restenosis after transluminal coronary angioplasty: a risk factor analysis. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis* 1990; 19: 17-22.
170. Weisz G, Cox DA, Garcia E, Tchong JE, Griffin JJ, Guagliumi G, Stuckey TD, Rutherford BD, Mehran R, Aymong E, Lansky A, Grines CL, Stone GW. Impact of smoking status on outcomes of primary coronary intervention for acute myocardial infarction-the smokers paradox revisited. *AM Heart J* 2005; 150(2): 358-364.
171. Pell JP. Does smoking cessation reduce the risk of restenosis following coronary angioplasty. *Heart* 2000; 84:233-234.
172. Ashby DT, Dangas G, Mehran R et al. Comparison of one-year outcomes after percutaneous coronary intervention among current smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Cardiol* 2002; 89: 221-224.
173. Mortasawi A, Ashraf MN, Gryson AD, OO AY. Impact of smoking on the results of coronary artery bypass surgery. *Herz* 2004; 29: 310-316.

174. Van Domburg RT, Meeter K, Van Berkel DFM et al. Smoking cessation reduces mortality after coronary artery bypass surgery: a 20-year follow-up study. *JACC* 2000; 36: 787-883.
175. Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effects of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003;326 (7404): 1423-1428.
176. McKenney JM. Pharmacologic options for aggressive low-density lipoprotein cholesterol lowering: benefits versus risks. *Am J Cardiol.* 2005 Aug 22;96(4A): 60E-66E.
177. Lenzen MJ, Boersma E, Bertrand ME, Maier W, Moris C, Piscione F, Sechtem U, Stahle E, Widimsky P, de Jaegere P, Scholte op Reimer WJ, Mercado N, Wijns W; European Society of Cardiology. Management and outcome of patients with established coronary artery disease: the Euro Heart Survey on coronary revascularization. *Eur Heart J.* 2005 Jun;26(12): 1169-79.
178. De Bruyn VH, Nuno DW, Cappelli-Bigazzi M, Dole WP, Lamping KG. Effect of acute hypertension in coronary circulation: role of mechanical factors and oxygen free radicals. *J Hypert* 1994;12: 163-172.
179. Alexander RW. Hypertension and pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response—a new perspective. *Hypertension* 1995; 25: 155-161.
180. Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Thromb Haemostasis* 1999; 3:287-293.
181. Scheidegger KJ, Butler S, Witztum J. Angiotensin II increases macrophage-mediated modification of low density lipoprotein via lipoxygenase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1997; 272:21609-15.
182. Peters S, Gotting B, Trummel M, Rust H, Brattstrom A. Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions: the VALPREST trial. *J Invasive Cardiol.* 2001 Feb;13(2):93-7.
183. Peters S, Trummel M, Meyners W, Koehler B, Westermann K. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation—results of the

VALVACE trial.

Int J Cardiol. 2005 Feb 15;98(2):331-5.

184. Frostegard J, Ruehua WU, Lemne C, Thulin T, Witztum T, De Faires U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clinical Science* 2003; 105: 615-620.
185. Ndrepepa G, Braun S, von Beckerath N, Mehilli J, Gorchakova O, Vogt W, Schomig A, Kastrati A. Oxidized low density lipoproteins, statin therapy and severity of coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2005 Oct;360(1-2): 178-86.
186. Vaarala O. Autoantibodies to modified LDLs and other phospholipid-protein complexes as markers of cardiovascular disease. *J Int Med* 2000; 247: 381-384.
187. Radulescu L, Stancu C, Antohe F. Antibodies to human oxidized low-density lipoproteins (LDL) as markers of human plasma modified lipoproteins. *Med Sci Monit* 2004; 10: 207-214.
188. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced in vivo low-density lipoprotein oxidation. *J Hypert* 1995; 13: 129-138.
189. Reigang S, Horkko S, Miller E, Witztum JL, Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanism other than induction of high titers of antibodies to oxidative neopeptides. *Art Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1972-1982.
190. Schwenke DC, D'Agostino FB, Goff DC, et al. Differences in LDL oxidizability by glycemic status. *Diabetes Care* 2003; 26: 1449-1455.
191. Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 653-657.
192. Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, et al. High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes

