

Utjecaj smanjene izbačajne frakcije lijevog ventrikula na srčani metabolizam masnih kiselina i ugljikohidrata u pacijenata podvrgnutih ugradnji koronarne prenosnice

Slapničar, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:594981>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ema Slapničar

**UTJECAJ SMANJENE IZBAČAJNE FRAKCIJE LIJEVOG VENTRIKULA NA
SRČANI METABOLIZAM MASNIH KISELINA I UGLJIKOHIDRATA U
PACIJENATA PODVRGNUTIH UGRADNJI KORONARNE PREMOŠNICE**

Diplomski rad

Akademska godina:

2021./2022.

Mentor:

Prof. dr. sc. Marko Ljubković

Split, srpanj 2022.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ema Slapničar

**UTJECAJ SMANJENE IZBAČAJNE FRAKCIJE LIJEVOG VENTRIKULA NA
SRČANI METABOLIZAM MASNIH KISELINA I UGLJIKOHIDRATA U
PACIJENATA PODVRGNUTIH UGRADNJI KORONARNE PREMOŠNICE**

Diplomski rad

Akademska godina:

2021./2022.

Mentor:

Prof. dr. sc. Marko Ljubković

Split, srpanj 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Srčano zatajenje	2
1.1.1. Epidemiologija srčanog zatajenja.....	2
1.1.2. Patofiziologija srčanog zatajenja.....	2
1.1.3. Klasifikacija srčanog zatajenja.....	3
1.1.4. Liječenje srčanog zatajenja.....	3
1.2. Energijski metabolizam miokarda.....	4
1.2.1. Mitohondriji.....	4
1.2.2. Mehanizam oksidativne fosforilacije.....	7
1.2.3. Kemiosmotičko združivanje.....	9
1.2.4. Glikoliza i oksidacija piruvata.....	11
1.2.5. Beta-oksidacija masnih kiselina.....	11
1.2.6. Ciklus limunske kiseline.....	12
1.2.7. Metabolička fleksibilnost miokarda.....	13
1.3. Aortokoronarno premoštenje.....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2.1. Cilj istraživanja.....	17
2.2. Hipoteze istraživanja.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Ustroj istraživanja.....	19
3.2. Postupak sakupljanja i pripreme uzoraka tkiva miokarda.....	19
3.3. Mjerenja mitohondrijske respiracije.....	20
3.4. Određivanje količine oksidacijskih enzima u tkivu metodom Western blota...20	
3.5. Određivanje aktivnosti piruvat dehidrogenaze.....	21
3.6. Statistička analiza.....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Opća obilježja ispitanika.....	24
4.2. Povezanost izbačajne frakcije i korištenja metaboličkih supstrata.....	25
5. RASPRAVA.....	30

6. ZAKLJUČCI.....	35
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	37
8. SAŽETAK.....	43
9. SUMMARY.....	47
10. ŽIVOTOPIS.....	49

ZAHVALA

Hvala mojem mentoru, prof. dr. sc. Marku Ljubkoviću, kao i prof. dr. sc. Jasni Marinović Ljubković na posvećenom vremenu i korisnim savjetima koje su sa mnom podijelili, ne samo pri pisanju ovog rada, već i u svakodnevnim razgovorima.

Hvala mojim prijateljima s kojima sam dijelila i lijepa i zahtjevne trenutke školovanja. Obilježili ste moje studentske dane smijehom, veseljem i dobrim društvom.

Hvala mojoj obitelji, koja mi uvijek pruža neizmjernu ljubav i podršku.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri. Vi ste moji najveći prijatelji i najbolji učitelji.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU:

LVEF – izbačajna frakcija lijevog ventrikula

HFrEF – srčano zatajenje sa smanjenom izbačajnom frakcijom

HFpEF – srčano zatajenje s očuvanom izbačajnom frakcijom

HFmEF – srčano zatajenje s umjereno smanjenom izbačajnom frakcijom

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim

ETC – respiracijski lanac ili elektrontransportni lanac, engl. *electron transport chain*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomalna ribonukleinska kiselina

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

FADH₂ – flavin adenin dinukleotid

CABG – aortokoronarno premoštenje, engl. *coronary artery bypass grafting*

OPCAB - aortokoronarno premoštenje bez uspostave izvantjelesnog krvotoka, engl. *off-pump coronary artery bypass*

RIPA pufer – engl. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

SDS-PAGE – natrijev dodecil sulfat - poliakrilamidna gel elektroforeza , engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

VLCAD – dehidrogenaza vrlo dugolančanih acil-CoA, engl. *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*

HADHA – alfa podjedinica hidroxiacil-CoA dehidrogenaze, engl. *alpha subunit of hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*

PDH – piruvat dehidrogenaza

LVAD – uređaj za mehaničku cirkulacijsku potporu lijevoj klijetki, engl. *left ventricular assist device*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen species*

1. UVOD

1.1. Srčano zatajenje

Srčano zatajenje označava klinički sindrom u kojem srce ne može ostvariti prikladan minutni volumen za opskrbu organizma uz fiziološke vrijednosti tlakova i volumena punjenja. U blagim i umjerenim stupnjevima srčanog zatajenja srčani minutni volumen dostatan je za opskrbu organizma u mirovanju, ali se ne može povećati u trenutku kad porastu metaboličke potrebe organizma. Teški oblik srčanog zatajenja označava nesposobnost miokarda da isporuči dostatan minutni volumen tkivima tijekom mirovanja (1).

1.1.1. Epidemiologija srčanog zatajenja

Srčano zatajenje u današnjoj je medicini važno zbog visoke prevalencije, mortaliteta i morbiditeta. Procjenjuje se da oko 65 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od srčanog zatajenja (2). Zatajivanje srca bolest je pretežito starije životne dobi. U razvijenim zemljama prevalencija dijagnosticiranog srčanog zatajenja u odrasloj populaciji je 1-2%, uz visoku petogodišnju smrtnost od 50% unatoč modernom liječenju (2, 3).

1.1.2. Patofiziologija srčanog zatajenja

U fiziološkim se uvjetima tijekom dijastole volumen svakog srčanog ventrikula obično poveća na približno 110-120 ml. Taj se volumen naziva završni dijastolički volumen. Tijekom sistole volumen svakog ventrikula smanji se za približno 70 ml što je nazvano udarnim volumenom. Volumen koji preostaje u svakom ventrikulu, približno 40-50 ml, zove se završni sistolički volumen. Udio završnog dijastoličkog volumena koji se izbacuje zove se izbačajna frakcija i fiziološki je u rasponu 50-70% (4). Kada govorimo o sistoličkoj funkciji lijevog ventrikula, upravo je izbačajna frakcija najčešće korišteno mjerilo njezine kvalitete.

Srčano zatajenje može biti uzrokovano bilo kojim stanjem koje smanjuje mogućnost srca za pumpanjem krvi. Najčešći je uzrok smanjena kontraktilnost miokarda zbog nedostatnog koronarnog protoka krvi. Osim toga, srčano zatajenje može biti uzrokovano bolestima srčanih zalistaka, primarnim bolestima miokarda (kardiomiopatijama), hipertenzijom, metaboličkim deficitima i tako dalje (5).

1.1.3. Klasifikacija srčanog zatajenja

Klasifikacija srčanog zatajenja zasniva se na simptomima i izračunatoj izbačajnoj frakciji lijevog ventrikula (LVEF). Ljevostrano zatajenje srca može se kategorizirati kao zatajenje srca sa smanjenom izbačajnom frakcijom (HFrEF), zatajenje srca s očuvanom izbačajnom frakcijom (HFpEF) te zatajenje srca s umjereno smanjenom izbačajnom frakcijom (HFmEF).

Definicija HFrEF razlikuje se među autorima, no najčešće se uzima kao LVEF manja ili jednaka 40%. Zatajenje srca s očuvanom izbačajnom frakcijom (HFpEF) je definirano kao srčano zatajenje uz izbačajnu frakciju veću od 50%. HFmEF označava srčano zatajenje u kojem je LVEF od 40% do 50% (2).

Pri evaluaciji simptoma najčešće se koristi New York Heart Association (NYHA) funkcionalna klasifikacija (Tablica 1) (6).

Tablica 1. NYHA* funkcionalna klasifikacija srčanog zatajenja

NYHA stupanj	Definicija	Ograničenja
I	Uobičajena fizička aktivnost ne dovodi do iscrpljenosti, zaduhe, palpitacija ili angine	Nema
II	Uobičajena fizička aktivnost dovodi do iscrpljenosti, zaduhe, palpitacija ili angine	Blaga
III	Bez tegoba u mirovanju; fizička aktivnost manja od uobičajene dovodi do iscrpljenosti, zaduhe, palpitacija ili angine	Umjerena
IV	Tegobe u mirovanju; svaki oblik fizičke aktivnosti pojačava nelagodu	Velika

* New York Heart Association

Preuzeto i prilagođeno prema: Caraballo C, Desai NR, Mulder H, Alhanti B, Wilson FP, Fiuzat M i sur. Clinical Implications of the New York Heart Association Classification. J Am Heart Assoc. 2019;8:e014240.

1.1.4. Liječenje srčanog zatajenja

Današnji pristup liječenju kroničnog srčanog zatajenja zasniva se prvenstveno na smanjenju rada miokarda. Lijekovi koji se koriste za liječenje kroničnog srčanog zatajenja su blokatori adrenergičkih beta-1 receptora (tzv. beta blokatori), blokatori angiotenzinskih receptora, ACE inhibitori, antagonisti aldosterona. Njima se postiže smanjenje srčane frekvencije, predopterećenja i naknadnog opterećenja srca, što rezultira smanjenim energijskim potrebama miokarda. Navedeni lijekovi djeluju sustavno, blokirajući neuroendokrine kompenzacijske mehanizme koji dugoročno iscrpljuju srčanu rezervu i dovode do patološkog remodeliranja miokarda (7).

1.2. Energijski metabolizam miokarda

Svaka stanica za preživljenje i funkcioniranje treba imati stalan dotok energije. Energijska valuta stanice je ATP, adenzin trifosfat, koji ima ulogu prijenosnika slobodne energije između spojeva s većim energijskim potencijalom na one s manjim energijskim potencijalom. Ovaj energijom bogat spoj proizvodi se u svakoj stanici procesima enzimske razgradnje supstrata. Ti su supstrati ugljikohidrati, masne kiseline, proteini i njihovi međuprodukti na putu razgradnje do CO₂ i vode. Živa stanica ima tri osnovna načina sinteze ATP-a:

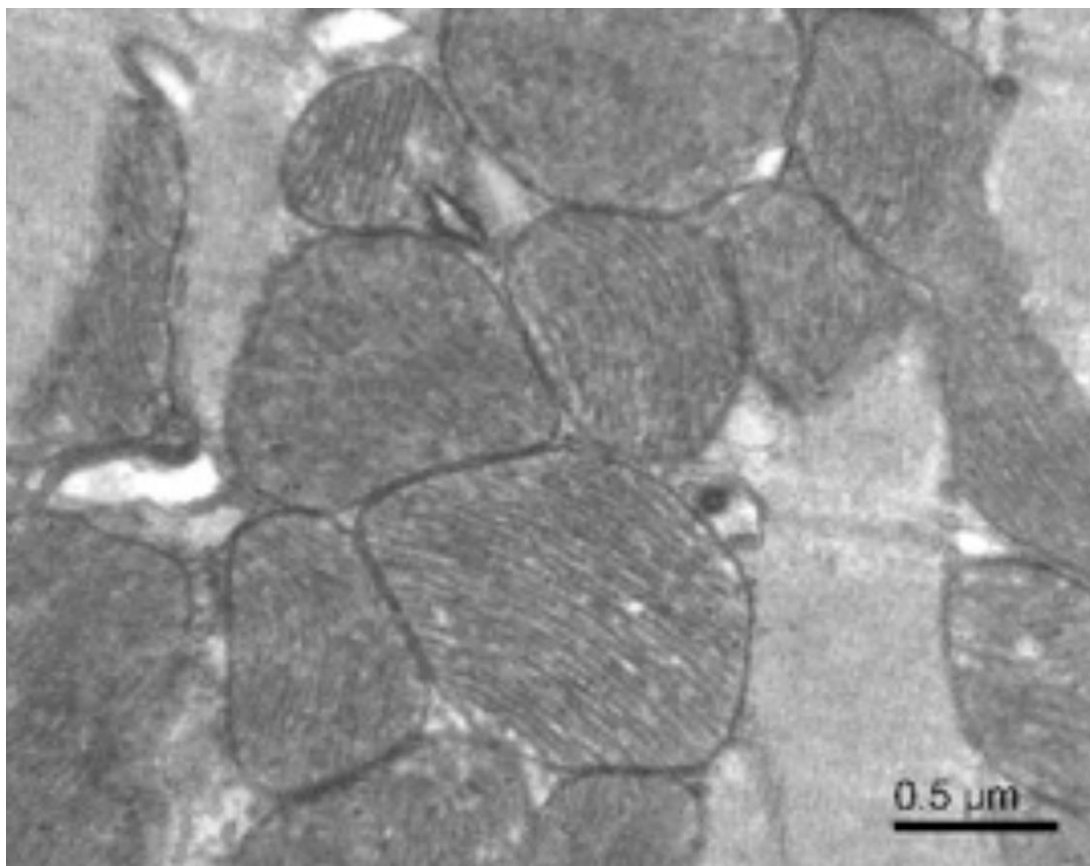
1. Oksidativna fosforilacija: kvantitativno je najznačajniji izvor energijom bogatih fosfata. Oksidacija prijenosnika elektrona molekularnim kisikom u respiracijskom lancu unutar mitohondrija izvor je slobodne energije za fosforilaciju ADP-a anorganskim fosfatom (P_i).
2. Glikoliza: razgradnjom jedne molekule glukoze do piruvata ukupno nastaju dva energijom bogata spoja u reakcijama kataliziranim fosfoglicerat-kinazom i piruvat-kinazom. Ove su reakcije anaerobne; odvijaju se u citoplazmi bez potrebe za kisikom.
3. Ciklus limunske kiseline: izravno u ciklusu nastaje jedan energijom bogat spoj. Reakcije ciklusa limunske kiseline odvijaju se u matriksu mitohondrija (8).

