

# Akutno izazvan poremećaj protoka krvi pogoršava endotelnu disfunkciju u umjerenoj do vrlo teškoj kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti

---

**Mladinov, Suzana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*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:171:490642>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Suzana Mladinov, *dr. med.*

**AKUTNO IZAZVAN POREMEĆAJ PROTOKA KRVI  
POGORŠAVA ENDOTELNU DISFUNKCIJU  
U UMJERENOJ DO VRLO TEŠKOJ  
KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI**

**Doktorska disertacija**

Split, 2019.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Suzana Mladinov, *dr. med.*

**AKUTNO IZAZVAN POREMEĆAJ PROTOKA KRVI  
POGORŠAVA ENDOTELNU DISFUNKCIJU  
U UMJERENOJ DO VRLO TEŠKOJ  
KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI**

**Doktorska disertacija**

Split, 2019.

Ovo istraživanje je provedeno u laboratoriju Zavoda za integrativnu fiziologiju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu i u Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split. Registrirano je na *ClinicalTrials.gov* pod identifikatorom NCT03004352 22. prosinca 2016. god.

**Mentor: *prof. dr. sc. Željko Đujić, dr. med.***

## **ZAHVALA**

Od srca zahvaljujem svojem mentoru, profesoru Željku Dujiću, na ukazanom povjerenju i časti. Radom u njegovom znanstvenom timu stekla sam neprocjenjivo znanstveno i životno iskustvo.

Hvala mom najbližem suradniku u ovom istraživanju, profesoru Ottu Baraku, na pomoći, vodstvu i prijateljstvu.

Zahvaljujem ostalim kolegama koautorima bez kojih ne bi bilo ovog rada.

Hvala svim liječnicima, medicinskim sestrama i pomoćnom osoblju Klinike za plućne bolesti bez kojih regrutacija i priprema ispitanika ne bi bila moguća.

Hvala Ivani Banić na trudu i ljubaznosti.

Hvala i svim ispitanicima, naročito oboljelima od KOPB-a, na plemenitosti i požrtvovnosti.

Hvala mojim roditeljima, bratu i sestri na podršci i ljubavi.

I na kraju, hvala mojima Marinu, Šimi i Mari. Oni su moje nadahnuće i moj smisao.

## SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA</b> .....	1
<b>1. UVOD</b> .....	4
1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB).....	4
1.2. KOPB i kardiovaskularni rizik.....	8
1.3. Endotelna funkcija.....	10
1.4. Endotelna disfunkcija.....	13
1.5. Klinička procjena endotelne funkcije.....	15
1.5.1. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD).....	16
1.5.2. Mikročestice endotelnog podrijetla (EMP) u plazmi.....	21
1.6. Oscilirajuće smično opterećenje.....	26
1.7. Endotelna disfunkcija u KOPB-u.....	30
1.8. Endotelna funkcija i hipoksija.....	34
1.9. Svrha istraživanja.....	37
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	38
2.1. Ciljevi istraživanja.....	38
2.2. Hipoteze istraživanja.....	39
<b>3. METODE</b> .....	40
3.1. Organizacija istraživanja.....	40
3.2. Ispitanici.....	41
3.3. Postupci.....	43
3.3.1. Anamneza i fizikalni pregled.....	43
3.3.2. Plinska analiza arterijske krvi i acidobazni status.....	43
3.3.3. Pulsna oksimetrija.....	44
3.3.4. Spirometrija.....	44
3.3.5. Hemodinamika brahijalne arterije.....	45
3.3.6. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD).....	45
3.3.7. Oscilirajuće smično opterećenje (intervencija).....	47
3.3.8. Mjerenje koncentracije mikročestica (MP) u plazmi.....	47
3.3.9. Protokol istraživanja.....	48

3.4. Statistička analiza.....	50
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>52</b>
4.1. Ispitanici.....	52
4.2. Stopa smicanja (SR) i oscilirajući smični indeks (OSI).....	55
4.3. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD).....	56
4.4. Mikročestice (MP) u plazmi.....	60
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>62</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>71</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>72</b>
<b>8. NASLOV I SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU.....</b>	<b>74</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>76</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>96</b>
<b>11. PRILOZI.....</b>	<b>100</b>
Prilog 1. Skala zaduhe mMRC.....	100
Prilog 2. Upitnik CAT.....	100
Prilog 3. Objavljeni rad iz ovog istraživanja.....	101

## POPIS KRATICA

- ACE - engl. *angiotensin-converting enzyme*, enzim koji konvertira angiotenzin
- ACEI - engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitor*, inhibitor enzima koji konvertira angiotenzin
- ADMA - asimetrični dimetil-arginin
- ARB - engl. *angiotensin II receptor blocker*, blokator receptora angiotenzina II
- aSR - engl. *antegrade shear rate*, antegradna stopa smicanja
- BH4 - tetrahidro-biopterin
- BMI - engl. *body mass index*, indeks tjelesne mase
- CAT - engl. *COPD Assessment Test*
- CD - engl. *cluster of differentiation*
- CEACAM-8 - engl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-8*, CD66b
- CEC - engl. *circulating endothelial cell*, cirkulirajuća endotelna stanica
- cGMP - ciklički gvanozin-monofosfat
- CI - engl. *confidence interval*, interval pouzdanosti
- cIMT - engl. *carotid intima-media thickness*, debljina intime i medije karotidne arterije
- COX-2 - ciklooksigenaza-2
- CRP - C-reaktivni protein
- CT - engl. *computerized tomography*, kompjutorizirana tomografija
- D<sub>0</sub> - početni promjer arterije
- DBP - engl. *diastolic blood pressure*, dijastolički arterijski krvni tlak
- D<sub>max</sub> - vršni promjer arterije
- DNA - deoksiribonukleinska kiselina
- EDHF - engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, hiperpolarizirajući čimbenik podrijetlom iz endotela
- EDTA - engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilen-diamino-tetraoctena kiselina
- ELAM-1 - engl. *endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1*, adhezijska molekula endotelnih stanica i leukocita-1, E-selektin, CD62E
- EMP - engl. *endothelial microparticle*, endotelna mikročestica
- eNOS - engl. *endothelial nitric oxide synthase*, endotelna sintaza NO-a
- EPC - engl. *endothelial progenitor cell*, endotelna progenitorska stanica
- FEF<sub>25-75</sub> - forsirani ekspiracijski protok između 25% i 75% izdahnutog vitalnog kapaciteta
- FEV<sub>1</sub> - forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi



FiO<sub>2</sub> - engl. *fraction of inspired oxygen*, udio kisika u udahnutom zraku  
FMD - engl. *flow-mediated dilation*, vazodilatacija posredovana protokom  
FVC - engl. *forced vital capacity*, forsirani vitalni kapacitet  
FVII - engl. *factor VII*, čimbenik VII  
g - ubrzanje sile teže  
GOLD - „Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest”  
Hb - hemoglobin  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - bikarbonati  
HR - engl. *hazard ratio*, omjer rizika  
ICAM-1 - engl. *intercellular adhesion molecule-1*, intercelularna adhezijska molekula-1,  
CD54  
IFN- $\gamma$  - interferon- $\gamma$   
IL - interleukin  
KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest  
KRI - kronična respiracijska insuficijencija  
LDL - engl. *low-density lipoprotein*, lipoprotein male gustoće  
L-FMC - engl. *low-flow mediated constriction*, konstrikcija posredovana niskim protokom  
LPS - lipopolisaharid  
LTOT - engl. *long-term oxygen therapy*, dugotrajno liječenje kisikom  
M - engl. *mean*, srednja vrijednost  
MAP - engl. *mean arterial pressure*, srednji arterijski krvni tlak  
MCP-1 - engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, monocitni kemotaktični protein-1  
mikro-RNA - mikro-ribonukleinska kiselina  
MMP - matriksna metaloproteinaza  
mMRC - engl. *modified Medical Research Council*  
MP - engl. *microparticle*, mikročestica  
MR - magnetska rezonanca  
mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina  
mSR - engl. *mean shear rate*, srednja stopa smicanja  
n - broj  
NADPH - reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata  
NMD - engl. *nitroglycerine-mediated dilation*, vazodilatacija posredovana nitroglicerinom  
NO - dušični oksid  
OR - engl. *odds ratio*, omjer izgleda

OSA - engl. *obstructive sleep apnoea*, opstruktivska apneja u snu

OSI - oscilirajući smični indeks

PaCO<sub>2</sub> - parcijalni tlak ugljičnog dioksida u perifernoj arterijskoj krvi

PAI-1 - engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, inhibitor aktivatora plazminogena-1

PaO<sub>2</sub> - parcijalni tlak kisika u perifernoj arterijskoj krvi

PDGF - engl. *platelet-derived growth factor*, čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita

PECAM-1 - engl. *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*, adhezijska molekula trombocita i endotelnih stanica-1, CD31

PET - pozitronska emisijska tomografija

PGI<sub>2</sub> - prostaciklin

pH - kiselost

PWV - engl. *pulse wave velocity*, brzina pulsnog vala

PY - engl. *pack-year*, pušačka kutija-godina

ROS - engl. *reactive oxygen species*, reaktivni kisikovi oblici

rSR - engl. *retrograde shear rate*, retrogradna stopa smicanja

SaO<sub>2</sub> - saturacija hemoglobina periferne arterijske krvi kisikom

SBP - engl. *systolic blood pressure*, sistolički arterijski krvni tlak

SD - standardna devijacija

SpO<sub>2</sub> - saturacija hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom

SR - engl. *shear rate*, stopa smicanja

SR-AUC - engl. *shear rate-area under curve*, površina ispod krivulje stope smicanja

SSRE - engl. *shear stress response element*, element koji reagira na smično opterećenje

TF - engl. *tissue factor*, tkivni čimbenik

TLco - difuzijski kapacitet za ugljični monoksid

TNF- $\alpha$  - engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , čimbenik tumorske nekroze- $\alpha$

TXA<sub>2</sub> - tromboksan A<sub>2</sub>

v - brzina struje krvi

VCAM-1 - engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, adhezijska molekula vaskularnih stanica-1, CD106

VEGF - engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni čimbenik rasta

VE-kadherin - engl. *vascular endothelial cadherin*, vaskularni endotelni kadherin, CD144

vWF - engl. *von Willebrand factor*, von Willebrandov čimbenik

# 1. UVOD

## 1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je bolest koja se manifestira trajnim dišnim simptomima i ograničenjem protoka zraka u dišnim putovima, koje nije potpuno reverzibilno, obično je progresivno, a posljedica je poremećaja dišnih putova i/ili alveola najčešće uzrokovanih značajnom izloženošću štetnim česticama i plinovima (1).

KOPB je česta bolest čija je globalna prevalencija 2010. god. procijenjena na 11.7% s 384 milijuna oboljelih (2). Trenutno se smatra četvrtim uzrokom smrti od kroničnih bolesti u svijetu i predstavlja veliki ekonomski i socijalni teret za društvo (3). U Europskoj uniji čak 56% ukupnih direktnih troškova respiracijskih bolesti (38.6 milijardi eura) otpada na KOPB (4), pri čemu se najveći dio troši na zbrinjavanje akutnih egzacerbacija. Rastuća svjetska populacija, koja je sve starija, u kombinaciji s visokom prevalencijom pušenja i zagađenjem okoliša, osigurati će da KOPB ostane rastući problem i u 21. stoljeću te se očekuje da će 2020. god. biti treći uzrok smrti od kroničnih bolesti u svijetu (5).

Poremećeni upalni odgovor pluća na udisanje štetnih čestica i plinova uz poremećeni proces cijeljenja u KOPB-u uzrokuju strukturne promjene koje se sastoje od destrukcije plućnog parenhima i bolesti malih dišnih putova s pojačanom sekrecijom sluzi, oštećenjem mukocilijarnog klirensa i remodeliranjem (6, 7). Funkcionalne posljedice ovih promjena sastoje se od ograničenja protoka zraka u dišnim putovima, poremećaja ventilacije, hiperinflacije pluća, a u konačnici dolazi i do poremećaja izmjene plinova. Klinički se bolest očituje kroničnim kašljem, iskašljavanjem i progresivnom zaduhom, a bitno obilježje bolesti su i akutne egzacerbacije koje ubrzavaju napredovanje bolesti i pridonose povećanom riziku od nepovoljnih kliničkih ishoda poput posjeta hitnoj službi, hospitalizacija i smrti.

Temeljno patofiziološko obilježje KOPB-a je opstrukcija protoka zraka u dišnim putovima u ekspiriju koja je definirana *post*-bronhodilatacijskim omjerom forsiranog ekspiracijskog volumena u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC), tzv. *Tiffeneau*-ovim indeksom ( $FEV_1/FVC$ )  $<70\%$ . Metoda izbora za utvrđivanje bronhalne opstrukcije te procjenu njezine težine i reverzibilnosti je spirometrija s bronhodilatacijskim testom, naravno u odgovarajućem kliničkom kontekstu simptoma i izloženosti rizičnim čimbenicima (1). U dijagnostici, procjeni težine bolesti i praćenju bolesnika koristimo se i drugim testovima plućne funkcije poput mjerenja statičkih plućnih volumena, difuzijskog kapaciteta za ugljični monoksid (TLco), plinske analize arterijske krvi, acidobaznog statusa i testova opterećenja, ali i slikovnim metodama.

Donedavno je težina KOPB-a procijenjivana samo na temelju stupnja bronhalne opstrukcije utvrđenog spirometrijom te se  $FEV_1$  smatrao glavnim pokazateljem težine i prognoze bolesti (Tablica 1.). Blagi je KOPB bio definiran vrijednošću  $FEV_1 \geq 80\%$  pred. (predviđenog za dob, spol, visinu i rasu), umjereni KOPB s  $FEV_1 50-79\%$  pred., teški KOPB s  $FEV_1 30-49\%$  pred., a vrlo teški KOPB s  $FEV_1 <30\%$  ili  $<50\%$  pred. s kroničnom respiracijskom insuficijencijom ili znacima kroničnog plućnog srca. Međutim, utvrđeno je da se bolesnici s istim stupnjem bronhalne opstrukcije često razlikuju s obzirom na vrstu i intenzitet simptoma, funkcionalnu sposobnost, kvalitetu života, tijek bolesti i brzinu propadanja plućne funkcije, učestalost i težinu egzacerbacija (8-10) te smrtnost (9, 11). S tim u vezi je u reviziji smjernica „Globalne inicijative za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest” (GOLD) iz 2013. god. predložena kombinirana procjena bolesnika s KOPB-om koja uzima u obzir sljedeće aspekte bolesti: stupanj bronhalne opstrukcije, prirodu i intenzitet simptoma te anamnezu umjerenih i teških egzacerbacija (12).

**Tablica 1.** Klasifikacija težine bronhalne opstrukcije u KOPB-u (prema *post*-bronhodilatacijskom  $FEV_1$ )

$FEV_1/FVC < 0.7$		$FEV_1$ (% pred.*)
GOLD 1	Blagi	$\geq 80$
GOLD 2	Umjereni	50-79
GOLD 3	Teški	30-49
GOLD 4	Vrlo teški	$< 30$

\*pred. = predviđenog za dob, spol, visinu i rasu

Za procjenu simptoma se koriste dva upitnika: intenzitet zaduhe se procjenjuje skalom mMRC (engl. *modified Medical Research Council*, Prilog 1.) (13), a u svrhu sveobuhvatne procjene bolesnikovih simptoma koristi se upitnik CAT (engl. *COPD Assessment Test*, Prilog 2.) (14). S obzirom da su učestale egzacerbacije (više od jedne umjerene ili teške u prethodnoj godini ili samo jedna ako je bolesnik hospitaliziran) najbolji predskazatelj budućih egzacerbacija (10, 15), rizik od egzacerbacija se procjenjuje, ne samo prema stupnju bronhalne opstrukcije, nego i prema anamnezi egzacerbacija. Temeljem simptoma, stupnja bronhalne opstrukcije i učestalosti umjerenih i teških egzacerbacija oboljeli od KOPB-a su razvrstani u četiri skupine: A, B, C ili D (Tablica 2.). U skupini A i B su bolesnici s najviše jednom, ambulantno liječenom, egzacerbacijom godišnje i/ili s  $FEV_1 \geq 50\%$ : oni s malo simptoma (mMRC <2 ili CAT <10) svrstani su u skupinu A, a oni s izraženim simptomima u skupinu B. Bolesnici s češćim egzacerbacijama i/ili  $FEV_1 < 50\%$  imaju povećani rizik od egzacerbacija i lošiju prognozu te su, ovisno o bremenu simptoma, svrstani u skupinu C (malo simptoma) ili D (više simptoma) (12).

**Tablica 2.** Kombinirana procjena KOPB-a (2013. god.)

Stupanj bronhalne opstrukcije (GOLD)			Broj umjerenih i teških egzacerbacija prethodne godine
4- $FEV_1 < 30\%$	<b>C</b>	<b>D</b>	$\geq 2$ ili $\geq 1$ hospitalno liječena
3- $FEV_1 30-49\%$			
2- $FEV_1 50-79\%$	<b>A</b>	<b>B</b>	0-1
1- $FEV_1 \geq 80\%$			
	mMRC <2 CAT <10	mMRC $\geq 2$ CAT $\geq 10$	
	Simptomi		

Premda je na populacijskoj razini jasno utvrđena povezanost stupnja bronhalne opstrukcije i rizika od egzacerbacija (10) i smrti (9, 11), zbog nedovoljne preciznosti  $FEV_1$  kao prediktora egzacerbacija i smrti u pojedinog bolesnika i njegove ograničene vrijednosti u

izboru terapije, revizija GOLD-ovih smjernica iz 2017. god. je iz procjene „ABCD” izdvojila spirometrijski nalaz čija uloga ostaje u postavljanju dijagnoze, procjeni stupnja bronhalne opstrukcije s prognostičkim implikacijama i izboru pojedinih terapijskih postupaka poput redukcije plućnog volumena ili transplantacije pluća (16). Na taj se način uvažavaju ograničenja FEV<sub>1</sub>, a naglašava važnost simptoma i rizika od egzacerbacija u izboru terapije za pojedinog bolesnika.

KOPB je kompleksna bolest, a bolesnici s KOPB-om vrlo heterogena skupina bolesnika. Pojava novih terapijskih opcija i njihova različita učinkovitost u bolesnika s KOPB-om različitih obilježja dovela je do koncepta fenotipova u KOPB-u. Fenotipovi su definirani kombinacijom obilježja po kojima se bolesnici s KOPB-om međusobno razlikuju, a odnose se na simptome, egzacerbacije, brzinu progresije bolesti, odgovor na terapiju i smrtnost. Fenotipovi omogućuju grupiranje bolesnika u skupine jedinstvenih terapijskih i prognostičkih implikacija. Danas najčešće govorimo o fenotipu učestalog egzacerbatora, fenotipu kroničnog bronhitisa, fenotipu emfizema-hiperinflacije i fenotipu preklapanja s astmom (17).

Dok se ranije KOPB smatrao izoliranom bolešću dišnog sustava, danas se percipira kao sustavna bolest koja je praćena nizom ekstrapulmonalnih manifestacija (18) i koja se češće pojavljuje u kombinaciji s pridruženim bolestima (komorbiditetima) nego kao samostalna bolest. Bolesnici s KOPB-om imaju značajno veći rizik od pojave komorbiditeta u odnosu na zdravu populaciju, a najčešći komorbiditeti su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, plućna hipertenzija, osteoporoza, metabolički sindrom i njegove sastavnice, gastroezofagealna refluksna bolest, anemija, sarkopenija, kaheksija i depresija (8, 19-21). Pridružene bolesti su povezane s KOPB-om, bilo zbog zajedničkih rizičnih čimbenika poput pušenja, starenja i tjelesne neaktivnosti, bilo zbog toga što sam KOPB povećava rizik nastanka pridružene bolesti. Danas se smatra da, u patogenetskom smislu, ključnu ulogu u povezanosti KOPB-a i pridruženih bolesti imaju sustavna upala, oksidacijski stres i endotelna disfunkcija (7, 19, 22-24). Komorbiditeti negativno utječu na klinički značajne ishode u KOPB-u, prije svega hospitalizacije i smrtnost (19, 21, 23, 25, 26). Štoviše, u blagom i umjerenom KOPB-u bolesnici češće umiru od pridruženih bolesti (karcinomi i kardiovaskularne bolesti), dok je respiracijska insuficijencija glavni uzrok smrti samo u teškim oblicima KOPB-a (25, 27). Stoga je pravovremeno dijagnosticiranje pridruženih bolesti i njihovo adekvatno liječenje od iznimne važnosti u terapijskom pristupu oboljelima od KOPB-a.

## 1.2. KOPB i kardiovaskularni rizik

Kako je prethodno rečeno, KOPB je kompleksna bolest praćena brojnim komorbiditetima među kojima su najčešće upravo kardiovaskularne bolesti. One značajno pridonose progresiji bolesti, nepovoljnim kliničkim ishodima, potrošnji zdravstvenih resursa i među glavnim su uzrocima hospitalizacija i smrti bolesnika s KOPB-om (23, 25-27).

Skupnom analizom rezultata dvaju velikih epidemioloških istraživanja na više od 20 000 odraslih ispitanika (engl. *Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC)* i *Cardiovascular Health Study (CHS)*) prevalencija kardiovaskularnih bolesti (ishemijska bolest srca, srčano zatajivanje, moždani udar ili prolazna ishemijska ataka) u bolesnika s KOPB-om iznosila je 19-22% u usporedbi s 9% u ispitanika bez KOPB-a (25). Prema rezultatima sustavnog preglednog rada, koji je obuhvatio 27 opservacijskih istraživanja, bolesnici s KOPB-om imaju 2.46 puta veće izgleda za kardiovaskularnu bolest u odnosu na opću populaciju (95% CI 2.02-3.00,  $p < 0.0001$ ), pri čemu je naročito povećan rizik od ishemijske bolesti srca, odnosno angine pektoris (meta-OR 8.16, 95% CI 3.08-21.59,  $p < 0.0001$ ), i bolesti plućne cirkulacije (meta-OR 5.14, 95% CI 4.07-6.50,  $p < 0.0001$ ) (28). Bolesnici koji uz KOPB boluju i od kardiovaskularnih bolesti imaju lošiju kvalitetu života, izraženiju zaduhu i slabiju toleranciju napora (19), češće se hospitaliziraju (25) te imaju veći rizik od akutnih egzacerbacija (29) i smrti (19, 25-27). U *Lung Health Study* je pokazano da se u bolesnika s blagim do umjerenim KOPB-om, sa svakim smanjenjem FEV<sub>1</sub> za 10%, učestalost koronarnih događaja povećava za 16%. U tom je istraživanju 60% smrti bolesnika s KOPB-om bilo uzrokovano karcinomima, dok su kardiovaskularni događaji bili uzrokom smrti u 25% slučajeva (30). Kardiovaskularne bolesti se u bolesnika s KOPB-om smatraju uzrokom smrti u četvrtine do čak polovice slučajeva (25, 27, 30), a FEV<sub>1</sub> se smatra neovisnim prognostičkim čimbenikom kardiovaskularne smrtnosti (27, 31).

Mehanizmi koji su u podlozi povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti u oboljelih od KOPB-a nisu dovoljno razjašnjeni. Pušenje je neosporni rizični čimbenik i za aterosklerozu i za KOPB. Međutim, epidemiološka istraživanja su pokazala da je povećani kardiovaskularni rizik u KOPB-u neovisan o pušačkom statusu (31). Osim što KOPB i kardiovaskularne bolesti dijele tradicionalne rizične čimbenike poput pušenja, starenja, šećerne bolesti, arterijske hipertenzije i tjelesne neaktivnosti (21, 25, 26, 28), odgovornima se smatra još cijeli niz mehanizama (32-34), među kojima značajno mjesto zauzima sustavna upala sa svojim *pro*-trombotskim učincima i važnom ulogom u nastanku endotelne disfunkcije i ateroskleroze (35). Brojna su istraživanja ukazala na perzistentnu sustavnu upalu

dijela bolesnika s KOPB-om (36), pri čemu bolesnici s KOPB-om i kardiovaskularnim bolestima imaju tendenciju više serumske koncentracije biljega sustavne upale, poput interleukina-6 (IL-6) i fibrinogena, nego bolesnici s KOPB-om bez kardiovaskularnih bolesti (19, 37). Osim toga, koncentracija biljega sustavne upale dodatno raste za vrijeme akutnih egzacerbacija KOPB-a (10, 38) kada je i rizik od kardiovaskularnih događaja povećan (39, 40). Upalnim procesom u KOPB-u dominira pojačana ekspresija IL-6 u plućima i njegovi sustavni učinci: stimulacija jetrene proizvodnje proteina akutne faze (fibrinogena i C-reaktivnog proteina (CRP)) te mobilizacija prethodnika neutrofila i monocita iz koštane srži. Ovi upalni medijatori u postojećim aterosklerotskim plakovima potiču oksidacijske procese te modifikaciju lipida i proteina čime pogoduju destabilizaciji aterosklerotskog plaka (35). Još uvijek nije jasno je li sustavna upala u KOPB-u posljedica prelijevanja upalnih medijatora i reaktivnih kisikovih radikala iz pluća u sustavnu cirkulaciju ili se radi o paralelnom procesu, eventualno u sklopu nekog od komorbiditeta (7).