- present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation* 2004;110:1406-1412
193. Vasankari T, Ahotupa M, Toikka J, Mikkola J, Irjala K, Pasanen P, Neuvonen K, Raitakari O, Viikari J. Oxidized LDL and thickness of carotid intima-media are associated with coronary atherosclerosis in middle-aged men: lower levels of oxidized LDL with statin therapy. *Atherosclerosis*. 2001 Apr;155(2):403-12.
  194. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II15-7.
  195. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat. Med.* 2000;6:1399-1402.
  196. Tsimikas S, Lau HK, Kyoo-Rok H, Shortal B, Miller ER, Segev A, Curtiss LK, Witztum JL, Strauss BH. Percutaneous Coronary Intervention Results in Acute Increases in Oxidized Phospholipids and Lipoprotein(a): Short-term and Long-Term Immunologic Responses to Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circulation* 2004;109:3164-3170.
  197. Ylä-Herttua S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*. 1989;84:1086-1095.
  198. Lazzarino G, Raatikainen P, Nuutinen M, Niissinen J, Tavazzi B, Pierro DD, Giardina B, Peuhkurinen K. Myocardial Release of Malondialdehyde and Purine Compounds During Coronary Bypass Surgery. *Circulation*. 1994. 90(1): 291-97.
  199. Navab M, Ananthramiah GM, Reddy ST, et al. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: the oxidation hypothesis of atherosclerosis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004, 45:993-1007.
  200. Sutton-Tyrrell K, Rihal C, Sellers MA, Burek K et al. BARI investigation. Long-Term Prognostic Value of Clinically Evident Noncoronary Vascular Disease in Patients Undergoing Coronary Revascularization in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI). *Am J of Cardiol*. 1997. 81:375-81.



201. Shaukat N, Ashraf SS, Mackness MI, Mbewu AD, Bhatnagar D, Durrington PN. A prospective study of serum lipoproteins after coronary artery bypasses surgery. *QJM*. 1994 Sep;87(9):539-45.
202. Cavallini C, Savonitto S, Violini R, Arraiz G et al. Impact of the elevation of biochemical markers of myocardial damage on long-term mortality after percutaneous coronary intervention: results of the CK-MB and PCI study. *EHI*; 2005;26: 1494-98.
203. Abdelmeguid AE, Topol EJ, Whitlow PL, Sapp SK, Ellis SG. Significance of mild transient release of creatine kinase-MB fraction after percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 1996 Oct 1;94(7):1528-36.
204. Ricciardi M, Wu E, Davidson C et al. Visualization of discrete microinfarction after percutaneous coronary interventions associated with mild creatine kinase-MB elevation. *Circulation* 2001;103:2780-83.
205. Myocardial infarction redefined. A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J*;2000;21: 1502-13.
206. Saucedo JF, Mehran R, Dangas G, Hong MK, Lansky A, Kent KM, Satler LF, Pichard AD, Stone GW, Leon MB. Long-term Clinical Events Following Creatine Kinase-Myocardial Band Isoenzyme Elevation After Successful Stenting. *J Am Coll Cardiol* 2000;35: 1134-41.
207. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(13):5134-8.
208. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*. 2004 Dec 16;351(25):2599-610.
209. Wu T, Willett WC, Rifai N, Shai I, Manson JE, Rimm EB. Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used

- antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among U.S. men and women? *J Am Coll Cardiol*. 2006 Sep 5;48(5):973-9.  
Epub 2006 Aug 17.
210. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005 Aug;15(4):316-28.
  211. Rajakumar AR, Prasad K, Mantha SV, Khouri M, Raney B. Protection of coronary angioplasty-induced oxidative stress by Isovue used during angioplasty. *Can J Cardiol*. 1999 Sep;15(9):989-98.
  212. Olsson KA, Harnek J, Ohlin AK, Pavlidis N, Thorvinger B, Ohlin H. No increase of plasma malondialdehyde after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Scand Cardiovasc J*. 2002 Aug;36(4):237-40.
  213. Suttnar J, Masova L, Dyr JE. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;751:193e7.
  214. Larstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Toren K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:107e14
  215. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81e128
  216. Rajakumar AR, Prasad K, Mantha SV, Khouri M, Raney B. Protection of coronary angioplasty-induced oxidative stress by Isovue used during angioplasty. *Can J Cardiol*. 1999 Sep;15(9):989-98.
  217. Saadeddin SM, Habbab MA. Percutaneous coronary intervention in the context of systemic inflammation: more injury and worse outcome. *Med Sci Monit* 2003; 9(8):RA193-197.

## ŽIVOTOPIS

**STARČEVIĆ Boris**, Mr. Sci., Dr.med.

Rođen: 15.srpnja 1961, Zagreb, Hrvatska

Oženjen (supruga pedijatar), otac dvije kćeri

### **Zavod za bolesti srca i krvnih žila**

Interna klinika, KB "Dubrava"

Avenija Gojka Šuška 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

tel. 385/1/290 24 44; fax. 385/1/286 36 95

### **Obrazovanje:**

Osnovnu i srednju školu završio sam u Zagrebu

1981.-1986. studij na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu (diplomirao s prosječnom ocjenom 4.86). Tijekom studija demonstrator na Zavodu za fiziologiju

1987. odradio obvezatni staž i položio državni ispit.

1987. / 1988. pohađao poslijediplomski studij "Klinička imunologija"

1987.-1989. kao znanstveni novak radio sam na Zavodu za fiziologiju, Medicinskog fakulteta, ali sam većinu posla obavljao na Zavodu za nuklearnu medicinu KBC "Rebro".

1989. radio sam godinu dana u općoj praksi u seoskoj ambulanti u Slavoniji.

1990.-1994. specijalizacija iz interne medicine na Internoj klinici, KB "Sestre milosrdnice", a 10. travnja 1994. položio specijalistički ispit s ocjenom odličan.

Od 1993.godine uz redoviti specijalistički staž počinjem učiti UZV srca i invazivnu kardiološku obradu.

U razdoblju 1994.-2002. radio na Kardiologiji II, Interne klinike, KB "Sestre milosrdnice", kao intervencijski kardiolog, odjelni liječnik, te u laboratoriju za ultrazvučnu dijagnostiku.

Od 5.mj.2002. radim u KB "Dubrava" kao voditelj Odjela invazivne kardiologije, a u sklopu projekta Svjetske banke za unapređenje invazivne kardiologije u Hrvatskoj.

Rukovoditelj Laboratorija za invazivnu dijagnostiku i terapiju.

Voditelj edukacije drugih invazivnih kardiologa iz našeg centra, ali i iz OB "Sl.Brod" i KBC "Split".

1997./1998. pohađam poslijediplomski studij “Kardiovaskularne bolesti”, a magistriram 1998. na temu “Serumska koncentracija lipoproteina (a) i težina koronarne bolesti”.

Od 1998-2002. blagajnik sam Hrvatskog kardiološkog društva.

Od 1998. do 2003. asistent u kumulativnom radnom odnosu na Katedri za internu medicinu, Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Završio sam tečaj za tutore na Medicinskom fakultetu, te tečaj iz umijeća medicinske nastave.

2001.godine na Poslijediplomskom studiju iz infektologije držim predavanja iz ehokardiografije, a također u timu prof.dr.sc. Nikolić-Heitzlera educirao buduće kardiologe iz ehokardiografije, po programu odobrenom od Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Suradnik sam u poslijediplomskoj nastavi na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, na predmetu ”Transplantacija srca”

2001.g. dobio sam diplomu “Europski kardiolog”, a uz rigorozne uvjete UEMS-a.