Za svoje aktivnosti stanica koristi energiju pohranjenu u fosfatnoj vezi procesom hidrolize. Hidroliza ATP-a je proces obrnut od fosforilacije, pri kojem dolazi do pucanja energijski bogate fosfatne veze i odcjepljenja zadnjeg fosfata. Pri tome nastaje ADP, energijski siromašniji spoj.

1.2.1. Mitochondriji

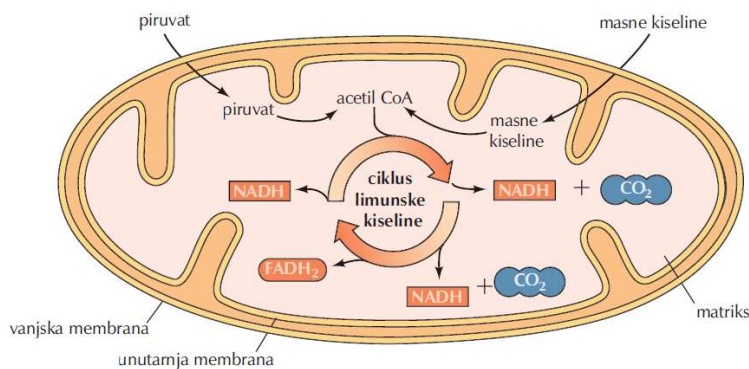
Mitochondriji su stanični organeli koji igraju ključnu ulogu u proizvodnji iskoristive energije u stanicama eukariota. Katabolizam energijskih supstrata u mitohondrijima združen je sa sintezom ATP-a procesom oksidativne fosforilacije. Mitochondriji sadržavaju vlastiti DNA materijal koji kodira tRNA, rRNA i neke od proteina mitohondrija. Mitochondriji su dijelom izgrađeni od proteina kodiranih vlastitim genomom, a dijelom od proteina kodiranih genomom stanične jezgre (9).

Mitochondriji su omeđeni unutarnjom i vanjskom membranom između kojih se nalazi međumembranski prostor. Unutarnja membrana mitohondrija oblikuje nabore (kriste, lat. *cristae*) koje se protežu u unutrašnjost organela (Slika 1). Matriks mitohondrija omeđen je unutarnjom membranom koja je relativno nepropusna za difuziju tvari, zbog čega je sastav matriksa znatno drugačiji od sastava međumembranskog prostora (9).



Slika 1. Građa mitohondrija miokarda, snimljeno elektronskim mikroskopom

Matriks mitohondrija sadržava enzime koji sudjeluju u reakcijama oksidativnog metabolizma. Razgradnja glukoze i masnih kiselina glavni je izvor energije u životinjskim stanicama. Početni stupanj metabolizma glukoze (glikoliza) odvija se u citoplazmi stanice gdje se glukoza razgrađuje do piruvata. Piruvat se zatim prenosi u mitohondrije, gdje se njegovom potpunom oksidacijom proizvodi većina energije (tj. ATP-a) dobivene metabolizmom glukoze. Ovaj proces uključuje početnu oksidaciju piruvata do acetil-koenzima A (acetil-CoA), koji se tada u ciklusu limunske kiseline razgrađuje do CO₂. Oksidacijom masnih kiselina također nastaje acetil-CoA, koji se također metabolizira u ciklusu limunske kiseline u mitohondrijima. Stoga su enzimi ciklusa limunske kiseline (smješteni u matriksu mitohondrija) neophodni u reakcijama oksidativnog metabolizma ugljikohidrata i masnih kiselina (Slika 2) (9).



Slika 2. Metabolizam u matriksu mitohondrija (izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 401 str.)

Oksidacija acetil-CoA združena je s redukcijom koenzima NAD⁺ i FAD u NADH i FADH₂. Procesom oksidativne fosforilacije elektroni iz NADH i FADH₂ prenose se kroz seriju proteinskih nosača u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani na molekularni kisik (9).

Energija koja se oslobađa tijekom oksidacijsko-redukcijskih reakcija pretvara se u potencijalnu energiju pohranjenu u gradijentu protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu. Struktura unutarnje membrane prilagođena je njezinog bitnoj funkciji u proizvodnji ATP-a. Površina membrane povećana je nabiranjem u kriste. Unutarnja membrana mitohondrija ima visok udio proteina (više od 70%) koji su uključeni u oksidativnu fosforilaciju i transport metabolita (primjerice piruvata i masnih kiselina) između citoplazme i mitohondrija. Unutarnja membrana nepropusna je za većinu iona i malih molekula, što je nužno za održavanje gradijenta protona koji pokreće fosforilaciju ADP-a u ATP (9).

Za razliku od unutarnje membrane, vanjska membrana mitohondrija vrlo je propusna za male molekule jer sadržava proteine nazvane porini koji oblikuju kanale i dopuštaju slobodnu difuziju molekula manjih od 1.000 daltona. Zbog toga je sastav iona i malih molekula međumembranskog prostora sličan citoplazmi (9).

1.2.2. Mehanizam oksidativne fosforilacije

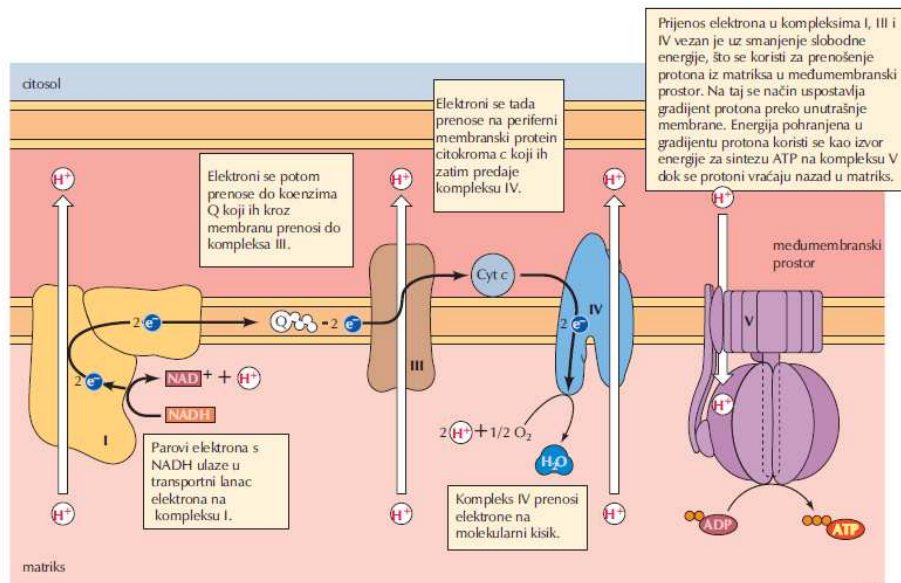
Najveći dio energije dobivene razgradnjom ugljikohidrata ili masnih kiselina nastaje oksidativnom fosforilacijom unutar mitohondrija. Razgradnja glukoze glikolizom i reakcije ciklusa limunske kiseline proizvode ukupno četiri molekule ATP-a, deset molekula NADH i dvije molekule FADH₂. Elektroni se s NADH i FADH₂ zatim prenose na molekularni kisik (O₂) što je združeno nastajanjem dodatne 32 do 34 molekule ATP-a oksidativnom fosforilacijom. Transport elektrona i oksidativna fosforilacija odvijaju se na proteinskim kompleksima unutarnje membrane mitohondrija (Slika 3 i 4). U procesu oksidativne fosforilacije elektroni s NADH i FADH₂ spajaju se s kisikom, a energija oslobođena u tim redoks reakcijama združena je sa sintezom ATP-a iz ADP-a (9).

Transport elektrona s NADH na kisik oslobađa slobodnu energiju. Kako bi se mogla iskoristiti, ta se energija mora postupno oslobađati prolaskom elektrona preko serije od četiri proteinska kompleksa koji čine transportni lanac elektrona (ETC) na unutarnjoj membrani mitohondrija. Peti proteinski kompleks na unutarnjoj membrani mitohondrija (ATP-sintetaza) fosforilira ADP u ATP i tako združuje energijski egzergone reakcije na elektrontransportnom lancu i endergoni proces sinteze ATP-a (9).

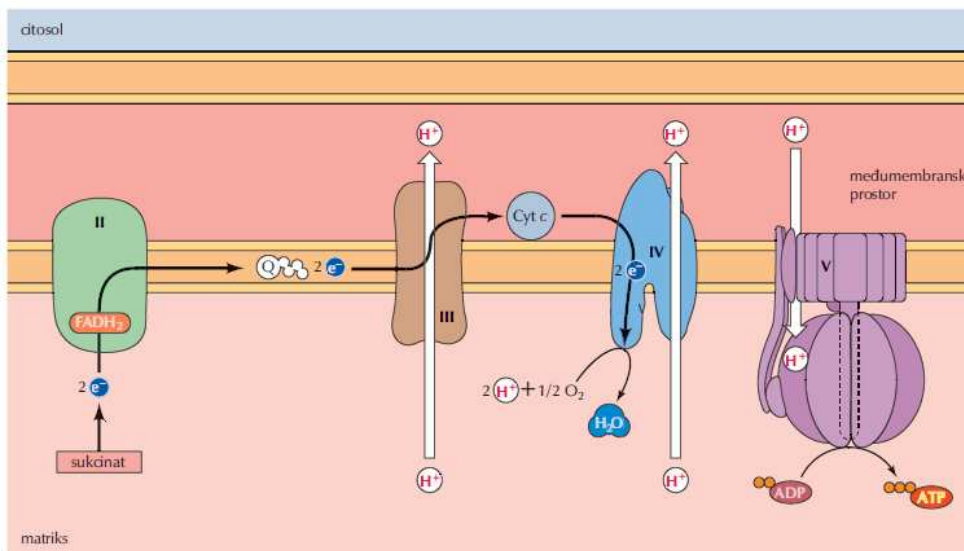
Elektroni s NADH ulaze u transportni lanac elektrona preko kompleksa I. Prvo se elektroni prenose s NADH na flavin-mononukleotid, a zatim na koenzim Q u procesu koji oslobađa energiju. Koenzim Q ili ubikinon mala je, u lipidima topljiva molekula, koja kroz membranu prenosi elektrone s kompleksa I na kompleks III. U kompleksu III elektroni se prenose s citokroma *b* na citokrom *c*, što oslobađa dodatnu energiju. Citokrom *c* je periferni membranski protein vezan za vanjsku stranu unutarnje membrane, a prenosi elektrone s kompleksa III na kompleks IV (citokrom-oksidadu), gdje oni na kraju prelaze na molekularni kisik (Slika 3) (9).

Sukcinat, koji je međuprodukt u ciklusu limunske kiseline, prenosi elektrone na kompleks II. Ti se elektroni dalje prenose na FADH₂, a zatim na koenzim Q. Od koenzima Q

elektroni se prenose na kompleks III, a zatim na kompleks IV (Slika 4). Za razliku od prijenosa elektrona s NADH na koenzim Q na kompleksu I, prijenos elektrona s FADH₂ na koenzim Q nije povezan sa značajnim sniženjem slobodne energije te stoga nije povezan sa sintezom ATP-a. Prijenos elektrona od FADH₂ na elektrontransportnom lancu oslobađa veću količinu slobodne energije samo na kompleksima III i IV (9).