U bolesnika s KOPB-om je, u odnosu na zdrave ispitanike, povećana agregacija trombocita i monocita, kao vrlo osjetljiva i specifična mjera aktivacije trombocita, koja se dodatno povećava za vrijeme akutnih egzacerbacija (41).

Ono što povezuje KOPB i kardiovaskularne bolesti je i koncept ubrzanog starenja pluća, odnosno krvnih žila. U usporedbi sa zdravim ispitanicima uočeno je skraćanje telomera senescentnih stanica u alveolarnom epitelu i endotelu bolesnika s KOPB-om (naročito u emfizematoznom fenotipu) (42). Istovremeno se starenje endotelnih stanica dovodi u vezu s endotelnom disfunkcijom i aterogenezom (43).

Nadalje, KOPB i kardiovaskularne bolesti dijele i neravnotežu u sustavu proteaza i *anti*-proteaza. Najviše je dokaza u vezi s matriksnim metaloproteinazama (MMP), poput MMP-2, čija je aktivnost povećana u plućnom tkivu i alveolarnim makrofazima bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave pušače i nepušače (44). Istovremeno je aktivnost MMP-2 povećana i u koronarnim aterosklerotskim lezijama (45), a serumski MMP-2 povezan s izoliranom sistoličkom hipertenzijom i povećanom arterijskom krutošću (46). Povećani sustavni izražaj MMP-ova u bolesnika s KOPB-om povezuje se s pojačanom degradacijom elastina arterijske stijenke i povećanom arterijskom krutošću.

Učinci hipoksemije su višestruki (32, 34): rezultirajuća plućna hipertenzija u bolesnika s teškim KOPB-om može dovesti do popuštanja desnog srca s reperkusijama na geometriju i dijastoličko punjenje lijeve klijetke, na koje negativno utječe i hiperinflacija pluća; hipoksija remeti srčanu repolarizaciju s potencijalno većim rizikom od ventrikularnih aritmija i nagle srčane smrti; hipoksija potencira sustavnu upalu i pogoduje arterijskoj krutosti, inducira



oksidacijski stres te pojačava izražaj adhezijskih molekula, ali i serumsku koncentraciju CRP-a; hemodinamske posljedice hipoksije uključuju aktivaciju simpatičkog živčanog sustava s povećanjem srčane frekvencije i srčanog indeksa te aktivaciju sustava renin-angiotenzin s perifernom vazokonstrikcijom (47) i povećanim oksidacijskim stresom. U bolesnika s KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom je utvrđena pojačana aktivacija simpatičkog sustava (48), ali i smanjena varijabilnost srčane frekvencije kao biljeg disfunkcionalnog autonomnog živčanog sustava i prediktor smrtnosti (49). Pojačana aktivnost simpatičkog sustava dodatno potencira sustavnu upalu i aktivaciju trombocita (50).

Povećanom kardiovaskularnom riziku u bolesnika s KOPB-om pridonose i sustavni poremećaji arterijske stijenke poput degradacije elastina i elastokalcinoze medije s posljedičnom povećanom arterijskom krutošću (32). Amortizacija sistoličkog tlaka pulsa u velikim krvnim žilama je smanjena u arterijama povećane krutosti, što se ogleda u povećanoj karotidno-femoralnoj brzini pulsno vala (engl. *pulse wave velocity*, PWV). PWV se kao mjera arterijske krutosti pokazao dobrim prediktorom kardiovaskularnih događaja u zdravih osoba, ali i dobrim prediktorom smrtnosti u bolesnika s ishemijskom bolesti srca (51, 52). U prethodnim istraživanjima je utvrđena povećana arterijska krutost u bolesnika s KOPB-om u usporedbi s ispitanicima odgovarajuće dobi i spola (53, 54), pri čemu su i FEV<sub>1</sub> i serumski IL-6 bili neovisno povezani s PWV-om upućujući na moguću ulogu sustavne upale u patogenezi arterijske krutosti (53). Povezanost degradacije kožnog elastina s težinom emfizema i povećanom arterijskom krutošću, uputila je Maclaya i sur. na zaključak da je u KOPB-u degradacija elastina sustavna, zahvaća velike arterije i za posljedicu ima povećanu arterijsku krutost, a s tim u vezi i povećani kardiovaskularni rizik (55).

Kardiovaskularnom riziku u bolesnika s KOPB-om pridonosi i endotelna disfunkcija (32) koja je ključni rani poremećaj u procesu aterogeneze i smatra se jednim od potencijalnih mehanizama kojima sustavna upala pridonosi povećanom kardiovaskularnom riziku u KOPB-u (35, 56, 57). U bolesnika s KOPB-om je utvrđena ne samo endotelna disfunkcija plućnog, nego i sustavnog krvožilja, povezana je s težinom bronhalne opstrukcije, a sve je više dokaza i o njezinoj ulozi u nastanku emfizema.

### 1.3. Endotelna funkcija

Endotel se sastoji od stanica koje u jednom sloju, debljine od 0.5 do 1 µm, oblažu unutarnje stijenke cijelog cirkulacijskog sustava: od srca do najmanjih kapilara. Danas se zna

da je endotel puno više od puke barijere koja selektivno propušta vodu i elektrolite. Endotel obavlja brojne, kompleksne i jedinstvene funkcije od iznimne važnosti za vaskularnu homeostazu (58, 59). Pri tome endotelne stanice imaju senzorne i efektorske sposobnosti kojima prepoznaju fizikalne i kemijske podražaje te na njih reagiraju promjenama sastava staničnih membrana, stanične organizacije i biokemijskih procesa. Endotel autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem djeluje na endotelne i glatke mišićne stanice krvnih žila, trombocite, leukocite i udaljena tkiva.

Osim u spomenutom prometu tekućina i otopljenih tvari, endotel sudjeluje u metabolizmu vazoaktivnih medijatora i lipoproteina, uspostavljanju redoks-ravnoteže, stvaranju ekstracelularnog matriksa, hormonskoj homeostazi, a izražajem adhezijskih molekula u interakciji trombocita i neutrofila s krvožilnom stijenkom. Lučenjem čimbenika rasta i njihovih inhibitora endotel upravlja procesima staničnog rasta, proliferacije i angiogeneze, a lučenjem kemokina i citokina sudjeluje u upalnim procesima i upravlja regulacijom vaskularne upale i remodeliranja. Endotel sudjeluje u svim važnim hemostatskim procesima, sprječava kontakt stanica periferne krvi s *pro*-trombotskim subendotelnim ekstracelularnim matriksom te inhibira aktivaciju, adheziju i agregaciju trombocita (58, 59).

Jedna od glavnih funkcija zdravog endotela je upravljanje protokom krvi koje se ostvaruje regulacijom vaskularnog tonusa. U odgovoru na različite podražaje, poput poremećaja protoka krvi ili hipoksije, endotel luči različite vazoaktivne tvari koje upravljaju dilatacijom i konstrikcijom krvožilja. Endotel, također, modificira učinak cirkulirajućih vazoaktivnih tvari koje nisu endotelnog podrijetla poput bradikinina i trombina. Učinak endotela na protok krvi se dijelom ostvaruje i zahvaljujući sposobnosti endotelne stanice da stvori aktivnu *anti*-trombotsku površinu koja pridonosi fluidnosti krvi (58, 59).

Krv u lumenu krvne žile djeluje na stijenku dvjema ortogonalnim silama. Jedna je sila hidrostatskog tlaka koja djeluje okomito na površinu stijenke i uzrokuje njezinu distenziju, a druga je frikcijska sila koja djeluje tangencijalno na površinu stijenke i proizvodi smično opterećenje (engl. *shear stress*) (60). Čim prepoznaju učinke ovih sila, odnosno promjenu perfuzije tkiva, endotelne stanice započinju adaptacijski odgovor s ciljem prilagodbe vaskularnog tonusa protoku krvi.

Učinak endotela na vaskularni tonus rezultat je odnosa između vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih mehanizama. Endotelom regulirana vazodilatacija dominantno je posredovana dušičnim oksidom (NO). Još su 1980. godine pionirski eksperimenti Furchgotta i Zawadzki pokazali da je acetilkolinom izazvana vazodilatacija posredovana relaksirajućim čimbenikom podrijetlom iz endotela (61). Naknadno se ispostavilo da se radi o NO-u, plinu

koji se sintetizira iz aminokiseline L-arginina u procesu kojeg katalizira endotelna sintaza NO-a (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) (62). NO difundira do vaskularne glatke mišićne stanice, aktivira gvanilat-ciklazu i putem cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP) smanjuje intracelularnu koncentraciju kalcija čime dovodi do relaksacije glatkog mišića, a time i vazodilatacije (62). Dio svojih učinaka NO ostvaruje i nitrozilacijom cisteinskih ostataka proteina čime modificira njihovu funkciju (58, 59).

Ključni podražaj za aktivnost eNOS-a je povećani protok krvi (60, 63, 64) čiji je učinak posredovan reakcijom struktura stanične membrane osjetljivih na smično opterećenje: glikokaliksa, primarnih cilija i osjetljivih ionskih kanala poput kalijevih (65). Oni u konačnici dovode do povećanog izražaja mRNA za eNOS, ali i njezine odgovarajuće *post*-translacijske modifikacije (66). U aktivaciji eNOS-a mogu sudjelovati i acetilkolin, bradikinin, kalcij, adenozin, vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) u odgovoru na hipoksiju ili serotonin koji se otpušta prilikom agregacije trombocita (67).

Osim učinka NO-a na vaskularne glatke mišićne stanice, za vaskularnu homeostazu su važni i učinci na trombocite i leukocite. NO-om izazvan porast cGMP-a u trombocitima dovodi do inhibicije njihove aktivacije, adhezije i agregacije, a u leukocitima također smanjuje adhezivni potencijal i aktivaciju. NO sudjeluje u inhibiciji trombogenezе, upale i stanične proliferacije te ograničava oksidacijsku fosforilaciju i stvaranje reaktivnih kisikovih oblika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u mitohondrijima. S druge strane, NO potiče proliferaciju endotelnih stanica te mobilizaciju i sazrijevanje endotelnih progenitorskih stanica (engl. *endothelial progenitor cell*, EPC) iz koštane srži s ciljem obnove oštećenog endotela. NO ima vrlo kratko poluvrijeme života od nekoliko sekundi i inaktivira se u interakciji sa slobodnim radikalima poput ROS-a, s kojima čini redoks-ravnotežu (58, 59).

Postoje i drugi mehanizmi, neovisni o NO-u, kojima endotel upravlja vazodilatacijom. Hiperpolarizirajući čimbenici podrijetlom iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) dovode do povećane propusnosti kalijevih kanala i posljedične relaksacije vaskularnog glatkog mišića (68), pa mogu nadoknaditi učinak NO-a u slučaju njegove smanjene dostupnosti. Prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), koji nastaje aktivnošću ciklooksigenaze iz arahidonske kiseline, i tip C natriuretskog peptida su, također, vazodilatatori podrijetlom iz endotela (58).

Vazokonstriksijski čimbenici kojima endotel regulira vazomotorni tonus uključuju endotelin-1, ROS i angiotenzin II koji nastaje iz angiotenzina I na endotelnoj površini. Vazokonstrikcija je posredovana i tromboksanom A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) iz aktiviranih trombocita (58).

#### 1.4. Endotelna disfunkcija

Pod pojmom endotelne aktivacije podrazumijeva se fiziološko stanje u kojem određeni podražaj izazove transformaciju endotelne stanice iz neaktiviranog u aktivirani fenotip. Temeljna promjena u podlozi ove transformacije je pojačano stvaranje ROS-a koji inaktivira NO i dovodi do njegove smanjene raspoloživosti te neravnoteže u redoks-sustavu.

Stvaranje peroksinitrita iz ROS-a i NO-a se smatra ključnim inicijatorom kroničnog poremećaja endotelne funkcije (69). Naime, peroksinitrit uzrokuje monomerizaciju, odnosno odvajanje (engl. *uncoupling*) eNOS-a od njegovog kofaktora tetrahidro-biopterina (BH4) kojeg, uz to, oksidacijom inaktivira. U monomernom obliku eNOS se transformira iz oksidaze u reduktazu, pa i sam sudjeluje u stvaranju ROS-a i superoksida umjesto NO-a. Reakcijom superoksida s NO-om također nastaje peroksinitrit, čime se zatvara *circulus vitiosus* (70). Peroksinitrit i ROS reagiraju s cisteinskim ostacima proteina čime mijenjaju njihovu funkciju, a peroksinitrit sudjeluje i u oksidaciji lipoproteina (69).

Osim inaktivacije, smanjena razina NO-a može biti posljedica i smanjene aktivnosti eNOS-a bilo zbog učinka egzogenih ili endogenih inhibitora (poput asimetričnog dimetil-arginina (ADMA)), bilo zbog slabe dostupnosti supstrata L-arginina ili kofaktora BH4 (62).

U slučaju izloženosti podražaju odgovarajuće prirode, intenziteta ili trajanja, endotelna aktivacija prelazi u patofiziološko stanje koje nazivamo endotelnom disfunkcijom, a u kojem štetni podražaj uzrokuje trajnu transformaciju endotelne stanice u fenotip obilježen gubitkom mehanizama prilagodbe na fizikalna ili kemijska oštećenja žilnih stijenki. Osim poremećaja regulacije vaskularnog tonusa, endotelna disfunkcija je obilježena i drugim poremećajima koji se smatraju specifičnim za aterosklerozu: povećanom propusnošću za makromolekule kao što su lipoproteini, povećanom ekspresijom kemotaktičkih i adhezijskih molekula, pojačanim nakupljanjem monocita i makrofaga u intimi u obliku pjenastih stanica, smanjenom regeneracijom endotelnih stanica, a povećanom proliferacijom i migracijom glatkih mišićnih stanica, povećanom ekspresijom *pro*-koagulacijskih molekula kao što su von Willebrandov čimbenik (engl. *von Willebrand factor*, vWF) i tkivni čimbenik (engl. *tissue factor*, TF), te pojačanim stvaranjem trombina, agregacijom trombocita i taloženjem fibrina (60).

Ovakvu neprikladnu aktivaciju endotela mogu izazvati: hiperkolesterolemija s produktima oksidacije lipoproteina, šećerna bolest s hiperglikemijom i krajnjim produktima glikozilacije, metabolički sindrom s ROS-om i adipokinima, arterijska hipertenzija s ROS-om i angiotenzinom II, starenje, oksidacijski stres, *pro*-upalni citokini poput interleukina-1 (IL-1) i čimbenika tumorske nekroze- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), CRP, bakterijski

endotoksini, virusi, cigaretni dim, okolišni zagađivači, ali i hemodinamski čimbenici poput poremećenog protoka krvi (59). Dakle, gotovo svi dobro poznati čimbenici kardiovaskularnog rizika mogu izazvati endotelnu disfunkciju (52, 71), pa se o njoj razmišlja kao o barometru ukupnog kardiovaskularnog rizika koji bi bio rezultanta svih poznatih i nepoznatih aterogenih i ateroprotektivnih čimbenika uključujući i genetsku predispoziciju (72). Tome u prilog idu rezultati niza istraživanja u kojima se makrovaskularna i mikrovaskularna endotelna disfunkcija pokazala neovisnim prediktorom štetnih kardiovaskularnih događaja (52, 71, 73-79).

Endotelna se disfunkcija smatra ključnim ranim poremećajem u patogenezi ateroskleroze i njezinim najranijim biljekom koji prethodi nastanku jasnih morfoloških vaskularnih promjena (80, 81) i pridonosi njihovoj progresiji. Povezuje se s kardiovaskularnim bolestima poput arterijske hipertenzije, koronarne bolesti, srčanog zatajivanja i periferne arterijske bolesti, ali i sa šećernom bolešću, kroničnim zatajivanjem bubrega, nekim infekcijama te stanjima sa sustavnom upalom poput reumatoidnog artritisa i KOPB-a (71).

Kada produljena ili ponovljena izloženost štetnim čimbenicima iscrpi obrambene sposobnosti endotela, u endotelnim stanicama započinje proces ubrzanog starenja. Pri tome dolazi do otpuštanja u cirkulaciju dijelova endotelnih stanica koje nazivamo endotelne mikročestice (engl. *endothelial microparticle*, EMP), a i cijele se endotelne stanice odvajaju od žilne stijenke i cirkuliraju krvlju (engl. *circulating endothelial cell*, CEC). Istovremeno, oštećenje endotela uzrokuje pojačano otpuštanje pluripotentnih matičnih stanica koštane srži - endotelnih progenitorskih stanica (EPC) koje sudjeluju u vaskularnom oporavku i angiogenezi. EMP-ovi i CEC-ovi nam služe kao cirkulirajući biljezi endotelnog oštećenja, a EPC-ovi su odraz kapaciteta oporavka endotela (82, 83).

Endotelna disfunkcija je potencijalno reverzibilni proces. Većina terapijskih intervencija, koje smanjuju kardiovaskularni rizik, imaju povoljni učinak na endotelnu funkciju. To pokazuju rezultati brojnih istraživanja u kojima su primijenjeni statini, inhibitori enzima koji konvertira angiotenzin (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitor*, ACEI), blokatori receptora angiotenzina II (engl. *angiotensin II receptor blockers*, ARB), blokatori kalcijevih kanala, neki  $\beta$ -blokatori ili metformin. Slični učinak na endotelnu funkciju imaju i promjene životnih navika poput prestanka pušenja, povećanja tjelesne aktivnosti ili mršavljenja (52, 71).

## 1.5. Klinička procjena endotelne funkcije

Povezanost endotelne disfunkcije sa svim stadijima aterosklerotske kardiovaskularne bolesti i njezina vrijednost kao neovisnog prediktivnog čimbenika štetnih kardiovaskularnih događaja, potaknuli su razvoj niza metoda za testiranje različitih aspekata endotelne funkcije. Te su metode pružile, ne samo novi uvid u patofiziologiju poremećaja endotela, već i mogućnost otkrivanja najranijih stadija kardiovaskularnih bolesti, kvantificiranje kardiovaskularnog rizika te procjenu odgovora na različite terapijske intervencije (71).

S obzirom na ključnu ulogu NO-a u regulaciji endotelne funkcije, u praksi se integritet i funkcija endotela najčešće procjenjuju mjerenjem učinka NO-a. Kako je NO lako difuzibilna molekula vrlo kratkog vremena poluživota teško ju je mjeriti *in vivo*, pa se učinak NO-a procjenjuje posredno, mjerenjem sposobnosti dilatacije krvne žile. Vazodilatacija se može potaknuti lokalnom primjenom vazoaktivnih tvari poput vazodilatatora ovisnih o endotelu (acetilkolin, bradikinin, serotonin, tvar P), egzogenih donatora NO-a (nitroprusid, nitroglicerol, papaverin), endogenih donatora NO-a (adenozin) (71) ili fizikalnim podražajem, odnosno izazivanjem naglog povećanja protoka krvi i posljedičnog porasta smičnog opterećenja, npr. vožnjom bicikla u ležećem položaju, tahikardijom izazvanom elektrostimulacijom, reaktivnom hiperemijom nakon okluzije arterije ili termalnom hiperemijom (79). Zastupljenost NO-a u posredovanju vazodilatacije izazvane spomenutim podražajima je različita, odnosno u vazodilataciji mogu sudjelovati i drugi mehanizmi (84).

Vazodilatacija se može mjeriti invazivnim metodama s intraarterijskom primjenom vazoaktivnih tvari i neinvazivnim metodama, kako u koronarnoj, tako i u perifernoj cirkulaciji (71, 79, 85). Direktno mjerenje vazodilatacije ovisne o endotelu za vrijeme koronarografije predstavlja zlatni standard u procjeni endotelne funkcije epikardijalnih krvnih žila, no u primjeni su i neinvazivne metode poput magnetske rezonance (MR), ehokardiografije i pozitronske emisijske tomografije (PET). Endotelna funkcija perifernih arterija može se, također, mjeriti invazivno, odnosno infuzijom vazoaktivne tvari u ispitivanu arteriju, ali se češće koriste neinvazivne metode. Među njima je najzastupljenija arterijska dilatacija posredovana protokom (engl. *flow-mediated dilation*, FMD) u kojoj se ispituje sposobnost provodne arterije da, na naglo povećanje protoka u vidu reaktivne hiperemije, odgovori pojačanim otpuštanjem NO-a i vazodilatacijom. Pri tome se ultrazvukom visoke rezolucije utvrđuje razlika između početnog promjera arterije ( $D_0$ ) i njezinog maksimalnog promjera za vrijeme dilatacije ( $D_{max}$ ). U procjeni periferne vazodilatacije se, osim ultrazvuka, koristi još

nekoliko neinvazivnih metoda kao što su periferna arterijska tonometrija, laserski *Doppler* i fotopletizmografija.

Od optimalnog testa endotelne funkcije se, osim dijagnostičke točnosti i prognostičke vrijednosti, očekuje da su mu učinci reverzibilni, da je reproducibilan, jednostavan, jeftin, neinvazivan i neovisan o vještini osobe koja ga izvodi. Kako navedene kriterije ne zadovoljava nijedna od spomenutih metoda, one još uvijek nisu ušle u svakodnevnu praksu niti su preporučene za planiranje primarne i sekundarne prevencije kardiovaskularnih bolesti (86, 87). Treba imati na umu da, bez obzira na korištenu metodu, vaskularni odgovor ovisi, ne samo o funkcionalnom statusu provodne arterije, nego i o stanju u pripadajućoj mikrocirkulaciji koja se može procijeniti posredno, mjerenjem promjena u protoku krvi (npr. termodilucijom ili intravaskularnim *Dopplerom*). S obzirom da se fiziologija i patofiziologija makrovaskularnog i mikrovaskularnog endotela razlikuju, spoznaje o endotelnoj disfunkciji provodnih arterija ne mogu se ekstrapolirati na mikrocirkulaciju (71).

### **1.5.1. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD)**

Zahvaljujući svojoj neinvazivnosti, vazodilatacija posredovana protokom (FMD) je metoda kojom se najčešće procjenjuje funkcija endotela. Ovom se metodom procjenjuje sposobnost endotela da odgovori na specifični podražaj - reaktivnu hiperemiju koja nastaje nakon okluzije neke od provodnih arterija, odnosno zbog dilatacije u mikrocirkulaciji izazvane ishemijom i promjenama krvnog tlaka. Pri tome se ultrazvukom procjenjuje arterijska dilatacija izazvana povećanim protokom krvi, odnosno povećanim smičnim opterećenjem krvožilne stijenke (76).

Celermajer i suradnici su 1992. godine prvi primijenili ovu metodu *in vivo* i ispitali učinke reaktivne hiperemije na promjer periferne provodne arterije u usporedbi s učincima sublingvalno primijenjenog nitroglicerina, kao egzogenog donatora NO-a (80). FMD je prvenstveno, premda ne u cijelosti, ovisan o endotelu i dominantno posredovan NO-om, pa se smatra mjerom bioraspoloživosti NO-a (75, 76, 84, 88-91). Za razliku od FMD-a, vazodilatacija posredovana nitroglicerinom (engl. *nitroglycerine-mediated dilation*, NMD) ne ovisi o protoku i funkciji endotela, već o osobinama vaskularne stijenke, prije svega glatkog mišićnog sloja.

FMD se može primijeniti na velikim provodnim arterijama kao što su brahijalna, radijalna i površinska femoralna arterija. U praksi se najčešće mjeri FMD brahijalne arterije pri čemu se komprimirati može sama brahijalna arterija (nadlaktična, proksimalna

kompresija) ili radijalna arterija (podlaktična, distalna kompresija). Test proksimalnom kompresijom je tehnički zahtjevniji zbog okluzije ispitivane arterije, ali se dobije veći relativni porast promjera arterije u usporedbi s podlaktičnom kompresijom. To se objašnjava jačim protokom, odnosno jačim podražajem, ali s izravnim učinkom ishemije na brahijalnu arteriju te reakcijom mišićnog sloja arterijske stijenke kao zbunjujućim čimbenicima. Prednost distalne kompresije je veća ovisnost FMD-a o NO-u. U svakom slučaju, manžeta treba biti postavljena distalno od mjesta ultrazvučnog prikaza arterije, jer je tada ovisnost vazodilatacije o endotelnom NO-u maksimalna (75). Iz istog razloga se okluzija izaziva kompresijom arterije manžetom sfigmomanometra tijekom 5 minuta i to tlakom koji je najmanje 50 mm Hg viši od sistoličkog tlaka ispitanika. FMD induciran intervencijama koje izazivaju veće smično opterećenje (okluzija arterije dužeg trajanja ili proksimalno smještenom manžetom) jest veći, ali je dijelom ovisan i o drugim vazoaktivnim tvarima osim NO-a (75, 76).

