

# Izražaj subpopulacija monocita i NK stanica u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

---

**Kumrić, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:619158>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marko Kumrić**

**IZRAŽAJ SUBPOPULACIJA MONOCITA I NK STANICA U BOLESNIKA S  
AKUTNIM KORONARNIM SINDROMOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Tina Tičinović Kurir, dr. med.**

**Split, srpanj 2020.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marko Kumrić**

**IZRAŽAJ SUBPOPULACIJA MONOCITA I NK STANICA U BOLESNIKA S  
AKUTNIM KORONARNIM SINDROMOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Tina Tičinović Kurir, dr. med.**

**Split, srpanj 2020.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Definicija, klasifikacija i epidemiologija infarkta miokarda.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Definicija.....	2
1.1.2. Klasifikacija .....	2
1.1.3. Epidemiologija IM.....	5
<b>1.2. Patologija IM.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Etiologija i rizični čimbenici.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Dijagnoza .....</b>	<b>7</b>
1.4.1. Anamneza i klinički pregled.....	7
1.4.2. Elektrokardiografija .....	8
1.4.3. Biokemijski parametri.....	9
1.4.4. Dijagnostički pristup.....	9
<b>1.5. Liječenje IM .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Prognoza i prognostički čimbenici.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7. Uloga upalnih parametara u infarktu miokarda.....</b>	<b>13</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Opis istraživanja.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Ispitanici .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Kriteriji uključenja u istraživanje .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Kriteriji isključenja iz istraživanja.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Provedeni postupci .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6. Statistička obrada podataka .....</b>	<b>20</b>

<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Osnovna obilježja ispitanika .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Rezultati protočne citometrije .....</b>	<b>23</b>
4.2.1. Dinamika CD226+ NK stanica u STE-ACS .....	23
4.2.2. Usporedna analiza subpopulacija monocita i NK stanica u STE-ACS i NSTE-ACS.....	24
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>28</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....</b>	<b>30</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>35</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>37</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>39</b>

## Zahvala

„Everyone has a plan, until they get hit.“ - Mike Tyson

*Ovim bih riječima započeo svoju zahvalu budući da me pratila tijekom cijelog studija. Isprva ništa ne bi krenulo prema planu, al bi se na kraju uvijek dobro završilo, pa sam evo na kraju puta, pišem zahvalu... Srećom, na cijelom ovom putu nisam bio sam, a ovim se putem želim zahvaliti upravo onima koji su bili sa mnom, bili oni svjesni toga ili ne. Za početak bih se zahvalio producentima emisije Extreme makeover koja me inspirirala da postanem liječnik. Posebno hvala i Uči, nastavniku čije su me metode vješanja na ploču u trenucima nemira formirale. Zahvalio bih prof. Ljiljani Mlačić-Brakus koja je rekla da će pojesti stol u knjižnici ako ja postanem liječnik pa mi je to bio čest izvor inspiracije za učenje. Zatim, zahvalio bih Dragi Jukiću na 15 minutnim kavama za vrijeme turnusa anatomije, kumu jer... je to kum i svim svojim ostalim vranama koji me zovu u svako doba dana i noći tražeći medicinske savjete, što me natjeralo da učim čak i one najrjeđe i najdosadnije bolesti. Kad već zahvaljujem, dodati moram i obitelj jer i njih uvijek nešto boli, iako im na sreću nikada nije ništa, a posebno želim izdvojiti svoje nećake Nastu i Boyku zbog kojih nije bilo teško učiti pedijatriju. Nadalje, zahvalio bih svojim džokerima zovi dr. Tatjani Postrak Jukić, dr. Josipu Zekiću i dr. Zoranu Tocilju koji su uvijek bili spremni dati stručni savjet. Zahvalio bih se i svim medicinskim sestrama, tehničarima, doktorima i profesorima koji se nisu libili podijeliti sa mnom svoja znanja i vještine. Hvala i treneru Tomislavu Marijanoviću što je napravio radnika i čovika od mene, bez kojeg ne bi bilo ništa od mene kao judaša, a ni kao liječnika. Za kraj, zahvalio bih se svojoj profi Rođenoj, mojoj majci među doktorima, mother from another grandmother, prof. Tini Tičinović Kurir, doktorici s kojom sam napravio prve korake u klinici, a koja me naučila da ako se glasa sa „IA, IA, IA!“ da je prvo magarac, a tek onda onda zebra i od koje ću u svojoj profesionalnoj karijeri još mnogo toga naučiti i čijih ću se savjeta uvijek sjetiti.*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

IM – infarkt miokarda

STEMI – infarkt miokarda sa ST elevacijom (engl. *ST-elevation myocardial infarction*)

STE-ACS – akutni koronarni sindrom sa ST elevacijom (engl. *ST-elevation acute coronary syndrome*)

NSTE-ACS – akutni koronarni sindrom bez ST elevacije (engl. *non-ST-elevation acute coronary syndrome*)

NSTEMI – infarkt miokarda bez ST elevacije (engl. *non ST-elevation myocardial infarction*)

hsTnI/hsTnT – visoko osjetljivi troponin I i T (engl. *high sensitivity troponin I and T*)

CK-MB – kreatin kinaza – mišić/mozak izoforma (engl. *creatine kinase – muscle/brain*)

PCI – perkutana koronarna intervencija (engl. *percutaneous coronary intervention*)

CABG – presadba koronarne arterije (engl. *coronary artery bypass grafting*)

EKG – elektrokardiogram

AKS – akutni koronarni sindrom

DM – šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

LBBB - blok lijeve grane (engl. *left bundle branch block*)

PVB – periferna vaskularna bolest

TIMI score – skor trombolize u infarktu miokarda (engl. *Thrombolysis In Myocardial Infarction score*)

GRACE – globalni registar akutnih koronarnih incidenata (engl. *The Global Registry of Acute Coronary Events*)

DSM – neusklađenost između dopreme i potražnje hranjivih tvari (engl. *demand-supply mismatch*)

## **1. UVOD**



## 1.1. Definicija, klasifikacija i epidemiologija infarkta miokarda

### 1.1.1. Definicija

Infarkt miokarda najjednostavnije se definira kao ozljeda srčanog mišića koja je nastala kao posljedica ishemije. Unatoč ovoj jednostavnoj definiciji koja sugerira etiologiju srčanog oštećenja, s kliničkog aspekta bilo je puno teže ostvariti definiciju koja će nam osigurati stvarnu distinkciju ishemijskog oštećenja srca i svih ostalih srčanih oštećenja. Upravo zbog toga, klinička dijagnoza i klasifikacija infarkta miokarda nikada nisu bile jednostavne i tijekom godina su prošle kroz veliki broj izmjena (1). Prvu poveznicu okluzije koronarnih arterija i samog infarkta miokarda pronašao je Hammer davne 1848. čineći post-mortem analize (2), a korelacija između formiranja tromba u koronarnim arterijama i simptoma koje danas poznajemo kao simptome ishemije utvrđena je već 1910. godine (3). Unatoč ovim vrlo znakovitim opservacijama, prošlo je skoro pola stoljeća prije nego što je entitet „infarkt miokarda“ ušao u kliničku praksu, ispočetka pod nazivom „koronarna tromboza“.