Slika 3. Prijenos elektrona s NADH (izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 409. str.)



Slika 4. Prijenos elektrona s FADH₂ (izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 410. str.)

Slobodna energija oslobođena prolaskom elektrona kroz komplekse I, III i IV koristi se za sintezu ATP-a. Energija oslobođena tijekom transporta elektrona koristi se za stvaranje gradijenta protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija. Potencijalna energija pohranjena u tom gradijentu iskorištava se s pomoću kompleksa V koji združuje energetski povoljan protok protona kroz membranu sa sintezom ATP-a (9).

1.2.3. Kemiosmotičko združivanje

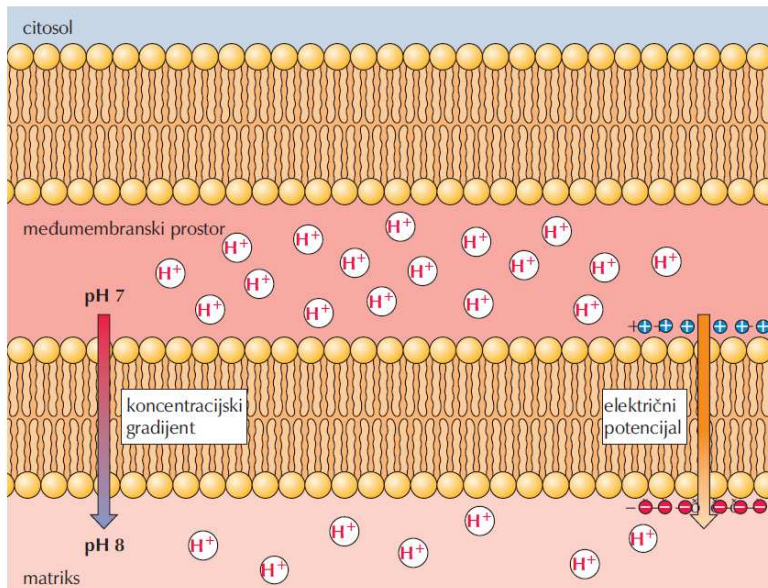
Hipotezu o kemiosmotičkom združivanju transporta elektrona i proizvodnje ATP-a postavio je Peter Mitchell 1961. godine. On je pretpostavio da ATP nastaje korištenjem energije pohranjene u obliku gradijenta protona preko bioloških membrana, a ne izravnim kemijskim prijenosom energijom bogatih skupina. Transport elektrona kroz komplekse I, III i IV združen je s transportom protona iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor. Na ovaj se način slobodna energija oslobođena prijenosom elektrona iskorištava za uspostavljanje gradijenta protona kroz unutrašnju membranu. Kompleksi I i IV djeluju kao protonske crpke koje, kao rezultat konformacijskih promjena potaknutih transportom elektrona, prenose protone kroz membranu. U kompleksu III protoni se prenose kroz membranu s pomoću koenzima Q, koji prihvaća protone iz matriksa na kompleksu I ili II, a oslobađa ih u međumembranski prostor na kompleksu III. Kompleks I prenosi četiri protona, a kompleks III dva protona kroz membranu po jednom paru elektrona. U kompleksu IV dva se protona po paru elektrona prenose kroz membranu, a dva dodatna protona po paru elektrona reagiraju s kisikom i stvaraju molekulu vode unutar matriksa (9).

Ovaj prijenos protona iz matriksa u međumembranski prostor ima ključnu ulogu u pretvorbi energije oslobođene redoks reakcijama tijekom transporta elektrona u potencijalnu energiju pohranjenu u gradijentu protona (9).

Kako su protoni električki nabijene čestice, potencijalna energija pohranjena u gradijentu protona po svojoj je prirodi i električna i kemijska. Električna komponenta odgovara razlici potencijala (naponu) kroz unutarnju membranu mitohondrija (s negativnim matriksom) te se naziva mitohondrijski membranski potencijal (9).

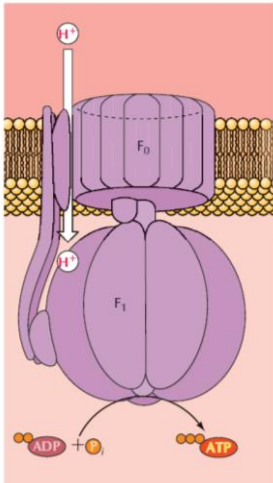
U metabolički aktivnim stanicama kemijski (koncentracijski) gradijent protona kroz unutrašnju membranu odgovara otprilike jednoj pH jedinici, tj. koncentracija protona je oko deset puta niža u matriksu mitohondrija, nego u međumembranskom prostoru (Slika 5). U

matriksu mitohondrija pH iznosi oko 8, u usporedbi s neutralnim pH (približno 7) u citoplazmi i međumembranskom prostoru. Taj gradijent također stvara i razliku električnog potencijala od približno 160 mV kroz membranu (s negativnim matriksom) (10). Gradijent pH i razlika električnog potencijala zajedno stvaraju elektrokemijski gradijent kroz unutrašnju membranu mitohondrija koji potiskuje protone iz međumembranskog prostora natrag u matriks (9).



Slika 5. Elektrokemijska priroda gradijenta protona (izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 412. str.)

Budući da je fosfolipidni dvosloj nepropustan za ione, protoni mogu proći kroz membranu samo kroz posebne proteinske prijenosnike ili kanale. Ta činjenica omogućuje da se energija pohranjena u elektrokemijskom gradijentu iskoristi za sintezu ATP-a djelovanjem ATP-sintetaze, koja se naziva i kompleks V. ATP-sintetaza sastoji se od dviju strukturno različitih komponenti F_0 i F_1 , koje su međusobno povezane tankom stapkom (Slika 6). Dio F_0 oblikuje kanal kroz unutarnju membranu kojim protoni iz međumembranskoga prostora prolaze u matriks. Energetski povoljan protok protona u matriks povezan je sa sintezom ATP-a iz ADP-a i fosfatnih iona (P_i). Protok protona kroz F_0 podjedinicu uzrokuje rotaciju dijela F_1 podjedinice koji djeluje kao rotacijski motor za pokretanje sinteze ATP-a. Za sintezu jedne molekule ATP-a na F_1 podjedinici potreban je prolazak četiri protona kroz F_0 podjedinicu. Izračunato je da oksidacija jedne molekule NADH omogućuje sintezu 2.5 molekula ATP-a, a oksidacija $FADH_2$ omogućuje sintezu 1.5 molekule ATP-a (9).



Slika 6. Struktura ATP-sintaze (izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 414. str.)

1.2.4. Glikoliza i oksidacija piruvata

Glikoliza je metabolički put razgradnje glukoze do piruvata ili laktata. Događa se u citoplazmi svih stanica sisavaca. U anaerobnim uvjetima laktat je krajnji produkt glikolize (npr. u mišićima pri vježbanju ili kada nedostaje metabolički aparat za daljnju oksidaciju piruvata, npr. u eritrocitima), dok je u prisutnosti kisika krajnji produkt piruvat. Glikolizu reguliraju tri enzima koji kataliziraju nereverzibilne reakcije: heksokinaza, fosfofruktokinaza i piruvatkinaza (11).

Piruvat nastao u citoplazmi prenosi se u mitohondrij gdje se oksidacijski dekarboksilira u acetil-CoA pomoću multienzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze (PDH) koji je vezan na unutarnju mitohondrijsku membranu (12).

1.2.5. Beta-oksidacija masnih kiselina

Beta-oksidacija masnih kiselina niz je metaboličkih reakcija kojim se masne kiseline postupno razgrađuju do konačnog produkta, acetil-CoA. Niz reakcija beta-oksidacije odvija se u matriksu mitohondrija (13).

Prvi je korak u procesu razgradnje masnih kiselina njihova aktivacija u aktivni međuprodukt acil-CoA, tzv. „aktiviranu masnu kiselinu“. S obzirom da dugolančani acil-CoA ne može slobodno proći kroz unutarnju mitohondrijsku membranu, drugi je korak u pripremi

za beta-oksidaciju pretvaranje acil-CoA u spoj acilkarnitin. Ključnu ulogu u tome ima enzim karnitin-palmitoil-transferaza I, prisutan u vanjskoj membrani mitohondrija. Acilkarnitin može proći kroz unutarnju mitohondrijsku membranu i pristupiti enzimima sustava β -oksidacije.

Unutar matriksa mitohondrija, svaki se ciklus β -oksidacije sastoji od niza četiriju reakcija u kojima se razgradnjom acil-CoA oslobađa jedna molekula acetil-CoA koja svoj daljnji metabolički put nastavlja u ciklusu limunske kiseline.

Prva reakcija beta-oksidacije katalizirana je enzimom acil-CoA-dehidrogenazom koja uklanja dva vodikova atoma s $\alpha(2)$ i $\beta(3)$ - ugljikovih atoma dugolančane masne kiseline. Sljedeća je reakcija hidratacija, odnosno adicija vode na dvostruku vezu pri čemu nastaje 3-hidroxiacil-CoA. Tu reakciju katalizira enzim enoil-CoA-hidrataza. Treća reakcija beta-oksidacije uključuje daljnju dehidrogenaciju supstrata na 3-C atomu i katalizirana je enzimom hidroxiacil-CoA dehidrogenazom. U toj reakciji nastaje odgovarajući spoj 3-ketoacil-CoA. Konačno, 3-ketoacil-CoA se cijepa tiolazom na 2,3 položaju uz nastajanje acetil-CoA i nove molekule acil-CoA kraće za dva ugljikova atoma u odnosu na izvornu acil-CoA molekulu koja je ušla u ciklus beta-oksidacije (13).

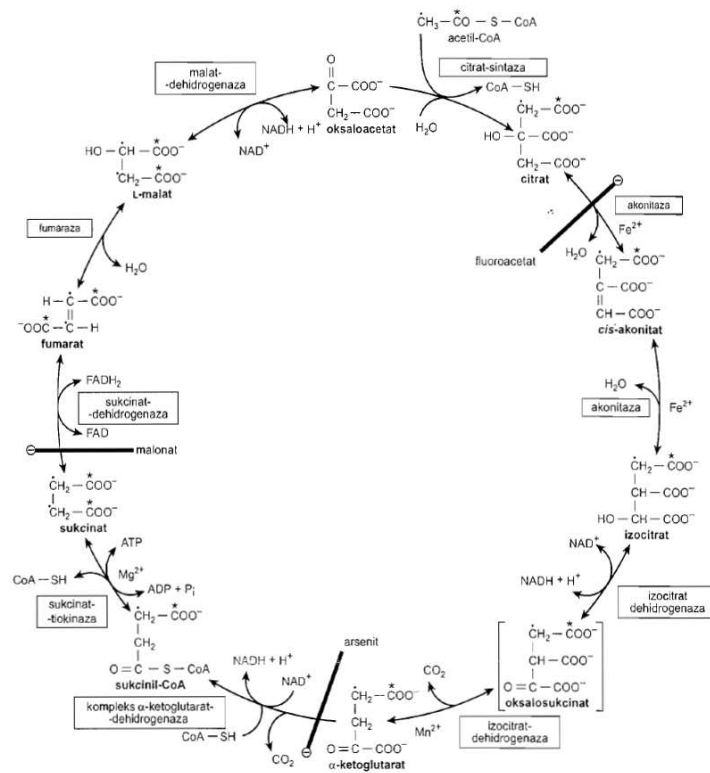
Povećana oksidacija masnih kiselina karakteristična je pri gladovanju i šećernoj bolesti tipa 1 te vodi prema stvaranju ketonskih tijela u jetri. Ketonska tijela mogu uzrokovati ketoacidozu ako nastaju u suvišku tijekom duljih razdoblja (13).

1.2.6. Ciklus limunske kiseline

Ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus, ciklus trikarbonskih kiselina) niz je reakcija u mitohondriju kojima se oksidira acetilni ostatak iz acetil-CoA i reduciraju koenzimi koji se ponovo oksidiraju u ETC, što je povezano sa sintezom ATP-a. Ciklus limunske kiseline konačni je i zajednički put oksidacije ugljikohidrata, lipida i proteina zbog toga što se glukoza, masne kiseline i većina aminokiselina metaboliziraju do acetil-CoA ili nekog od intermedijera ciklusa (11).

Citrat se u ciklusu razgrađuje nizom dehidrogenacija (oksidacija) i dekarboksilacija, reducirajući pritom koenzime, otpuštajući dvije molekule CO_2 i obnavljajući oksaloacetat. Enzimi ciklusa limunske kiseline nalaze se u matriksu mitohondrija, kao slobodni enzimi ili

vezani za unutarnju mitohondrijsku membranu i kriste membrane, gdje se također nalaze i enzimi respiracijskog lanca (11). Reakcije ciklusa limunske kiseline prikazane su na Slici 7.