U ovom je istraživanju ispitivan FMD brahijalne arterije nakon kratkotrajne okluzije radijalne arterije.

Pri izvođenju FMD-a se izmjeri početni promjer ( $D_0$ ) brahijalne arterije prije inflacije manžete sfigmomanometra, kojom se radijalna arterija okludira tijekom 5 minuta (76). Nakon toga se brzom deflacijom manžete izazove reaktivna hiperemija. Promjer brahijalne arterije se ponovno kontinuirano mjeri od 30 s prije do 5 minuta nakon deflacije podlaktične manžete, pri čemu se postizanje vršnog promjera ( $D_{max}$ ) očekuje unutar 120 sekundi od prekida kompresije (92). Razlika između vršnog i početnog promjera arterije predstavlja **apsolutni FMD (mm)**:

$$\text{FMD (mm)} = D_{max} - D_0,$$

a porast promjera u odnosu na početni promjer **relativni FMD (%)** ili **FMD% indeks**:

$$\text{FMD (\%)} = \frac{D_{max} - D_0}{D_0} \times 100.$$

U slučaju postojanja čimbenika koji remete funkciju endotela, raspoloživost NO-a je smanjena, a posljedično tome i FMD. Vrijeme do postizanja vršnog promjera je samo djelomično ovisno o NO-u i za sada se ne čini korisnim pokazateljem endotelne funkcije (93).

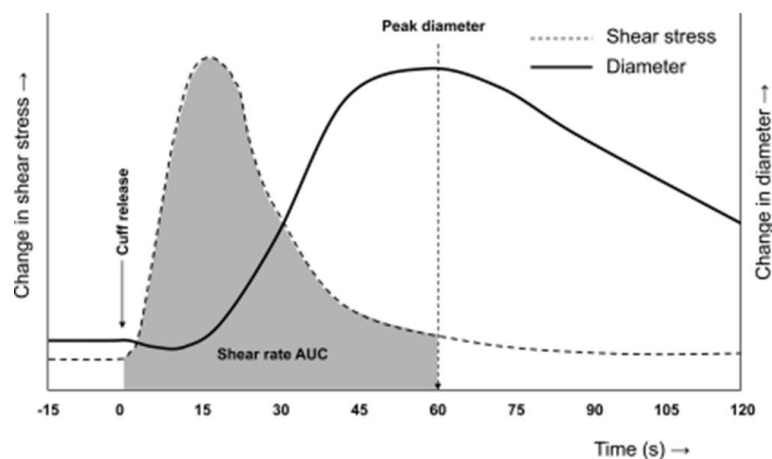
U testu se, usporedo s promjerom arterije, mjeri i brzina struje krvi. Iz podataka o promjeru arterije i brzini struje krvi izračuna se stopa smicanja (engl. *shear rate*, SR) koja je mjera smičnog opterećenja (84, 94-96):

$$\text{SR} = 4 \times \text{brzina struje krvi} / \text{promjer arterije}.$$



Premda SR ovisi i o viskoznosti krvi, ona se ne uzima u obzir jer se smatra relativno konstantnom i bez značajnog utjecaja na procjenu smičnog opterećenja i interpretaciju rezultata FMD-a (76, 84, 97).

Ultrazvučni pregled se izvodi *duplex* uređajem visoke rezolucije koji objedinjuje B prikaz longitudinalno vizualizirane arterije za mjerenje promjera i pulsni Dopplerski signal za mjerenje brzine struje krvi (76, 96). Glavni izazov B prikaza je precizna identifikacija vaskularnih granica, no zahvaljujući automatiziranom softveru za praćenje stijenki i detekciju rubova promjer arterije se može izmjeriti s preciznošću manjom od 0.05 mm. Promjer arterije se može mjeriti na kraju diastole, kako bi se izbjegao utjecaj varijacija arterijskog promjera tijekom srčanog ciklusa posljedično promjenama tlaka plusa, ili se može izračunati prosječni promjer arterije tijekom cijelog srčanog ciklusa. Da bi se jedinstvenom linearnom sondom zadovoljila preciznost procjene brzine struje krvi Dopplerskim signalom i optimalni B prikaz, treba paziti na kut insonacije koji ne bi smio biti veći od 60°.



**Slika 1.** Shematski prikaz promjene promjera arterije i smičnog opterećenja (ili stope smicanja) izazvanih deflacijom manžete nakon 5-minutnog ishemijskog podražaja. Sivo je označen relevantni podražaj za vazodilataciju: ukupno smično opterećenje do trenutka postizanja vršnog promjera arterije (SR-AUC). Preuzeto iz: Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Jan;300(1):H2-12 (76).

S obzirom na vremensko zaostajanje vrška promjera arterije u odnosu na vršno smično opterećenje, postavilo se pitanje koji je dio reaktivne hiperemije relevantni podražaj za vazodilataciju. Pokazalo se da ukupno smično opterećenje do trenutka postizanja vršnog promjera arterije, kojem odgovara površina ispod krivulje stope smicanja (engl. *shear rate-area under curve*, SR-AUC), bolje korelira s veličinom FMD-a od vršnog smičnog opterećenja (Slika 1.) (98). Podražaj smičnim opterećenjem utječe na veličinu vazodilatacije na način koji je ovisan o intenzitetu i obrascu smicanja (98), ali i o prijenosu signala do

glatkih mišićnih stanica, njihovom odgovoru i strukturnim obilježjima krvožilne stijenke. Drugim riječima, i NMD se pokazao neovisnim prediktorom FMD-a (99). To je uzrok slabije korelacije smičnog opterećenja i FMD-a među pojedincima (100).

Razlike u FMD-u između skupina i pojedinaca se pripisuju ne samo intrinzičkoj biološkoj varijabilnosti endotelne funkcije, nego i razlikama u obilježjima reaktivne hiperemije (101) na koju također može utjecati više čimbenika (npr. veličina arterije) (99, 102). Zbog toga još uvijek traje rasprava o potrebi korekcije FMD-a za razlike u smicanju i statistički najprihvatljivijem obliku normalizacije: omjer FMD-a i stope smicanja zahtijeva barem umjerenu korelaciju ovih parametara (94, 98, 100, 103, 104). U osnovi se radi o potrebi eliminacije ovisnosti FMD-a (%), kao najčešće mjere ishoda u istraživanjima, o utjecaju početnog promjera arterije, odnosno postavlja se pitanje prikladnosti normalizacije FMD-a prema početnom promjeru arterije omjerom. Naime, FMD (%) iznosi  $\frac{D_{\max} - D_0}{D_0} \times 100$  što je ekvivalent  $\frac{D_{\max}}{D_0}$ . Veći početni promjer arterije podrazumijeva manji FMD (%) i obrnuto, odnosno početni promjer arterije je najvažniji zbunjujući čimbenik FMD-a (%) koji umjereno korelira i s FMD-om (%) i sa stopom smicanja i daje privid njihove veće međusobne korelacije. Drugim riječima, veći početni promjer arterije je povezan s manjim FMD-om (%) ne samo izravno, nego i preko manjeg smičnog opterećenja (99). Stoga se sugerira normalizacija apsolutne vrijednosti FMD-a (mm) kao primarnog statističkog i kliničkog ishoda prema početnom promjeru arterije alometrijskim metodama ili barem vrednovanje razlika uključenjem početnog promjera arterije i stope smicanja kao kovarijanci (105-107). U analizi razlika FMD-a (%) među skupinama ili intervencijama klinička značajnost, odnosno veličina razlike, i snaga korelacije se smatraju važnijima od statističke značajnosti razlike mjerene p vrijednošću.

Na rezultate FMD-a utječu brojni čimbenici (76). Krvne žile većeg promjera imaju manju sposobnost dilatacije od krvnih žila manjeg promjera, odnosno FMD krvnih žila promjera većeg od 6 mm je minimalan i to je razlog zbog kojeg se u odraslih ne izvodi FMD karotidnih i zajedničkih femoralnih arterija. S druge strane, FMD krvnih žila promjera manjeg od 2.5 mm se teško pouzdano procjenjuje. Stoga su za ovu metodu pogodne radijalna, aksilarna, površinska femoralna i najčešće, kao standard, brahijalna arterija. Treba imati na umu da se arterije različite veličine, položaja i građe razlikuju u sadržaju eNOS-a i relativnom doprinosu NO-a FMD-u, pa metodološki pristup FMD-u, rezultati i njihova interpretacija nisu usporedivi s FMD-om brahijalne arterije. Nadalje, utjecaj na FMD imaju i obroci, tjelesna

aktivnost, kofein, alkohol, neki lijekovi, doba dana, okolišna temperatura, tonus simpatičkog živčanog sustava, a u žena i faza menstrualnog ciklusa. Zato smjernice preporučuju izvođenje testa natašte, nakon barem šestosatnog ustezanja od spomenutih zbunjujućih čimbenika, u slično doba dana, u tihoj, zamračenoj prostoriji kontrolirane temperature, a nakon odgovarajućeg perioda mirovanja.

Premda počiva na jednostavnom principu, FMD je tehnički izazovna metoda koja zahtijeva odgovarajuću obuku i metodološku standardizaciju kako bi se postigla što bolja reproducibilnost i validnost metode (76, 85). Naročito osjetljivi momenti u izvođenju FMD-a su: pozicioniranje ultrazvučne sonde i manžete sfigmomanometra, vrijeme arterijske okluzije, precizno korištenje softvera za detekciju rubova i ispravna procjena veličine dilatacije. Značajna varijabilnost srednjih vrijednosti FMD-a (%) otežava usporedbe rezultata u različitim istraživanjima te pozicioniranje individualnih vrijednosti unutar referentnog raspona (107). Unatoč nedostacima, FMD je etabliran kao vodeća metoda u ispitivanju endotelne funkcije *in vivo*, zahvaljujući svojoj neinvazivnosti i prognostičkoj vrijednosti.

U novije vrijeme se istražuju i neki novi aspekti ove tehnike (71). Naime, hiperemični protok i brzina struje krvi, kao mjera periferne mikrovaskularne funkcije, pokazuju čak i jaču korelaciju s kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima od FMD-a i čine se dobrim prediktorima kardiovaskularnih ishoda (71, 74, 108). S kliničkim ishodima dobro korelira čak i sami početni promjer brahijalne arterije (73) koji je, za razliku od FMD-a (%), manje podložan pogrešci mjerenja (107).

Endotelna se disfunkcija perifernih arterija, mjerena FMD-om, pokazala neovisnim prediktorom kardiovaskularnih incidenata u ispitanika s umjerenim do visokim rizikom za kardiovaskularne bolesti, čak i nakon korekcije za tradicionalne rizične čimbenike. U ispitanika bez kardiovaskularnih bolesti prognostička vrijednost FMD-a je manje uvjerljiva, ali se generalno gledajući može reći da je bolja ili barem jednako dobra kao i procjena rizika na temelju tradicionalnih rizičnih čimbenika (52, 71, 73-79). Rezultati nekih istraživanja sugeriraju da je promjena FMD-a, izazvana intervencijom poput tjele vježbe ili lijeka, bolji pokazatelj kardiovaskularnog rizika od pojedinačne vrijednosti FMD-a (75). U istraživanju Andersona i sur., na 1574 vatrogasca bez znakova kardiovaskularne bolesti, FMD (%) brahijalne arterije korigiran za smično opterećenje (HR 1.18 po SD, 95% CI 1.09-1.28,  $p < 0.001$ ) i integral brzine struje krvi po vremenu (HR 0.52 po SD, 95% CI 0.41-0.66,  $p < 0.001$ ) su bili značajni prediktori kardiovaskularnih događaja (nefatalni infarkt miokarda, koronarna revaskularizacija, cerebrovaskularna bolest i periferna vaskularna bolest). Istovremeno, sami FMD (%) nije bio pouzdan u predviđanju kardiovaskularnih događaja (HR

0.92,  $p=0.54$ ) (74). U istraživanju Yeboaha i sur., na 3026 odraslih ispitanika bez kardiovaskularne bolesti, u multivarijantnoj analizi nakon prilagodbe za tradicionalne kardiovaskularne rizične čimbenike, FMD (%) brahijalne arterije po jedinici SD-a je bio značajno povezan s učestalošću kardiovaskularnih događaja poput infarkta miokarda, angine pektoris, koronarne revaskularizacije, moždanog udara, srčanog aresta i smrti zbog kardiovaskularnog događaja (HR 0.84, 95% CI 0.71-0.99,  $p=0.04$ ) (73). Prognostičku vrijednost FMD-a potvrđuju rezultati meta-analize Inabe i sur. kojom je utvrđeno da je za porast FMD-a od 1% relativni rizik od nepovoljnog kardiovaskularnog događaja 13% manji (95% CI 9-17%,  $p<0.05$ ) (77).

FMD (%) brahijalne arterije manji od 4.1% snažno korelira s progresijom aterosklerotske bolesti mjereno debljinom intime i medije karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*, cIMT) (109). Poremećaj FMD-a (%) u perifernim arterijama korelira s invazivno procijenjenim poremećajem vazoreaktivnosti koronarnih arterija (110, 111), pa se smatra posrednim pokazateljem koronarne endotelne funkcije. Osim toga, FMD (%) dobro korelira i s težinom koronarne bolesti (112).

Vrijednost FMD-a u procjeni kardiovaskularnog rizika još je veća kad se kombinira s konstrikcijom posredovanom niskim protokom (engl. *low-flow mediated constriction*, L-FMC) (113). Radi se o mjerenju promjera brahijalne arterije u odgovoru na smanjenje protoka krvi, odnosno smičnog opterećenja, koje je uglavnom posredovano endotelinom-1, a izaziva se okluzijom arterije distalno položenom manžetom.

### 1.5.2. Mikročestice endotelnog podrijetla (EMP) u plazmi

Brojni su sudionici vaskularne homeostaze endotelnog podrijetla u sustavnoj cirkulaciji ispitivani kao potencijalni biljezi (biomarkeri) endotelne disfunkcije poput nitrita, ADMA, oksidiranog LDL-a (engl. *low-density lipoprotein*) i dr. Alternativa izravnom mjerenju endotelne funkcije su i stanični biljezi u sustavnoj cirkulaciji: endotelne progenitorske stanice podrijetlom iz koštane srži (EPC) kao biljezi kapaciteta vaskularnog oporavka te endotelne mikročestice (EMP) i cirkulirajuće endotelne stanice (CEC) kao biljezi endotelne aktivacije, oštećenja, starenja i apoptoze. Premda su neki od ovih biljega pokazali dobru korelaciju s endotelnom funkcijom, primjena im je uglavnom ograničena zbog složenosti testova ili tehnika izolacije, cijene, varijabilnosti rezultata ili niske specifičnosti (79, 85), pa se uglavnom određuju u okviru istraživanja.

Ekstracelularne vezikule su heterogena populacija fragmenata stanične membrane, odnosno vezikula koje u izvanstanični prostor otpuštaju različite vrste stanica spontano u fiziološkim uvjetima, ali i nakon stimulacije (114, 115). Dok su se nekad smatrale staničnim otpadom bez biološke funkcije, danas je prepoznata njihova uloga u međustaničnoj komunikaciji, regulaciji imunoloških procesa, tkivnoj regeneraciji, u nastanku i progresiji bolesti poput kardiovaskularnih, degenerativnih, autoimunih, malignih i upalnih, a spekulira se i o njihovom terapijskom potencijalu. Zna se da gotovo sve vrste stanica, uključujući tumorske stanice, otpuštaju ekstracelularne vezikule kojima komuniciraju s drugim stanicama. Pri tome se ekstracelularne vezikule vežu na površinske receptore ili prenose svoj sadržaj u ciljne stanice procesima endocitoze odnosno fuzije s ciljnom staničnom membranom, što rezultira aktivacijom i fenotipskom modifikacijom ciljne stanice (114, 115).

Ekstracelularne vezikule se dijele prema nastanku, veličini i sadržaju u tri glavne skupine: egzosome, ektosome ili mikročestice (engl. *microparticle*, MP) te apoptotička tjelešca (116). Najmanji su egzosomi, približnog promjera 30-100 nm, nastaju unutarnjim pupanjem endosomalne membrane, a iz stanice se otpuštaju fuzijom multivezikularnih tjelešaca sa staničnom membranom. Najveća su apoptotička tjelešca koja nastaju od umirućih stanica i veličine su 1-5  $\mu\text{m}$ . MP-ovi, veličine 100-1000 nm, nastaju pupanjem i odvajanjem od stanične membrane, pri čemu dolazi do eksternalizacije fosfatidil-serina, jednog od glavnih biljega MP-ova, na kojega se veže aneksin V.

Od niza metoda za izolaciju ekstracelularnih vezikula (117-119) najčešće se koristi diferencijalno centrifugiranje u kojem se najprije centrifugira malom brzinom da bi se odvojile stanice, stanični *debris* i apoptotička tjelešca. Nakon toga se centrifugiranjem na 10 000-20 000 g izoliraju MP-ovi, dok je za izolaciju egzosoma potrebno centrifugiranje na 100 000-120 000 g. Na učinkovitost izolacije utječe niz čimbenika poput centrifugalne sile, temperature, trajanja centrifugiranja i vrste centrifuge, pa ih je potrebno navesti pri objavljivanju rezultata analiza.

MP-ovi izražavaju membranske i citoplazmatske proteine, sadrže DNA, mRNA, *mikro*-RNA, lipide, transkripcijske čimbenike, čimbenike rasta, citokine i metabolite, a sastav im ovisi o izvornoj stanici i podražaju koji je doveo do njihovog otpuštanja (114, 115). Pri tome MP-ovi svoje učinke dominantno ostvaruju interakcijom s endotelnim stanicama kao primarnim ciljnim mjestom djelovanja.

Otpuštanje u perifernu krv malih količina ekstracelularnih vezikula, među njima i MP-ova, konstitucijsko je obilježje endotelnih stanica. Dok većina cirkulirajućih MP-ova u perifernoj krvi zdravih ljudi potječe od trombocita i eritrocita, endotelne mikročestice (EMP)

obuhvaćaju oko 5-15% MP-ova (120, 121). EMP-ovi se u plazmu otpuštaju s citoplazmatske membrane aktiviranih ili apoptotičkih endotelnih stanica, definirani su izražajem antigena specifičnih za membranu izvornih stanica i podražaj koji je doveo do njihovog otpuštanja (122).

EMP-ovi koji se povezuju s apoptozom endotelnih stanica izražavaju konstitutivni biljeg CD31 (adhezijska molekula trombocita i endotelnih stanica-1, engl. *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1) i povišeni su u nizu vaskularnih poremećaja poput kardiovaskularnih bolesti, terminalne bubrežne bolesti, plućne arterijske hipertenzije, apneje u snu, teške arterijske hipertenzije, šećerne bolesti tip 2, ali i u pušača (123). CD31 se nalazi na površini endotelnih stanica, trombocita, ali i neutrofila i limfocita. Stoga se antigeni specifični za trombocite, kao CD41 i CD42b, koriste za razlikovanje CD31+ MP-ova podrijetlom iz endotela, odnosno trombocita. CD31 sudjeluje u angiogenezi, aktivaciji limfocita, regulaciji funkcije trombocita i endotelne permeabilnosti (124-126).

S druge strane, EMP-ovi, koji izražavaju inducibilni, za endotel specifični CD62E (adhezijska molekula endotelnih stanica i leukocita-1, engl. *endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1*, ELAM-1 ili E-selektin), pokazatelj su aktivacije endotela nakon upalnog podražaja i povišeni su u kardiovaskularnim bolestima, plućnoj arterijskoj hipertenziji, apneji u snu te u pušača (123). TNF- $\alpha$  sudjeluje u indukciji E-selektina na aktiviranim endotelnim stanicama nekoliko sati nakon upalnog podražaja, pri čemu E-selektin regrutira leukocite na mjesto upale (124, 125).

EMP-ovi mogu izražavati i druge adhezijske molekule specifične za zrele endotelne stanice: CD54 (intercelularna adhezijska molekula-1, engl. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), CD106 (adhezijska molekula vaskularnih stanica-1, engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) ili CD62P (P-selektin). Izolirani su i EMP-ovi koji izražavaju CD105 (endoglin, koji je izražen i na aktiviranim monocitima-makrofazima i stanicama koštane srži, a sudjeluje u angiogenezi i vaskularnom remodeliranju), CD144 (VE-kadherin, engl. *vascular endothelial cadherin*, koji sudjeluje u organizaciji međustaničnih spojeva i regulaciji vaskularne permeabilnosti) ili vWF (pretežito se sintetizira u endotelnim stanicama i ima važnu ulogu u hemostatskim procesima, odnosno posreduje adheziju trombocita na subendotelno vezivno tkivo nakon ozljede endotela) (121, 125).

Od spomenutih biljega, samo se CD62E i CD144 nalaze isključivo na endotelnim stanicama.

U ovom je istraživanju za utvrđivanje podrijetla MP-ova i njihovu karakterizaciju korištena protočna citometrija s fluorescentnim obilježavanjem površinskih biljega i to:

CD31, CD62E, CD41, CD142, CD66b, CD14, nitrotirozin i vWF. CD41 je  $\alpha$ -lanac-IIb integrina specifičnog za trombocite koji sudjeluje u oblikovanju receptora za fibrinogen i regulira agregaciju trombocita (127). CD142 je TF, glavni receptor i kofaktor čimbenika VII (FVII), inicijator koagulacijske kaskade kojeg izražavaju perivaskularne i epitelne stanice, a sudjeluje i u regulaciji upalnih procesa (128). CD66b (engl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-8*, CEACAM-8) je protein kojeg izražavaju isključivo polimorfonuklearni leukociti, a posreduje u adheziji neutrofila na endotelne stanice (129). CD14, protein koji pripada sustavu urođene imunosti, služi kao koreceptor za bakterijski lipopolisaharid (LPS) i jako je pozitivan u monocitima i većini tkivnih makrofaga, manje u neutrofilima i dendritičkim stanicama (130). Nitrotirozin je biljeg endogene aktivnosti peroksinitrita i oksidacijskog stresa (131).

Povišeni biljezi apoptoze endotelnih stanica i njihove regeneracije uočeni su u dijelovima krvožilja sklonim aterosklerozi i aterosklerotskim plakovima, povezuju se s nastankom, progresijom i rupturom aterosklerotskog plaka te s gotovo svim poznatim čimbenicima kardiovaskularnog rizika poput oksidiranog LDL-a i hiperglikemije (120, 121, 132, 133). Na otpuštanje EMP-ova utječe niz čimbenika poput TNF- $\alpha$ , *pro*-upalnog citokina koji inducira aktivaciju endotelnih stanica. Otpuštanje EMP-ova *in vitro* mogu potaknuti i trombin, CRP, PAI-1 (inhibitor aktivatora plazminogena-1, engl. *plasminogen activator inhibitor-1*), IL-1, IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), ROS, uremički toksini te bakterijski LPS (120, 121, 133). Utjecaj hipoksije na otpuštanje EMP-ova je kontroverzan: neki su autori našli povišene razine specifičnih EMP-ova nakon kratkotrajnog izlaganja ispitanika hipoksiji, dok drugi nisu potvrdili ovakvi učinak hipoksije (134). Slično opterećenje se pokazalo fiziološkim regulatorom otpuštanja EMP-ova (120). Vion i sur. su pokazali *in vitro* i *in vivo* da je, u uvjetima laminarnog protoka krvi i visokog intenziteta smičnog opterećenja, razina cirkulirajućih EMP-ova smanjena i to mehanizmima ovisnima o NO-u (135). U bolesnika s terminalnim zatajivanjem bubrega hemodijaliza uzrokuje porast smičnog opterećenja u brahijalnoj arteriji i posljedično smanjenje cirkulirajućih EMP-ova (136). S druge strane, 20 minuta eksperimentalno induciranog oscilirajućeg smičnog opterećenja s povećanom retrogradnom komponentom u brahijalnoj arteriji zdravih ljudi dovodi do poremećaja funkcije endotela u smislu povećanja cirkulirajućih EMP-ova i to biljega aktivacije i apoptoze endotelnih stanica (CD62E+ odnosno CD31+/CD42b- EMP-ova) (137).