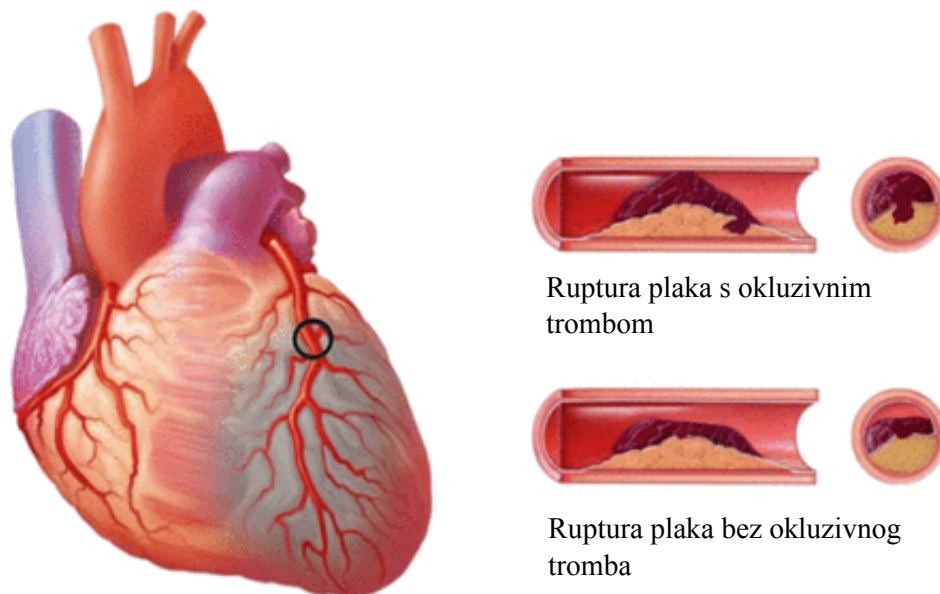
### 1.1.2. Klasifikacija

Prvu klasifikaciju infarkta miokarda objavila je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) 50-ih godina prošlog stoljeća na temelju EKG kriterija, a u epidemiološke svrhe (4). Sve do 2000. susljedne klasifikacije su imale samo epidemiološku svrhu, a uvođenjem osjetljivih srčanih biomarkera, kreirana je nova klasifikacija koja se temelji na kliničkom pristupu i time je redefiniran pojam IM (5). Ta je klasifikacija prošla do danas kroz četiri modifikacije, sa zadnjom modifikacijom objavljenom 2018. Prema suvremenoj, četvrtoj klasifikaciji, infarkte miokarda dijelimo na 5 tipova na temelju etiologije same ishemije (4).

#### 1.1.2.1. *IM tip 1*

Infarkt miokarda koji je nastao kao posljedica ruptуре ili erozije plaka na aterosklerotički promijenjenoj koronarnoj arteriji klasificira se kao tip 1 (Slika 1). Patofiziološki gledano, ruptura/erozija plaka može dovesti do potpune okluzije koronarne arterije stvaranjem tromba koji potpuno okludira žilu na mjestu ruptуре, a navedeno će rezultirati STEMI-jem, budući da će doći do transmuralne ozljede miokarda pa će vektor srčane struje biti usmjeren prema prsnom košu. S druge strane, može doći i do nepotpune okluzije žile što će rezultirati NSTEMI-jem jer će u tom

slučaju doći do subepikardijalne ozljede miokarda, a time i položajem vektora srčane struje suprotno od prsnog koša (6). Valja naglasiti da u 66% slučajeva do rupture dođe na žilama koje su prije toga bile nekritično stenozirane (manje od 50% lumena) (7). Razlikovanje STEMI-ja i NSTEMI-ja klinički je važno zbog različitog pristupa i prognoze (8).



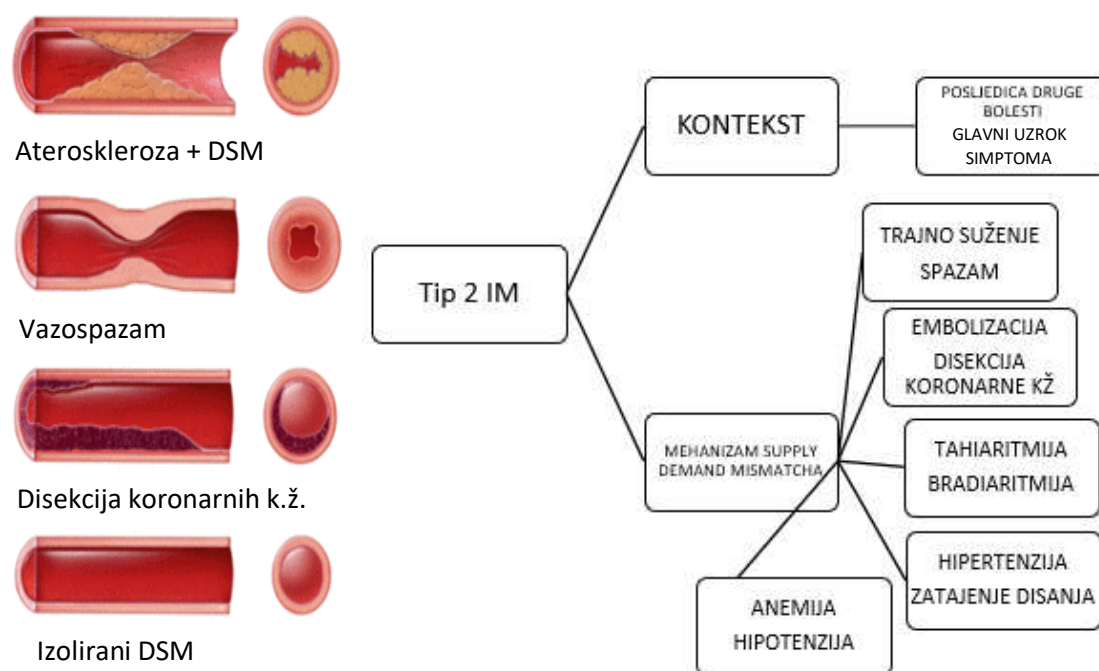
**Slika 1.** Patofiziološki mehanizam razvoja tipa 1 IM. (Preuzeto i prilagođeno prema: Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):618–51.)

#### 1.1.2.2. *IM tip 2*

Patofiziološki mehanizam koji dovede do ishemije miokarda, a kao posljedica DSM (engl. *demand-supply mismatch*), označavamo kao tip 2 IM (9) (Slika 2). Tip 2 obuhvaća pet patofizioloških scenarija:

1. Izolirani DSM;
2. DSM superponiran na aterosklerotički promijenjenu koronarnu krvnu žilu;
3. Vazospazam ili poremećaj koronarne mikrocirkulacije;
4. Ne-aterosklerotsku disekciju koronarne arterije;
5. Koronarnu emboliju od embolusa koji ne potječe iz koronarnih krvnih žila.

Koliku štetu će IM tipa 2 učiniti, ovisi o postojećoj koronarnoj bolesti, strukturnim abnormalnostima srca, težini stresora koji uzrokuju demand-supply mismatch te o ostalim nekardijalnim abnormalnostima. Tip 2 nalazimo u 25% svih slučajeva IM, a u čak 50% bolesnika ne nalazimo znakove prethodne koronarne bolesti (10). Tip 2 češći je u ženskoj populaciji, a prema većini studija povezan je s lošijom prognozom od tipa 1, zbog čega je važna distinkcija između ovih dvaju tipova IM (11).



**Slika 2.** Patofiziološki mehanizam razvoja tipa 2 IM. (Preuzeto i prilagođeno prema: Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):618–51.); Kratice: k.ž. – krvne žile, DSM – neujednačenost dopreme i potražnje hranjivih tvari (engl. *demand-supply mismatch*)

### 1.1.2.3. IM tip 3

Tip 3 infarkta je patofiziološki gledano jednak bilo tipu 1, bilo tipu 2, s razlikom da je u tipu 3 smrt nastupila prije nego što su postupci uzorkovanja krvi ili EKG-a mogli biti provedeni. Dakle, IM tip 3 nije posebni patofiziološki mehanizam, već privremena dijagnoza prije provođenja obdukcije (4).

#### 1.1.2.4. *IM tip 4*

IM tip 4 je peri ili post proceduralna komplikacija perkutane koronarne intervencije (PCI), a dijelimo ga u tri vrste, ovisno o vremenu nastanka komplikacije te o samom patofiziološkom poremećaju koji je uvjetovao nastanak IM tipa 4 nakon PCI (4):

1. Tip 4a – IM unutar 48 sati od PCI;
2. Tip 4b – IM kao posljedica tromboze unutar endovaskularne proteze;
3. Tip 4c – restenoza unutar endovaskularne proteze ili suženje segmenta dilatiranog balonom.

#### 1.1.2.5. *IM tip 5*

Tip 5 IM, poznat i kao IM povezan s koronarnim prenosnicama (engl. CABG), obuhvaća kardijalnu ozljedu koja nastaje isključivo kao posljedica ishemije za vrijeme CABG-a, što je ponekad teško utvrditi s obzirom na to da tijekom operacije dolazi do ozljede srca zbog mehaničke traume na srčani mišić (4).

#### 1.1.2.6. *Razlika između reinfarkta i rekurentnog infarkta*

Reinfarkcija obuhvaća ponovljeni IM unutar 28 dana od posljednjeg infarkta kojeg je osoba prebolila. S druge strane, rekurentni infarkt označava ponovljeni IM nakon više od 28 dana od prvog infarkta. Zbog dinamike promjena u EKG-u koja prate incidentni infarkt, ponekad je teško na temelju EKG-a utvrditi je li došlo do reinfarkcije pa je nužno pratiti razine visoko osjetljivog troponina (4).