Slika 7. Ciklus limunske kiseline (izvor: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 145. str.)

1.2.7. Metabolička fleksibilnost miokarda

Srčane stanice za procese koji se u njima odvijaju trebaju veliku količinu energije. Razmjere metaboličke aktivnosti srca odražava činjenica da je to tkivo u organizmu čovjeka s najvećom potrošnjom kisika po jedinici mase. Kardiomiociti stoga obiluju mitohondrijima, koji zauzimaju jednu trećinu njihovog ukupnog volumena. Tako velik broj mitohondrija čini srčani mišić tkivom s najvećim udjelom mitohondrija u organizmu (14). Ekscitacija srčanog mišića i sprezanje ekscitacije s kontrakcijom troši većinu ATP-a koji se proizvodi u mitohondrijima kardiomiocita. Kako bi se energetske zahtjevni procesi u kardiomiocitima mogli nesmetano odvijati, oni su opremljeni s učinkovitim metaboličkim sustavima proizvodnje energije i

oslanjaju se primarno na oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijima, koja opskrbljuje 95% energijskih potreba srca (15).

Metabolička fleksibilnost je sposobnost zdravog srca da oksidira različite supstrate kako bi se osigurao kontinuiran dotok energije u obliku ATP-a. U fiziološkim uvjetima, za sintezu ATP-a, srce se oslanja pretežno na oksidaciju masnih kiselina (60-90%). Ostalih 10-40% ATP-a dobiva se oksidacijom piruvata, završnog produkta glikolize i produkta oksidacije laktata. Alternativni izvori, kao što su ketonska tijela i aminokiseline, predstavljaju izrazito malen doprinos sintezi ATP-a u kardiomiocitima u fiziološkim uvjetima (15). Relativni doprinos različitih supstrata za produkciju ATP-a značajno varira ovisno o potrebi kardiomiocita za energijom, dostupnosti supstrata i utjecaju neuroendokrinih čimbenika (16). Na primjer, akutno povećanje rada srca dovodi do metaboličkog prijelaza: s većinske oksidacije masnih kiselina usmjerava se prema oksidaciji glukoze (15).

1.3. Aortokoronarno premoštenje

Ishemija miokarda zbog koronarne ateroskleroze jedan je od najčešćih uzroka smrtnosti i pobola u razvijenim zemljama svijeta. Kao zlatni standard u liječenju višežilne bolesti srca i okluzivne bolesti lijeve silazne koronarne arterije (LAD) pokazala se operacija aortokoronarnog premoštenja (17).

Aortokoronarno premoštenje (engl. *coronary artery bypass grafting*, CABG) kirurški je zahvat ugradnje spoja između aorte i koronarne arterije, kako bi se premostio suženi dio koronarne arterije i time poboljšao protok u ishemičnom miokardu. Koristeći arterijsku (*a. thoracica interna*, *a. radialis*) ili vensku (*v. saphena magna*) premosnicu, kirurg spaja aortu s koronarnom arterijom distalno od njezina suženja (17). Na taj se način postiže smanjenje simptoma ishemijske bolesti srca, snižava se rizik nastanka infarkta miokarda i poboljšava se preživljenje (18). Navedena operacija izvodi se uz pomoć aparata za izvantjelesni krvotok ili se može izvesti i bez njega na kucajućem srcu (*off-pump*) (19).

U klasičnom izvođenju aortokoronarnog premoštenja s korištenjem pumpe za izvantjelesni krvotok započinje se s medijanom sternotomijom kako bi se pristupilo srcu, nakon čega slijedi kardioplegija i uspostavljanje izvantjelesnog krvotoka uz pomoć aparata koji prikuplja krv iz šupljih vena, stvara potisnu silu i vraća krv pod tlakom u aortu (20). Tijekom postupka, tijelo se uvodi u hipotermiju kako bi se smanjila metabolička aktivnost, a time i

potreba za energijom (21, 22). Postupak aortokoronarnog premoštenja bez korištenja pumpe (OPCAB) za izvantjelesni krvotok ne uključuje kardioplegiju, već kirurg izvodi operaciju na kucajućem srcu (23).

Značajne komplikacije CABG operacije uključuju krvarenje, moždani udar, akutni infarkt miokarda i smrt. Ipak, ishodi aortokoronarnog premoštenja su izvrsni s niskom stopom smrtnosti (2-3%) (24). Dugotrajna je prognoza jako dobra uz snižen rizik za nastanak akutnog infarkta miokarda i ukupno poboljšanje preživljenja (24).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Glavni je cilj ovog istraživanja bio ispitati utjecaj srčanog popuštanja na metabolizam masnih kiselina i ugljikohidrata u miokardu pacijenata. Dosadašnja su istraživanja nedvojbeno utvrdila da se metaboličke promjene događaju u poodmaklim fazama srčanog zatajenja. Predmet ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li metaboličko remodeliranje i u početnim fazama srčanog zatajenja, u srcima s očuvanom izbačajnom frakcijom (LVEF>40%).

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Smanjenje izbačajne frakcije lijevog ventrikula dovodi do metaboličkog remodeliranja miokarda i mijenja omjer korištenja masnih kiselina i ugljikohidrata za proizvodnju ATP-a za energetske potrebe srca.
2. Navedene metaboličke promjene događaju se već u ranim fazama srčanog zatajenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

U istraživanje je uključen 41 pacijent Zavoda za kardiokirurgiju KBC-a Split. Kod svih je pacijenata poduzeta elektivna operacija aortokoronarnog premoštenja. Pacijenti su bili hemodinamski stabilni prije izvođenja zahvata. Prije operacije u svih je pacijenata ehokardiografski izmjerena izbačajna frakcija lijevog ventrikula (LVEF). U studiju nisu bili uključeni pacijenti kojima je potreban hitni CABG, pacijenti kojima je LVEF<40%, pacijenti istodobno podvrgnuti zahvatu zamjene srčanog zaliska i pacijenti s konkomitantnim bolestima bubrega, jetre ili pluća.

Ova je studija izvedena na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u suradnji sa Zavodom za kardiokirurgiju KBC-a Split. Eksperimentalni protokol studije odobrilo je Etičko povjerenstvo KBC-a Split (Klasa: 500-03/12/01/33; Ur. broj: 2181-147-01/M.J.-12-2) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu (Ur. broj: 2181-198-03-04). Provedba studije odgovarala je etičkim standardima Helsinške deklaracije. Svi uključeni ispitanici potpisali su informirani pristanak o sudjelovanju u studiji.

Svi relevantni klinički podaci o zdravstvenom stanju pacijenata prikupljeni su prije operacijskog zahvata. Priprema bolesnika za zahvat, sami operativni zahvat i postoperativna skrb za pacijenta izvedeni su u skladu s rutinskim standardima Zavoda za kardiokirurgiju KBC-a Split.

3.2. Postupak sakupljanja i pripreme uzoraka tkiva miokarda

Tijekom operativnog zahvata postavljanja srčane prenosnice bez upotrebe stroja za izvantjelesnu oksigenaciju krvi (tzv. *off-pump* CABG metoda) iglenom biopsijom sakupljeni su uzorci tkiva subepikardijalnog miokarda lijevog ventrikula (anteroseptalni dio). Dio bioptiranog tkiva naglo je zamrznut u tekućem dušiku na temperaturi od -80°C. Ostatak tkiva odmah je uronjen u posebno pripremljenu hladnu otopinu radi očuvanja kardiomiocita i mitohodrija (sastav otopine: 2,77 mmol/l CaK₂EGTA, 7,23 mmol/l K₂EGTA, 6,56 mmol/l MgCl₂, 5,7 mmol/l Na₂ATP, 15 mmol/l fosfokreatina, 20 mmol/l imidazola, 20 mmol/l taurina, 0,5 mmol/l DTT i 50 mmol/l K-metansulfonata; pH 7,1 na 0°C). Tkivo je u navedenoj otopini dopremljeno do laboratorija unutar 15 minuta od uzimanja uzorka, gdje su se provela mjerenja mitohodrijske respiracije.

Pod kontrolom mikroskopa s uzorka su prvo uklonjena tkiva koja ne sadrže kardiomiocite, npr. masno i vezivno tkivo. Uslijedila je pažljiva disekcija kojom su se međusobno odvojila srčana vlakna. Zatim je tkivo permeabilizirano laganim miješanjem uz dodatak saponina (50 μ g/ml) na temperaturi od 4°C. Saponin je amfifilna tvar koja djeluje kao surfaktant i ulazi u interakciju sa staničnom membranom otapajući kolesterol (25). Na taj način čini staničnu membranu propusnijom. Budući da mitohondrijske membrane sadrže zanemarive količine kolesterola, njihov se integritet ne narušava. Ovim postupkom supstrati koji će se koristiti u eksperimentalnom protokolu imaju izravan pristup mitohondrijima (25).

3.3. Mjerenja mitohondrijske respiracije

Prije početka mjerenja mitohondrijske respiracije otopina za transport tkiva isprana je, a tkivo je uronjeno u respiracijski medij, otopinu sastava: 2,77 mmol/l CaK₂EGTA, 7,23 mmol/l K₂EGTA, 1,38 mmol/l MgCl₂, 3 mmol/l K₂HPO₄, 20 mmol/l imidazola, 20 mmol/l taurina, 0.5 mmol/l DTT, 90 mmol/l K-metansulfonata, 10 mmol/l Na-metansulfonata, 0.2% BSA, 100 nmol/l slobodnog Ca²⁺, 1 mmol/l slobodnog Mg²⁺; pH 7,1. Uzorak tkiva premješten je u komoricu u kojoj će biti izvedena mjerenja respiracije, volumena 2 ml i ispunjenu istim respiracijskim medijem.

Mitohondrijska oksidacija supstrata evaluirana je mjerenjem potrošnje kisika u komorici s tkivom koristeći Clark-elektrodu (26). Potrošnja kisika izražena je u pmolO₂/s po miligramu tkiva miokarda.

Pri mjerenju oksidacije masnih kiselina kao supstrat korišten je palmitoil-karnitin (40 μ mol/l). Metabolizam ugljikohidrata određen je korištenjem piruvata (10 mmol/l). U oba je protokola u komorici bila dostatna koncentracija ADP-a (2.5 mmol/l) i malata (5 mmol/l). Koncentracija kisika u komorici stalno je održavana na razini iznad 210 μ mol/l.

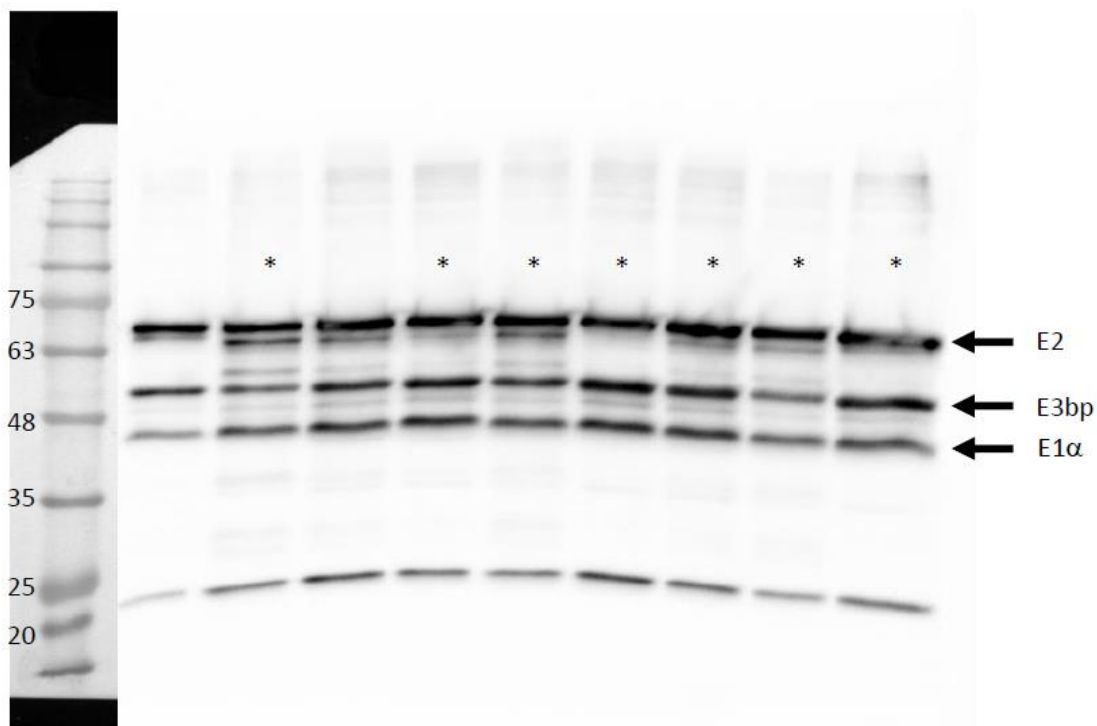
Svi korišteni kemijski reagensi, ukoliko nije naznačeno drugačije, kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich.