Slijedom navedenog endotelna disfunkcija povezana s povišenim razinama EMP-ova utvrđena je u nizu patofizioloških stanja kao što su ateroskleroza, akutni koronarni sindrom, šećerna bolest, metabolički sindrom, arterijska i plućna hipertenzija, vaskulitis, sepsa,

kronično zatajivanje bubrega, preeklampsija, trombotička trombocitopenička purpura i multipla skleroza (125, 133).

EMP-ovi su vezikule raznovrsnog sastava i kompleksne biološke uloge: sudjeluju u regulaciji upalnih procesa, hemostaze, angiogeneze, staničnog rasta i preživljenja te obnavljanja oštećenog endotela (121, 132, 138). Cirkulirajući EMP-ovi utječu na funkciju endotelne stanice ne samo izravno, lučenjem pojedinih čimbenika, nego i posredno, mijenjajući ekspresiju gena, što je dijelom posredovano i prenošenjem genetskog materijala (139). *In vitro* izlaganje endotelne stanice visokim koncentracijama EMP-ova izoliranih iz neaktiviranih endotelne stanice remeti procese angiogeneze, proliferacije stanice i inducira apoptozu (140). *In vitro* i *in vivo* istraživanja su potvrdila da EMP-ovi posjeduju i prokoagulacijsku aktivnost zahvaljujući površinskoj ekspresiji negativno nabijenog fosfatidilserina i TF-a, što omogućuje interakciju s čimbenicima koagulacije i aktivaciju vanjskog puta koagulacije (121). Na primjeru endotelne stanice ljudske umbilikalne vene *in vitro* ustanovljeno je da TNF- $\alpha$  stimulira stvaranje trombina upravo putem otpuštanja TF+ EMP-ova sugerirajući posredničku ulogu EMP-ova između upale i tromboze (141). Na primjeru štakorske aorte utvrđeno je da EMP-ovi remete vazodilataciju ovisnu o endotelu što je praćeno povećanom proizvodnjom superoksidnog aniona (142). Negativni učinci MP-ova potvrđeni su i *in vivo*: MP-ovi bolesnika sa srčanim infarktom uzrokuju poremećaj dilatacije ovisne o endotelu na izoliranim arterijama (143). *Uncoupling* eNOS-a pridonosi otpuštanju EMP-ova sugerirajući mogući recipročni odnos između EMP-ova i endotelne disfunkcije (144). Nizom istraživanja je potvrđena negativna korelacija endotelne funkcije i koncentracije cirkulirajućih EMP-ova (145).

Osim negativnih, EMP-ovi imaju i pozitivnih učinaka (121, 133). Zna se da potiču preživljavanje endotelne stanice i povoljno utječu na angiogenezu. *In vitro* stvaranjem plazmina pomažu endotelnim progenitorskim stanicama u angiogenezi (146), a sličan učinak imaju i EMP-ovi koji matriksnim metaloproteinazama remodeliraju izvanstanični matriks i pripremaju ga za stvaranje vaskularnih struktura (147). Pro-angiogenetski učinak EMP-ovi ostvaruju kad su prisutni u niskim koncentracijama, dok se pri visokim koncentracijama taj učinak gubi, što se dijelom pripisuje inhibiciji stvaranja struktura nalik kapilarama ROS-om (140). EMP-ovi čije je stvaranje potaknuto aktiviranim proteinom C i koji nose endotelni receptor za protein C, mogu suprimirati upalu i apoptozu (148).

Sve je izvjesnije kako je uloga EMP-ova u procesima vaskularne homeostaze ambivalentna. Generalno gledajući, smatra se da EMP-ovi u povišenim koncentracijama smanjuju proizvodnju NO-a, povećavaju oksidacijski stres u endotelnim stanicama, pogoduju



nastanku endotelne disfunkcije te izražaju *pro*-koagulacijskog i *pro*-upalnog endotelnog fenotipa što vodi nastanku i progresiji kardiovaskularnih bolesti (133). EMP-ovi su se profilirali kao dobar sustavni biljeg disfunkcionalnog endotela i koristan prognostički čimbenik kardiovaskularnih bolesti (121). Smatra se da bi MP-ovi standardizacijom nomenklature, jasnim definicijama te proteomičkom i funkcionalnom karakterizacijom u specifičnim populacijama bolesnika mogli postati pravi biomarkeri različitih bolesti.

## 1.6. Oscilirajuće smično opterećenje

Obrasci protoka krvi i hemodinamske sile su različiti u različitim dijelovima krvožilnog sustava. Upravo je selektivna distribucija aterosklerotskih lezija na tipičnim mjestima poput grananja arterija, s lokalno poremećenim protokom krvi, skrenula pozornost na ulogu hemodinamskih sila kao lokalnog rizičnog čimbenika u patogenezi endotelne disfunkcije i ateroskleroze.

Normalno je u ravnim dijelovima provodnih arterija protok krvi laminaran, pulsirajući, u sistoli i dijelu dijastole antegradan, u ranoj dijastoli retrogradan, s dominantnom antegradnom komponentom (149) i visokim intenzitetom srednjeg smičnog opterećenja arterijske stijenke ( $10-70 \text{ dyn/cm}^2$ ) (150). Na mjestima grananja i zavojima provodnih arterija, u sinusima arterijskih i venskih valvula, na aterosklerotskim plakovima, na termino-lateralnim anastomozama arterija, na mjestima insercije arterijskih stentova ili kod inkompetentnih venskih valvula protok krvi je poremećen, u obliku vrtloga, staze, refluksa ili oscilirajući, s povećanom retrogradnom komponentom i smanjenim srednjim smičnim opterećenjem ( $<4 \text{ dyn/cm}^2$ ), odnosno značajnim prostornim i vremenskim gradijentom smičnog opterećenja (60).

Kako je prethodno rečeno, smično opterećenje je proporcionalno viskoznosti krvi i brzini struje krvi, a obrnuto proporcionalno promjeru arterije. Stoga se u provodnim arterijama, gdje je protok krvi općenito laminaran i jednosmjernan, smično opterećenje može procijeniti temeljem sljedeće jednadžbe (84, 90):

$$\text{smično opterećenje} = \frac{\text{viskoznost krvi} \times \text{brzina struje krvi}}{\text{promjer arterije}}$$

Precizno mjerenje smičnog opterećenja *in vivo* je komplicirano zbog pulsirajuće prirode protoka krvi i nužnosti mjerenja brzine struje krvi i viskoznosti krvi u vrlo uskom sloju koji protiče neposredno uz stijenkku krvne žile. Zbog toga se u praksi kao zamjenska mjera koristi

stopa smicanja (SR) koja je proporcionalna brzini struje krvi, a obrnuto proporcionalna promjeru arterije, dok se viskoznost krvi smatra konstantnom i bez značajnog utjecaja na procjenu smičnog opterećenja (76, 84, 97). SR je definiran sljedećom jednačbom:

$$SR = 4 \times \frac{\text{brzina struje krvi}}{\text{promjer arterije}}$$

Ovakva definicija stope smicanja (84, 94-96) i njezina primjena umjesto smičnog opterećenja ima svoja ograničenja zbog potencijalnih promjena viskoznosti krvi ili razlika u viskoznosti krvi između pojedinaca, ali i zbog činjenice da se radi o ne-newtonovskom fluidu u distenzibilnim krvnim žilama koje se granaju, a protok krvi je varijabilan (94). Antegradni i retrogradni SR se računaju uz pomoć antegradne odnosno retrogradne brzine struje krvi.

Oscilirajući smični indeks (OSI), kao pokazatelj veličine smičnih oscilacija, definiran je omjerom apsolutne vrijednosti retrogradnog SR-a i zbroja antegradnog te apsolutne vrijednosti retrogradnog SR-a:

$$OSI = \frac{|\text{retrogradni SR}|}{\text{antegradni SR} + |\text{retrogradni SR}|}$$

Vrijednosti OSI-a mogu iznositi od 0 do 0.5, pri čemu vrijednost 0 odgovara jednosmjernom protoku krvi tijekom cijelog srčanog ciklusa, dok vrijednost od 0.5 odgovara podjednakoj veličini antegradne i retrogradne komponente sa srednjom stopom smicanja jednakoj nuli (151).

Povećanje protoka krvi uzrokuje početno povećanje antegradnog, a posljedično i srednjeg smičnog opterećenja, koje inducira kompenzacijsku vazodilataciju kako bi se srednje smično opterećenje vratilo na početnu vrijednost. Istraživanje na mezenterijskim arterijama štakora pokazalo je da duže izlaganje povećanom smičnom opterećenju uzrokuje hiperplaziju endotelnih i glatkih mišićnih stanica te povećanje sinteze vezivnog tkiva u krvožilnoj stijenci (152). Nasuprot tome, dugotrajno smanjenje smičnog opterećenja karotidne arterije u zečeva uzrokovalo je smanjenje unutarnjeg promjera krvne žile koje je ovisno o endotelu i nije posredovano kontrakcijom glatkih mišićnih stanica nego hipertrofijom stijenke (153). Pozitivno remodeliranje inducirano povećanim smičnim opterećenjem naziva se eutrofičnim širenjem krvne žile, a negativno remodeliranje izazvano smanjenim smičnim opterećenjem naziva se hipertrofičnim suženjem krvne žile. Neto učinak ovih kompenzacijskih odgovora posredovanih endotelom je održavanje srednjeg smičnog opterećenja arterijskog sustava ~15-20 dyn/cm<sup>2</sup> (150).

U primjeni je mnoštvo sustava kojima se, na jednoslojnim kulturama endotelnih stanica *in vitro*, ispituje utjecaj različitih obrazaca protoka i smičnog opterećenja na strukturu

i funkciju endotelnih stanica. Slično promjenama koje se vide u područjima sklonima aterosklerozi *in vivo*, poremećaj protoka krvi *in vitro* uzrokuje promjenu staničnog oblika i organizacije citoskeleta endotelnih stanica, potiče njihovu proliferaciju, ubrzano starenje i apoptozu, povećava oksidacijski stres, promjenom izražaja proteina pukotinskih spojišta povećava permeabilnost endotela za makromolekule, usmjerava promjenu fenotipa glatke mišićne stanice iz vazokonstriktorskog u sintetski, a utjecajem na ekspresiju adhezijskih molekula i kemokina te osobinama protoka krvi pogoduje taloženju fibrinogena i fibronektina te adheziji monocita na endotelne stanice. Ovi su učinci praćeni odgovarajućim promjenama ekspresije gena, epigenetskih modifikacija i staničnog signaliranja, a značajno ovise, ne samo o obrascu i intenzitetu smicanja, nego i o njegovoj dinamici (59, 60, 64, 154, 155).

Utvrđeno je da mehanički podražaj regulira ekspresiju različitih gena koji upravljaju staničnom rastom, hemostatskim i upalnim procesima, što predstavlja ključnu vezu između mehaničke stimulacije i aktivacije endotela, tzv. „mehanotransdukciju” (59). Naime, identificirani su dijelovi promotorskih regija relevantnih gena (npr. gena za PDGF (čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita, engl. *platelet-derived growth factor*), eNOS i VCAM-1) koji reagiraju na smično opterećenje (engl. *shear stress response element*, SSRE) promjenom transkripcije gena (59, 156). Tako laminarni protok krvi u endotelnim stanicama selektivno pojačava ekspresiju niza ateroprotektivnih gena poput gena za ciklooksigenazu-2 (COX-2), eNOS i superoksid-dismutazu ovisnu o manganu (157), a istovremeno smanjuje ekspresiju *pro*-aterogenih gena poput gena za endotelin-1 (66, 158, 159). U slučaju poremećenog protoka krvi ova pozitivna regulacija endotelnog fenotipa izostaje (160).

Pojačanim izražajem eNOS-a laminarni protok krvi pogoduje endotelnom lučenju NO-a. Dio pozitivnih učinaka aerobnog vježbanja može se pripisati upravo uspostavljanju laminarnog protoka krvi u blizini mjesta rizičnih za nastanak aterosklerotskih lezija, čime se endotel usmjerava prema povoljnom vazoprotektivnom fenotipu (66, 151, 154, 158). Laminarni protok krvi je ključni podražaj, a NO glavni medijator ekspresije „mirnog”, neaktiviranog fenotipa endotelne stanice koji je vazodilatacijski, protuupalni i *anti*-trombotski (60).

S druge strane, oscilirajuće smično opterećenje s visokom razinom retrogradnog smicanja i posljedično sniženom srednjom vrijednošću, smatra se *pro*-aterogenim (60), odnosno može dovesti do pojačanog izražaja *pro*-aterogenih gena (npr. gena za NADPH-oksidadu, MCP-1 (monocitni kemotaktični protein-1, engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) koji privlači monocite u arterijsku stijenu ili gena za PDGF koji uzrokuje

migraciju glatkih mišićnih stanica u *sub-intimalni* prostor) i smanjenog izražaja *anti-aterogenih* gena (npr. gena za eNOS) (66, 154, 159).

Negativni utjecaj akutnog povećanja retrogradnog smicanja na endotelnu funkciju potvrđen je rezultatima niza istraživanja, najprije *in vitro*, potom i *in vivo*, na arterijama sklonim aterosklerozi i arterijama otpornim na aterosklerozu (161-163). Manipulirajući retrogradnim SR-om bez promjene antegradnog SR-a i hemodinamskih parametara, Thijssen i sur. su uočili smanjenje FMD-a (%) brahijalne arterije kao odgovor na povećano retrogradno smicanje s učinkom ovisnim o dozi i snažnom korelacijom povećanja retrogradnog SR-a i pada FMD-a (%) (161). Pri tome je podlaktična manžeta bila napuhana na 25, 50 i 75 mm Hg tijekom 30 minuta. Potvrda ovog koncepta, ne samo na funkcionalnoj, nego i na molekulsko-staničnoj razini, su rezultati istraživanja Jenkinsa i sur. koji su na mladim, zdravim ljudima pokazali da 20 minuta eksperimentalno induciranog oscilirajućeg smičnog opterećenja inflacijom podlaktične manžete na 220 mm Hg dovodi do povećanja retrogradnog SR-a i poremećaja funkcije endotela brahijalne arterije u smislu povećanja cirkulirajućih EMP-ova i to bilježa aktivacije i apoptoze endotelnih stanica (CD62E+ odnosno CD31+/CD42b- EMP-ova) (137), sugerirajući *pro-upalni* i *pro-apoptotički* učinak poremećenog protoka krvi.

Poremećaj FMD-a se pripisuje i povećanom oksidacijskom stresu uzrokovanom oscilirajućim smicanjem (66, 164). Nadalje, akutno povećanje mišićnog simpatičkog tonusa je povezano s porastom retrogradnog smicanja u brahijalnoj arteriji (165) i također može uzrokovati poremećaj FMD-a (166).

Sad je već jasno da i dugotrajno povećanje retrogradnog smicanja negativno utječe na endotelnu funkciju. Obrasci protoka krvi s kronično povišenom retrogradnom komponentom u proksimalnim provodnim arterijama mogu nastati zbog povišenog tonusa u distalnom krvožilju (167), kao npr. u starijoj dobi, kod pretilosti i arterijske hipertenzije (168-171), odnosno u stanjima s povećanim perifernim vaskularnim otporom (172). Smatra se da je povećanje retrogradnog smicanja povezano sa starijom dobi u značajnoj mjeri uzrokovano smanjenom raspoloživošću NO-a u mikrocirkulaciji (169). Povećani retrogradni protok negativno utječe na funkciju provodnih arterija i mikrožilja, odnosno povezan je sa smanjenim FMD-om i smanjenom reaktivnom hiperemijom, ali i s većom aortalnom krutošću i perifernom vaskularnom rezistencijom koje dodatno pogoduju reverziji protoka (172).

## 1.7. Endotelna disfunkcija u KOPB-u

Endotelna disfunkcija plućnog krvožilja, koja je jasno utvrđena u bolesnika s KOPB-om (56), kako u napredovaloj bolesti, tako i u blagom KOPB-u, značajno pridonosi progresiji bolesti (57) koja se povezuje s pojačanom apoptozom endotelnih stanica (125, 173) i poremećajem funkcije endotelnih progenitorskih stanica (174). Također, sve je veći broj istraživanja koja upućuju na postojanje endotelne disfunkcije sustavnog krvožilja u bolesnika s KOPB-om (175). U KOPB-u se istražuje i mnoštvo ekstracelularnih vezikula od kojih se neke povezuju s patogenezi i napredovanjem bolesti, a podrijetla su epitelnih i endotelnih stanica, makrofaga i respiracijskih patogena poput bakterija (176).

U sustavnom preglednom radu čijom je meta-analizom obuhvaćeno 426 bolesnika sa stabilnim KOPB-om u 10 istraživanja, Vaes i sur. su zaključili da je u bolesnika sa stabilnim KOPB-om endotelna funkcija perifernih krvnih žila mjerena FMD-om (%) poremećena u odnosu na kontrolne ispitanike bez KOPB-a (175). Pri tome je razlika FMD-a (%) između navedenih skupina iznosila -3.22% (95% CI od -4.74 do 1.69,  $p < 0.001$ ,  $I^2 = 96\%$ ), dok je razlika vazodilatacije neovisne o endotelu mjerena NMD-om (%) bila manja i iznosila je -2.86% (95% CI od -5.63 do -0.09,  $p = 0.04$ ,  $I^2 = 83\%$ ). Ovi rezultati sugeriraju da je poremećaj vazodilatacije u KOPB-u prije svega posredovan endotelnom disfunkcijom. FMD (%) je u bolesnika s KOPB-om iznosio od -0.6% do 14.2%, a u kontrolnih zdravih ispitanika od 4.3% do 15.6%. Ovako značajna varijabilnost FMD-a i činjenica da nisu sva istraživanja utvrdila značajnu razliku između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika objašnjava se razlikama u izboru ispitanika s obzirom na čimbenike značajno povezane s FMD-om: dob, FEV<sub>1</sub> i pušenje.

Rezultati prethodnih istraživanja su pokazali da je endotelna funkcija poremećena u pušača u usporedbi s nepušačima i bivšim pušačima i da je intenzitet pušenja, mjereno brojem pušačkih kutija-godina (engl. *pack-year*, PY), neovisno povezan s FMD-om (%) (177, 178). Heiss i sur. su kratkotrajnim (30-minutnim) pasivnim izlaganjem nepušača cigaretnom dimu uzrokovali prolazno smanjenje FMD-a (%), dok su porast plazmatske razine EMP-ova i VEGF-a bili održani i nakon 24 h, u smislu aktivacije i ozljede vaskularnog endotela. Istovremeno su mobilizirane disfunkcionalne endotelne progenitorske stanice s oštećenom kemotaksijom prema VEGF-u i oštećenom proizvodnjom NO-a (179). U pušača s normalnim spirometrijskim nalazom, ali sa sniženim TLco-om, dakle u ranim stadijima emfizema, utvrđene su povišene koncentracije EMP-ova podrijetlom iz apoptotičkih stanica i to dominantno EMP-ova koji sadrže enzim koji konvertira angiotenzin (engl. *angiotensin-*

*converting enzyme*, ACE, CD143), odnosno EMP-ova koji potječu od plućnih kapilara. To podupire koncept u kojem je apoptoza plućnih kapilarnih endotelih stanica jedan od mogućih primarnih uzroka nastanka emfizema (180, 181). U tom smislu mogu se interpretirati i rezultati istraživanja Thomashowa i sur. (124) u kojem je koncentracija CD31+ EMP-ova u bolesnika s KOPB-om bila značajno viša u odnosu na kontrolne zdrave ispitanike, ne samo u teškom nego i u blagom KOPB-u, i bila je značajno povezana s intenzitetom emfizema, redukcijom plućne mikrocirkulacije i TLco-a. Istovremeno je koncentracija CD62E+ EMP-ova bila povećana samo u KOPB-u s teškom bronhalnom opstrukcijom uz značajnu povezanost s intenzitetom hiperinflacije. Potencijalna uloga EMP-ova u patogenezi KOPB-a leži u pretpostavci da plućne kapilarne endotelne stanice prenose  $\alpha_1$ -antitripsin do alveolarnih epitelnih stanica upravo putem EMP-ova. Radi se o inhibitoru proteaza kojeg u sustavni krvotok luči jetra i koji ima važnu ulogu u zaštiti integriteta plućnog parenhima. Izlaganje plućnog endotela ekstraktu cigaretnog dima smanjuje prijenos  $\alpha_1$ -antitripsina do epitelnih stanica i pogoduje nastanku emfizema (182).

Nedavno su objavljeni rezultati istraživanja u kojem je razina ukupnih i EMP-ova podrijetlom iz apoptotičkih stanica ostala značajno povišena više od 12 mjeseci nakon prestanka pušenja u bolesnika s KOPB-om, dok su se razine navedenih EMP-ova u zdravih pušača po prestanku pušenja vratile na razine kakve imaju nepušači (183). Čini se, dakle, da je endotelna disfunkcija povezana s KOPB-om neovisna o anamnezi pušenja i pušačkom statusu (24, 184-186), sugerirajući postojanje drugih uzročnih čimbenika. Primjerice, pokazalo se da je porast biljega sustavne upale u KOPB-u neovisni prediktor smanjenja FMD-a (%) (185, 187). Na endotelnu funkciju mogu utjecati prisutnost i intenzitet emfizema (184), plinovi u arterijskoj krvi (24, 188), ali i poremećeni metabolizam glukoze (189). Barr i sur. su na uzorku od 107 bivših pušača, od kojih je 40% imalo KOPB, utvrdili da je u multivarijantnoj analizi poremećeni FMD (%) linearno povezan s težinom opstrukcije protoka zraka u dišnim putovima (mjereno *post*-bronhodilatacijskim FEV<sub>1</sub> u rasponu od normalnog do vrlo teške bronhalne opstrukcije) i s težinom emfizema (mjereno *low-dose* CT-om) neovisno o prisutnosti KOPB-a, anamnezi pušenja i drugim potencijalnim uzrocima endotelne disfunkcije. Dakle, ova je povezanost bila prisutna i u ispitanika bez KOPB-a čime je utvrđen kontinuitet poremećaja FMD-a (%) ovisan o plućnoj funkciji, čak i u potencijalno pretkliničkom KOPB-u, a to ide u prilog ideji o vaskularnom poremećaju kao inicijalnom događaju u patogenezi KOPB-a (184). Moro i sur. su u 44 bolesnika s KOPB-om i konkomitantnim kardiovaskularnim bolestima, u usporedbi sa zdravim ispitanicima, također utvrdili poremećaj FMD-a (%) proporcionalan težini bronhalne opstrukcije. Pri tome je u

manjoj mjeri bio poremećen i NMD (%) uz pozitivnu povezanost s FMD-om ( $\beta=0.396$ ,  $p<0.001$ ) (186). Eickhoff i sur. su na 100 ispitanika, od kojih je njih 60 imalo KOPB, utvrdili poremećeni FMD (%) u bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave osobe nepušače i pušače s normalnom plućnom funkcijom, što se nije promijenilo ni nakon normalizacije za početni promjer brahijalne arterije (FMD (%)/ $D_0$ ) koji je u bolesnika s KOPB-om bio veći u odnosu na zdrave nepušače ( $3.64\pm 0.63$  mm vs.  $3.28\pm 0.61$  mm,  $p<0.05$ ). Utvrđena je i statistički značajna povezanost FMD-a (%), težine bronhalne opstrukcije i biljega sustavne upale neovisno o anamnezi pušenja, sugerirajući moguću ulogu sustavne upale u patogenezi endotelne disfunkcije u KOPB-u (185). S druge strane, Boyer i sur. su utvrdili da umjerena policitemija ne utječe nepovoljno na vaskularnu funkciju u KOPB-u, a policitemični i normocitemični bolesnici s KOPB-om se nisu razlikovali ni u bazalnom smičnom opterećenju (veća viskoznost krvi, ali i početni promjer arterije) (190). Clarenbach je sa sur. na 106 bolesnika s KOPB-om potvrdio negativnu povezanost FMD-a (%) i težine bronhalne opstrukcije (mjereno *post*-bronhodilatacijskim FEV<sub>1</sub>,  $\beta=0.04$ ,  $p<0.01$ ) pri čemu je FMD (%) u bolesnika s teškim i vrlo teškim KOPB-om (GOLD 3 i 4) iznosio  $2.8\pm 1.5\%$ , odnosno  $2.0\pm 1.3\%$ . Za razliku od parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida u perifernoj arterijskoj krvi (PaCO<sub>2</sub>) koji je negativno utjecao na FMD (%) ( $\beta=-0.74$ ,  $p<0.01$ ), nije utvrđena povezanost između hipoksemije i FMD-a (%). U multivarijantnoj analizi je, uz težinu bronhalne opstrukcije, neovisna povezanost s FMD-om (%) utvrđena samo za tjelesnu aktivnost i promjer brahijalne arterije (24). Pобољшanje FMD-a (%) nakon kirurške redukcije plućnog volumena također sugerira povezanost poremećaja plućne funkcije i vaskularne bolesti u bolesnika s KOPB-om (191).