Stručno se usavršavao iz područja invazivne kardiologije i ehokardiografije u centrima u Europi i SAD-u.

2004.g. završio sam subspecijalizaciju iz kardiologije.

Engleski jezik govorim i pišem, a francuskim se služim.

### Znanstveni i stručni rad:

Na Zavodu za fiziologiju i imunologiju i Zavodu za nuklearnu medicinu, osim stručnog rada na UZV i citopunkcijama štitnjače, te UZV abdomena, radim na znanstvenim projektima iz područja imunologije, metabolizma, bolesti štitnjače, a objavljujem više radova i sudjelujem na domaćim i inozemnim kongresima.

1994. tijekom prvog posjeta Svetog Oca Hrvatskoj, izabran sam u njegov osobni liječnički tim kao internist intenzivac.

1995. proveo sam dva mjeseca na edukaciji iz intervencijske kardiologije u Lyonu, u kardiopulmološkom centru “Louis Pradel”.

1996. bio sam dva tjedna na edukaciji iz intervencijske kardiologije na Texas Heart Institute, Houston, USA.

1998. jedan mjesec provodim na edukaciji iz transezofagealnog UZV i stres ehokardiografije na Georgetown University Medical Center, Washington DC, USA.

2002. godine dva tjedna u bolnici Bethanien u Frankfurtu (kod prof. Sieverta) na tečaju iz kardioloških intervencija u prirođenim i stečenim srčanim manama.

Objavio sam oko 70 radova, držao više predavanja i tečajeva u našoj zemlji iz neinvazivne i invazivne kardiologije. Sudjelovao sam u zapaženoj multicentričnoj europskoj ENACT studiji (vidi publikacije). Također sudjelujem u radu na istraživačkim projektima u našo zemlji (u prilogu).

Do sada sam učinio preko 2000 intervencijskih kardioloških zahvata, te oko 6000 invazivnih dijagnostika (kronarografija i kateterizacija srca), 5000 UZV srca ( TEE,TTE ), a godišnje obradim oko 300 bolničkih pacijenata i 1000 ambulantnih .

Na sjednici Fakultetskog vijeća, Medicinskog fakulteta 24.02.2004. prihvaćena mi je prijava i tema doktorske disertacije “Koncentracija cirkulirajućeg oksidiranog LDL-a (oxLDL) i protutijela na oxLDL u koronarnih bolesnika prije i nakon revaskularizacije”.

U Zagrebu 01.12.2006.

### Značajnije publikacije:

1. Vincelj J, **Starcevic B**, Sokol I, Sutlic Z. Rupture of a right sinus of valsalva aneurysm into the right ventricle during vaginal delivery: a case report. *Echocardiography*. 2005 Nov;22(10):844-6.
2. Bacak V, Biocina B, **Starcevic B**, Gertler S, Begovac J. Candida albicans endocarditis treatment with caspofungin in an HIV-infected patient--case report and review of literature. *J Infect*. 2006 Jul;53(1):e11-4.
3. Banic M, Sutlic Z, Biocina B, Kujundzic M, Fabijanic D, Ljubicic N, Plesko S, Buljevac M, Kardum D, Cabrijan Z, Grgurevic I, Urek M, Tadic M, Hulak V, Petroveckii M, Bedenikovic V, **Starcevic B**, Rotkvic I. Peptic ulcer disease in dyspeptic patients with ischemic heart disease: search and treat? *Z Gastroenterol*. 2005 Jun;43(6):581-6.
4. **Starcevic B**, Vagic JS. Stents without restenosis--true or a myth? *Acta Med Croatica*. 2004;58(2):143-6. Croatian.
5. Raguz M, **Starcevic B**, Todorovic N, Veskovic M, Vagic JS, Bergovec M. Percutaneous coronary interventions (PTCA and stent) myocardial infarct with ST segment elevation. *Acta Med Croatica*. 2004;58(2):107-9. Croatian.
6. Klinar I, Baršić B, Biočina B, **Starčević B**, Sutlić Ž, Vincelj J. Outcome of patients with infective endocarditis. *Neurologia Croatica*, 2003; 52:13-22.
7. Pintaric H, Nikolic-Heitzler V, Mihatov S, Vukosavic D, Lukenda J, Radic B, **Starcevic B**, Zigman M, Sharma M. Dominant right ventricular infarction: is angioplasty the optimal therapeutic approach? *Acta Med Austriaca*. 2001;28(5):129-34.
8. Fox KAA, Cokkinos DV, Deckers J, Keil U, Maggioni A, and Steg G on behalf of the ENACT (European Network for Acute Coronary Treatment) investigators. The ENACT study; a pan-European survey of acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2000; 21: 1440-1449. – član ENACT investigators
9. Klinar I, Baršić B., Marton E., Himbele J., Vranjiić Z, Kuzmanović N, Boras A, **Starčević B**, Biočina B. Retrospektivna analiza bolesnika s endokarditisom liječenih u desetogodišnjem razdoblju (1990.-1999.). *Infektološki glasnik* 2000 ; 2: 51-54.