3.4. Određivanje količine oksidacijskih enzima u tkivu metodom Western blota

Metoda Western blota (imunoblota) korištena je kako bi se odredila količina enzima koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina i ugljikohidrata u uzorku tkiva miokarda (27). Uzorci

zamrznutog tkiva homogenizirani su u modificiranom RIPA puferu s dodatkom inhibitora proteaze i fosfataze. Nakon razdvajanja tkivnih proteina metodom SDS-PAGE i prijenosom razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu, membrana je impregnirana primarnim protutijelima na VLCAD (dehidrogenaza vrlo dugolančanih acil-CoA; sc-376239, Santa Cruz Biotechnology), HADHA (alfa podjedinica hidroksiacil-CoA dehidrogenaze; sc-376239, Santa Cruz Biotechnology) i mješavinom protutijela na enzime kompleksa piruvat-dehidrogenaze (PDH E1 α , PDH E2, PDH E3bp; ab110416, Abcam). Nakon inkubacije s odgovarajućim sekundarnim protutijelima i signalnom tvari SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific), blotovi su slikovno dokumentirani koristeći ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) (Slika 8).

Gel 1.



Slika 8. Metodom Western blota određena je ekspresija enzima koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina i ugljikohidrata u uzorku tkiva miokarda. Slika prikazuje gel na kojem su elektroforezom odvojene podjedinice kompleksa PDH.

3.5. Određivanje aktivnosti piruvat dehidrogenaze

Aktivnost enzima piruvat dehidrogenaze glavni je regulacijski mehanizam metabolizma ugljikohidrata u miokardu (28). Tijekom istraživanja aktivnost PDH mjerena je

spektrofluorometrijom koristeći komercijalni kit (AAMT008-1KIT, Merck-Millipore) i izražena kao promjena apsorbancije (optičke gustoće) svjetlosti valne duljine 450 nm u jedinicama mOD/min po miligramu proteina.

3.6. Statistička analiza

Statistička analiza rezultata izvršena je koristeći GraphPad Prism 9 softver. Normalnost distribucije ocijenjena je D'Agostino-Pearson testom za vrijednosti metričkog sustava. Podaci u Tablici 2 prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD). Kategorijske varijable prikazane su kao cijeli broj i postotak.

Mjerene varijable mitohondrijske funkcije su: maksimalna mitohondrijska respiracija potaknuta piruvatom, odnosno palmitoil-karnitinom; ekspresija proteina VLCAD, HADHA i podjedinica kompleksa PDH; aktivnost PDH. Korelacija između navedenih mjerenih varijabli mitohondrijske funkcije i izbačajne frakcije analizirana je Pearsonovim testom korelacije i prikazana kao Pearsonov koeficijent korelacije (r). Za svaki statistički test, vrijednost $P < 0,05$ je smatrana značajnom razlikom.

4. REZULTATI

4.1. Opća obilježja ispitanika

Svi su ispitanici uspješno podvrgnuti operaciji aortokoronarnog premoštenja. Ni u jednog pacijenta nisu se razvile postoperativne komplikacije vezane za postupak prikupljanja uzorka miokarda iglenom biopsijom. Klinička i opća obilježja pacijenata koji su sudjelovali u istraživanju prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2. Klinička i opća obilježja pacijenata uključenih u studiju

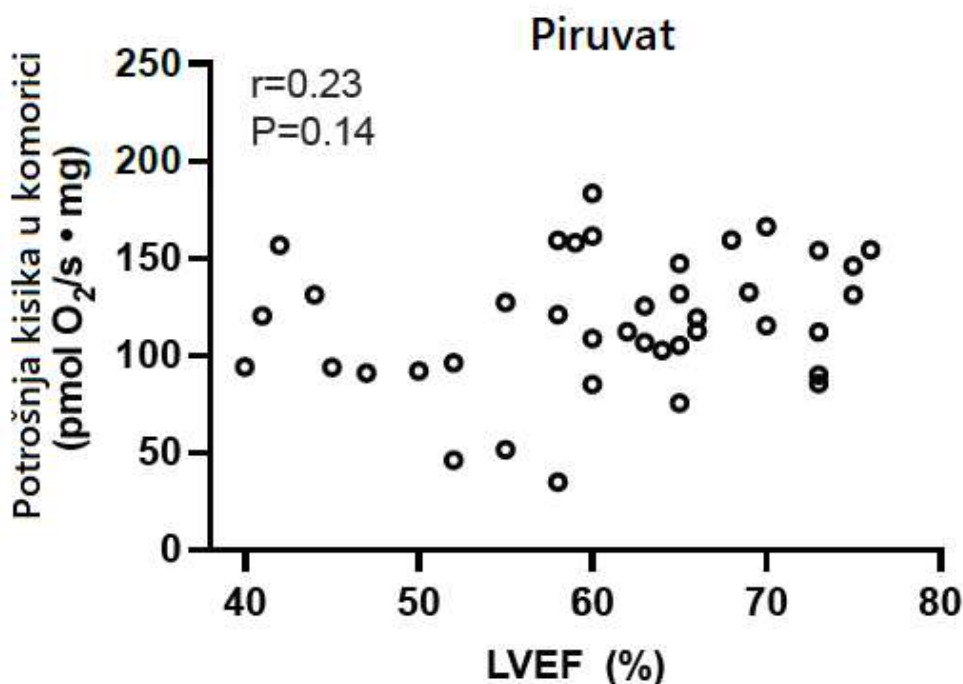
	N=41
Ženski spol, N (%)	9 (21,95)
Dob (godine)	66,5±7,4
LVEF (%)	61,35±0,1
<i>Kliničke karakteristike</i>	
Hipertenzija, N (%)	26 (63,4)
BMI (kg/m²)	29,2±4,1
HbA1c (%)	7,63±0,1
HDL-C (mmol/l)	1,06±0,3
LDL-C (mmol/l)	2,01±0,7
TG (mmol/l)	1,76±0,9
<i>Lijekovi, N (%)</i>	
Acetilsalicilna kiselina	37 (90,3)
Klopidogrel	25 (61,0)
Beta blokator	33 (80,5)
ACE inhibitor/ARB	26 (63,4)
Statin	34 (82,9)
Nitrat	10 (24,4)
Diuretik	16 (39,0)
Blokator Ca-kanala	6 (14,6)
Amiodaron	3 (7,3)
Inzulin	4 (9,8)
Oralni hipoglikemik	7 (17,1)
Antitrombotik	11 (26,8)

LVEF = izbačajna frakcija lijevog ventrikula; BMI = indeks tjelesne mase; HbA1c = glikirani hemoglobin; HDL-C = kolesterol u lipoproteinu visoke gustoće; LDL-C = kolesterol u lipoproteinu niske gustoće; TG = trigliceridi; ACE = angiotenzin-konvertirajući enzim; ARB = antagonist receptora za angiotenzin II.

4.2. Povezanost izbačajne frakcije i korištenja metaboličkih supstrata

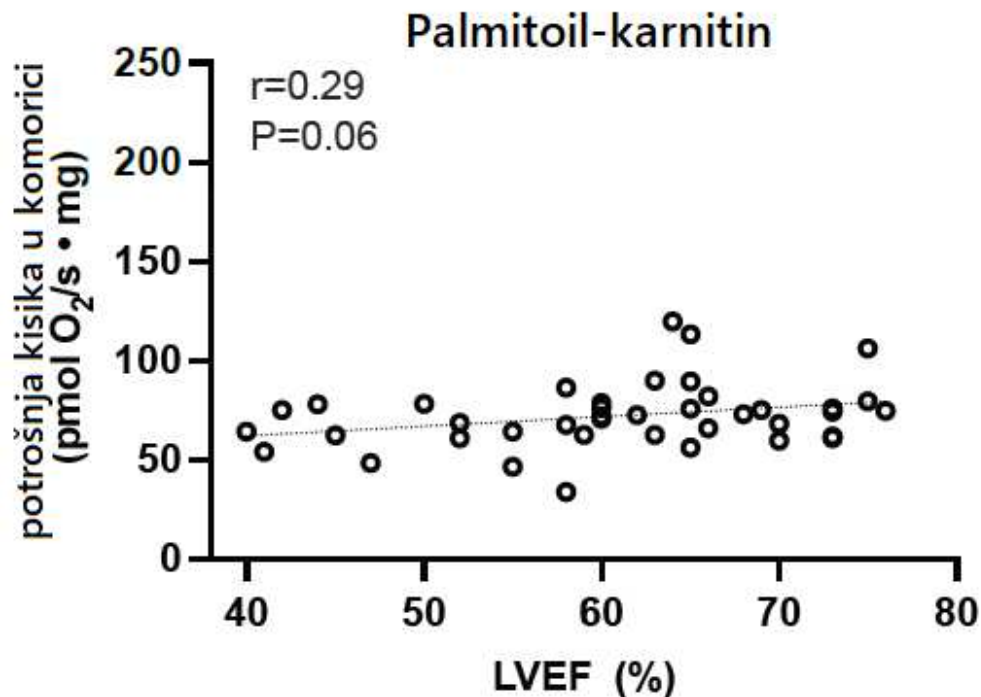
Mitohondrijska respiracija mjerena je u respiracijskoj komorici i izražena smanjenjem koncentracije kisika u komorici nakon dodavanja određenih supstrata. Ti supstrati nužni su za odvijanje metaboličkih puteva razgradnje ugljikohidrata i masnih kiselina. Dodatkom piruvata u komoricu s tkivom miokarda potaknut je metabolički put razgradnje ugljikohidrata u kojem ključnu ulogu ima enzimski kompleks piruvat dehidrogenaze. Dodatkom palmitoil-karnitina stimuliran je put beta-oksidacije masnih kiselina u kojem prvi korak katalizira enzim VLCAD, a treći korak katalizira enzim HADHA.

Nakon dodatka piruvata, odnosno palmitoil-karnitina u respiracijsku komoricu, nije opažena statistički značajna povezanost između oksidacije navedenih supstrata i izbačajne frakcije (Slika 9, Slika 10). Ipak, promatrajući krivulju ovisnosti potrošnje kisika u komorici i izbačajne frakcije, opažen je porast maksimalne respiracije potaknute palmitoil-karnitinom u srcima s većom izbačajnom frakcijom (Slika 10). Dakle, iako nije statistički značajna, postoji jasna tendencija porasta oksidacije masnih kiselina u uzorcima tkiva srca s većom izbačajnom frakcijom ($P=0,060$).



Slika 9. Dijagram prikazuje odnos između maksimalne mitohondrijske respiracije potaknute piruvatom i izbačajne frakcije (LVEF).

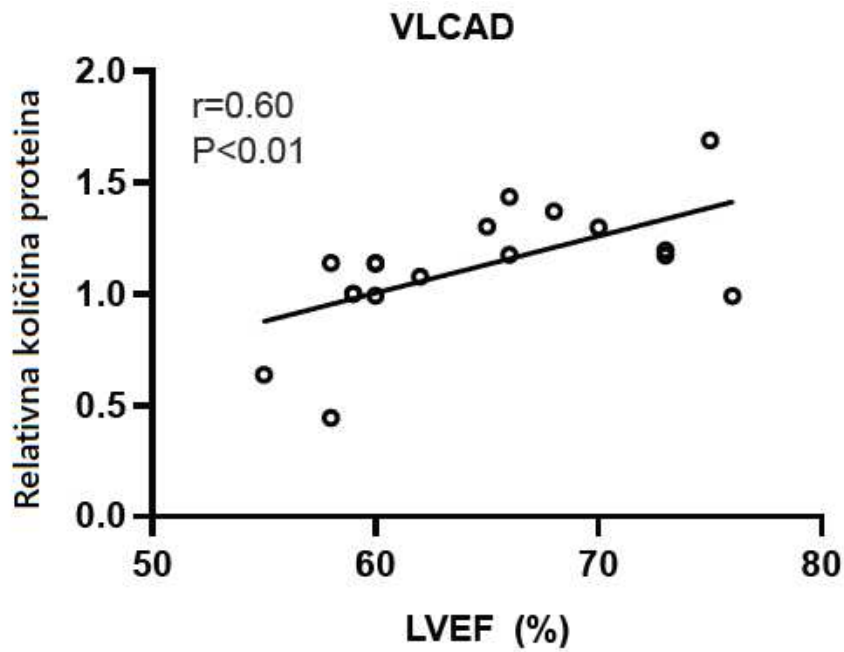
* Pearsonov koeficijent korelacije



Slika 10. Dijagram prikazuje odnos između maksimalne mitohondrijske respiracije potaknute palmitoil-karnitinom i izbačajne frakcije (LVEF).