#### 1.1.3. Epidemiologija IM

Ishemijska srčana bolest glavni je uzrok smrti u svijetu prema podacima WHO-a, uzrokujući 9,5 milijuna smrti godišnje, čineći udio veći od 16% u ukupnoj smrtnosti (12). Infarkt miokarda, kao glavni predstavnik koronarne bolesti, zaslužan je za 7% svih smrtnih slučajeva na području Republike Hrvatske u 2018. godini, od čega su 2/3 činili muškarci (13). Prema zadnjim dostupnim informacijama Europskog kardiološkog društva, procjenjuje se da je na području RH incidencija infarkta miokarda oko 200/100000 stanovnika (14).

## 1.2. Patologija IM

S patološkog aspekta, IM se definira kao nekroza tkiva miokarda uzrokovana produljenom ishemijom (15). Prve ultrastrukturne abnormalnosti, koje se javljaju unutar 10 minuta od početka ishemije su: smanjenje depozita glikogena, disrupcija sarkoleme i mitohondrijske abnormalnosti. Ponekad su potrebni sati prije nego što se nekroza može detektirati *post-mortem* PHD-analizom (16). Eksperimentalno, nekroza postupno progredira od subendokarda prema subepikardu u roku nekoliko sati, što je u sprezi s razlikama u EKG nalazu između STEMI-ja i NSTEMI-ja (17). Valja naglasiti da pravodobna reperfuzija smanjuje opseg tkiva miokarda koji je infarcirao (18). *Post-mortem* analizama koronarnih krvnih žila utvrdilo se da u STEMI-ju nalazimo crveni ugrušak pun fibrina, a u NSTEMI-ju bijeli ugrušak kojeg tvore trombociti (19).

## 1.3. Etiologija i rizični čimbenici

Glavni etiološki faktor koji dovodi do smanjenog protoka, a onda i do IM jest ateroskleroza koronarnih krvnih žila, stoga rizični faktori za istu predstavljaju rizične faktore za razvoj IM (20). Etiološki čimbenici nevezani uz aterosklerozu čine 3% svih slučajeva IM, a redom su trauma, vaskulitis, kokain i ostali vazokonstriktori, anomalije koronarnih arterija, embolija koronarnih arterija, disekcija koronarnih arterija i stanja povećane potražnje miokarda za kisikom (21).

Tradicionalno, čimbenike rizika za aterosklerozu dijelimo na modificirajuće i nemodificirajuće (21). Nemodificirajući čimbenici su:

1. Muški spol;
2. Starija dob;
3. Pozitivna obiteljska anamneza;
4. Androgeni tip ćelavosti.

Modificirajući čimbenici su:

1. Pušenje;
2. Dislipidemija;
3. *Diabetes mellitus*;

4. Hipertenzija;
5. Debljina;
6. Manjak tjelovježbe;
7. Periferna vaskularna bolest;
8. Povećana razina homocisteina u krvi;
9. Nezadovoljavajuća oralna higijena.

## 1.4. Dijagnoza

Današnji dijagnostički pristup IM obuhvaća nekoliko sastavnica: Anamnestičke podatke i klinički pregled, seriju EKG-a, visoko osjetljivi troponin I i T (hsTnI/hsTnT) te slikovne metode poput CT-angiografije, MR srca, koronarografije i radionuklidne pretrage srca.

### 1.4.1. Anamneza i klinički pregled

Anamneza i klinički pregled imaju ulogu u određivanju vjerojatnosti dijagnoze AKS, ali i u svrhu prognoze. Tipični klinički prikaz AKS-a karakteriziran je dubokom, slabo lokaliziranom boli u retrosternalnoj regiji (Levineov znak) sa širenjem u lijevu ruku, lopaticu ili čeljust. Razlika u odnosu na stabilnu anginu je pojava stabilne angine pri naporu ili emocionalnom stresu, te olakšanje na nitroglicerini i mirovanje, što izostaje u AKS-u i čini važno diferencijalno dijagnostičko sjecište. U žena i starijih bolesnika, mogu se javiti atipični simptomi, takozvani ekvivalenti angine: dispneja (najčešća), mučnina i povraćanje, znojenje i neobjašnjivi umor. Bol koja je oštra, probadajuća i lokalizirana vrškom prsta slabo korelira s AKS-om (21).

Pet najvažnijih faktora koji nas upućuju na vjerojatnost ishemijske etiologije su sljedeći (poredani prema važnosti): anginalna priroda simptoma, pozitivna osobna anamneza na bolest koronarnih arterija, starija dob, muški spol i, posljednji po važnosti, spomenuti tradicionalni rizični faktori (hipertenzija, hiperkolesterolemija, pušenje, šećerna bolest i pozitivna obiteljska anamneza na IM) (21).

Glavni ciljevi kliničkog pregleda u AKS-u su: utvrđenje ishemijske etiologije ozljede srčanog mišića, procjena utjecaja AKS-a na hemodinamiku i tragova koji mogu pomoći u diferencijalnoj dijagnozi. U kliničkoj slici u tom smislu tragamo za znojenjem, krepitacijama,

hipotenzijom, tahikardijom, oslabljenim pulsevima, blijedom i hladnom kožom te trećim srčanim tonom, budući da nam svi ti znakovi govore u prilog negativnom utjecaju AKS-a na hemodinamiku. Također, uočimo li zvuk perikardijalnog trenja ili različite pulseve na lijevoj i desnoj ruci, usmjerit ćemo dijagnostiku prema odgovarajućim entitetima (perikarditis i aortna disekcija).

#### 1.4.2. Elektrokardiografija

Prema važećim smjernicama, kliničar bi morao prvi EKG napraviti unutar 10 minuta od prijema (22). Osim inicijalnog EKG-a prije bolničkog prijema koji ubrzava put do dijagnoze i liječenja, EKG bi unutar prvih sat do 2 trebalo ponavljati svakih 15 do 30 minuta, a posebno ako inicijalni EKG nije bio dijagnostički za AKS. Korisnost EKG-a je također i u praćenju uspješnosti reperfuzijske terapije, budući da nakon uspješne reperfuzije nakon STEMI-ja dolazi do redukcije ST elevacije (22). Uloga EKG-a u dijagnozi IM je dvojaka. Prva je uspostavljanje dijagnoze, a druga je prognoza, budući da će bolesnici s izostankom znakova ishemije u EKG-u imati bolju prognozu (22).

Glavni EKG nalaz koji upućuje na STEMI jest elevacija ST-segmenta (od početka QRS kompleksa do J točke) za više od 1 mm u 2 susjedna odvoda, u svim odvodima osim u  $V_2$  i  $V_3$ . U odvodima  $V_2$  i  $V_3$ , za žene je značajna vrijednost elevacije veća od 1,5 mm, za muškarce starije od 40 godina veća od 2 mm te za muškarce mlađe od 40 godina više od 2,5 mm (4). Konveksni i uzlazni ili ravni oblik ST segmenta upućuju na ishemiju miokarda, dok konkavni oblik bez obzira na elevaciju ima nisku prediktivnu vrijednost za STEMI. Valja naglasiti da su svi ovi kriteriji primjenjivi samo u izostatku prijašnjeg bloka lijeve grane (LBBB). U slučaju prijašnjeg LBBB, za dijagnozu STEMI-ja koriste se modificirani Sgarbossa kriteriji (23).

Sama novonastala pojava LBBB smatra se kliničkim ekvivalentom STEMI-ja. Naime, pokazalo se da 5-20% osoba s anginalnim simptomima i od prije nepoznatim LBBB imaju potpunu okluziju neke od koronarnih arterija. Osim novonastalog bloka lijeve grane, ekvivalent STEMI-ja mogu biti i hiperakutni T valovi u vrlo ranom infarktu, nastali zbog lokalne hiperkalijemije uzrokovane destrukcijom miokarda te de Winter valovi, odnosno visoki T valovi praćeni ST depresijom u prekordijalnim odvodima (24).

EKG znakovi koji upućuju na nestabilnu anginu/NSTEMI su horizontalna ili silazna ST-depresija veća od 0,5 mm u barem dva susjedna odvoda (uz uvjet da ne predstavljaju reciprocitet ST elevaciji) i/ili negativni valovi dubine veće od 1 mm u svim odvodima s R/S omjerom većim od 1 (4).