10. Kes P, Reiner Z, **Starčević B**, Ratkovic-Gusic I. Influence of erythropoietin treatment on dialyzer reuse. *Blood Purif.* 1997;15(2):77-83.
11. Rundek T, Demarin V, Vuković V, Podobnik-Šarkanji S, **Starčević B**: TCD detection of cerebral emboli in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a 1 - year follow-up survey. In: *New Trends in Cerebral Hemodynamics and Neurosonology*, Ed. J.Klingelhofer, E.Bartels and E.B.Ringelstein, Elsevier 1997.;435-440.
12. Rundek T. Demarin V, Niederkom K, Vuković V, Podobnik-Šarkanji S, Runjić D, Lovrenčić-Huzjan A, **Starčević B**, Richter D, Planinc D.: Prevalence of intracranial emboli signals in patients with carotid and cardiac disease. *Acta Clin Croat* 1995; 34: 137-143.
13. Vuković V, Demarin V, Rundek T, Podobnik S, **Starčević B**, Planinc D: TCD detection of cerebral microemboli in patients with heart disease. *Acta Clin Croat* 1997;36:14-18.
14. Ferenčić Ž. **Starčević B**, Richter D: Fatal disseminated strongyloidiasis - a case report. *Vet Arh* 1992; 62: 49-52.
15. Škreb F, Gregorić N, **Starčević B**, Rožman B, Vlatković M, Šimonović I: Značaj tireostimulirajućih protutijela kod bolesti štitnjače. *Med Razgl* 1988; 27: 47-49.
16. Škreb F, Kusić Z, Prpić H, **Starčević B**: Učestalost pozitivnog titra mikrosomalnih i tireoglobulinskih antitijela štitnjače u populaciji sjeverozapadne Hrvatske. *Med Razgl* 1988;27:39-40.
17. Buhberger-Horvat K, Škreb F, **Starčević B**, Halbauer M, Tomić-Brzac H: Lymphocytic thyroiditis:cytologically, immunologically and functionally. *Period Biol* 1989; 91:451-452.
18. Škreb F, **Starčević B**, Vlatković M, Pavlinović Ž, Šimonović L: Serum concentration of procollagen type III in thyroid disorder. *Period Biol* 1989; 91: 461-462.
19. Sabolić I, Salihagić A, Zimolo Z, Jurčević S, Mačković-Bašić M, Čulić O, **Starčević B**, Škreb F: Proton pathways in renal brush-border membranes from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Period Biol* 1989; 91: 357-366.
20. Palić M, **Starčević B**, Anić B: Novo o virusnom hepatitisu. *Praxis Medici* 1987;18:37-61.

21. Morović-Vergles J, Čulo F, **Starčević B**: The influence of suppressor cells in the antitumor activity passively transferred immune cells. *Period Biol* 1986; 534-535.