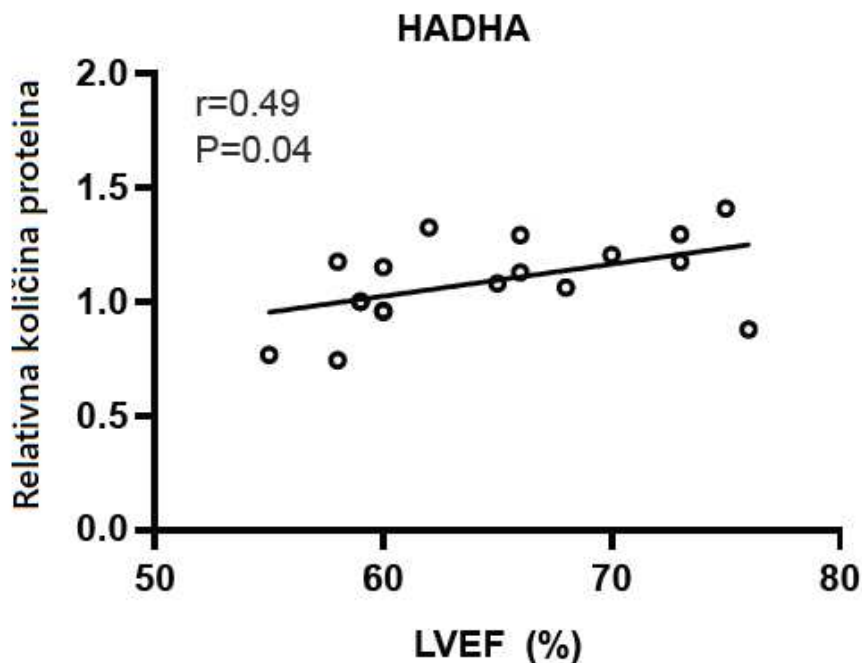
* Pearsonov koeficijent korelacije

Proučavan je i odnos ekspresije enzima srčanog metabolizma masnih kiselina, odnosno ugljikohidrata s izbačajnom frakcijom. Količina enzima VLCAD i HADHA, ključnih enzima beta-oksidacije masnih kiselina, pozitivno korelira s porastom izbačajne frakcije ($P < 0,01$ za VLCAD, odnosno $P = 0,040$ za HADHA) (Slika 11, Slika 12). Takva povezanost s izbačajnom frakcijom nije pronađena kod ekspresije enzima koji reguliraju metabolizam ugljikohidrata, a to su podjedinice kompleksa piruvat dehidrogenaze: PDH E1 α , PDH E2 i PDH E3bp (Slika 13, Slika 14, Slika 15). Također, ne postoji povezanost između aktivnosti piruvat dehidrogenaze i izbačajne frakcije (Slika 16).



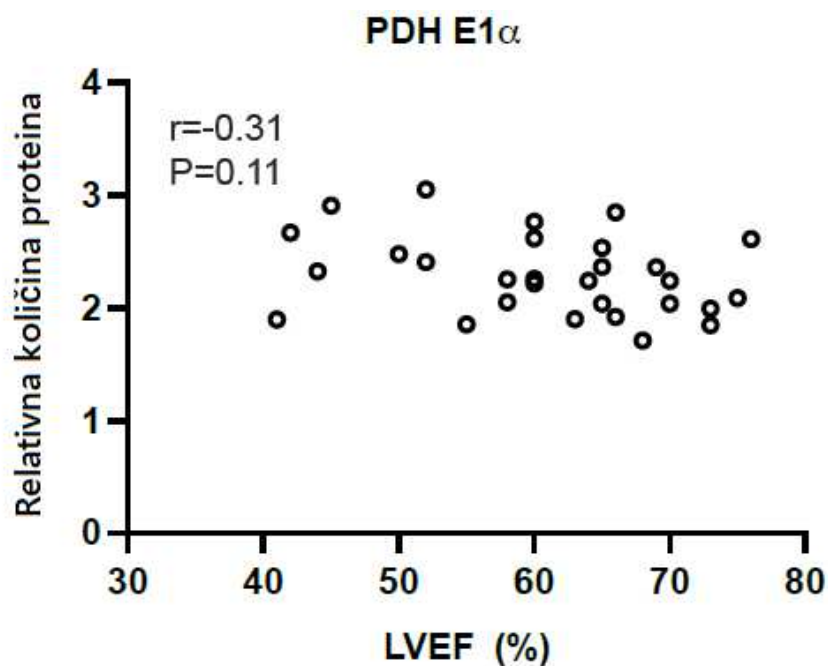
Slika 11. Dijagram prikazuje odnos između ekspresije VLCAD, prvog enzima puta oksidacije masnih kiselina, i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije



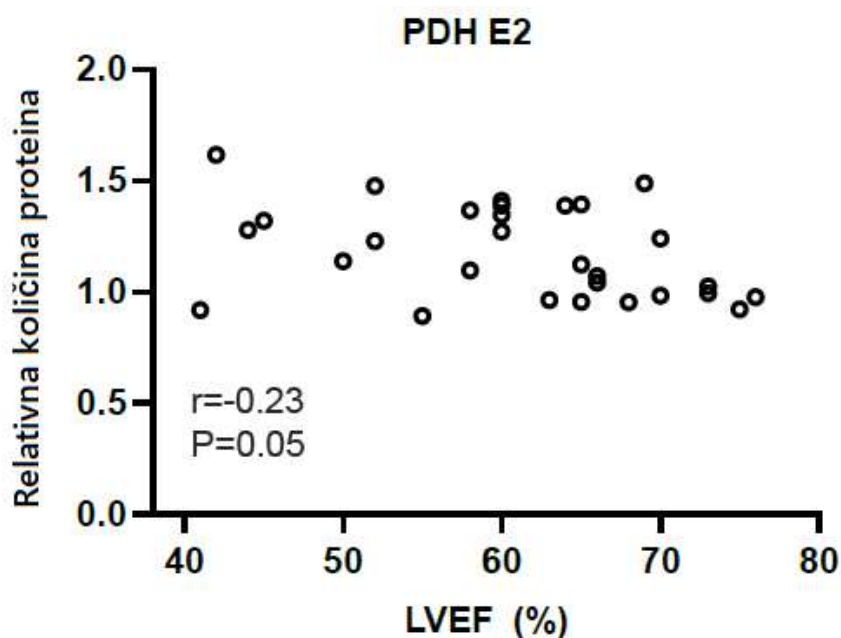
Slika 12. Dijagram prikazuje odnos između ekspresije HADHA, trećeg enzima puta oksidacije masnih kiselina, i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije



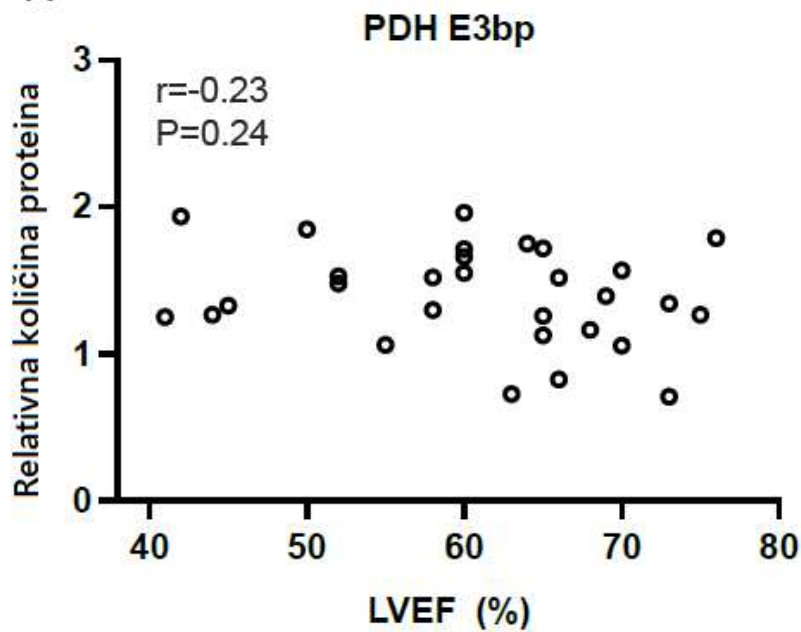
Slika 13. Dijagram prikazuje odnos između ekspresije PDH E1 α , podjedinice enzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze, i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije



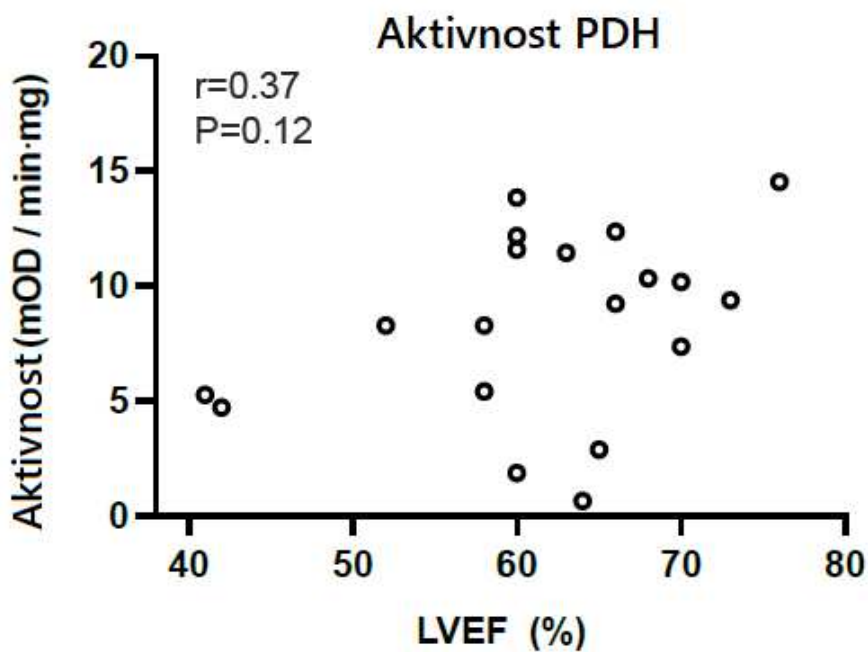
Slika 14. Dijagram prikazuje odnos između ekspresije PDH E2, podjedinice enzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze, i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije



Slika 15. Dijagram prikazuje odnos između ekspresije PDH E3bp, podjedinice enzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze, i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije



Slika 16. Dijagram prikazuje odnos između aktivnosti PDH i izbačajne frakcije (LVEF).

* Pearsonov koeficijent korelacije

5. RASPRAVA

Zdravo srce pokazuje visok stupanj metaboličke fleksibilnosti, sposobnosti da koristi različite energetske supstrate za sintezu ATP-a. Predominantni metabolički put i energijski supstrati mogu se značajno mijenjati prilikom promjene okolišnih uvjeta, npr. dostupnosti supstrata, neuroendokrinog statusa i potrebe za energijom (16). U fiziološkim uvjetima kardiomiociti pretežito koriste oksidaciju masnih kiselina za stvaranje ATP-a (29).

Kardiomiocite karakterizira stalna potreba za velikom količinom energije uz istodobno zanemarivu zalihu energijom bogatih spojeva unutar stanice, pa ključnu ulogu ima pravilno funkcioniranje mitohondrija u kojima se stvara ATP (30). Velik broj studija upućuje na pozitivnu korelaciju između napredovanja srčanog zatajenja i mitohondrijske disfunkcije. Pretpostavlja se da je upravo mitohondrijska disfunkcija glavni pokretač začaranog kruga srčanog zatajivanja (6, 31).

Mitohondrijska disfunkcija uključuje nepravilnosti građe, dinamike i funkcije tih organela (6). Nepravilnosti u građi mitohondrija pronađene su u životinjskim modelima i ljudskim uzorcima srca sa smanjenom izbačajnom frakcijom (32). Te morfološke abnormalnosti uključuju hiperplaziju, fragmentaciju organela, smanjenje volumena mitohondrija, gubitak matriksa te disrupciju unutarnje i vanjske mitohondrijske membrane (32). Abnormalnosti građe mitohondrija dovode do manjkave produkcije energije i povećanog otpuštanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (33, 34).