Da bi se razlikovali EMP-ovi koji potječu iz plućne i sustavne cirkulacije, ispituje se njihov izražaj vWF-a i ACE-a. vWF je biljeg endotelnih stanica kojeg endotelne stanice plućnih kapilara ne izražavaju, ali zato obiluju ACE-om. Dakle, vWF- i/ili ACE+ EMP-ovi su plućnog kapilarnog podrijetla (125). U aktivnih pušača s normalnom spirometrijom i sniženim TLco-om, približno 76% CD31+ EMP-ova je pozitivno na ACE (181), a u KOPB-u s umjerenom bronhalnom opstrukcijom oko 60% povišenih EMP-ova je negativno na vWF (180). Nadalje, broj EMP-ova u KOPB-u s teškim emfizemom je niži nego u onih s blagim emfizemom, što odražava redukciju plućne kapilarne mreže u emfizemu. Ovi rezultati potvrđuju da povećani EMP-ovi u KOPB-u uglavnom potječu iz plućnih kapilara te da su vWF- ili ACE+ EMP-ovi osjetljivi biljezi ozljede plućnog kapilarnog endotela.

Uspoređujući bivše pušače s invazivno dokazanom koronarnom arterijskom bolešću sa i bez konkomitantnog KOPB-a, Keymel i sur. su utvrdili da je FMD (%) brahijalne arterije

niži u bolesnika s KOPB-om uz pozitivnu korelaciju FMD-a (%) i FEV<sub>1</sub>, dok razlike u pokazateljima mikrovaskularne funkcije i početnom promjeru brahijalne arterije nije bilo (192). Prisutnost učinaka KOPB-a i u kasnim fazama aterogeneze naglašava važnost KOPB-a u vaskularnoj biologiji.

U istraživanju mehanizama odgovornih za vaskularnu disfunkciju u KOPB-u, Ives i sur. su također utvrdili značajno niži FMD (%) u nepušača s KOPB-om u odnosu na zdrave nepušače (3.1±0.5% vs. 6.7±0.6%, p<0.05) pri čemu nije bilo razlike u podražaju odnosno smičnom opterećenju (SR-AUC) niti reaktivnoj hiperemiji kao pokazatelju mikrovaskularne funkcije. Ovi su rezultati bili konzistentni i nakon normalizacije FMD-a prema stopi smicanja (FMD/SR-AUC) i praćeni povišenim pokazateljima bazalnog oksidacijskog stresa te smanjenog antioksidacijskog potencijala, odnosno poremećenom redoks-ravnotežom kao jednim od potencijalnih uzročnih mehanizama. Primjena antioksidansa dovela je do značajnog povećanja FMD-a (%), ali i smanjenja PWV-a (193), sugerirajući prethodno uočenu ovisnost arterijske krutosti o redoks-ravnoteži, bioraspoloživosti NO-a i endotelnoj funkciji (194).

Akutne egzacerbacije također pogoršavaju endotelnu funkciju u KOPB-u (125, 188). Da bi razjasnili utjecaj akutnih egzacerbacija na endotelnu funkciju u bolesnika s KOPB-om, Takahashi i sur. su proveli istraživanje u kojem su, uz značajno povišenu razinu CD31+, CD62E+ i CD144+ EMP-ova u bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave bivše pušače (uz pozitivnu korelaciju sa stupnjem bronhalne opstrukcije i značajnu povezanost s FEV<sub>1</sub>/FVC), utvrdili da se razina navedenih EMP-ova dodatno značajno povisila za vrijeme akutnih egzacerbacija u odnosu na stabilni KOPB neovisno o dobi, pušenju, indeksu tjelesne mase i intenzitetu emfizema, a povišeni EMP-ovi su bili dominantno plućnog podrijetla. Suprotno od CD62E+ EMP-ova, CD31+ EMP-ovi su ostali povišeni do 28. dana nakon egzacerbacije ukazujući na perzistentno oštećenje i apoptozu plućnog kapilarnog endotela. Multivarijatna analiza je pokazala da je koncentracija CD62E+ EMP-ova u stabilnom KOPB-u s više od jedne akutne egzacerbacije godišnje veća nego u KOPB-u bez egzacerbacija (180). Poremećeni FMD i NMD u teškim akutnim egzacerbacijama KOPB-a se značajno oporavljaju tri mjeseca nakon rezolucije egzacerbacije (195). Na temelju ovih rezultata spekulira se da je utjecaj čestih egzacerbacija KOPB-a na pogoršanje plućne funkcije, progresiju bolesti i povećani kardiovaskularni rizik upravo posljedica oštećenja endotela koje je potencijalno posredovano EMP-ovima.

U sustavnoj cirkulaciji bolesnika s KOPB-om, u usporedbi s pušačima bez KOPB-a, smanjena je koncentracija endotelnih progenitorskih stanica (EPC) - pluripotentnih matičnih stanica koštane srži koje sudjeluju u vaskularnom oporavku i angiogenezi (196).



Smatra se da sustavna makrovaskularna i mikrovaskularna endotelna disfunkcija nastaju rano u KOPB-u, naročito u emfizematoznom fenotipu, i da potencijalno pridonose patogenezi KOPB-a (197). S obzirom na povezanost endotelne disfunkcije i povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti u KOPB-u, praćenje endotelne funkcije može pridonijeti boljoj fenotipizaciji bolesnika s KOPB-om i preciznijoj procjeni ukupnog kardiovaskularnog rizika.

## 1.8. Endotelna funkcija i hipoksija

Utjecaj hipoksije na FMD i otpuštanje EMP-ova je kontroverzan: neki su autori našli smanjeni FMD i povišene razine specifičnih EMP-ova nakon kratkotrajnog izlaganja ispitanika hipoksiji, dok drugi nisu potvrdili ovakvi učinak hipoksije (134). I u uvjetima intermitentne hipoksije, kao u opstruktivskoj apneji u snu (engl. *obstructive sleep apnoea*, OSA), dolazi do poremećaja vaskularne funkcije, odnosno vazodilatacije ovisne o endotelu i promjene koncentracije cirkulirajućih MP-ova (198, 199). Jedno od mogućih objašnjenja proturječnih rezultata utjecaja hipoksije na endotelnu funkciju leži u različitom intenzitetu i trajanju hipoksije, ali i u ispitivanoj populaciji te eventualnom postojanju i stadiju aterosklerotske bolesti (200).

Keymel i sur. (192) su zdrave ispitanike podvrgnuli udisanju 12%-tnog kisika i izazvali pad PaO<sub>2</sub>, posljedičnu hiperventilaciju i pad PaCO<sub>2</sub> uz istovremeni porast promjera brahijalne arterije (3.94±0.37 mm vs. 4.18±0.38 mm, p=0.014) što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (201). Istovremeno je došlo do značajnog smanjenja FMD-a (%) (7.08±0.29% vs. 4.89 ±0.24%, p ≤ 0.001) i kapilarne mikrocirkulacije. Time je pokazano da hipoksemija dovodi do značajnog funkcionalnog oštećenja endotela u zdravih ispitanika.

Osim što povećava oksidacijski stres, hipoksija snažno aktivira simpatički živčani sustav (166, 202, 203), čime uzrokuje vaskularnu disfunkciju (166, 203, 204). U istraživanju Hijmeringa i sur. je smanjenje FMD-a (%) uzrokovano povećanim simpatičkim tonusom potpuno ukinuto  $\alpha$ -adrenergičkom blokadom (203). U placebo kontroliranom pokusu Lewisa i sur. je FMD (%) brahijalne arterije mladih zdravih ljudi bio značajno smanjen (za 28-35%, p≤0.003) za vrijeme normobarične hipoksije (FiO<sub>2</sub> 11% kao ekvivalent 5 000 m nadmorske visine) i taj je učinak djelomično poništen primjenom blokatora  $\alpha_1$ -adrenergičkih receptora (204).

Brojna su istraživanja o utjecaju hipoksije na endotelnu funkciju provedena u hipobaričnim uvjetima, na velikoj nadmorskoj visini. Lewis i sur. su istražili utjecaj akutne i

kronične izloženosti hipobaričnoj hipoksiji na vaskularnu funkciju i strukturu mladih zdravih ljudi (204). Akutna izloženost hipoksiji na 5050 m nadmorske visine izazvala je smanjenje FMD-a (%) brahijalne arterije za 14% ( $p \leq 0.02$ ), dok su početni promjer arterije i SR-AUC ostali nepromijenjeni. Ovaj je rezultat zadržao značajnost i nakon alometrijske prilagodbe za varijabilnost početnog promjera arterije. Paralelno sa smanjenjem FMD-a (%), smanjen je i NMD (%), upućujući na doprinos poremećene strukture i/ili funkcije glatkog mišićnog sloja arterijske stijenke na smanjenje FMD-a (%). Ovakvi učinci hipobarične hipoksije su se održali nakon dva tjedna i bili su usporedivi s pokazateljima vaskularne funkcije u domicilnih stanovnika. U ovom je istraživanju korelacija saturacije hemoglobina periferne arterijske krvi kisikom ( $\text{SaO}_2$ ) i FMD-a (%) bila blaga do umjerena ( $r=0.33$ ,  $p=0.05$ ), a izračunom koeficijenta determinacije je utvrđeno da se tek 11% varijabilnosti FMD-a (%) može povezati sa  $\text{SaO}_2$ , što upućuje da su, pored hipoksemije, i drugi mehanizmi uključeni u oštećenje FMD-a na velikoj nadmorskoj visini. U zaključku ovog istraživanja autori hipobaričnu hipoksiju povezuju s perzistentnim oštećenjem vaskularne funkcije koje je potencijalno posredovano povećanim oksidacijskim stresom i simpatičkim tonusom s implikacijama na arterijsku strukturu (povećani omjer debljine stijenke prema širini lumena karotidne arterije) i funkciju (povećani centralni PWV).

Svakako treba uzeti u obzir moguće razlike između normobarične i hipobarične hipoksije. Endotelna disfunkcija, izazvana akutnom hipoksijom, na morskoj je razini povezana sa smanjenom bioraspoloživošću NO-a (205, 206). Na velikoj nadmorskoj visini je bioraspoloživost NO-a čak i povišena (204), kao vjerojatni adaptacijski mehanizam kojim se postiže vazodilatacija i suprimira metabolizam (207), a vaskularna se disfunkcija povezuje s dodatnim vazokonstriktorskim čimbenicima poput produkata lipidne peroksidacije (204) ili ROS-a (208).

Za razliku od prethodnih istraživanja u kojima korelacija FMD-a i parcijalnog tlaka kisika u perifernoj arterijskoj krvi ( $\text{PaO}_2$ ) nije ispitivana (184-186, 209) ili utvrđena (24, 190), Keymel i sur. (192) su, uspoređujući bivše pušače s invazivno dokazanom koronarnom arterijskom bolešću sa i bez konkomitantnog KOPB-a, utvrdili značajnu korelaciju FMD-a (%) i  $\text{PaO}_2$ , neovisnu o  $\text{FEV}_1$  i anamnezi pušenja. U skladu s tim je u bolesnika s KOPB-om i  $\text{PaO}_2 \leq 65$  mm Hg FMD (%) bio značajno manji u usporedbi s bolesnicima čiji je  $\text{PaO}_2$  bio  $>65$  mm Hg ( $3.0 \pm 0.5\%$  vs.  $3.7 \pm 0.4\%$ ,  $p=0.008$ ). Ovi rezultati podupiru hipotezu o doprinosu hipoksemije disfunkciji endotela, potencijalno posredovanoj smanjenom bioraspoloživošću NO-a. Pri procjeni učinka hipoksemije na FMD uzet je u obzir početni promjer brahijalne arterije koji je u bolesnika s KOPB-om i nižom razinom kisika bio neznatno veći, ali ta razlika

nije dosegla statističku značajnost ( $4.8 \pm 0.7$  mm vs.  $4.5 \pm 0.5$  mm,  $p=0.293$ ). Periferna vazodilatacija je u usporedbi s kontrolnim ispitanicima nepušačima utvrđena u bolesnika s KOPB-om i u ranijim istraživanjima (185, 209), što se povezuje, ne samo s direktnim učinkom hipoksemije, nego i s volumnim opterećenjem u bolesnika s kroničnim plućnim srcem (210) te s gubitkom elastina (55).

Dinh-Xuan i sur. su *in vitro*, na uzorcima plućne arterije bolesnika s krajnjim stadijem KOPB-a kojima su transplantirana pluća, pokazali korelaciju, iako ne i uzročnu povezanost, oštećene vazodilatacije ovisne o endotelu i smanjenog  $\text{PaO}_2$ , što upućuje na to da kronična hipoksemija doprinosi oštećenju endotelne funkcije u bolesnika s KOPB-om (211).

Tremblay i sur. (134) su htjeli utvrditi kako povećano smično opterećenje u kombinaciji s hipoksijom, izazvanom brzim, pasivnim usponom na 3 800 m nadmorske visine, utječe na endotelnu funkciju u mladih, zdravih ljudi. Usponom je, u usporedbi s morskom razinom, došlo do značajne konstrikcije brahijalne arterije i posljedičnog povećanja SR-AUC uz nepromijenjeni FMD sugerirajući postojanje poremećaja endotelne funkcije u hipoksičnim uvjetima. Tome je u prilog govorila i inverzna korelacija početnog promjera brahijalne arterije i koncentracije cirkulirajućih MP-ova s porastom ukupnih i CD66b+ MP-ova podrijetlom iz neutrofila koji potencijalno pridonose osjetljivosti endotela na oscilirajuće smicanje. Učinci hipoksije su vjerojatno dijelom posredovani utjecajem povećanog simpatičkog tonusa na vazokonstrukciju perifernih provodnih arterija i povećano retrogradno smicanje (165). Kombinacija hipoksije i povećanog retrogradnog smicanja, izazvanog 30-minutnom inflacijom podlaktične manžete na 75 mm Hg, dovela je do smanjenja FMD-a na 3 800 m nadmorske visine, ali ne i na morskoj razini, sugerirajući povećanu osjetljivost endotela na oscilirajuće smično opterećenje u uvjetima akutne hipobarične hipoksije. Kako nije bilo korelacije SR-AUC-a i FMD-a, autori su zaključili da je smanjenje FMD-a uzrokovano poremećajem endotelne funkcije, a ne smanjenim intenzitetom podražaja. S druge strane, smanjenje FMD-a je koreliralo s porastom ukupnih i CD31+/CD41b- EMP-ova (biljega endotelne apoptoze) koji, doduše, nije bio statistički značajan.

Oštećenje endotelne funkcije u hipoksemičnih bolesnika s KOPB-om može se pokušati objasniti povećanim oksidacijskim stresom i smanjenom raspoloživošću NO-a te pojačanim simpatičkim tonusom posljedično dugotrajnoj izloženosti hipoksemiji.

$\text{CO}_2$  se smatra snažnim vazodilatatorom čiji su učinci u određenoj mjeri posredovani i NO-om (212). U usporedbi s cerebralnim, periferno krvožilje je manje osjetljivo na promjene  $\text{PaCO}_2$  i pH (213). U istraživanju de Mattheais i sur. (188), u bolesnika s akutnom egzacerbacijom KOPB-a i povišenim  $\text{PaCO}_2$ , standardno liječenje je dovelo do značajnog

povećanja vrijednosti pH te smanjenja PaCO<sub>2</sub> i FMD-a (%), pri čemu je utvrđena pozitivna korelacija FMD-a (%) i PaCO<sub>2</sub> te veće smanjenje FMD-a (%) u ispitanika s većom bazalnom vrijednošću. Ovi rezultati upućuju na zaključak da je vazodilatacija ovisna o endotelu, mjerena FMD-om, povećana tijekom hiperkapnije i ovisna o integritetu vaskularnog endotela.

## 1.9. Svrha istraživanja

Kako je prethodno spomenuto, u bolesnika s KOPB-om su utvrđeni poremećeni FMD i povišena razina cirkulirajućih EMP-ova, što ukazuje na disfunkcionalni endotel s *pro*-aterogenim fenotipom endotelnih stanica. Kompleksni mehanizmi koji su odgovorni za endotelnu disfunkciju u KOPB-u još su u značajnoj mjeri neistraženi.

U bolesnika s napredovalim KOPB-om i razvijenom kroničnom respiracijskom insuficijencijom do sada nije ispitivana hemodinamika brahijalne arterije. Također, nije ispitivana endotelna funkcija kao ni utjecaj poremećene hemodinamike na endotelnu funkciju u toj populaciji bolesnika.

Svrha ovog istraživanja je u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om ispitati utjecaj *pro*-aterogenog stimulusa, odnosno poremećaja protoka krvi u obliku oscilirajućeg smičnog opterećenja, na hemodinamiku brahijalne arterije i pokazatelje endotelne funkcije: FMD brahijalne arterije i razinu cirkulirajućih EMP-ova. Također planirano je istražiti ulogu kronične hipoksemije i njezine korekcije na hemodinamiku brahijalne arterije, endotelnu funkciju i učinke oscilirajućeg smičnog opterećenja.

Od rezultata ovog temeljnog istraživanja očekuje se doprinos boljem razumijevanju kompleksnih mehanizama koji su odgovorni za fiziologiju endotela u zdravih ljudi, odnosno za *pro*-aterogeni fenotip endotelnih stanica u bolesnika s napredovalim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom. Pokušalo se utvrditi kako poremećena hemodinamika, u vidu oscilirajućeg smičnog opterećenja, utječe na pokazatelje endotelne funkcije ionako oštećenog krvožilja ovih bolesnika. Time bi se dodatno razjasnila patofiziološka veza između KOPB-a i sustavne ateroskleroze kao glavne ekstrapulmonalne manifestacije bolesti. Rezultati ovog istraživanja također bi mogli rasvijetliti ulogu kronične hipoksemije u ekspresiji vulnerabilnog endotelnog fenotipa te utvrditi potencijalni dodatni protektivni učinak terapije kisikom.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE

### 2.1. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je ispitati u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom:

1. pogoršava li akutni poremećaj protoka krvi u obliku oscilirajućeg smičnog opterećenja endotelnu funkciju i
2. poboljšava li korekcija hipoksemije akutnim udisanjem kisika endotelnu funkciju i štiti li je od eventualnog pogoršanja induciranog oscilirajućim smičnim opterećenjem.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. ispitati bazalni obrazac smicanja (antegradni SR (aSR) i retrogradni SR (rSR)) brahijalne arterije, oscilirajući smični indeks (OSI), vazodilataciju posredovanu protokom (FMD) i razinu cirkulirajućih endotelnih mikročestica (EMP) u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom prije i nakon korekcije hipoksemije te ih usporediti sa zdravim ispitanicima,
2. ispitati utjecaj oscilirajućeg smičnog opterećenja (20-minutna inflacija podlaktične manžete na 75 mm Hg) na aSR i rSR brahijalne arterije, OSI, FMD i razinu cirkulirajućih EMP-ova u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom prije i nakon korekcije hipoksemije, uz usporedbu sa zdravim ispitanicima.

## 2.2. Hipoteze istraživanja

1. Retrogradna stopa smicanja (rSR) i oscilirajući smični indeks (OSI) su povišeni, FMD smanjen, a razina cirkulirajućih EMP-ova povišena u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Akutno povećanje retrogradnog smičnog opterećenja dodatno smanjuje FMD i povećava EMP-ove u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om.
3. Korekcija kronične hipoksemije u bolesnika sa stabilnim KOPB-om akutnim udisanjem kisika smanjuje utjecaj akutnog povećanja retrogradnog smičnog opterećenja na FMD i EMP-ove.

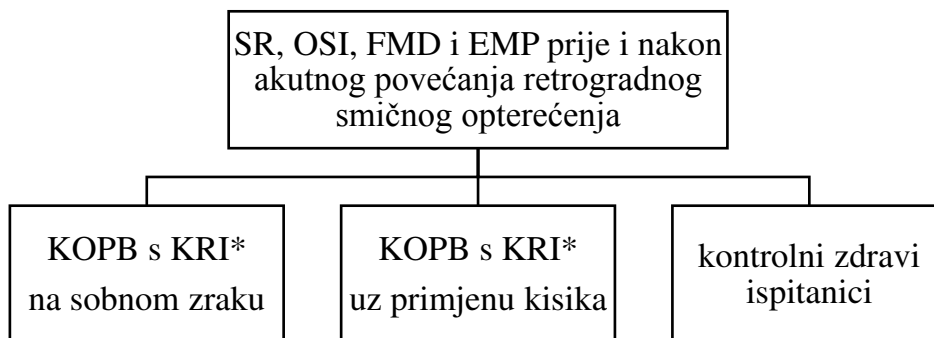
# 3. METODE

## 3.1. Organizacija istraživanja

Istraživanje je provedeno u laboratoriju Zavoda za integrativnu fiziologiju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu i u Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split. Radi se o eksperimentalnom nerandomiziranom istraživanju u kojem ispitivanu skupinu čine bolesnici sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom, a kontrolnu skupinu zdravi ispitanici.

Testiranju su podvrgnuti hipoksemični bolesnici s KOPB-om pri udisanju sobnog zraka i nakon 20-minutnog udisanja kisika preko nosnih vila, odnosno nakon postizanja normalne zasićenosti hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom ( $SpO_2 \geq 95\%$ ). Kontrolni normoksemični ispitanici su testirani samo tijekom udisanja sobnog zraka. U sve tri skupine određeni su SR i OSI kao hemodinamski pokazatelji te FMD i EMP-ovi kao biljezi endotelne funkcije prije i nakon akutnog povećanja retrogradnog smičnog opterećenja (Slika 3.).

**Slika 3.** Hodogram istraživanja



\*KRI-kronična respiracijska insuficijencija

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a registrirano je na *ClinicalTrials.gov* pod identifikatorom NCT03004352 22. prosinca 2016. god. Svi su postupci izvršeni u skladu s etičkim načelima Deklaracije iz Helsinkija i uz poštivanje profesionalnih standarda, zakona i konvencija koji reguliraju istraživanja na ljudima.

### 3.2. Ispitanici

Ispitivanu skupinu u istraživanju čine bolesnici sa stabilnim KOPB-om koji je dijagnosticiran i klasificiran prema „Globalnoj strategiji za dijagnostiku, liječenje i prevenciju kronične opstruktivske plućne bolesti (GOLD)” (1).

Opstrukcija protoka zraka u dišnim putovima utvrđena je spirometrijom, a definirana je omjerom *post*-bronhodilatacijskog FEV<sub>1</sub> i FVC-a <70% pri čemu je FEV<sub>1</sub>:

1. u blagom KOPB-u  $\geq 80\%$  pred.,
2. u umjerenom KOPB-u 50-79% pred.,
3. u teškom KOPB-u 30-49% pred., a
4. u vrlo teškom KOPB-u <30% ili <50% pred. ako je istovremeno prisutna i kronična respiracijska insuficijencija ili znaci kroničnog plućnog srca.

Urađena je također i kombinirana procjena KOPB-a prema intenzitetu zaduhe mjerene skalom mMRC i prema riziku od egzacerbacija procijenjenom temeljem vrijednosti FEV<sub>1</sub> i broja egzacerbacija u prethodnoj godini:

1. u skupini A su bolesnici s malo simptoma (mMRC <2) i malim rizikom od egzacerbacija (FEV<sub>1</sub>  $\geq 50\%$  i/ili  $\leq 1$  akutna egzacerbacija koja nije hospitalno liječena),
2. u skupini B su bolesnici s izraženim simptomima (mMRC  $\geq 2$ ) i malim rizikom od egzacerbacija (FEV<sub>1</sub>  $\geq 50\%$  i/ili  $\leq 1$  akutna egzacerbacija koja nije hospitalno liječena),
3. u skupini C bolesnici s malo simptoma (mMRC <2) i velikim rizikom od egzacerbacija (FEV<sub>1</sub> <50% i/ili >1 akutna egzacerbacija ili jedna akutna egzacerbacija ako je hospitalno liječena), a
4. u skupini D bolesnici s izraženim simptomima (mMRC  $\geq 2$ ) i velikim rizikom od egzacerbacija (FEV<sub>1</sub> <50% i/ili >1 akutna egzacerbacija ili jedna akutna egzacerbacija ako je hospitalno liječena).