#### 1.4.3. Biokemijski parametri

Tijekom povijesti razni biokemijski parametri služili su u dijagnostici AKS-a. Dio panela biokemijskih pretraga u okviru obrade bolesnika sa sumnjom na AKS činili su: aspartat aminotransferaza (AST), mioglobin i izoforma kreatin kinaze mišić-mozak (CK-MB). U današnje vrijeme ti su parametri većinom postali opsolentni zbog niže osjetljivosti i specifičnosti, osim CK-MB u zemljama trećeg svijeta, a određeni autori navode i korištenje mioglobina u ranoj dijagnostici, koristeći njegovo svojstvo ranog porasta u AKS-u.

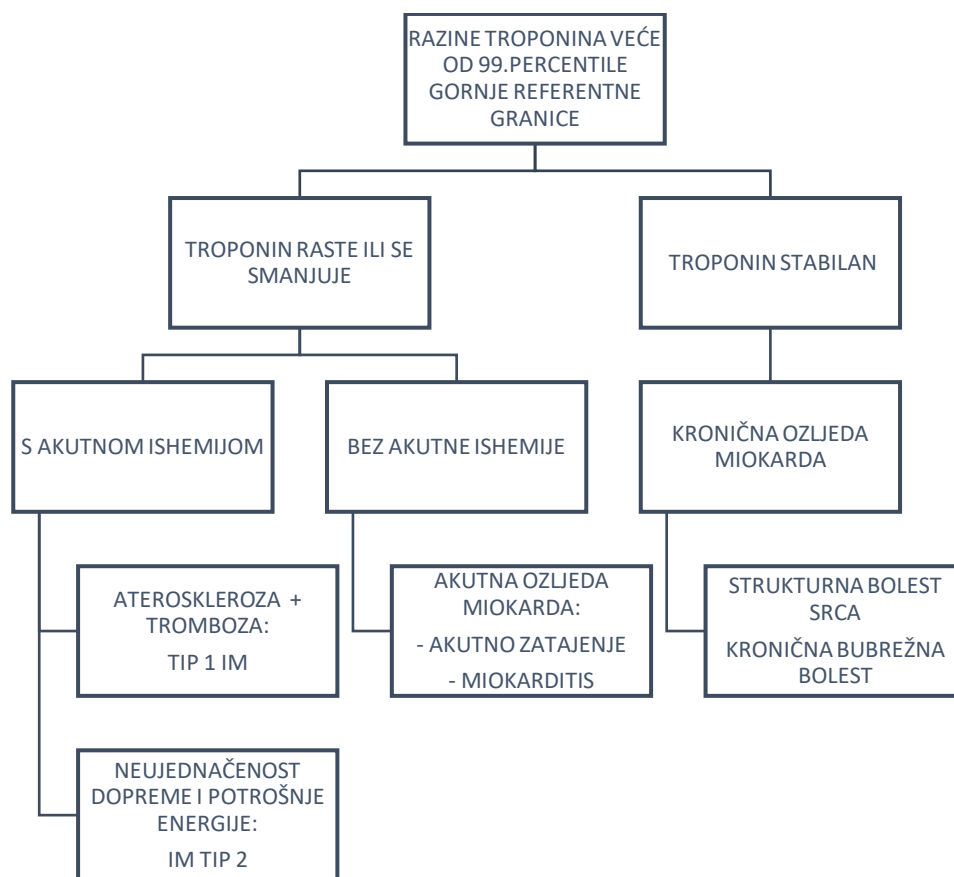
Današnji standardni biokemijski parametri su srčani troponini I i T visoke osjetljivosti. Vrijednosti iznad 99. percentile gornje referentne granice gotovo su siguran znak ozljede miokarda (25). Ipak, nužno je naglasiti da sam porast troponina ne upućuje na patofiziologiju oštećenja miokarda, već samo na oštećenje miokarda *per se* pa su tako, uz ishemiju kao najvažnije oštećenje, mogu javiti i drugi uzročnici porasta troponina: anemija, šok/hipotenzija, ventrikularna tahiaritmija, bolesti bubrega, zatajenje srca i mnogi drugi (26).

#### 1.4.4. Dijagnostički pristup

Inicijalni korak u dijagnozi IM jest EKG, a protokol provođenja istog opisan je u odlomku o EKG-u. Sljedeći korak u analizi jest mjerenje biokemijskih parametra, ukoliko je dostupan, to je uvijek hsTnI/TnT (26). Uz karakterističnu simptomatologiju i nalaz ishemijskog uzorka ST-elevacije, dijagnoza STEMI-ja je praktički postavljena i biokemijski parametri neće promijeniti tijek liječenja, ali srčani troponini se svejedno mjere u svrhu potvrde. Ipak u većini slučajeva, da bismo postavili dijagnozu infarkta miokarda potrebno je višekratno testirati razinu hsTnI/TnT u uzorcima krvi. Naime, jedna vrijednost ne mora upućivati na akutnu ozljedu miokarda već može biti riječ o kroničnoj (26).



Prvi korak bliže u dijagnostici IM, u vidu biokemijskih parametara, jest pojava barem jedne vrijednosti hsTnI/TnT veće od 99. percentile gornje referentne granice. Kada se takva utvrdi, sljedeći korak u algoritmu je utvrđivanje dinamike troponina pa će tako promjena manja od 20% upućivati na kroničnu ozljedu miokarda, a ne na akutno zbivanje (26) (Slika 3). Ukoliko je pad ili rast vrijednosti troponina veći od 20%, sljedeće dijagnostičko raskrižje bit će etiološka diferencijacija porasta srčanih troponina pa ćemo na temelju kliničkih simptoma i znakova te ostalih dijagnostičkih procedura odrediti radi li se o ishemijskoj ili neishemijskoj ozljedi miokarda. Kao zadnji korak, prema smjernicama novijeg doba, potrebno je još utvrditi radi li se o tipu 1 ili tipu 2 IM, što ćemo odrediti tako što ćemo tragati za DSM poremećajima. U slučaju da nađemo na takav poremećaj, postaviti ćemo dijagnozu tipa 2 IM, a inače tipa 1 (27).



**Slika 3.** Dijagnostički pristup IM. (Preuzeto i prilagođeno prema: Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. Circulation. 2018;138(20):618–51.)

## 1.5. Liječenje IM

Inicijalnu terensku terapiju u liječenju IM pamtimo po akronimu MONA, protokolu koji se sastoji od primjene morfija, kisika, nitroglicerina, aspirina te klopidogrela/tikagrelola. Unatoč širokoj primjeni ovog protokola, snagu dokaza A i razinu preporuke 1 imaju samo aspirin u dozi od 300 mg i klopidogrel u dozi od 600 mg, a prema novim dokazima i tikagrelol u dozi od 180 mg (28). Konačni terapijski pristup (kratkoročno) ovisi o tipu akutnog koronarnog sindroma. Naime, ukoliko je riječ o bolesnicima sa STEMI-jem ili bolesnicima s NSTEMI-jem vrlo visokog rizika (primjerice hemodinamski nestabilni), terapija izbora jest primarna PCI (29). U tih bolesnika primarnu PCI može zamijeniti fibrinolitička terapija, ali ako i samo ako najbliži centar za provedbu PCI nije dostupan unutar 120 minuta (29). Za bolesnike s NSTEMI-jem u odabiru terapije najvažnija je stratifikacija bolesnika prema riziku, budući da na temelju nje određujemo hoćemo li i kada ćemo provesti PCI. Stratifikacija rizika i prateća terapija za bolesnike s NSTEMI-jem navedena je u Tablici 1 (30). Za pomoć u stratifikaciji bolesnika s NSTEMI-jem koriste se GRACE (engl. *The Global Registry of Acute Coronary Events*) i TIMI skor (engl. *Thrombolysis In Myocardial Infarction score*) (31,32). Ta dva sustava vrednovanja, osim uloge u stratifikaciji, služe i u procjeni prognoze bolesnika sa STEMI-jem i NSTEMI-jem. Postoje dva TIMI skora pri čemu se jedan koristi za procjenu prognoze bolesnika sa STEMI-jem, a drugi za bolesnike s nestabilnom anginom pectoris i NSTEMI-jem. TIMI za STEMI ima raspon od 0 – 14, a što je veći, to je omjer izgleda za smrtnost u sljedećih 30 dana veća. TIMI za nestabilnu anginu pectoris i NSTEMI ima raspon od 0 – 7, uz iste zakonitosti kao i TIMI za STEMI (31). GRACE skor ima ulogu u predikciji mortaliteta za vrijeme boravka u bolnici, a predikcija se vrši dodjeljivanjem bodova na temelju godina, pulsa, tlaka, kreatinina, Killip klase, nalaza EKG-a, srčanih markera te aresta pri prijemu. Maksimalni broj bodova koji ujedno predviđa najveću smrtnost jest 363 (32).