Mitohondriji u zdravom srcu su dinamični organeli koji na promjene staničnog okoliša ili energetskehtjeva odgovaraju brzo. Mitohondrijska biogeneza je proces kojim se u stanicama stvaraju novi mitohondriji te se njihov broj povećava (35). Procesi fuzije i fisije mitohondrija značajni su za očuvanje integriteta mitohondrijske DNA jer popravljaju mitohondrije s djelomično oštećenim genetskim materijalom (36). Fuzijom i fisijom upravljaju specifični mitohondrijski fuzijski i fisijski proteini (37). Mitofagija je fiziološki proces uklanjanja oštećenih mitohondrija koji se ne mogu popraviti postupcima fuzije i fisije (38). Nepravilnosti mitohondrijske dinamike odnose se na poremećaj biogeneze, fuzije i fisije mitohondrija te mitofagije. Tijekom srčanog zatajivanja nastaje neravnoteža signalnih puteva koji reguliraju navedene procese, što doprinosi nakupljanju disfunkcionalnih mitohondrija i stvara začarani krug (39).

Mitohondriji u srcu sa smanjenom kontraktilnosti pokazuju i funkcionalne abnormalnosti: povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i smanjeno stvaranje ATP-a (40-43). ROS su spojevi kisika koji imaju visoku razinu slobodne energije zbog

nesparenih elektrona u njihovoj strukturi. To ih čini jako nestabilnima i sklonima ulasku u reakcije s okolnim spojevima, čime smanjuju svoju slobodnu energiju i postižu kemijsku stabilnost. Većina ROS-a stvara se u mitohondrijima tijekom redoks reakcija na elektrontransportnom lancu (44). U fiziološkim uvjetima, produkcija ROS-a je malena, a nastanak oksidativnog oštećenja staničnih makromolekula sprječavaju antioksidativni spojevi i enzimski sustavi. Ukoliko se stvara višak ROS-a ili postoje defekti antioksidativnih mehanizama, dolazi do oksidacije staničnih proteina, peroksidacije lipida, lomova DNA, oštećenja elektrontransportnog lanca; to jest do mitohondrijske disfunkcije (45).

Srčano zatajenje karakterizirano je remodeliranjem miokarda. To je patološki proces koji zahvaća srčane stanice mijenjajući im morfologiju i metabolizam. Proces remodeliranja obuhvaća molekularne, stanične i intersticijske promjene u miokardu (46). Te su promjene u početku adaptivne, nastaju kao prilagodba srca na patološke okolišne uvjete. Napredovanjem patološkog procesa, remodeliranje miokarda postaje maladaptivno (47). Proces remodeliranja stoga završava lošim ishodom i promiče srčano zatajenje. Morfološke promjene obuhvaćaju hipertrofiju lijevog ventrikula i dilataciju ventrikula. Zbog hipertrofičnih i dilatativnih promjena raste potreba za energijom, a koronarni protok relativno se smanjuje (47). Neravnoteža između potrebe za ATP-om i dostupnosti energije dovodi do disfunkcije srčanih mitohondrija, tj. metaboličkog remodeliranja.

Dosadašnja su istraživanja metabolizma miokarda sa smanjenom kontraktilnom funkcijom dokazala da se u kasnim stadijima srčanog zatajenja smanjuje metabolička fleksibilnost, što se očitujem smanjenjem oksidacije masnih kiselina i povećanom oksidacijom glukoze (30, 40). Ograničenje tih studija je što su provedene na uzorcima srca u završnoj fazi zatajenja, tj. doniranim od pacijenata koji su prošli kroz postupak transplantacije srca ili ugradnje uređaja za mehaničku cirkulacijsku potporu lijevoj klijetki (LVAD, od engl. *left ventricular assist device*) (48-50).

Spomenuta istraživanja upućuju na činjenicu da u razvoju i napredovanju srčanog zatajenja bitnu, a možda i pokretačku ulogu, imaju mitohondrijska disfunkcija i metaboličke promjene. U našem je istraživanju proučavan metabolički kapacitet za korištenje masnih kiselina i ugljikohidrata u tkivu miokarda pacijenata s različitim vrijednostima izbačajnih frakcija. Glavni je cilj istraživanja bio ustanoviti postoji li pozitivna korelacija između vrijednosti izbačajne frakcije i metaboličkog kapaciteta za korištenje masnih kiselina već u ranim fazama srčanog zatajenja, kad je izbačajna frakcija veća od 40%.

Rezultati našeg istraživanja podupiru hipotezu da metaboličko remodeliranje započinje u ranim stadijima srčanog zatajenja, a očituje se smanjenjem tkivne ekspresije enzima beta-oksidacije masnih kiselina VLCAD i HADHA proporcionalno smanjenju izbačajne frakcije.

Također je proučavan srčani metabolizam ugljikohidrata kod pacijenata s početnim stadijima srčanog zatajenja. Aktivnost i ekspresija piruvat dehidrogenaze u uzorku miokarda nije bila povezana s promjenom izbačajne frakcije. Piruvat dehidrogenaza glavni je regulator brzine metabolizma ugljikohidrata, što upućuje na to da mitohondrijski kapacitet za korištenje ugljikohidrata nije zahvaćen promjenom izbačajne frakcije.

Ova studija nije dokazala povezanost između izbačajne frakcije i mitohondrijske respiracije potaknute piruvatom, odnosno palmitoil-karnitinom. Ipak, relativni doprinos metaboličkog puta razgradnje masti (mitohondrijska respiracija potaknuta palmitoil-karnitinom) pokazuje tendenciju korelacije s izbačajnom frakcijom, koja nije statistički značajna ($P=0,060$). To upućuje na mogućnost da povezanost LVEF i mitohondrijske respiracije potaknute palmitoil-karnitinom zaista postoji, ali je ispitivanje provedeno na premalom broju uzoraka kako bi se statistički značajna korelacija mogla dokazati.

Ovi su rezultati u skladu s dosadašnjim tijelom dokaza o izmijenjenoj tendenciji miokarda za korištenje metaboličkih supstrata tijekom razvoja srčanog zatajenja. Brojne studije na životinjama istraživale su kako povećanje tlačnog opterećenja lijevog ventrikula (eng. *afterload*) mijenja utilizaciju supstrata. Metabolički pomak prema dominantnom korištenju ugljikohidrata umjesto masnih kiselina opažen je u modelima srčanog zatajenja u štakora (51) i pasa (52). Miokard pacijenata u završnom stadiju zatajenja pokazuje isti metabolički pomak karakteriziran smanjenim metabolizmom masnih kiselina i povećanim metabolizmom glukoze (53, 54). Još nije poznato djeluje li ovaj pomak u korištenju supstrata kao adaptivni mehanizam i kompenzacijski odgovor srca na patološke okolišne uvjete ili djeluje štetno potičući smanjenje kontraktilne funkcije.

Značajno je da se u kardiomiocitima smanjuje stopa oksidacije masnih kiselina, no to nije popraćeno smanjenim unosom masnih kiselina u srčane stanice. Naprotiv, dotok slobodnih masnih kiselina do srca pacijenata u uznapredovalim stadijima srčanog zatajenja raste zbog njihove povećane plazmatske koncentracije. Razina slobodnih masnih kiselina u krvi povećava se kao posljedica sustavne aktivacije simpatikusa (55). Nesklad između povećanog unosa masnih kiselina u kardiomiocite i njihovog smanjenog metaboliziranja dovodi do unutarstaničnog nakupljanja lipida (56). Unutar kardiomiocita, lipidi su pohranjeni u obliku

triglicerida, ali i ceramida i diacilglicerola, koji na stanicu djeluju štetno. Štetni učinak unutarstanično pohranjenih lipida zove se lipotoksičnost; ona dovodi do apoptoze kardiomiocita i mitohondrijske disfunkcije (57, 58).

Provedena studija imala je određena ograničenja. Srčano zatajenje klinički je sindrom koji nastaje uslijed različitih etiopatogenetskih mehanizama. Ishemijska bolest srca jedan je od najčešćih uzroka slabljenja kontraktilne funkcije. Pacijenti uključeni u studiju imali su izraženu bolest koronarnih arterija, zbog koje su podvrgnuti postupku aortokoronarnog premoštenja. Stoga su rezultati ove studije povezani uz srčano zatajenje nastalo u toj specifičnoj populaciji pacijenata. Trebalo bi provesti dodatna istraživanja u pacijenata kod kojih srčano zatajenje nije uzrokovano ishemijskom bolesti srca kako bi se rezultati mogli poopćiti na ukupnu populaciju pacijenata sa srčanim zatajenjem. Također, neki od pacijenata uključenih u studiju bolovali su od šećerne bolesti tipa 2, koja dokazano utječe na mitohondrijsku funkciju (59, 60). Dodatni ograničavajući čimbenik bila je mala masa biopsiranih uzoraka miokarda (10 mg i manje), što je onemogućilo provedbu većeg broja mjerenja na svim prikupljenim uzorcima.

Prethodno razmotrene činjenice upućuju na zaključak da oštećenje mitohondrijske funkcije postoji već u početnim fazama srčanog zatajenja. Mitohondrijska disfunkcija može se smatrati uzrokom, a ne posljedicom bolesti srca. Ona predstavlja primarni i temeljni poremećaj koji dovodi do smanjenja kontraktilne sposobnosti srca i rezultira patološkim remodeliranjem koje dodatno pogoršava kontraktilnu disfunkciju i pokreće začarani krug.

Današnji pristup liječenju srčanog zatajenja usmjeren je na sprječavanje remodeliranja miokarda lijekovima poput ACE inhibitora, antagonista receptora za angiotenzin, inhibitora neprilizina, antagonista adrenergičkih beta-1 receptora (tzv. beta blokatori), antagonista aldosterona i SGLT-2 inhibitora. Terapija navedenim lijekovima dokazano smanjuje mortalitet od srčanog zatajenja i poboljšava kvalitetu života pacijenata (61). Ipak, postojeći lijekovi ne djeluju na molekularne i metaboličke abnormalnosti koje postoje u srčanom zatajenju. U svjetlu novih saznanja o metaboličkom remodeliranju miokarda i mitohondrijskoj disfunkciji koja promovira srčano zatajenje, usmjeravanje farmakološke terapije na mitohondrijske abnormalnosti može biti obećavajuće. Lijekovi koji na srčani metabolizam djeluju modulacijom mitohondrijske funkcije su u fazi razvoja (npr. elamipretid) (39). Ipak, još treba razviti učinkovite i sigurne načine liječenja.

6. ZAKLJUČCI

Srčano zatajenje sve je zastupljenije u modernim zemljama te ima veliki epidemiološki i ekonomski značaj.

Kardiomiociti imaju stalnu potrebu za velikom količinom energije zbog čega ovise o optimalnoj funkciji mitohondrija u kojima se stvara ATP. Mitohondrijska disfunkcija karakteristika je miokarda sa smanjenom kontraktilnom funkcijom, tj. miokarda u kojemu se razvija srčano zatajenje. Mitohondrijska disfunkcija doprinosi pogoršanju srčanog zatajenja i patološkom remodeliranju miokarda. Patološko remodeliranje miokarda obuhvaća morfološke i metaboličke promjene u srcu koje zatajuje.

Na temelju rezultata dobivenih tijekom našeg istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Metaboličko remodeliranje miokarda započinje u ranim stadijima srčanog zatajenja. Očituje se smanjenjem tkivne ekspresije enzima beta-oksidacije masnih kiselina VLCAD i HADHA proporcionalno smanjenju izbačajne frakcije.
2. Aktivnost i ekspresija piruvat dehidrogenaze u kardiomiocitima nije povezana s promjenom izbačajne frakcije. Na temelju toga zaključujemo da mitohondrijski kapacitet za korištenje ugljikohidrata nije zahvaćen promjenom izbačajne frakcije.
3. Ova studija nije dokazala povezanost između izbačajne frakcije i mitohondrijske respiracije potaknute piruvatom, odnosno palmitoil-karnitinom. Ipak, relativni doprinos metaboličkog puta razgradnje masti (mitohondrijska respiracija potaknuta palmitoil-karnitinom) pokazuje tendenciju korelacije s izbačajnom frakcijom, koja nije statistički značajna ($P=0,060$).

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Walker BR, Colledge NR, Ralston SH, Penman ID. Davidson's principle and practice of medicine. 22. izdanje. Edinburgh: Elsevier; 2014. 546. str.
2. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2020;22:1342-56.
3. Lindmark K, Boman K, Olofsson M, Törnblom M, Levine A, Castelo-Branco A i sur. Epidemiology of heart failure and trends in diagnostic work-up: a retrospective, population-based cohort study in Sweden. *Clin Epidemiol.* 2019;11:231-44.
4. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija – udžbenik. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2017. 115. str.
5. Guyton AC, Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12. izdanje. Philadelphia: Elsevier. 2011. 255. str.
6. Caraballo C, Desai NR, Mulder H, Alhanti B, Wilson FP, Fiuzat M i sur. Clinical Implications of the New York Heart Association Classification. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e014240.
7. Sabbah HN. Targeting the mitochondria in heart failure: a translational perspective. *JACC Basic Transl Sci.* 2020;5:88-106.
8. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 95. str.
9. Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2004. 399-414. str.
10. Pelletier-Galarneau M, Petibon Y, Ma C, Han P, Kim SJW, Detmer FJ i sur. In vivo quantitative mapping of human mitochondrial cardiac membrane potential: a feasibility study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021;48:414-20.
11. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 143.-156. str.
12. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, Jordan F. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem.* 2014; 289:16615-23.
13. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. 184.-192. str.
14. Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113:603-16.
15. Bertero E, Maack C. Metabolic remodeling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:457-70.