U istraživanje su uključeni bolesnici s KOPB-om koji su zadovoljili sljedeće kriterije:

1. muškarci ili žene,
2. stariji od 40 godina,
3. dijagnoza KOPB-a po GOLD-u (1),
4. stabilni KOPB bez akutnih egzacerbacija u prethodnih 6 tjedana koje bi zahtijevale antimikrobnu terapiju, korekciju terapije KOPB-a ili posjet hitnoj službi,
5. kronična hipoksemija sa SpO<sub>2</sub> <90% u mirovanju, zabilježena najmanje dva puta u prethodnih 6 mjeseci i



## 6. negativni bronhodilatacijski test salbutamolom.

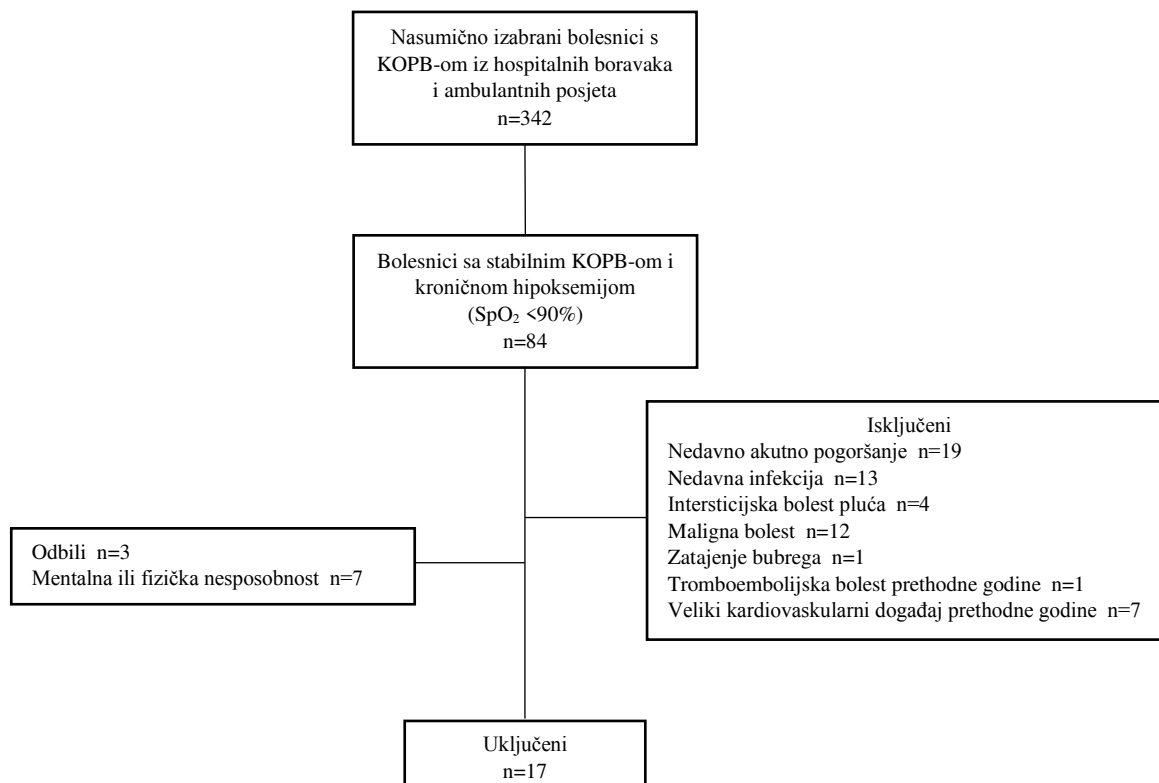
Isključeni su bolesnici s KOPB-om koji su u prethodnih 6 tjedana imali akutno pogoršanje, respiracijsku infekciju ili infekciju drugih lokalizacija, kao i bolesnici s relevantnom koegzistirajućom bolešću kao što su intersticijska bolest pluća, maligna bolest, zatajenje bubrega, tromboembolijska bolest ili veliki kardiovaskularni događaj tijekom prethodne godine.

Nakon pregleda arhivske medicinske dokumentacije bolesnika hospitaliziranih u Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split te dokumentacije bolesnika pregledanih u Polikliničkoj službi Klinike, na temelju kriterija uključenja i isključenja, izvršen je probir i kontaktirani su potencijalni ispitanici (Slika 4.).

Kontrolna skupina zdravih ispitanika nepušača odgovarajuće dobi, s normalnim spirometrijskim nalazom, regrutirana je među poznanicima osoblja Medicinskog fakulteta u Splitu i Kliničkog bolničkog centra Split te u lokalnoj općoj medicinskoj praksi.

U istraživanje je uključeno 17 bolesnika s KOPB-om i 10 zdravih ispitanika. Pisani informirani pristanak dali su svi sudionici nakon što su detaljno upoznati s protokolom istraživanja i svim planiranim postupcima te mogućim neželjenim događajima.

**Slika 4.** Dijagram toka izbora ispitanika



### 3.3. Postupci

#### 3.3.1. Anamneza i fizikalni pregled

Istraživanje je započeto uzimanjem anamnestičkih podataka od ispitanika. Utvrđen je pušački status i procijenjena izloženost duhanskom dimu računanjem broja pušačkih godina (engl. *pack-year*, PY = broj godina pušenja x broj popušanih cigareta na dan/20). Ispitano je postojanje pratećih bolesti i uzimanje lijekova. U bolesnika s KOPB-om prikupljeni su i podaci o terapiji kisikom, utvrđen je broj akutnih egzacerbacija u prethodnoj godini, a intenzitet zaduhe pri izvođenju svakodnevnih aktivnosti procijenjen je skalom mMRC u kojoj se stupanj zaduhe opisuje riječima kojima je pridružen broj od 0 do 4 (Prilog 1.).

Potom su izvršena antropometrijska mjerenja, odnosno izmjerena je tjelesna visina (V, cm) pomoću visinomjera te tjelesna masa (m, kg) pomoću digitalne vage. Indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI, kg/m<sup>2</sup>) je izračunat iz mase podijeljene kvadratom visine izražene u metrima.

$$\text{BMI} = \frac{m}{V^2}$$

Arterijski krvni tlak je izmjeren pomoću aneroidnog tlakomjera. Pri tome je manžeta, omotana oko nadlaktice, najprije napuhana iznad vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka, a onda su, tijekom deflacije manžete, stetoskopom osluškivani Korotkovljevi šumovi nad brahijalnom arterijom u kubitalnoj jami i određeni sistolički (engl. *systolic blood pressure*, SBP) i dijastolički (engl. *diastolic blood pressure*, DBP) arterijski krvni tlak (mm Hg). Iz izmjerenih vrijednosti je izračunat srednji arterijski krvni tlak (engl. *mean arterial pressure*, MAP, mm Hg).

$$\text{MAP} = \frac{1}{3} (\text{SBP} - \text{DBP}) + \text{DBP}$$

#### 3.3.2. Plinska analiza arterijske krvi i acidobazni status

U sklopu procjene plućne funkcije svakom je ispitaniku s KOPB-om urađena plinska analiza arterijske krvi i acidobazni status. Uzorak krvi za analizu je uzet u sjedećem položaju ispitanika pri udisanju sobnog zraka punkcijom radijalne arterije pomoću heparinizirane šprice volumena 3 mL. Dobiveni uzorak arterijske krvi volumena 0.5-1 mL je odmah po punkciji analiziran u uređaju *GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory, Lexington,*

MA, USA). Mjereni su sljedeći parametri: saturacija hemoglobina kisikom ( $\text{SaO}_2$ , %), parcijalni tlak kisika ( $\text{PaO}_2$ , kPa), parcijalni tlak ugljičnog dioksida ( $\text{PaCO}_2$ , kPa), kiselost (pH), bikarbonati ( $\text{HCO}_3^-$ , mmol/L) i hemoglobin (Hb, g/L).

### 3.3.3. Pulsna oksimetrija

Tijekom izvođenja istraživanja svakom je ispitaniku transkutano mjerena zasićenost hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom ( $\text{SpO}_2$ , %) pri čemu je senzor pulsne oksimetra stavljen na jagodicu prsta lijeve ruke. Korišten je uređaj *Poet II* (*Criticare Systems, Waukesha, WI, USA*).

### 3.3.4. Spirometrija

Spirometrija je jedna od metoda procjene plućne funkcije kojom se mjere volumeni i protoci udahnutog i izdahnutog zraka. Postupak je izvođen puhanjem kroz usnik u stojećem stavu uz instrukcije ispitivača prema smjernicama Američkog torakalnog društva i Europskog respiracijskog društva (214). Korišten je uređaj *Master Screen* (*Cardinal Health, Hoechberg, Germany*). Svaki je ispitanik izvršio najmanje tri reproducibilna mjerenja, a kao vrijednost promatranog pokazatelja uzeta je najveća izmjerena vrijednost izražena u postotku predviđene vrijednosti s obzirom na dob, spol, tjelesnu visinu i rasu (% pred.).

Izmjereni su sljedeći pokazatelji plućne funkcije, i to njihove *post*-bronhodilatacijske vrijednosti: FVC (forsirani vitalni kapacitet - maksimalni volumen zraka koji se forsirano, brzo i snažno izdahne nakon maksimalnog udaha),  $\text{FEV}_1$  (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi - maksimalni volumen zraka koji se izdahne u prvoj sekundi forsiranog izdaha nakon maksimalnog udaha) i  $\text{FEF}_{25-75}$  (forsirani ekspiracijski protok između 25% i 75% izdahnutog vitalnog kapaciteta). Na temelju izmjerenog *post*-bronhodilatacijskog  $\text{FEV}_1$  i FVC-a izračunat je omjer njihovih vrijednosti izraženih u litrama (*Tiffeneau*-ov indeks,  $\text{FEV}_1/\text{FVC}$ , %). U zdravih ispitanika  $\text{FEV}_1/\text{FVC}$  iznosi ~80%, a u bolesnika s KOPB-om <70%.

Radi procjene reverzibilnosti bronhalne opstrukcije svim ispitanicima je urađen farmakodinamski (bronhodilatacijski) test salbutamolom (Ventolin aerosol za inhalaciju, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska), odnosno spirometrija je urađena prije i 20 minuta nakon inhalacije 4 potiska od po 100  $\mu\text{g}$  salbutamola preko komorice za inhaliranje. Pozitivnim

nalazom smatran je porast FEV<sub>1</sub> ili FVC-a za 12% i 200 mL u odnosu na početnu vrijednost. Ispitanici s pozitivnim bronhodilatacijskim testom nisu uključeni u ovo istraživanje.

### 3.3.5. Hemodinamika brahijalne arterije

Brahijalna arterija pokusne desne ruke je longitudinalno vizualizirana oko 5 cm proksimalno od kubitalne jame. Brzina struje krvi u brahijalnoj arteriji ( $v$ , cm/s) i njezin promjer ( $D$ , cm) mjereni su duplex ultrazvukom (*Terason t3200TM*, *Teratech*, *Burlington, MA, USA*) s višefrekvencijskom linearnom sondom od 10 MHz. Isti prilagođeni softver za detekciju rubova i praćenje stijenki krvnih žila korišten je pri simultanom mjerenju brzine struje krvi u brahijalnoj arteriji i njezinog promjera frekvencijom od 30 Hz. Određen je prosječni promjer arterije tijekom cijelog srčanog ciklusa jer su prethodna istraživanja pokazala da je u tom slučaju FMD gotovo jednak kao i kada se koristi teledijastolički promjer arterije (103).

Kako krivulja brzine struje krvi otprilike odgovara paraboli, uz pomoć površine ispod pozitivne defleksije (antegradni protok) i površine iznad negativne defleksije (retrogradni protok), odnosno softverskim izračunom integrala brzine po vremenu, izračunate su prosječna srednja antegradna, srednja retrogradna i srednja ukupna brzina struje krvi tijekom cijelog srčanog ciklusa.

Iz spomenutih brzina struje krvi u brahijalnoj arteriji ( $v$ , cm/s) te njezinog promjera ( $D$ , cm) izračunate su odgovarajuće stope smicanja: antegradni SR ( $aSR$ , s<sup>-1</sup>), retrogradni SR ( $rSR$ , s<sup>-1</sup>) odnosno srednji SR (engl. *mean SR*,  $mSR$ , s<sup>-1</sup>) (84, 94, 96).

$$SR = 4 \times \frac{v}{D}$$

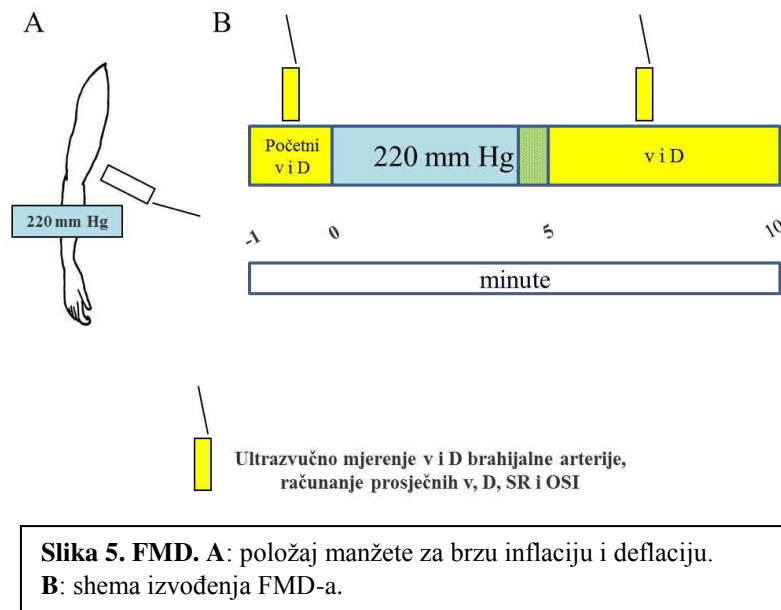
Oscilirajući smični indeks (OSI), kao pokazatelj veličine smičnih oscilacija, izračunat je iz  $aSR$ -a i  $rSR$ -a.

$$OSI = \frac{|rSR|}{aSR + |rSR|}$$

### 3.3.6. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD)

FMD brahijalne arterije je na pokusnoj ruci procijenjen prije i nakon intervencije oscilirajućim smičnim opterećenjem prema međunarodnim smjernicama (76, 96). Manžeta za

mjerenje arterijskog krvnog tlaka, koja je korištena za brzu inflaciju i deflaciju, postavljena je na podlakticu pokusne ruke neposredno distalno od olekranona (Slika 5.).



Početni ultrazvučni prikaz brzine krvne struje u brahijalnoj arteriji i promjer brahijalne arterije je kontinuirano sniman tijekom 1 minute prije inflacije manžete te su izračunati prosječna srednja vrijednost antegradne, retrogradne i ukupne brzine struje krvi po srčanom ciklusu ( $v$ , cm/s), početni promjer arterije ( $D_0$ , cm), aSR, rSR i mSR ( $s^{-1}$ ) te OSI.

Potom je podlaktičnom manžetom napuhanom na 220 mm Hg tijekom 5 minuta izazvana okluzija radijalne arterije. Kontinuirano mjerenje brzine krvne struje i promjera brahijalne arterije ponovno je započeto 30 s prije i nastavljeno 5 minuta nakon deflacije podlaktične manžete. Vršni promjer arterije ( $D_{max}$ ) nakon deflacije manžete detektiran je automatski. Vrijeme do vršnog promjera ( $s$ ) odnosi se na vrijeme proteklo od trenutka deflacije manžete do postizanja maksimalnog promjera nakon deflacije (92). Iz podataka o promjeru arterije izračunati su apsolutni porast promjera (FMD (mm)) i relativni porast promjera (FMD (%)), u odnosu na početni promjer ( $D_0$ ).

Apsolutni porast promjera, FMD (mm)

$$FMD (mm) = D_{max} - D_0$$

Relativni porast promjera, FMD (%)

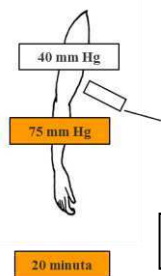
$$FMD (%) = \frac{D_{max} - D_0}{D_0} \times 100$$

U skladu s preporukama, intenzitet hiperemičnog podražaja, odnosno smičnog opterećenja odgovornog za FMD nakon deflacije manžete, određen je iz površine ispod krivulje mSR-a

(engl. *shear rate-area under curve*, SR-AUC,  $s^{-1} \times s$ ) od trenutka deflacije manžete do trenutka postizanja vršnog promjera brahijalne arterije (98).

### 3.3.7. Oscilirajuće smično opterećenje (intervencija)

Akutno povećanje retrogradnog smičnog opterećenja, odnosno oscilirajuće smično opterećenje (u daljnjem tekstu intervencija), izazvano je primjenom modificiranog okluzijskog modela Jenkinsa i sur. (137) (Slika 6.). Pri tome je pneumatska manžeta, smještena neposredno distalno od olekranona pokusne ruke, napuhana na 75 mm Hg. Istovremeno je druga pneumatska manžeta, postavljena blizu aksile, napuhana na 40 mm Hg kako bi se olakšalo hvatanje cirkulirajućih MP-ova. Objе manžete su bile napuhane tijekom 20 minuta.



Slika 6. Indukcija oscilirajućeg smičnog opterećenja (intervencija)

### 3.3.8. Mjerenje koncentracije MP-ova u plazmi

Uzorci periferne venske krvi su uzeti u epruvete *Cyto-chex* od 8 mL (*Streck, Inc., Medimark Europe, Grenoble, France*), kodirani i poslani brzom poštom na Sveučilište Maryland u SAD-u gdje su sve analize obavljene u roku od 48 sati od dolaska, pri čemu je laboratorij bio zaslijepljen. Značajke MP-ova se ne mijenjaju kada se uzorci, pohranjeni na temperaturi od 4°C ili sobnoj temperaturi, obrade u roku od 3 tjedna od prikupljanja (215). Krv je centrifugirana 5 minuta na 1 500 g, supernatant je pomiješan s etilen-diamino-tetraoctenom kiselinom koncentracije 12.5 mM (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), a zatim centrifugiran na 15 000 g tijekom 30 minuta. Alikvoti dobivenog supernatanta na 15 000 g su inkubirani s obilježenim protutijelima na MP-ove i analizirani protočnom citometrijom.

Kako EMP-ovi pupaju s endotelnih stanica, tako se na njihovoj površini izlažu negativno nabijeni ostaci fosfatidil-serina na koji se sekundarno veže aneksin V. Stoga su EMP-ovi definirani kao mikročestice promjera do 1  $\mu\text{m}$  pozitivne na aneksin V (145, 215) koje izražavaju:

- **CD31** (adhezijska molekula trombocita i endotelnih stanica-1, engl. *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1), ali ne i **CD41** ( $\alpha$ -lanac-IIb integrina specifičnog za trombocite) - CD31+/CD41-

ili izražavaju

- **CD62E** (E-selektin, adhezijska molekula endotelne stanice i leukocita-1, engl. *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*, ELAM-1) - CD62E+.

Mjerene su i mikročestice pozitivne na aneksin V koje izražavaju:

- **CD142** (tkivni čimbenik, TF),
- **CD66b** (engl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-8*, CEACAM-8),
- **CD14**,
- **nitrotirozin** i
- **von Willebrandov faktor** (vWF).

Analiza mikročestica protočnom citometrijom provedena je uređajem s trostrukim laserom i 8 boja *MACSQuant* (Miltenyi Biotec Corp., Auburn, CA) uz pomoć softvera proizvođača. Svi reagensi i otopine za analizu mikročestica su bili sterilni i filtrirani filterom od 0.2 µm. MP-ovi su obojani protutijelom za aneksin V i analizirani kao što je prethodno opisano, uz procjenu veličine čestica pomoću mikrokuglica s promjerima od 0.3 µm (*Sigma, Inc.*), 1.0 µm i 3.0 µm (*Spherotech, Inc., Lake Forest, IL*) (215). Površinski biljezi su analizirani uz pomoć *Fluorescence-Minus-One Control Test*. Prethodno je kod ponavljanih analiza istih uzoraka varijabilnost rezultata iznosila <5%. Analiziran je i kontrolni uzorak da bi se osiguralo ispravno postavljanje ograda (engl. *gating*) te suspenzija polistirenskih fluorescentnih mikrokuglica radi ispravnog brojenja mikročestica. Koncentracija MP-ova u plazmi izražena je njihovim brojem po µL.

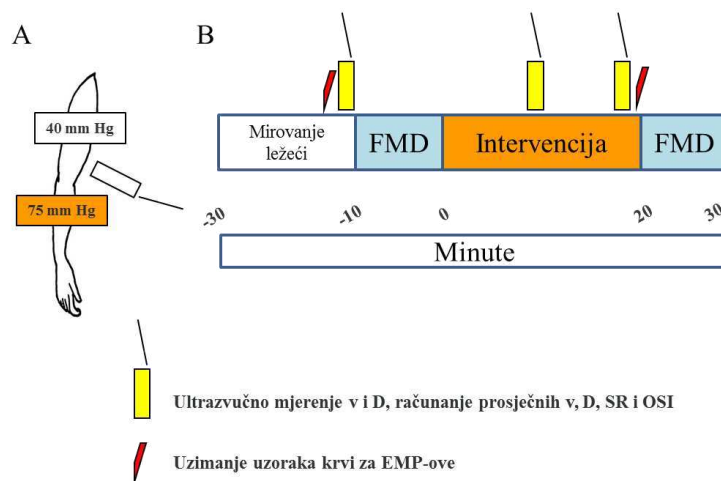
### 3.3.9. Protokol istraživanja

Nakon što su detaljno upoznati sa svrhom i protokolom istraživanja, svim planiranim postupcima i mogućim neželjenim događajima, svi sudionici su dali pisani informirani pristanak. Upućeni su da 4 sata prije testiranja ne jedu te da se unutar 12 sati do dolaska u laboratorij suzdrže od tjelovježbe, uzimanja alkohola i kofeina. Pušači su upućeni da ne puše 8 sati prije testiranja. Bolesnici i kontrolni ispitanici su na dan sudjelovanja u istraživanju uzimali svoju redovnu terapiju uobičajenim režimom.

Po dolasku ispitanika u laboratorij Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu dopunjeni su potrebni anamnestički podaci te je obavljen fizikalni pregled u

okviru kojeg su provedena antropometrijska mjerenja. Nakon toga je urađena spirometrija, a ispitanicima s KOPB-om još i plinska analiza arterijske krvi te acidobazni status.

Svi su postupci izvođeni u otprilike isto vrijeme u jutarnjim satima, u tihoj prostoriji kontrolirane temperature (20-22°C), pri čemu je ispitanik bio u ležećem položaju na leđima, s rukama ispruženim i pod kutom od 80° prema trupu. Po jedan venski kateter je postavljen u kubitalnu venu desne (pokusne) i lijeve (kontrolne) ruke, a pneumatske manžete aneroidnih tlakomjera su postavljene na nadlakticu i podlakticu desne ruke. Senzor pulsno oksimetra postavljen je na jagodicu kažiprsta lijeve ruke i tijekom cijelog testa je transkutano mjerena zasićenost hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom (SpO<sub>2</sub>, %). Nakon mirovanja u ležećem položaju, u trajanju od 20 minuta, izmjeren je arterijski krvni tlak na lijevoj ruci. Slijedilo je uzimanje uzoraka venske krvi iz obje ruke radi određivanja cirkulirajućih MP-ova, potom mjerenje hemodinamskih parametara brahijalne arterije i naposljetku je izveden bazalni FMD na pokusnoj desnoj ruci (Slika 7.).



**Slika 7. Prikaz protokola.** A: položaj manžeta kojima je izazvano oscilirajuće smično opterećenje (distalna manžeta - 75 mm Hg) i olakšano hvatanje endotelnih mikročestica (proksimalna manžeta - 40 mm Hg). B: shema protokola.

Neposredno nakon ovih mjerenja uslijedila je intervencija, odnosno izazvano je oscilirajuće smično opterećenje parcijalnom okluzijom radijalne arterije prema modificiranom modelu primijenjenom u radu Jenkinsa i sur. (137). Retrogradni je protok induciran tako što je pneumatska manžeta, smještena neposredno distalno od olekranona pokusne ruke, napuhana na 75 mm Hg. Istovremeno je druga pneumatska manžeta, postavljena blizu aksile, napuhana na 40 mm Hg kako bi se olakšalo hvatanje cirkulirajućih MP-ova. Obje manžete su bile napuhane tijekom 20 minuta. Na kontralateralnoj (kontrolnoj) ruci nije bilo manžete tijekom



intervencije. Hemodinamski parametri brahijalne arterije izmjereni su u 10. i 20. minuti intervencije, a novi uzorci venske krvi su uzeti iz pokusne i kontrolne ruke neposredno prije deflacije manžete. Pet minuta nakon deflacije manžete ponovljeno je mjerenje hemodinamskih parametara brahijalne arterije, potom FMD i mjerenje arterijskog krvnog tlaka.