**Tablica 1.** Stratifikacija bolesnika sa infarktomiokarda bez ST-elevacije.

<b>Liječenje</b>	<b>Rizični faktori</b>
<b>PCI unutar 120 minuta</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Refrakтерна angina</li><li>○ Angina koja se vraća pri minimalnom naporu</li><li>○ Novonastalo zatajenje srca ili pogoršana mitralna regurgitacija</li><li>○ Hemodinamska nestabilnost</li><li>○ Ventrikularna fibrilacija ili ventrikularna tahikardija duža od 20 sekundi</li></ul>
<b>Rana invazivna PCI (2-24h)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Ništa od gore navedenog, ali uz GRACE skor veći od 140</li><li>○ Novonastala depresija ST segmenta</li><li>○ Novonastala promjena vrijednosti troponina</li></ul>
<b>Odgodena invazivna PCI (24-72h)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Ništa od gore navedenog, ali uz šećernu bolest</li><li>○ Renalna insuficijencija (eGFR &lt;60 mL/min na 1.73 m<sup>2</sup>)</li><li>○ Ejekcijska frakcija &lt; 40%</li><li>○ Rana post-infarktna angina</li><li>○ PCI već rađen unutar 6 mjeseci ili prethodni CABG</li><li>○ GRACE 109–140 ili TIMI ≥2</li></ul>
<b>Ishemijska strategija</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Niski GRACE i TIMI skor</li><li>○ Žene niskog rizika i troponina</li></ul>

Preuzeto i prilagođeno prema: Harrison T, Kasper D. Harrison's Principles Of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill Medical Publ. Division; 2015.; Kratice: GRACE – globalni registar akutnih koronarnih incidenata (engl. *The Global Registry of Acute Coronary Events*), PCI – perkutana koronarna intervencija (engl. *Percutaneous coronary intervention*), CABG – presadba koronarne arterije (engl. *Coronary artery bypass grafting*), TIMI score – skor trombolize u infarktu miokarda (engl. *Thrombolysis In Myocardial Infarction score*)

## **1.6. Prognoza i prognostički čimbenici**

Smrtnost IM u prvih 30 dana je od 2,5 – 10%, a čak 50% bolesnika unutar prve godine ponovno potraži liječničku pomoć (33). Glavni prognostički čimbenici su dob, dijabetes u anamnezi, prijašnji IM, CVI ili PVB, smanjenje ejeckijske frakcije, povećane razine BNP-a, kasno provedena PCI i depresija (33). Kako bismo lakše procijenili prognozu bolesnika s IM oformljeno je nekoliko sustava vrednovanja. Najčešće korišteni su GRACE i TIMI skor (31,32).

## **1.7. Uloga upalnih parametara u infarktu miokarda**

Brojna istraživanja ukazala su na važnost sistemskog, ali i lokalnog upalnog odgovora u koronarnim incidentima. Gotovo sve imunološke stanice pokazale su aktivnost u koronarnoj bolesti, međutim uz različitu važnost. Većina autora smatra da su makrofagi najvažnije upalne stanice u aterosklerotskom procesu. Makrofagi su dio filogenetski starijeg, nespecifičnog (urođenog) imunološkog sustava, koji čini prvu liniju obrane protiv mikroorganizama. Posljedično, dio su svake upalne reakcije u organizmu, a tako i aterosklerotskog plaka, čija patofiziologija primarno ovisi o tijeku upalne reakcije (34). Monociti unutar plaka poprimaju tkivni oblik makrofaga mijenjajući obrasce sinteze unutar stanice i time modificirajući svoju ulogu. Promjena sinteze proteina također dovodi do promjene izražaja biljega diferencijacije na površini stanice što iskorištavamo u analizi tih stanica. Makrofagi u stabilnom plaku predstavljaju glavno skladište lipida, a aktivnost NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora pokazala se ključnom u patogenezi ruptуре plaka (35).

Usprkos nedvojbenoj važnosti makrofaga, ne treba zanemariti i ostale imunološke stanice poput NK stanica (36). NK stanice su stanice limfoidne loze koje također pripadaju nespecifičnom imunološkom sustavu, a njihova primarna uloga u organizmu je citotoksični učinak na tumorske i virusom inficirane stanice. U patogenezi aterosklerotskog plaka im je uloga dvojbeno, a noviji radovi ih opisuju kao „slučajne prolaznike“ unutar samog plaka (37). Osim zbivanja unutar plaka, nespecifična upalna reakcija ima i sistemsku komponentu koju analiziramo u ovom radu prateći dinamiku CD16+CD226+ i CD16+CD56- NK stanica te CD14++CD16- monocita u akutnom koronarnom sindromu.

Monociti i granulociti su pokazali da mijenjajući ekspresiju svojih molekula na površini mogu dovesti do aktivacije koagulacijske kaskade i da je broj takvih monocita i neutrofila povećan u okolini plaka u odnosu na ostatak sistemske cirkulacije (38).

CD16+CD226+ je subpopulacija NK stanica s izraženom DNAX akcesornom molekulom-1 (DNAM-1 ili CD226). DNAM-1 je aktivirajući receptor kojeg nalazimo na nekim NK stanicama, T-limfocitima i monocitima, a koji se vezuje za ligande CD155 ili CD112. Njegova uloga se očituje u edukaciji NK stanica, međustaničnim procesom kojeg čine aktivacijski, inhibicijski i adhezijski signali, a koji u konačnici koordinira djelovanje i ciljne mete NK stanica. Radovi upućuju na to da se edukacija može odviti i bez DNAM-1, zbog čega zaključujemo da DNAM-1 ima određenu ulogu, ali nije *conditio sine qua non* u edukaciji NK stanica (39). Budući da djeluju na tako važnu skretnicu imunološkog sustava, ne čudi to što CD226 ima ulogu u imunološkom odgovoru na tumore, u okviru alergijskog imunološkog odgovora i u autoimunim bolestima (40,41). Ulogu CD226 u IM proučili su Li i sur., a utvrdili su da u miševa dolazi do pojačane ekspresije CD226 u nekrotičnom dijelu miokarda nakon podvezivanja koronarne arterije (42).

CD14++CD16- je subpopulacija monocita, poznata i kao klasični monociti, koja čini 80 – 95% svih monocita u cirkulirajućoj krvi i ima jaku fagocitičku aktivnost, a monociti te subpopulacije važne su *scavenger* stanice (38). Knorr i sur. su pokazali da ova subpopulacija djeluje izrazito proaterogeno izlučujući TNF-alfa (43).

CD16+CD56- NK stanice su rijetke NK stanice koje na površini ne eksprimiraju CD56, adhezijsku molekulu neuralne stanice (NCAM1), važnog markera citotoksičnosti NK stanica. Ovu subpopulaciju bez izraženog CD56 rijetko pronalazimo u zdravih pojedinaca, a povišene razine nalazimo u bolesnika s kroničnim infekcijama HIV-om i Hepatitis C virusom (44). Budući da ateroskleroza predstavlja oblik kronične upale, a da ista subpopulacija nije istražena u sklopu koronarne bolesti, smatramo da je treba proučiti. Ono što istraživanje upalnih stanica u okviru AKS čini aktualnom je činjenica da unatoč brojnim istraživanjima, mnoga pitanja još uvijek nisu razjašnjena. Još uvijek nije potpuno jasno je li upalni odgovor uzrok ili posljedica aterosklerotske bolesti. Prema istraživanjima novijeg datuma, čini se da upala spada pod uzročni spektar, iako je vrlo teško dati decidan odgovor s obzirom na to da je upalni odgovor i posljedica, budući da dolazi do oštećenja endotela lokalno, ali i miokarda u cjelini (45).

Poznavanje tog patofiziološkog mehanizma je važno zbog terapijskih rješenja koja mogu proizići iz tih razmatranja. Već dugi niz godina se anti-inflamatorna svojstva aspirina i statina koriste u stabilizaciji plaka, međutim daljnje terapijske opcije su još otvorene zbog nepotpunog terapijskog uspjeha dostupnih lijekova u liječenju koronarne bolesti (46,47).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika u broju CD16+CD226+ NK stanica u uzorku krvi po prijemu u odnosu na uzorak krvi nakon 3 sata od prijema u bolesnika sa STE-ACS-om te postoji li razlika u broju CD14++CD16- monocita i CD16+CD56- NK stanica u bolesnika sa STE-ACS-om u odnosu na bolesnike s NSTEMI-ACS-om.