16. Karwi QG, Uddin GM, Ho KL, Lopaschuk GD. Loss of metabolic flexibility in the failing heart. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:68.
17. Caliskan E, de Souza DR, Böning A, Liakopoulos OJ, Choi YH, Pepper J i sur. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:155-69.
18. Doenst T, Haverich A, Serruys P, Bonow RO, Kappetein P, Falk V i sur. PCI and CABG for treating stable coronary artery disease: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73:964-76.
19. Møller CH, Steinbrüchel DA. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting. *Curr Cardiol Rep.* 2014;16:455.
20. Shaefi S, Mittel A, Loberman D, Ramakrishna H. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting - a systematic review and analysis of clinical outcomes. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019;33:232-44.
21. Greason KL, Kim S, Suri RM, Wallace AS, Englum BR. Hypothermia and operative mortality during on-pump coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148:2712-8.
22. Saad H, Aladawy M. Temperature management in cardiac surgery. *Global cardiology science & practice,* 2013;44–62.
23. Antunes PE, Ferrão de Oliveira J, Prieto D, Coutinho GF, Correia P, Branco CF i sur. Coronary artery bypass surgery without cardioplegia: hospital results in 8515 patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016;49:918-25.
24. Hawkes AL, Nowak M, Bidstrup B, Speare R. Outcomes of coronary artery bypass graft surgery. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2:477-84.
25. Francis G, Kerem Z, Makkar HP, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 2002;88:587-605.
26. Silva AM, Oliveira PJ. Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol Biol.* 2012;810:7-24.
27. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96.
28. Cavar M, Ljubkovic M, Bulat C, Bakovic D, Fabijanic D, Kraljevic J i sur. Trimetazidine does not alter metabolic substrate oxidation in cardiac mitochondria of target patient population. *Br J Pharmacol.* 2016;173:1529-40.
29. Lopaschuk GD, Ussher JR. Evolving concepts of myocardial energy metabolism: more than just fats and carbohydrates. *Circ Res.* 2016;119:1173-6.

30. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005;85:1093-129.
31. Poznyak AV, Ivanova EA, Sobenin IA, Yet SF, Orekhov AN. The role of mitochondria in cardiovascular diseases. *Biology (Basel).* 2020;9:137.
32. Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24:1333-47.
33. Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:1757-62.
34. Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Dec;32(12):2361-7.
35. Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr Pharm Des.* 2014;20:5507-9.
36. Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium.* 2016;60:88-101.
37. Ong SB, Kalkhoran SB, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol.* 2015;763:104-14.
38. Shires SE, Gustafsson ÅB. Mitophagy and heart failure. *J Mol Med (Berl).* 2015;93:253-62.
39. Sabbah HN, Gupta RC, Singh-Gupta V, Zhang K, Lanfear DE. Abnormalities of mitochondrial dynamics in the failing heart: normalization following long-term therapy with Elamipretide. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2018;32:319-28.
40. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest.* 2018;128:3716-26.
41. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94:909-50.
42. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2013;18:607-22.
43. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med.* 2019;51:1-13.

44. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N i sur. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999;85:357-63.
45. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K i sur. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res.* 2000;86:152-7.
46. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106:62-9.
47. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013;113:709-24.
48. Cordero-Reyes AM, Gupte AA, Youker KA, Loebe M, Hsueh WA, Torre-Amione G i sur. Freshly isolated mitochondria from failing human hearts exhibit preserved respiratory function. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;68:98-105.
49. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Höfer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43:1729-38.
50. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F i sur. Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:150-7.
51. Heather LC, Cole MA, Lygate CA, Evans RD, Stuckey DJ, Murray AJ i sur. Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart. *Cardiovasc Res.* 2006;72:430-7.
52. Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR i sur. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation.* 2002;106:606-12.
53. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP i sur. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:271-7.
54. Bedi KC Jr, Snyder NW, Brandimarto J, Aziz M, Mesaros C, Worth AJ i sur. Evidence for intramyocardial disruption of lipid metabolism and increased myocardial ketone utilization in advanced human heart failure. *Circulation.* 2016;133:706-16.
55. Opie LH, Knuuti J. The adrenergic-fatty acid load in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:1637-46.

56. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K i sur. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*. 2004;18:1692-700.
57. Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab*. 2012;15:805-12.
58. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801:311-9.
59. Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H. Taking diabetes to heart - deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000433.
60. Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D, Blamire AM, Buckingham RE, Styles P i sur. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003;107:3040-6.
61. Frigerio M, Roubina E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. *Am J Cardiol*. 2005;96:10-8.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati utjecaj srčanog popuštanja na metabolizam masnih kiselina i ugljikohidrata u miokardu pacijenata. Utvrditi postoji li metaboličko remodeliranje u početnim fazama srčanog zatajenja, u srcima s blago smanjenom i očuvanom izbačajnom frakcijom (LVEF>40%).

Materijali i metode: U istraživanje je uključen 41 pacijent s bolešću koronarnih arterija. Kod svih ispitanika poduzeta je elektivna operacija aortokoronarnog premoštenja. Prije operacije u svih je ispitanika ehokardiografski izmjerena izbačajna frakcija lijevog ventrikula. Tijekom operativnog zahvata postavljanja srčane prenosnice bez upotrebe stroja za izvantjelesnu oksigenaciju krvi (tzv. *off-pump* CABG metoda), iglenom biopsijom sakupljeni su uzorci tkiva subepikardijalnog miokarda lijevog ventrikula (anteroseptalni dio). Prikupljeni su uzorci na prikladan način obrađeni da bi se sačuvalo što više vijabilnih kardiomiocita te su dopremljeni u laboratorij. Mitohondrijska oksidacija supstrata evaluirana je mjerenjem potrošnje kisika u komorici s tkivom koristeći Clark-elektrodu. Metodom Western blota određena je ekspresija enzima koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina i ugljikohidrata u uzorku tkiva miokarda (enzimi beta-oksidacije masnih kiselina VLCAD i HADHA te podjedinice enzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze: PDH E1 α , PDH E2, PDH E3bp). Aktivnost enzima piruvat dehidrogenaze mjerena je metodom spektrofluorometrije.

Rezultati: Mitohondrijska respiracija mjerena je u respiracijskoj komorici i izražena je smanjenjem koncentracije kisika u komorici nakon dodavanja supstrata. Nakon dodatka piruvata, odnosno palmitoil-karnitina u respiracijsku komoricu, nije opažena statistički značajna povezanost između oksidacije navedenih supstrata i izbačajne frakcije. Ipak, postoji jasna tendencija porasta oksidacije masnih kiselina u uzorcima tkiva srca s većom izbačajnom frakcijom, koja nije statistički značajna ($P=0,060$). Količina enzima VLCAD i HADHA, ključnih enzima beta-oksidacije masnih kiselina, pozitivno korelira s porastom izbačajne frakcije. Takva povezanost s izbačajnom frakcijom nije pronađena kod ekspresije enzima koji reguliraju metabolizam ugljikohidrata, a to su podjedinice kompleksa piruvat dehidrogenaze: PDH E1 α , PDH E2 i PDH E3bp. Također, ne postoji povezanost između aktivnosti piruvat dehidrogenaze i izbačajne frakcije.

Zaključci: Metaboličko remodeliranje miokarda započinje u ranim stadijima srčanog zatajenja. Očituje se smanjenjem tkivne ekspresije enzima beta-oksidacije masnih kiselina VLCAD i HADHA proporcionalno smanjenju izbačajne frakcije. Relativni doprinos metaboličkog puta razgradnje masti (mitohondrijska respiracija potaknuta palmitoil-karnitinom) pokazuje tendenciju korelacije s izbačajnom frakcijom, koja nije statistički značajna. Aktivnost i

ekspresija piruvat dehidrogenaze u kardiomiocitima nije povezana s promjenom izbačajne frakcije.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Relationship between left ventricular ejection fraction and cardiac metabolism of fatty acids and carbohydrates in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery.

Objectives: The purpose of this study was to investigate whether there is a relationship between development of heart failure and altered metabolism of fatty acids and carbohydrates. The aim of this study was to determine whether metabolic remodeling in heart failure occurs in the initial stage of heart failure, in hearts with mildly reduced and preserved contractile function (LVEF>40%).

Materials and methods: This study included forty-one hemodynamically stable patients with coronary artery disease undergoing elective CABG surgery. Before the CABG procedure, each patient's LVEF was determined by transthoracic echocardiography. During the off-pump CABG procedure, a needle biopsy was performed and tissue was obtained from anteroseptal area of the left ventricle. Obtained tissue samples were processed in a manner to preserve as many viable cardiomyocytes as possible. Mitochondrial respiration was evaluated using an oxygen Clark-type electrode. For assessment of fatty acid oxidation, palmitoyl-carnitine was added to the respiratory chamber, while carbohydrate oxidation was assessed using pyruvate. Western blotting was used to assess expression of enzymes which regulate the rate of fatty acid and carbohydrate metabolism (VLCAD and HADHA, which play important role in beta-oxidation of fatty acids; PDH subunits PDH E1 α , PDH E2 and PDH E3bp, which regulate carbohydrate oxidation). Spectrofluorometry was used to measure the activity of pyruvate dehydrogenase.

Results: When myocardial oxygen consumption was stimulated with substrates of individual metabolic pathways, pyruvate or palmitoyl-carnitine, no significant association with LVEF was observed. However, there is a clear tendency for palmitoyl-driven maximal oxygen consumption to increase in tissues with higher LVEF (P=0.060). Moreover, LVEF was positively associated with expression of key enzymes of cardiac fatty acid metabolism: VLCAD and HADHA. No such relationship existed between LVEF and PDH activity and expression.

Conclusions: Myocardial metabolic remodeling begins in initial stages of heart failure. Among other, it is manifested as a down-regulation of beta-oxidation enzymes VLCAD and HADHA proportionally to LVEF reduction. This study did not find a statistically significant correlation between pyruvate-driven and palmitoyl-driven mitochondrial respiration and LVEF. However, there is a clear tendency for palmitoyl-driven maximal oxygen consumption to positively

correlate with LVEF, which is not statistically significant. Myocardial activity and expression of PDH is not related to the changes in LVEF.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNNE INFORMACIJE:

Ime i prezime: Ema Slapničar

Datum i mjesto rođenja: 25. kolovoza 1997. godine u Splitu

Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE:

2004.-2012. Osnovna škola Spinut, Split

2012.-2016. III gimnazija, Split

2016.-2022. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

JEZICI:

Hrvatski jezik – materinski

Engleski jezik – B2 razina

Njemački jezik – B2 razina

NAGRADE:

- Dobitnica Priznanja Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH za najbolju maturanticu na ispitima Državne mature u šk. god. 2015./2016.
- Dobitnica Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh za ak. god. 2016./2017.
- Dobitnica Rektorove nagrade za izvrsnost za ak. god. 2019./2020.
- Dobitnica stipendije Sveučilišta u Splitu u periodu 2016.-2022. god.

PUBLIKACIJE:

- Babic A, Vuka I, Saric F, Proloscic I, **Slapnicar E**, Cavar J, Poklepovic Pericic T, Pieper D, Puljak L. Overall bias methods and their use in sensitivity analysis of Cochrane reviews were not consistent. J Clin Epidemiol. 2020 Mar;119:57-64.
- Krsticevic M, Saric D, Saric F, **Slapnicar E**, Boric K, Dosenovic S, Jelcic Kadic A, Kegalj MJ, Puljak L. Selective reporting bias due to discrepancies between registered and published outcomes in osteoarthritis trials. J Comp Eff Res. 2019 Nov;8(15):1265-1273.

AKTIVNOSTI:

- Demonstratorica na Katedri za medicinsku biologiju u ak. god. 2017./2018. i 2018./2019.
- Demonstratorica na Katedri za patofiziologiju u ak. god. 2019./2020.
- Sudjelovanje na studentskoj razmjeni u berlinskoj bolnici Charité, rujan 2019. god.
- Sudjelovanje u radu udruženja studenata medicine CroMSIC u periodu 2018.-2022. god.
- Sudjelovanje na 12. ISABS konferenciji iz forenzike i antropološke genetike s predavanjima Mayo klinike iz područja individualizirane medicine, lipanj 2022. god.