Premda se ne očekuje da 20-minutna inflacija manžete na 75 mm Hg izazove ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, eventualna kontaminacija uzoraka periferne venske krvi krvlju, iz distalne ishemične regije, procijenjena je mjerenjem koncentracije laktata u krvi iz pokusne ruke na početku i na kraju inflacije manžete. FMD na kontralateralnoj ruci kao unutarnjoj kontroli nije mjereno budući da prethodnim istraživanjima nisu uočene promjene u obrascu SR-a ili FMD-u (%) (137, 161, 163, 164).

Opisanom testiranju podvrgnuti su bolesnici s KOPB-om najprije pri udisanju sobnog zraka te nakon 20-minutnog udisanja kisika protokom ~3 L/min preko nosnih vila s ciljem normalizacije zasićenosti hemoglobina periferne arterijske krvi kisikom odnosno postizanja  $SpO_2 \geq 95\%$  koji je održavan u drugom dijelu ispitivanja. Suprotno smjericama za terapiju kisikom oboljelih od KOPB-a prema kojima je ciljani  $SpO_2$  88-92% (216), u ovom je istraživanju kratkotrajno primijenjen kisik s ciljem postizanja  $SpO_2 \geq 95\%$  da bi se omogućila usporedba s kontrolnim normoksemičnim ispitanicima koji su testirani samo tijekom udisanja sobnog zraka. Naime, primjena kisika u zdravih osoba može dovesti do višestrukih fizioloških reakcija kao što su promijenjeni tonus simpatičkog živčanog sustava (217), povećani oksidacijski stres (218), promjena bioraspoloživosti NO-a (219) i periferne vaskularne funkcije (220). To bi predstavljalo zbunjujući čimbenik u usporedbi s oboljelima od KOPB-a.

### 3.4. Statistička analiza

Za izračun veličine uzorka korišten je *Power/Sample Size Calculator*. S obzirom na normalnu raspodjelu, koja je testirana Shapiro-Wilkovim testom, svi su mjereni parametri prikazani kao kvantitativni podaci u obliku srednje vrijednosti (engl. *mean*, M)  $\pm$  standardna devijacija (SD) sa statističkom značajnošću postavljenom na  $p < 0.05$ .

Za analizu SR-a i OSI-a korištena je trosmjerna ANOVA kako bi se utvrdila razlika između ispitanika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika, između udisanja sobnog zraka i kisika u ispitanika s KOPB-om te učinak intervencije (inflacije podlaktične manžete) na SR i OSI (prije intervencije, u 10. i 20. minuti intervencije).

Odnos između bazalnog FMD-a i bazalnog rSR-a u bolesnika i kontrolnih ispitanika testiran je Pearsonovim testom korelacije.

Učinak intervencije i normalizacije oksigenacije periferne arterijske krvi na FMD u ispitanika s KOPB-om procijenjen je pomoću dvosmjerne ANOVA-e za ponovljena mjerenja (čimbenici: udisanje sobnog zraka vs. kisika i prije vs. poslije intervencije). Učinak intervencije i normalizacije oksigenacije na koncentraciju MP-ova pokusne i kontrolne ruke procijenjen je pomoću Friedmanove analize varijance rangova za ponovljena mjerenja. Ako je utvrđen glavni učinak, urađeni su *post-hoc* t-testovi pomoću Tukeyeve HSD korekcije za višestruke usporedbe.

Učinak intervencije na FMD u kontrolnih ispitanika koji su udisali sobni zrak procijenjen je pomoću dvosmjernog t-testa za povezane uzorke. Učinak intervencije na koncentraciju MP-ova u kontrolnih ispitanika je analiziran dvosmjernom ANOVA-om miješanog dizajna (čimbenik između subjekata: kontrolna vs. pokusna ruka; čimbenik unutar subjekta: prije vs. poslije intervencije).

Da bi uzeli u obzir razlike u podražaju, FMD je uspoređen korištenjem dvosmjerne ANCOVA-e (prije vs. poslije intervencije, udisanje sobnog zraka vs. kisika) u ispitanika s KOPB-om s logaritamski preinačenim početnim promjerom brahijalne arterije ( $D_0$ ) i površinom ispod krivulje SR-a (SR-AUC) kao kovarijancama. Ako je utvrđen glavni učinak ili interakcija, izvedeni su *post-hoc* t-testovi pomoću Bonferronijeve korekcije za višestruke usporedbe. Učinci MAP-a, SpO<sub>2</sub> i FEV<sub>1</sub>/FVC na bazalni FMD te odgovor FMD-a na intervenciju i suplementaciju kisika su testirani kao kovarijance. Cohenovim *d* je izračunata veličina učinka razlike između aritmetičkih sredina dviju populacija.

Statistička analiza svih podataka je urađena pomoću aplikacije *Statistica* (verzija 8.0, Statsoft Inc., Tulsa, USA).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 27 ispitanika, od čega je njih 17 činilo ispitivanu skupinu bolesnika s KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom, a 10 ispitanika je bilo u kontrolnoj skupini zdravih nepušača. Obilježja ispitivane populacije su prikazana u Tablicama 3., 4. i 5.

Prosječna dob ispitanika s KOPB-om je iznosila  $69\pm 8$  godina, a kontrolnih ispitanika  $65\pm 7$  godina. Svi osim jednog ispitanika s KOPB-om su imali tešku ili vrlo tešku opstrukciju protoka zraka u dišnim putovima mjereno  $FEV_1$  (% pred.) i  $FEV_1/FVC$  (%) ( $31.8\pm 11.0$ , odnosno  $45.9\pm 10.1$ ), dok su vrijednosti navedenih parametara u kontrolnih ispitanika bile unutar normalnog raspona ( $107.3\pm 22.5$ , odnosno  $77.7\pm 6.0$ ). Težina bronhalne opstrukcije je u jednog bolesnika s KOPB-om odgovarala stupnju 2 prema GOLD-u, u šest bolesnika stupnju 3 i u deset bolesnika stupnju 4. Uzevši u obzir intenzitet zaduhe i učestalost egzacerbacija svi su bolesnici s KOPB-om klasificirani u skupinu D, osim jednog koji je bio u skupini B. Među ispitanicima s KOPB-om bila su četiri (23.5%) pušača, dok među kontrolnim ispitanicima nije bilo pušača. Četrnaest od 17 ispitanika s KOPB-om (82.4%) bilo je na trajnoj kućnoj terapiji kisikom koji je u svim slučajevima primjenjivan putem koncentratora kisika i nosnih vila protokom od 1-2 L/min. Ispitanici s KOPB-om nisu koristili kisik  $6.5\pm 5.8$  h prije dolaska u laboratorij. Prosječni bazalni  $SpO_2$  ispitanika s KOPB-om iznosio je  $88.2\pm 3.7\%$ , a kontrolnih ispitanika  $96.4\pm 1.0\%$ .

**Tablica 3.** Socio-demografska i antropometrijska obilježja, pušački status, popratne bolesti i terapija ispitanika

	Kontrolni ispitanici (n=10)	KOPB (n=17)
Dob (godine), M±SD	65.3±7.3	69.0±8.1
Spol (muški), n (%)	7(70.0)	11(64.7)
Visina (cm), M±SD	174.5±9.0	170.6±8.0
Masa (kg), M±SD	89.1±13.3	76.5±16.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), M±SD	29.3±4.0	26.2±5.2
<i>Pušački status, n (%)</i>		
Pušač	0(0.0)	4(23.5)
Bivši pušač	4(40.0)	11(64.7)
Nepušač	6(60.0)	2(11.8)
Pušačke godine (PY), M±SD	28.8±22.5	54.3±62.8
Arterijska hipertenzija, n (%)	4(40.0)	11(64.7)
Šećerna bolest, n (%)	1(10.0)	3(17.6)
Koronarna arterijska bolest, n (%)	0(0.0)	1(5.9)
Periferna arterijska bolest, n (%)	0(0.0)	2(11.8)
<i>Lijekovi, n (%)</i>		
β-blokatori	1(10.0)	4(23.5)
Blokatori kalcijevih kanala	0(0.0)	3(17.6)
ACEI ili ARB	0(0.0)	8(47.1)
Diuretici	1(10.0)	12(70.6)
Statini	0(0.0)	1(5.9)
Acetilsalicilna kiselina	0(0.0)	2(11.8)
Inhalacijski kortikosteroidi	0(0.0)	14(82.4)
Sustavni kortikosteroidi	0(0.0)	1(5.9)
Kratkodjelujući β <sub>2</sub> -agonisti	0(0.0)	4(23.5)
Dugodjelujući β <sub>2</sub> -agonisti	0(0.0)	17(100.0)
Kratkodjelujući antikolinergici	0(0.0)	3(17.6)
Dugodjelujući antikolinergici	0(0.0)	13(76.5)
Teofilin	0(0.0)	7(41.2)
Roflumilast	0(0.0)	2(11.8)
Metil-digoksin	0(0.0)	1(5.9)
Ivabradin	0(0.0)	1(5.9)
Trajna terapija kisikom	0(0.0)	14(82.4)

M = srednja vrijednost, SD = standardna devijacija.

BMI = indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), PY = pušačke godine (engl. *pack-year*), ACEI = inhibitor enzima koji konvertira angiotenzin (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitor*), ARB = blokator angiotenzinskih receptora (engl. *angiotensin II receptor blocker*).

**Tablica 4.** Arterijski krvni tlak, spirometrija i SpO<sub>2</sub> ispitanika

	Kontrolni ispitanici (n=10)	KOPB (n=17)
SBP (mm Hg)	133.0±18.7	133.2±21.8
DBP (mm Hg)	84.0±7.4	78.8±12.6
FEV <sub>1</sub> (% pred.)	107.3±22.5	31.8±11.0
FVC (% pred.)	110.8±24.6	52.3±10.8
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	77.7±6.0	45.9±10.1
FEF <sub>25-75</sub> (% pred.)	88.9±23.4	10.9±4.3
SpO <sub>2</sub> (%)	96.4±1.0	88.2±3.7

Prikazani su srednja vrijednost ± standardna devijacija.

SBP = sistolički krvni tlak (engl. *systolic blood pressure*), DBP = dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*), FEV<sub>1</sub> = forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi, FVC = forsirani vitalni kapacitet (engl. *forced vital capacity*), FEF<sub>25-75</sub> = forsirani ekspiracijski protok (engl. *forced expiratory flow*) između 25% i 75% FVC-a, SpO<sub>2</sub> = transkutano mjerena saturacija hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom.

**Tablica 5.** Plinska analiza arterijske krvi i acidobazni status te obilježja bolesti ispitanika s KOPB-om

	KOPB (n=17)
SaO <sub>2</sub> (%)	88.2±3.7
PaO <sub>2</sub> (kPa)	7.2±0.9
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	6.3±1.0
pH	7.42±0.03
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	30.5±4.9
Hb (g/L)	142.9±15.1
Period ispiranja O <sub>2</sub> (h)	6.5±5.8
<i>Stupanj bronhalne opstrukcije po GOLD-u*</i>	
Stadij 1	0 (0.0)
Stadij 2	1 (5.9)
Stadij 3	6 (35.3)
Stadij 4	10 (58.8)
Stupanj zaduhe (mMRC)	3.4±0.6
Akutne egzacerbacije u prethodnih 12 mjeseci ≥2*	12 (70.6)
<i>Kombinirana procjena KOPB-a*</i>	
Skupina A	0 (0.0)
Skupina B	1 (5.9)
Skupina C	0 (0.0)
Skupina D	16 (94.1)

Prikazani su srednja vrijednost ± standardna devijacija osim \*n (%).

SaO<sub>2</sub> = saturacija hemoglobina periferne arterijske krvi kisikom, PaO<sub>2</sub> = parcijalni tlak kisika u perifernoj arterijskoj krvi, PaCO<sub>2</sub> = parcijalni tlak ugljičnog dioksida u perifernoj arterijskoj krvi, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = aktualna koncentracija bikarbonata u perifernoj arterijskoj krvi, Hb = hemoglobin, GOLD = Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, mMRC = *modified Medical Research Council*.

Bazalne vrijednosti sistoličkog (SBP), dijastoličkog (DBP) i srednjeg arterijskog tlaka (MAP) se nisu razlikovale među skupinama niti je u pojedinoj skupini bilo razlike nakon intervencije u odnosu na bazalne vrijednosti (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Arterijski krvni tlak i SpO<sub>2</sub> ispitanika prije i nakon intervencije<sup>§</sup>

	KOPB - sobni zrak		KOPB - O <sub>2</sub>		Kontrolni ispitanici - sobni zrak	
	Prije intervencije	Nakon intervencije	Prije intervencije	Nakon intervencije	Prije intervencije	Nakon intervencije
SBP (mmHg)	130.9±18.3	131.2±17.5	130.0±17.8	133.2±21.1	132.5±18.7	133.5±18.3
DBP (mmHg)	78.2±11.9	77.6±9.7	77.9±9.8	79.2±13.3	83.0±7.1	84.0±7.0
MAP (mmHg)	95.8±13.5	95.5±11.5	95.3±11.9	97.2±15.4	99.5±10.8	100.5±10.4
SpO <sub>2</sub> (%)	88.1±3.8	87.9±3.7	97.1±1.2*	97.1±0.9*	96.8±1.0 <sup>†</sup>	96.9±0.9 <sup>†</sup>

Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

SBP = sistolički krvni tlak (engl. *systolic blood pressure*), DBP = dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*), MAP = srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*), SpO<sub>2</sub> = transkutano mjerena saturacija hemoglobina periferne kapilarne krvi kisikom.

§ označava 20-minutnu inflaciju podlaktične manžete na 75 mm Hg i nadlaktične manžete na 40 mm Hg,

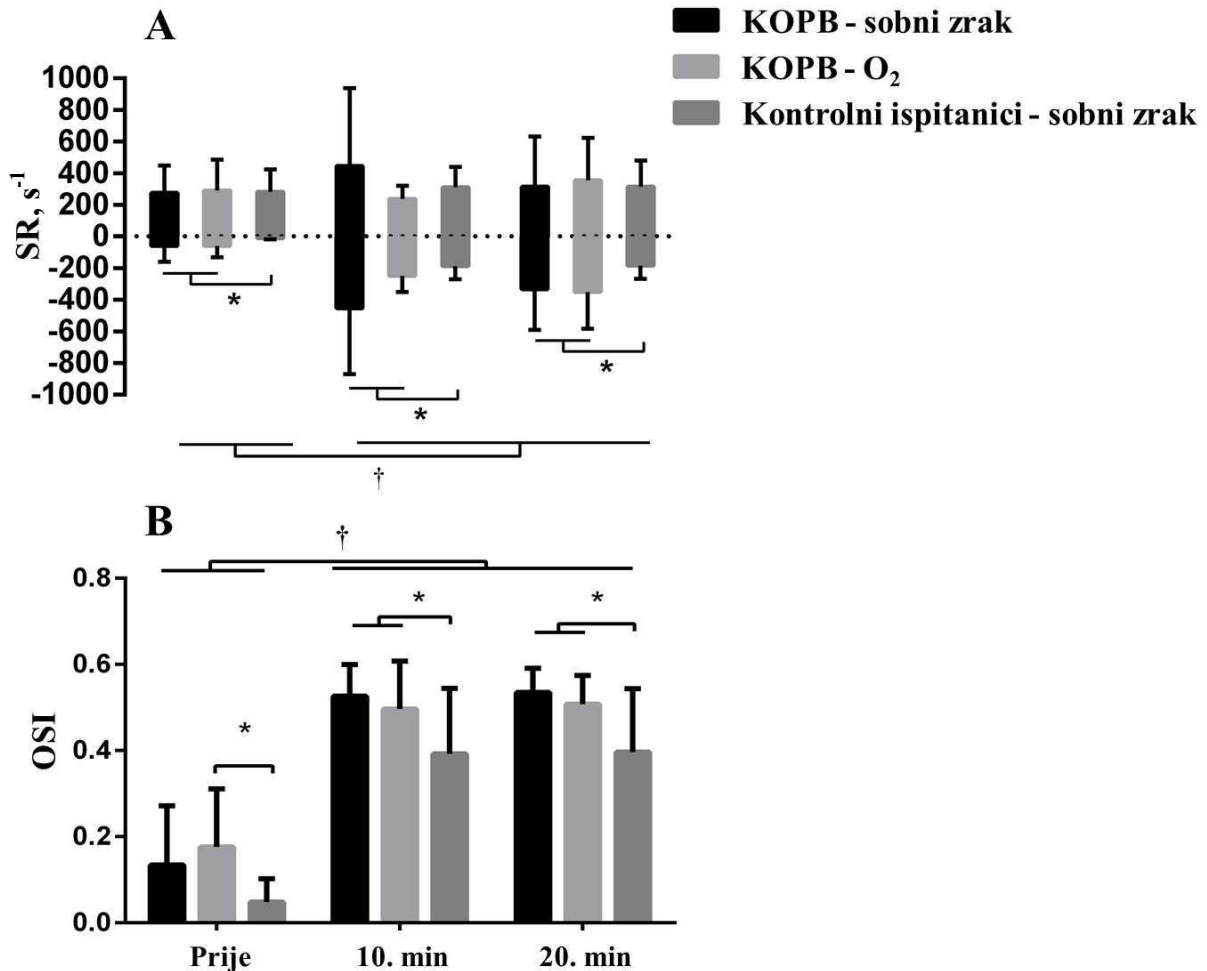
\* označava značajnu razliku između udisanja sobnog zraka i kisika u ispitanika s KOPB-om (prije i nakon intervencije) (p<0.05),

† označava značajnu razliku između ispitanika s KOPB-om i zdravih ispitanika na sobnom zraku (prije i nakon intervencije) (p<0.05).

#### 4.2. Stopa smicanja (SR) i oscilirajući smični indeks (OSI)

Obrasci SR-a prije intervencije, u 10. te u 20. minuti intervencije, značajno su se razlikovali između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika (Slika 8.). Naime, u bolesnika s KOPB-om je utvrđen veći rSR, kako prije, tako i nakon korekcije hipoksemije (p<0.05). U bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika 10-minutna i 20-minutna inflacija manžete na 75 mm Hg je značajno povećala rSR (p<0.05), ali nije utjecala na aSR (p>0.05).

Paralelno s povećanjem rSR-a izazvanim inflacijom podlaktične manžete, značajno je povećan OSI u svim skupinama (p<0.01). Razlike u OSI-u između skupina te prije i tijekom intervencije oscilirajućim smicanjem odgovarale su razlikama u rSR-u s jednom iznimkom. Naime, OSI je bio manji u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesnike s KOPB-om (p<0.05), osim u usporedbi s KOPB-om tijekom udisanja sobnog zraka prije intervencije gdje razlika nije bila statistički značajna (p>0.05).



**Slika 8.** Obrasci stope smicanja (SR, panel A) i oscilirajući smični indeks (OSI, panel B) prije i tijekom (10. i 20. minuta) intervencije na pokusnoj ruci inflacijom podlaktične manžete na 75 mm Hg i nadlaktične manžete na 40 mm Hg.

Vrijednosti antegradnog i retrogradnog SR-a i OSI-a prikazani su za bolesnike s KOPB-om na sobnom zraku (crno), za bolesnike s KOPB-om tijekom udisanja kisika (svijetlo sivo) i za kontrolne ispitanike (tamno sivo). Linije pogreške predstavljaju standardnu devijaciju (SD).

\* označava značajnu razliku između skupina ( $p < 0.05$ ),

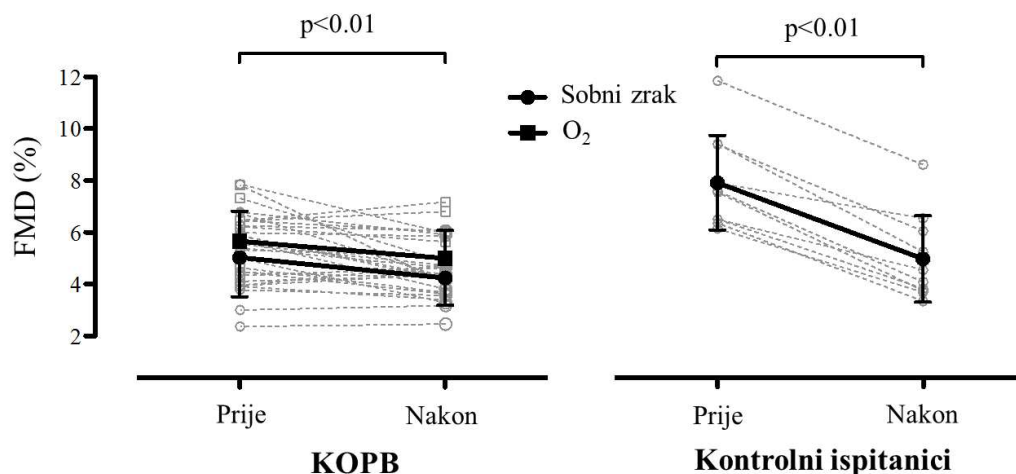
† označava značajnu razliku u odnosu na bazalnu vrijednost ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Vazodilatacija posredovana protokom (FMD)

Bazalni je FMD (%) bio 36% niži u bolesnika s KOPB-om tijekom udisanja sobnog zraka nego u kontrolnih ispitanika ( $5.03 \pm 1.51\%$  vs.  $7.88 \pm 1.81\%$ ,  $p < 0.05$ ), a 28% niži u bolesnika s KOPB-om tijekom udisanja kisika nego u kontrolnih ispitanika ( $5.66 \pm 1.16\%$  vs.  $7.88 \pm 1.81\%$ ,  $p < 0.05$ ). MAP kao kovarijanca nije imao utjecaja na značajnost razlike bazalnih FMD-ova (%) ( $F = 0.048$ ,  $p > 0.05$ ), dok je utjecaj  $FEV_1/FVC$  i  $SpO_2$  kao kovarijanci bio

značajan ( $F=6.588$ ,  $p<0.05$ , parcijalni  $\eta^2=0.223$ , odnosno  $F=22.131$ ,  $p<0.01$ , parcijalni  $\eta^2=0.490$ ). Utvrđena je umjerena korelacija bazalnog FMD-a (%) i bazalnog rSR-a u bolesnika s KOPB-om na sobnom zraku ( $r=-0.573$ ,  $p=0.07$ ), dok u kontrolnoj skupini nije bilo korelacije ( $r=0.009$ ,  $p=0.98$ ).

Intervencijom uzrokovano povećanje retrogradnog smičnog opterećenja dovelo je do značajnog smanjenja FMD-a (mm) i FMD-a (%), ali i SR-AUC-a u svim skupinama, uključujući bolesnike s KOPB-om nakon normalizacije oksigenacije ( $p<0.01$ ) (Slika 9., Tablica 7.). Ovaj učinak intervencije je utvrđen i kad su početni promjer brahijalne arterije ( $D_0$ ) i SR-AUC uključeni kao kovarijance. Ni MAP, ni  $FEV_1/FVC$ , ni  $SpO_2$  kao kovarijance nisu imali značajni utjecaj na odgovor FMD-a (%) na oscilirajuće smično opterećenje: MAP ( $F=0.510$ ,  $p>0.05$ ),  $FEV_1/FVC$  ( $F=0.014$ ,  $p>0.05$ ) i  $SpO_2$  ( $F=0.639$ ,  $p>0.05$ ). U bolesnika s KOPB-om, MAP i  $FEV_1/FVC$  kao kovarijance nisu imali značajni utjecaj na odgovor FMD-a (%) na povećano retrogradno smicanje tijekom udisanja kisika u usporedbi s udisanjem sobnog zraka ( $F=2.531$ ,  $p>0.05$ , odnosno  $F=3.539$ ,  $p>0.05$ ), dok je utjecaj  $SpO_2$  bio značajan ( $F=5.006$ ,  $p<0.05$ , parcijalni  $\eta^2=0.152$ ). Nakon uključenja  $D_0$  i SR-AUC kao kovarijanci, FMD (%) je bio značajno veći tijekom normalizacije oksigenacije nego pri udisanju sobnog zraka u bolesnika s KOPB-om i prije i nakon intervencije. Korekcija hipoksemije je istovremeno dovela do značajnog smanjenja SR-AUC-a, kako prije tako i nakon intervencije.