Hipoteze ovog istraživanja:

1. Nakon 3 sata od prijema, doći će do smanjenja postotka subpopulacije CD16+CD226+ NK stanica unutar limfocitne populacije u uzorku krvi bolesnika sa STE-ACS-om.
2. Prosječni izražaj biljega CD16+ po jednoj CD16+CD56- NK stanici u uzorku krvi po prijemu bit će veći u bolesnika sa STE-ACS-om, nego u bolesnika s NSTEMI-ACS-om.
3. Postotak CD14++CD16- monocitne subpopulacije unutar populacije monocita u uzorku krvi po prijemu bit će veći u bolesnika sa STE-ACS-om, nego u bolesnika s NSTEMI-ACS-om.



### **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Opis istraživanja**

Provedeno istraživanje je s obzirom na pristup opservacijsko, a s obzirom na namjenu primijenjeno istraživanje. Svi ispitanici uključeni u istraživanje obaviješteni su o tijeku i cilju istraživanja. Prije početka istraživanja, svi ispitanici potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu te je provedeno u skladu sa svim etičkim principima sedme revizije Helsinške deklaracije iz 2013. godine.

### **3.2. Ispitanici**

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 10 bolesnika s dijagnozom STE-ACS-a te 8 bolesnika s dijagnozom NSTEMI-ACS-a koji su bolnički liječeni u Kliničkom bolničkom centru Split. Istraživanje je provedeno od 1. veljače 2019. do 1. srpnja 2019. Dva bolesnika sa STE-ACS-om su isključena iz analize CD226+ NK stanica, budući da im nismo prikupili uzorak krvi nakon 3 sata zbog prebačaja u jedinicu intenzivne liječenja uslijed komplikacija bolesti.

### **3.3. Kriteriji uključanja u istraživanje**

U istraživanje su uključeni bolesnici s dijagnozom akutnog koronarnog sindroma sa i bez ST-elevacije, koji su zaprimljeni na Hitnom internom prijemu Kliničkog bolničkog centra Split u navedenom razdoblju.

### **3.4. Kriteriji isključenja iz istraživanja**

Iz istraživanja su isključeni bolesnici s nestabilnom anginom pectoris, hematološki bolesnici i imunokompromitirani bolesnici.

### **3.5. Provedeni postupci**

Od bolesnika sa STE-ACS-om smo sakupili uzorak krvi pri prijemu i nakon 3 sata, dok smo od bolesnika sa NSTEMI-ACS-om prikupili samo uzorak krvi pri prijemu. Od svih bolesnika smo prikupili opće i antropometrijske podatke (dob, spol, tjelesna masa, tjelesna visina, opseg struka, opseg bokova). Podatke o dobi, spolu, tjelesnoj visini i tjelesnoj masi smo prikupili iz medicinske dokumentacije bolesnika. Opseg struka mjereno je na polovini udaljenosti između ilijačne kriste i donjeg ruba rebrenog luka, a opseg bokova u razini velikih trohantera.

Laboratorijska obrada uzoraka krvi provedena je u Laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu unutar 6 sati od sakupljanja uzorka. Uzorci krvi iz jedne od perifernih vena ruke uzeti su u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Analizirano je 100  $\mu$ L pune krvi, prethodno obrađene reagensom koji se vezuje za Fc receptore kako bi se spriječila nespecifična vezanja protutijela (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka). Nakon 20 minutne inkubacije s protutijelima na CD226 (konjugirano s kromogenom Alexa Fluor 647; BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD), CD16 (konjugirano s kromogenom PE; BD Pharmingen) i CD14 (konjugirano s kromogenom FITC; BD Pharmingen) u mraku, na sobnoj temperaturi te lize eritrocita pomoću otopine za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), fluorescencija obojenih uzoraka izmjerena je pomoću BD Accuri C6 (BD Biosciences, Belgija). Podaci dobiveni protočnom citometrijom obrađeni su u Flow Logic programu (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Iz nalaza citometra izračunali smo prosječne logaritme intenziteta fluorescencije kromogena s protutijela, a potom smo iste koristili u statističkoj analizi.

### **3.6. Statistička obrada podataka**

U statističkoj analizi korišten je računalni program IBM SPSS 24.0 za Windows 10 (IBM, Armonk, NY, SAD). Kontinuirane varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon 25-75. U usporedbi općih i antropometrijskih karakteristika koristili smo Mann-Whitney U test, osim u slučaju spola, gdje smo koristili Fischerov egzaktni test. Za usporedbu CD226+ NK stanica korišten je Wilcoxon rank sum test, a u analizi CD56- NK stanica i CD14++CD16- monocita korišten je Mann-Whitney U test. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Osnovna obilježja ispitanika

U niti jednoj od mjerenih općih i antropometrijskih karakteristika nije bilo statistički značajne razlike između bolesnika sa STE-ACS-om i bolesnika s NSTE-ACS-om. Opće i antropometrijske karakteristike prikazane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Opće i antropometrijske karakteristike bolesnika.

Parametar	STE-ACS (n=10)	NSTE-ACS (n=8)	P
Dob pri dijagnozi (godine)	57 (52-60)	64 (54-75)	0,373*
Spol (prikazan kao apsolutni broj)			
Muškarci	8	7	0,588†
Žene	2	1	
Tjelesna visina (cm)	179 (175-184)	185 (182-186)	0,952*
Tjelesna masa (kg)	86 (66-98)	97 (83-101)	0,308*
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 (25,1-28,4)	27,6 (26,5-28,7)	0,772*
Opseg struka (cm)	99 (90-110)	112 (103-119)	0,110*
Opseg bokova (cm)	98 (93-107)	100 (96-106)	0,535*
W/H	1,01 (0,90-1,11)	1,07 (1,05-1,19)	0,984*

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) ako nije drugačije naznačeno

Kratice: ITM – indeks tjelesne mase, W/H – omjer opsega struka i bokova (engl. *waist/hip*)

\*Mann-Whitney U test; †Fisherov egzaktni test

## 4.2. Rezultati protočne citometrije

### 4.2.1. Dinamika CD226+ NK stanica u STE-ACS

U uzorcima krvi bolesnika sa STE-ACS-om nakon 3 sata, medijan prosječnog logaritma fluorescencije CD226+ NK stanica bio je statistički značajno manji nego u uzorcima krvi uzetim pri prijemu od istih bolesnika ( $P=0,023$ ) (Tablica 3).

**Tablica 3.** Dinamika CD226+ NK stanica u krvi ispitanika pri prijemu i nakon 3 sata.

Parametar	0 h	3 h	<i>P</i> *
Prosječni logaritam fluorescencije CD226+ NK stanica (n=8)	62,2 (55,9 – 65,3)	43,75 (38,2 – 50,8)	0,010

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).

Kratice: STE-ACS – akutni koronarni sindrom sa ST-elevacijom, NSTEMI-ACS – akutni koronarni sindrom bez ST-elevacije

\*Wilcoxon rank sum test

#### 4.2.2. Usporedna analiza subpopulacija monocita i NK stanica u STE-ACS i NSTEMI-ACS

U uzorcima krvi bolesnika sa STE-ACS-om pri prijemu, medijan prosječnog logaritma fluorescencije CD56- NK stanica bio je veći nego u uzorcima bolesnika s NSTEMI-ACS-om te je utvrđena statistička značajnost ove razlike ( $P=0,014$ ) (Tablica 3).

Mjerenjem je utvrđeno da između medijana prosječnog logaritma fluorescencije CD14++CD16- monocita iz uzorka krvi bolesnika sa STE-ACS-om i bolesnika s NSTEMI-ACS-om nema statistički značajne razlike ( $P=0,666$ ) (Tablica 4).

**Tablica 4.** Usporedba broja CD56- NK stanica i CD14++CD16- monocita u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom sa ST-elevacijom i bolesnika s akutnim koronarnim sindromom bez ST-elevacije.

Parametar	STE-ACS (n=10)	NSTEMI-ACS (n=8)	<i>P</i> *
Prosječni logaritam fluorescencije CD56- NK stanica	904,5 (866,4 – 957,6)	800,1 (748,6 – 899,5)	0,023
Prosječni logaritam fluorescencije CD14++CD16- monocita	5,4 (3,1 – 8,9)	3,8 (2,0 – 6,3)	0,645

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).

Kratice: STE-ACS – akutni koronarni sindrom sa ST-elevacijom, NSTEMI-ACS – akutni koronarni sindrom bez ST-elevacije

\*Mann-Whitney U test

## **5. RASPRAVA**



Uloga upalnih stanica u kontekstu akutnog koronarnog sindroma, ali i aterosklerotske bolesti općenito, tema je mnogih radova u znanstvenim publikacijama, dijelom zbog toga što je koronarna bolest srca još uvijek jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu, a dijelom jer ta uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (12). Ovo istraživanje pokušalo je razjasniti tu sliku praćenjem ponašanja upalnih stanica u akutnom koronarnom sindromu.

Prateći dinamiku CD226+ NK stanica u bolesnika sa STE-ACS-om, utvrdili smo da nakon 3 sata dolazi do značajnog smanjenja broja istih u perifernoj krvi bolesnika. Smatramo da je uzrok smanjenja broja u perifernoj krvi migracija te subpopulacije NK stanica u područje infarkcije, što je u sprezi s istraživanjem Lija i suradnika koji su u miševa s laboratorijski uzrokovanom transmuralnom nekrozom miokarda utvrdili porast CD226 ekspresije u području infarkcije (42). Naime, pokušavajući utvrditi ulogu CD226 u IM, Li i sur. su došli do dva saznanja. Utvrdili su da je ekspresija CD226 veća u infarciranom području miokarda, nego u ostatku srčanog mišića. Uz to, pokazali su da u miševa s *knockout*-om CD226 gena dolazi do značajnog poboljšanja postinfarktnog cijeljenja miokarda i atenuacije širenja infarktnog područja. Drugo saznanje potencijalno bi moglo biti važno kao terapijska točka djelovanja, a to bi moglo biti i praktično jer se inhibicija CD226 već istražuje kao potencijalno liječenje polimiozitisa i dermatomiozitisa (48).

Usporedbom CD56- NK stanica utvrdili smo da je u STE-ACS-u ta subpopulacija NK stanica bila značajno brojnija, nego u NSTEMI-ACS-u. U literaturi nema zapisa o tome da je itko istraživao CD56- NK stanice u koronarnoj bolesti pa ove rezultate nije moguće usporediti. Ipak, ova subpopulacija NK stanica zaslužuje posebnu pozornost iz dva razloga. Prvi je taj što se upravo ta populacija nakuplja u nekim kroničnim upalama poput HCV-a i HIV-1, što bi posljedično moglo doprinijeti razumijevanju kronične upale u koronarnoj arterijskoj bolesti (44). S druge strane, već je u više navrata utvrđeno smanjenje CD56bright i CD56dim subpopulacija NK stanica u koronarnoj arterijskoj bolesti (49), zbog čega bih za daljnje istraživanje osim CD56- subpopulacije, predložio usporedbu s ostalim NK stanicama (s CD56 bright i dim) u tom kontekstu. Usprkos tomu što neka istraživanja novijeg vijeka ukazuju na to da su NK stanice tek "slučajni prolaznici" u aterosklerotkom plaku i ne sudjeluju u progresiji plaka (37), prema Hongu i sur. NK stanice su u okviru koronarne arterijske bolesti pokazale funkcionalni deficit zbog neučinkovite degranulacije citotoksičnih granula (50).

Ovo može biti potencijalno važno zbog povećane podložnosti s aterosklerozom povezanim patogenima u bolesnika koji pate od koronarne arterijske bolesti zbog čega se isplati pobliže definirati povezanost različitih subpopulacija NK stanica u okviru akutnog koronarnog sindroma.

Ovim istraživanjem nije pronađena statistički značajna razlika u broju CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (klasičnih) monocita u perifernoj krvi između bolesnika sa STE-ACS-om i bolesnika s NSTEMI-ACS-om, što odgovara nalazu Leersa i sur., koji su proučavali različite subpopulacije monocita u različitim tipovima AKS i utvrdili da unatoč tome što u AKS dolazi do dvostrukog porasta svih subpopulacija monocita u perifernoj krvi u odnosu na zdrave kontrole, nema statistički značajne razlike u broju CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocita između pacijenata sa STE-ACS-om i NSTEMI-ACS-om (51). Njihovo je istraživanje je išlo i korak dalje pa su utvrdili da je u subpopulaciji klasičnih limfocita ekspresija CD11b biljega bila znatno veća u NSTEMI-ACS-u, nego u STE-ACS-u što autor smatra mogućom terapijskom metom.

Unatoč tome što je ovo istraživanje donijelo neke nove informacije o upalnom odgovoru u koronarnoj bolesti, moramo biti svjesni ograničenja ove studije. Glavno ograničenje ove studije je mali broj ispitanika. Kako bismo naše rezultate mogli primijeniti na populaciju, nužno je značajno povećati uzorak ispitanika. Drugo ograničenje je nedostatak kontrolne skupine koju bi činili ispitanici bez koronarne bolesti. Opservirane razlike mogle su biti posljedica populacijske varijacije u broju određene subpopulacije, a ne posljedica samog AKS, zbog čega bismo za daljnja istraživanja uključili i zdrave „kontrole“. Za kraj, ograničenje ove studije je i samo mjesto uzorkovanja. Naime, nužno je istovremeno uzimati uzorak iz periferne krvi i uzorak iz oštećenog dijela srca kako bismo mogli proizvesti zaključak da je smanjenje određene subpopulacije broja stanica u perifernoj krvi posljedica migracije istih u infarcirano područje. Takva je procedura tehnički vrlo teško izvediva na ljudima pa zasad moramo pretpostavljati na temelju analognih pretkliničkih studija poput one Lija i sur. (42).

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Istraživanjem je potvrđena hipoteza da se postotak CD16+CD226+ NK stanica unutar limfocitne populacije u bolesnika sa STE-ACS-om u perifernoj krvi smanjuje nakon 3 sata od prijema.
2. Istraživanjem je potvrđena hipoteza da bolesnici sa STE-ACS-om imaju veći prosječni izračaj CD16 biljega po jednoj CD16+CD56- NK stanici u odnosu na bolesnike s NSTEMI-ACS-om.
3. Istraživanje je pokazalo da nema značajne razlike u postotku CD14++CD16- monocita unutar monocitne populacije između bolesnika sa STE-ACS-om i bolesnika s NSTEMI-ACS-om.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Saaby L, Poulsen TS, Hosbond S. Classification of myocardial infarction: Frequency and features of type 2 myocardial infarction. *Am J Med.* 2013;126:789–97.
2. Hammer A. Ein Fall von thrombotischem Verschlusse einer der Kranzarterien des Herzens. *Wien Med Wschr.* 1878;28:97–102.
3. Obratzow VP, Straschesko ND. Zur Kenntnis der Thrombose der Koronararterien des Herzens. *Z Klin Med.* 1910;36:959–69.
4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 2018;138(20):618–51.
5. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(3):959–69.
6. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114:1852–66.
7. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: The pathologists' view. *Eur Heart J.* 2013;34:719–28.
8. Ibanez B, James S, Agewall S. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2018;39:119–77.
9. Smilowitz NR, Subramanyam P, Gianos E, Reynolds HR, Shah B, Sedlis SP. Treatment and outcomes of type 2 myocardial infarction and myocardial injury compared with type 1 myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2018;29(1):46–52.
10. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACC/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction: Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173–95.
11. Sandoval Y, Thygesen K. Myocardial infarction type 2 and myocardial injury. *Clin Chem.* 2017;63:101–7.
12. Heron M. Deaths: Leading Causes for 2015. *Natl Vital Stat Rep.* 2017;66(5):1–76.
13. Erceg M, Knežević AM. Izvješće o smrtnosti prema listi odabranih uzroka smrti u 2018. Zagreb: HZJZ; 2020, str. 15.

14. Timmis A, Townsend N, Gale CP. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020;41(1):12–85.
15. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*. 1974;35:156–72.
16. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol*. 1983;52:72–81.
17. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem*. 2000;46:338–44.
18. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1454–71.
19. Scheen AJ. From atherosclerosis to atherothrombosis : from a silent chronic pathology to an acute critical event. *Rev Med Liege*. 2018 May;73(5-6):224–8.
20. Kotecha T, Rakhit RD. Acute coronary syndromes. *Clin Med*. 2016;16(Suppl 6):43–8.
21. Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(10):917–38.
22. Roffi M, Patrono C, Collet JP. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2016;37:267–315.
23. Maloy KR, Bhat R, Davis J, Reed K, Morrissey R. Sgarbossa Criteria are Highly Specific for Acute Myocardial Infarction with Pacemakers. *West J Emerg Med*. 2010;11(4):354–7.
24. de Winter R, Robbert J. A new ECG sign of proximal LAD occlusion. *N Engl J Med*. 2008;359(19):2071–3.
25. Rittoo D, Jones A, Lecky B, Neithercut D. Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases: Implications for the diagnosis of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:2411–20.
26. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:691–9.
27. Sandoval Y, Jaffe AS. Type 2 Myocardial Infarction: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(14):1846–60.
28. Massberg S, Polzin A. Update ESC-Guideline 2017: Dual Antiplatelet Therapy. *Dtsch Med Wochenschr*. 2018;143(15):1090–3.

29. Wald DS, Bestwick JP. Preventive Percutaneous Coronary Intervention in ST-elevation Myocardial Infarction-The Primacy of Randomised Trials. *Interv Cardiol*. 2015;10(1):32–4.
30. Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med*. 2003;163(19):2345–53.
31. Morrow DA, Antman EM, Charlesworth A, Cairns R, Murphy SA, de Lemos JA i sur. TIMI risk score for ST-elevation myocardial infarction: A convenient, bedside, clinical score for risk assessment at presentation: An intravenous nPA for treatment of infarcting myocardium early II trial substudy. *Circulation*. 2000;102(17):2031–7.
32. Everett CC, Fox KA, Reynolds C, Fernandez C, Sharples L, Stocken D i sur. Evaluation of the impact of the GRACE risk score on the management and outcome of patients hospitalised with non-ST elevation acute coronary syndrome in the UK: protocol of the UKGRIS cluster-randomised registry-based trial. *BMJ Open*. 2019;9(9):321–65.
33. McManus DD, Gore J, Yarzebski J, Spencer F, Lessard D, Goldberg RJ i sur. Recent trends in the incidence, treatment, and outcomes of patients with STEMI and NSTEMI. *Am J Med*. 2011;124(1):40–7.
34. Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89(1):36–44.
35. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066–71.
36. Rickles FR, Levin J. Tissue factor generation by human mononuclear cells: effects of endotoxin and dissociation of tissue factor generation from mitogenic response. *Eur Heart J*. 1993;14(1):30–8.
37. Winkels H, Ley K. Natural Killer Cells at Ease: Atherosclerosis Is Not Affected by Genetic Depletion or Hyperactivation of Natural Killer Cells. *Circ Res*. 2018;122(1):6–7.
38. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol*. 2018;9(1):17–26.
39. Wagner AK, Kadri N, Snäll J. Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education. *Nat Commun*. 2017;8(2):15627.
40. Morisaki T, Onishi H, Katano M. Cancer immunotherapy using NKG2D and DNAM-1 systems. *Anticancer Res*. 2012;32:2241–7.



41. Elishmereni M, Bachelet I, Levi-Schaffer F. DNAM-1: an amplifier of immune responses as a therapeutic target in various disorders. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9:491–6.
42. Li J, Song Y, Jin JY, Li GH, Guo YZ, Yi HY i sur. CD226 deletion improves post-infarction healing via modulating macrophage polarization in mice. *Theranostics*. 2020;10(5):2422–35.
43. Knorr M, Münzel T, Wenzel P. Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction. *Front Physiol*. 2014;5:295.
44. Björkström NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol*. 2010;31(11):401–6.
45. Mulvihill NT, Foley JB. Inflammation in acute coronary syndromes. *Heart*. 2002;87(3):201–4.
46. Dave T, Ezhilan J, Vasawala H, Somani V. Plaque regression and plaque stabilisation in cardiovascular diseases. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013;17(6):983–9.
47. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol*. 2003;91(4):4–8.
48. Sasaki H, Kohsaka H. Current diagnosis and treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2018;28(6):913–21.
49. Hak Ł, Myśliwska J, Więckiewicz J. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun Ageing*. 2007;(4):4–8.
50. Hong YJ, Cho YN, Kim TJ. Functional deficiency of natural killer cells in acute coronary syndrome is related to ineffective degranulation. *Int J Cardiol*. 2014;172(3):613–5.
51. Leers MPG, Stockem C, Ackermans D. Intermediate and nonclassical monocytes show heterogeneity in patients with different types of acute coronary syndrome. *Cytometry A*. 2017;91(11):1059–67.

## **8. SAŽETAK**

**Svrha istraživanja:** Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi dinamiku CD226+ NK stanica u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom sa ST-elevacijom (engl. STE-ACS) te odrediti razliku u broju CD56- NK stanica i CD14++CD16- monocita u bolesnika sa STE-ACS-om u odnosu na bolesnike s akutnim koronarnim sindromom bez ST-elevacije (engl. NSTE-ACS).

**Ispitanici i metode:** Ovo presječno istraživanje je obuhvatilo 10 bolesnika sa STE-ACS-om i 8 bolesnika s NSTE-ACS-om liječenih u Kliničkom bolničkom centru Split, u razdoblju od veljače do lipnja 2019. kojima su uzeti uzorci krvi pri prijemu, odnosno tada i nakon 3 sata u slučaju bolesnika sa STE-ACS-om. Za analizu subpopulacija NK stanica i monocita korišten je protočni citometar.

**Rezultati:** Nakon 3 sata od prijema u perifernoj krvi dolazi do smanjenja broja CD226+ NK stanica u bolesnika sa STE-ACS-om ( $P=0,010$ ). Broj CD56- NK stanica u bolesnika sa STE-ACS-om značajno je veći nego u bolesnika s NSTE-ACS-om ( $P=0,023$ ). U broju CD14++CD16- subpopulacije monocita između skupina sa NSTE-ACS-om i STE-ACS-om nije bilo statistički značajne razlike ( $P=0,645$ ).

**Zaključci:** Istraživanje je pokazalo očekivanu dinamiku smanjenja broja CD226+ subpopulacije NK stanica, a smatramo da je tomu tako zbog migracije istih u infarcirano područje miokarda. Broj CD56- NK stanica je veći u bolesnika sa STE-ACS-om, a kako do sada nisu provedena slična istraživanja, ne znamo pravo značenje utvrđene razlike. Klasična subpopulacija monocita nije pokazala razliku među skupinama AKS sa i bez ST elevacije, što odgovara podacima iz literature.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Expression of monocyte and NK cell subpopulations in patients with acute coronary syndrome.

**Objectives:** To determine the dynamics of CD226+ NK cells in patients with ST-elevation acute coronary syndrome (STE-ACS) and to compare levels of CD56- NK cells and CD14++CD16- monocytes in patients with STE-ACS in comparison to patients with non ST-elevation acute coronary syndrome (NSTEMI-ACS).

**Materials and methods:** This cross sectional study consisted of 10 patients with STE-ACS and 8 patients with NSTEMI-ACS from February to June 2019. hospitalized in the University Hospital of Split. Patients' blood was drawn at admission and, in patients with STE-ACS, after 3 hours too. Method used for NK cells and monocytes counting was flow cytometry.

**Results:** Number of CD226+ NK cells have shown significant decrease on 3 hours after hospital admission in patients with STE-ACS ( $P=0.010$ ). Furthermore, number of CD56- NK cells was significantly higher in patients with STE-ACS versus in patients with NSTEMI-ACS ( $P=0.023$ ). There was no significant difference in CD14++CD16- monocyte numbers between STE-ACS and NSTEMI-ACS patients ( $P=0.645$ ).

**Conclusions:** Study has shown expected reduction of CD226 NK cells in peripheral blood, which, we argue, is due to migration in ischemic area of the heart. The CD56- NK cell subpopulation was significantly bigger in the STE-ACS group compared to the NSTEMI-ACS group but since no similar research has been conducted yet, the meaning of observed difference still remains unknown. We have shown no difference in number of classical monocyte subpopulation which is in conjunction with available data.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Marko Kumrić

Datum i mjesto rođenja: 18. ožujka 1996. godine, Makarska, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Zupina 26, Split

Telefon: +385953591337

E-adresa: kumricjudo@gmail.com

## **OBRAZOVANJE**

2002. – 2010. Osnovna Škola „Marjan“, Split

2010. – 2014. V.gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2014.– 2020. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer doktor medicine

## **VJEŠTINE I PRIZNANJA**

Crni pojas I. DAN u judu

10 x Prvak Hrvatske u judu

Državni prvak iz osnova informatike

Demonstrator na predmetu Patofiziologija

Demonstrator na predmetu Kliničke vještine

Dobitnik dekanove nagrade za izvrsnost

Dobitnik rektorove nagrade za izvrsnost

Vozačka dozvola B kategorije