**Slika 9.** FMD (%) u bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika prije i nakon intervencije na pokusnoj ruci inflacijom podlaktične manžete na 75 mmHg i nadlaktične manžete na 40 mm Hg. Intervencija je dovela do značajnog smanjenja FMD-a (%) u svim skupinama ( $p<0.01$ ).



U bolesnika s KOPB-om intervencijom izazvano smanjenje FMD-a (%) od 16% tijekom udisanja sobnog zraka ( $5.03 \pm 1.51\%$  vs.  $4.24 \pm 1.09\%$ ,  $p < 0.05$ ), odnosno 12% tijekom udisanja kisika ( $5.66 \pm 1.16\%$  vs.  $5.00 \pm 1.08\%$ ,  $p < 0.05$ ), imalo je umjerenu veličinu učinka (0.60, odnosno 0.59). Smanjenje FMD-a (%) od 37% u kontrolnoj skupini ( $7.88 \pm 1.81\%$  vs.  $4.95 \pm 1.66\%$ ,  $p < 0.05$ ) imalo je veličinu učinka 1.69.

**Tablica 7.** FMD brahijalne arterije prije i nakon intervencije<sup>§</sup> na pokusnoj ruci

	KOPB - sobni zrak		KOPB - O <sub>2</sub>		Kontrolni ispitanici - sobni zrak	
	Prije intervencije	Nakon intervencije	Prije intervencije	Nakon intervencije	Prije intervencije	Nakon intervencije
Početni promjer - D <sub>0</sub> (mm)	4.69±0.87	4.81±0.81	4.74±0.87	4.71±0.91	6.49±0.77 <sup>†</sup>	6.45±0.76 <sup>†</sup>
Vršni promjer - D <sub>max</sub> (mm)	4.92±0.92	5.01±0.85	5.01±0.91	4.94±0.93	7.01±0.86 <sup>†</sup>	6.77±0.81 <sup>†</sup>
Vrijeme do D <sub>max</sub> (s)	107.3±31.6	93.9±29.0	92.9±22.5	91.6±24.9	94.6±23.2	89.7±24.4
FMD (mm)	0.24±0.09	0.21±0.07 <sup>*</sup>	0.27±0.07	0.23±0.05 <sup>*</sup>	0.52±0.15 <sup>†</sup>	0.32±0.12 <sup>*†</sup>
FMD (%)	5.03±1.51	4.24±1.09 <sup>*</sup>	5.66±1.16	5.00±1.08 <sup>*</sup>	7.88±1.81 <sup>†</sup>	4.95±1.66 <sup>*†</sup>
SR-AUC (s <sup>-1</sup> x s)	25876±9985	17507±6005 <sup>*</sup>	18252±6732 <sup>††</sup>	14198±3976 <sup>*††</sup>	26124±5289	21811±5289 <sup>*</sup>

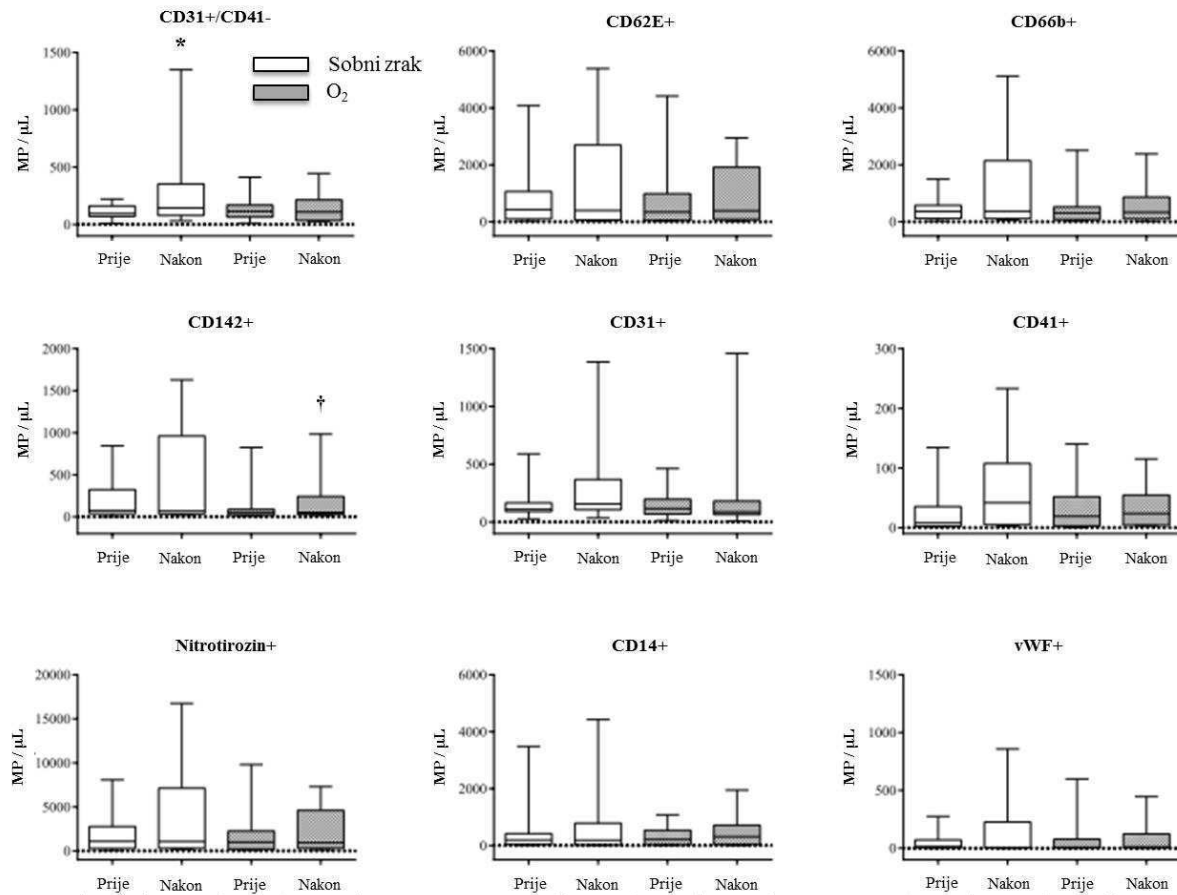
§ označava 20-minutnu inflaciju podlaktične manžete na 75 mm Hg i nadlaktične manžete na 40 mm Hg,

\* označava značajnu razliku prije i nakon intervencije (p<0.05),

† označava značajnu razliku između ispitanika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika na sobnom zraku (prije i nakon intervencije) (p<0.05),

†† označava značajnu razliku između ispitanika s KOPB-om na sobnom zraku i tijekom udisanja kisika (prije i nakon intervencije) (p<0.05).

#### 4.4. Mikročestice (MP) u plazmi



**Slika 10.** Plazmatske koncentracije MP-ova iz pokusne ruke prije i nakon intervencije<sup>§</sup> u ispitanika s KOPB-om na sobnom zraku (bijelo) i u ispitanika s KOPB-om tijekom udisanja kisika (sivo).  
<sup>§</sup> označava 20-minutnu inflaciju podlaktične manžete na 75 mm Hg i nadlaktične manžete na 40 mm Hg,  
 \* označava značajnu razliku u odnosu na udisanje sobnog zraka prije intervencije,  
 † označava značajnu razliku u odnosu na udisanje O<sub>2</sub> prije intervencije.

Plazmatske koncentracije MP-ova iz pokusne ruke prije i nakon intervencije u bolesnika s KOPB-om prikazane su na Slici 10. Utvrđena je značajna interakcija ( $p < 0.05$ ) za MP-ove koji su CD31+/CD41-, CD66b+ i CD142+, dok nikakvi značajni učinak nije utvrđen za ostale MP-ove. *Post-hoc* analiza je pokazala da je intervencija uzrokovala povećanje koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova tijekom udisanja sobnog zraka ( $p < 0.05$ ), ali ne i nakon normalizacije oksigenacije ( $p > 0.05$ ). Istovremeno je intervencija dovela do povećanja koncentracije CD142+ MP-ova tijekom udisanja kisika ( $p < 0.05$ ).

Nije utvrđena korelacija promjene koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova i promjene FMD-a (%) i FMD-a (mm) u bolesnika s KOPB-om – kako za vrijeme udisanja sobnog zraka tako ni pri udisanju kisika.

U plazmi iz kontrolne ruke bolesnika s KOPB-om oscilirajuće smično opterećenje nije izazvalo promjenu razine MP-ova, neovisno o oksigenaciji ( $p>0.05$ ).

Ni u kontrolnih zdravih ispitanika nije bilo utjecaja povećanog retrogradnog smicanja ( $p>0.05$ ) na razinu bilo kojeg podtipa MP-ova niti su se one razlikovale između pokusne i kontrolne ruke ( $p>0.05$ ).

## 5. RASPRAVA

Glavni nalazi ovog eksperimentalnog istraživanja su sljedeći:

1. u bolesnika sa stabilnim, napredovalim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom oscilirajuće smično opterećenje s akutnim povećanjem retrogradnog smicanja dodatno pogoršava ionako poremećenu endotelnu funkciju u vidu smanjenja dilatacije brahijalne arterije posredovane protokom (FMD) i povećanja plazmatske koncentracije CD31+/CD41- endotelnih mikročestica (EMP) kao biljega endotelne apoptoze, a

2. korekcija hipoksemije poništava učinak oscilirajućeg smičnog opterećenja na povećanje plazmatske koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova te poboljšava o endotelu ovisni FMD.

S obzirom da je prethodno utvrđeno postojanje endotelne disfunkcije u bolesnika s KOPB-om, glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi uzrokuje li poremećeni protok krvi dodatno pogoršanje funkcije endotela u populaciji hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om. I pokazano je da akutno izazvano oscilirajuće smično opterećenje dovodi do daljnjeg oštećenja endotela u vidu smanjenja FMD-a brahijalne arterije (FMD (%)) i FMD (mm)) i povećanja plazmatske koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova kao biljega endotelne apoptoze. Ukupno gledajući, rezultati ovog istraživanja po prvi put pružaju *in vivo* dokaz koji povezuje štetnu ulogu *pro*-aterogenih događaja, poput oscilirajućeg smičnog opterećenja, s endotelnom disfunkcijom u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom.

Dakle, u bolesnika s umjerenim do vrlo teškim, stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom akutno izazvano, oscilirajuće smično opterećenje uzrokuje povećanje koncentracije cirkulirajućih CD31+/CD41- EMP-ova, povezanih s endotelnom apoptozom, paralelno s poremećajem funkcije endotela u smislu smanjenja FMD-a brahijalne

arterije. Ovo je smanjenje FMD-a, izazvano oscilirajućim smicanjem, značajno i nakon uključenja  $D_0$  i SR-AUC kao kovarijanci, umjerene je veličine učinka i ne korelira s porastom koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova. U vezi s potonjim, u zdravih kontrolnih ispitanika odgovarajuće dobi značajna atenuacija FMD-a brahijalne arterije izazvana oscilirajućim smicanjem (veličina učinka 1.69) nije bila praćena povećanjem koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova, što sugerira da mogući odgovorni mehanizmi nisu povezani s oslobađanjem ili klirensom EMP-ova.

Iako su poduzete sve mjere za ograničenje pristranosti u vezi s interpretacijom ultrazvučnih slika (npr. šifriranje datoteka prije analize), smanjenje FMD (%) za  $<1\%$  ( $5.03 \pm 1.51\%$  vs.  $4.24 \pm 1.09\%$  na sobnom zraku, odnosno  $5.66 \pm 1.16\%$  vs.  $5.00 \pm 1.08\%$  tijekom udisanja kisika) u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom, izazvano akutnim povećanjem retrogradnog smicanja, zahtijeva opreznu raspravu o rezultatima. Međutim, i ovo malo smanjenje FMD-a može biti vrlo važno. Prethodnim je istraživanjima utvrđeno da u starijih osoba, s *a priori* niskim FMD-om, ne dolazi do daljnjeg smanjenja FMD-a nakon podražaja oscilirajućim smičnim opterećenjem. Naime, Schreuder i sur. (168) su inflacijom podlaktične manžete na 30 i 60 mm Hg tijekom 30 minuta izazvali porast rSR-a, ali bez utjecaja na FMD (%), koji je *a priori* bio značajno manji nego u ispitanika mlade dobi ( $4.3 \pm 1.9\%$  vs.  $6.4 \pm 2.4\%$ ) u kojih je porast rSR-a doveo do značajnog pada FMD-a (%) (162). To sugerira postojanje endotelne disfunkcije, odnosno različitu sposobnost i mehanizme prilagodbe na isti hemodinamski podražaj u starijih ispitanika, a povezuje se s promjenom bioraspodjelivosti NO-a (169, 221), smanjenom osjetljivosti glatkih mišićnih stanica krvožilne stijenke (222), povećanom arterijskom krutosti te povećanim simpatičkim i vaskularnim tonusom u starijoj dobi (169). Ovakav nalaz su autori dijelom pripisali smanjenom bazalnom FMD-u: naime, utvrđena je pozitivna korelacija bazalnog FMD-a i pada FMD-a ( $r=0.386$ ,  $p<0.001$ ), odnosno veće smanjenje FMD-a u odgovoru na porast rSR-a u ispitanika s većim bazalnim FMD-om. Stoga, makar i malo smanjenje FMD-a može odražavati povećanu osjetljivost već oštećenog endotela u napredovalom KOPB-u i podložnost potencijalnom dodatnom pogoršanju u slučaju izloženosti štetnom podražaju. Pokazalo se da i malo smanjenje FMD-a može imati značajni utjecaj na kardiovaskularni rizik (75).

Kod laminarnog, pulsirajućeg protoka krvi u provodnim arterijama dominira protjecanje krvi u antegradnom smjeru. Obrasci s povećanim retrogradnim protokom mogu nastati zbog povišenog tonusa u distalnim otporničkim krvnim žilama (167), što je uobičajeno u starijoj dobi, kod pretilosti i hipertenzije (168-171). Ovo je prvo istraživanje u kojem su

ispitani obrasci smicanja i rSR u bolesnika s napredovalim KOPB-om. Utvrđeno je da je niži bazalni FMD u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om, u usporedbi s kontrolnim zdravim ispitanicima, praćen povišenim bazalnim rSR-om. Umjerena korelacija bazalnog FMD-a (%) i bazalnog rSR-a ( $r=-0.573$ ,  $p=0.07$ ) nas navodi na zaključak da povećana retrogradna stopa smicanja može pridonijeti endotelnoj disfunkciji u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom.

U ovom je istraživanju uočeno smanjenje FMD-a u zdravih kontrolnih ispitanika starije dobi nakon izlaganja oscilirajućem smičnom opterećenju što nije u skladu s prethodnim nalazima Schreudera i sur. (168). Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi biti postojanje praga stope smicanja iznad kojeg dolazi do mjerljivog učinka na FMD, a čije je smanjenje ovisno o intenzitetu retrogradnog smicanja (161). Naime, Schreuder i sur. su primijenili protokol u kojem je podlaktična manžeta napuhana na 30 i 60 mm Hg tijekom 30 minuta, dok na nadlaktici nije bilo manžete (168). Pri tom su izazvali porast rSR-a ovisan o intenzitetu podražaja, ali bez posljedičnog utjecaja na FMD (%), kako je prethodno spomenuto. U pokusu Jenkinsa i sur. (137), na mladim, zdravim ispitanicima, inflacijom nadlaktične manžete kontrolne ruke na tlak od 40 mm Hg došlo je do blagog povećanja rSR-a, ali nedovoljno za promjenu razine EMP-ova što, također, sugerira moguće postojanje praga poremećaja protoka iznad kojeg dolazi do akutne endotelne ozljede. U ovom istraživanju, 20-minutno povećanje rSR-a u kontrolnih zdravih ispitanika nije uzrokovalo značajno povećanje koncentracije cirkulirajućih MP-ova, ali je dovelo do značajnog smanjenja FMD-a. Stoga, dok oscilirajuće smično opterećenje remeti endotel u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om na staničnoj i funkcionalnoj razini, u zdravih ispitanika vjerojatno postoje drugi mehanizmi distalno od izvora oscilirajućeg smicanja koji narušavaju FMD, kao što su smanjenje aktivnosti eNOS-a (159) i/ili povišeni oksidacijski stres (164).

Intervencija akutnim povećanjem retrogradnog smicanja u hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om uzrokovala je povećanje plazmatske koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova kao biljega apoptoze endotelnih stanica. Za razliku od Jenkinsovog istraživanja u kojem je potpuna distalna okluzija, podlaktičnom manžetom napuhanom na 220 mm Hg tijekom 20 minuta, izazvala povećanje biljega aktivacije i apoptoze endotelnih stanica (CD62E+ odnosno CD31+/CD42b- EMP-ova) (137), u ovom je istraživanju primijenjeno 75 mm Hg, što je vjerojatno dovelo do apoptoze endotelnih stanica, ali ne i njihove aktivacije. Naime, povećana je plazmatska koncentracija CD31+/CD41- EMP-ova, dok je koncentracija CD62E+ EMP-ova ostala nepromijenjena.

Specifični mehanizmi kojima sustavna upala sudjeluje u patogenezi kardiovaskularnih bolesti u KOPB-u su složeni. Aterosklerotski proces započinje ozljedom vaskularnog endotela kojeg dodatno oštećuje oscilirajuće smično opterećenje s povećanim retrogradnim smicanjem (povećani biljezi endotelne apoptoze uslijed akutnog poremećaja protoka) (59, 60, 137). Oscilirajuće smicanje povećava izražaj adhezijskih molekula i endotelina-1, čime pogoduje adheziji cirkulirajućih leukocita na oštećenu endotelnu površinu (159). Međutim, u ovom istraživanju, u bolesnika s napredovalim KOPB-om, nije utvrđena promjena koncentracije MP-ova s biljezima polimorfonuklearnih leukocita, monocita, makrofaga ili adhezijskih molekula leukocita-endotelnih stanica, koja bi bila inducirana oscilirajućim smičnim opterećenjem.

U ovom se istraživanju ispituje i utjecaj hipoksemije te njezine korekcije na endotelnu funkciju u bolesnika s napredovalim, stabilnim KOPB-om *in vivo*. Poznato je da hipoksemija povećava vazodilataciju posredovanu NO-om *in vivo* (205, 206), pri čemu treba imati na umu da je većina studija koje su istraživale učinke hipoksemije na arterijsku dilataciju provedena na zdravim dobrovoljcima u uvjetima akutne hipoksemije. Hipoksemija, također, snažno aktivira simpatički živčani sustav (166, 202, 203) dovodeći do hiperventilacije, tahikardije i periferne vazokonstrukcije, odnosno vaskularne disfunkcije (166, 203, 204). Prethodno je utvrđena disfunkcija autonomnog živčanog sustava u smislu njegove povećane aktivnosti, povišene srčane frekvencije i njezine smanjene varijabilnosti te smanjene osjetljivosti barorefleksa u bolesnika s KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom u odnosu na zdrave ispitanike (48, 49, 223, 224). Pri tome pojačana simpatička aktivnost u mišićima može biti posredovana i drugim mehanizmima osim aktivacije perifernih kemoreceptora: pored poremećaja osjetljivosti barorefleksa tu su i lokalni učinak produkata ishemijskog metabolizma u uvjetima povećanog rada disanja, ali i utjecaj diuretika,  $\beta_2$ -agonista ili teofilina (48). Budući da hipoksija povećava aktivnost i osjetljivost karotidnog tjelešca (225) te simpatičke impulse prema krvožilju (226), a hiperoksija ublažava povećanje simpatičkog tonusa (226), pretpostavljeno je da će normalizacija oksigenacije ublažiti poremećaj FMD-a povezan s podražajem simpatičkog živčanog sustava izazvanog hipoksijom (204). U zdravih osoba simpatička aktivnost u mišićima ostaje povišena  $\geq 20$  minuta nakon 20 minuta umjerene hipoksemije (SaO<sub>2</sub> 80%) (202, 226). Stoga, korekcija hipoksemije 20-minutnom nadoknadom kisika vjerojatno neće potpuno dokinuti vaskularne učinke dugotrajne hipoksemije. Međutim, prethodno je pokazano da kratkotrajna primjena kisika (4 L/min, 20 minuta, putem nosnih vila) ipak dovodi do blagog smanjenja aktivnosti simpatičkih živaca u mišićima (48). I zaista, u bolesnika s KOPB-om je korekcija hipoksemije dovela do povećanja FMD-a (%) kad su u



obzir uzeti  $D_0$  i SR-AUC kao kovarijance, što uz manji podražaj (SR-AUC) može ukazivati na određeno poboljšanje endotelne funkcije. U ovom istraživanju korekcija hipoksemije u bolesnika s KOPB-om nije utjecala na rSR. U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Dinh-Xuan i sur. (211) su *in vitro*, na uzorcima plućne arterije bolesnika s krajnjim stadijem KOPB-a kojima su transplantirana pluća, pokazali korelaciju oštećene vazodilatacije ovisne o endotelu i smanjenog preoperativnog  $PaO_2$ , što upućuje na to da kronična hipoksemija doprinosi oštećenju endotelne funkcije u bolesnika s KOPB-om. Nadalje, Keymel i sur. su, uspoređujući bivše pušače s invazivno dokazanom koronarnom arterijskom bolešću, sa i bez konkomitantnog KOPB-a, utvrdili značajnu korelaciju FMD-a (%) i  $PaO_2$ , neovisnu o  $FEV_1$  i anamnezi pušenja, sugerirajući doprinos hipoksemije disfunkciji endotela, potencijalno posredovanoj smanjenom bioraspoloživošću NO-a (192). Ono što također treba uzeti u obzir je činjenica da endotelna disfunkcija nastaje rano u KOPB-u, kada je opstrukcija protoka zraka u dišnim putovima blaga do umjerena (124, 180, 181, 184, 186), a još uvijek nema arterijske hipoksemije, što sugerira da hipoksemija možda nije direktno povezana s opaženim smanjenjem FMD-a u bolesnika s napredovalim KOPB-om. Tome u prilog govore rezultati istraživanja Clarenbacha i sur. u kojem u bolesnika s KOPB-om nije utvrđena povezanost hipoksemije s FMD-om (%), za razliku od hiperkapnije čiji je negativni utjecaj na FMD (%) u univarijantnoj analizi nestao nakon korekcije za  $FEV_1$ . U istom istraživanju nije utvrđena neovisna povezanost osjetljivosti barorefleksa i FMD-a (%), odnosno činilo se da simpatička aktivnost nije značajna odrednica endotelne funkcije u KOPB-u (24). Ni Eickhoff i sur. nisu uočili vezu između terapije kisikom i FMD-a (%) u bolesnika s KOPB-om (185).

Povećani oksidacijski stres je drugi potencijalni mehanizam kojim hipoksemija može doprinijeti endotelnoj disfunkciji u bolesnika s KOPB-om. U istraživanju mehanizama odgovornih za vaskularnu disfunkciju u KOPB-u, Ives i sur. su utvrdili značajno niži FMD (%) u nepušača s KOPB-om u odnosu na zdrave nepušače ( $3.1 \pm 0.5\%$  vs.  $6.7 \pm 0.6\%$ ,  $p < 0.05$ ) što je bilo praćeno povišenim pokazateljima bazalnog oksidacijskog stresa te smanjenim pokazateljima antioksidacijskog potencijala, odnosno poremećenom redoks-ravnotežom (193). Nasuprot tome, Clarenbach i sur. u KOPB-u nisu utvrdili povezanost FMD-a (%) i koncentracije malon-dialdehida, kao mjere oksidacijskog stresa (24). Kako 20-minutna terapija kisikom ne mijenja plazmatsku razinu biljega upale i oksidacijskog stresa u bolesnika s KOPB-om (227), malo je vjerojatno da su uočene promjene posljedica izmijenjene redoks-ravnoteže. Tome u prilog govori i nepromijenjena koncentracija nitrotirozina, kao biljega endogene aktivnosti peroksinitrita i oksidacijskog stresa, kad se uspoređuje udisanje sobnog zraka i kisika ispitanika s KOPB-om u ovom istraživanju.

U istraživanju Keymela i sur. je pri procjeni učinka hipoksemije na FMD uzet u obzir početni promjer brahijalne arterije koji je u bolesnika s KOPB-om i nižom razinom kisika bio neznatno veći, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost ( $4.8 \pm 0.7$  mm vs.  $4.5 \pm 0.5$  mm,  $p=0.293$ ) (192). Periferna vazodilatacija je u usporedbi s kontrolnim ispitanicima nepušačima utvrđena u bolesnika s KOPB-om i u ranijim istraživanjima (185, 209), što se povezuje, ne samo s direktnim učinkom hipoksemije nego i s volumnim opterećenjem u bolesnika s kroničnim plućnim srcem (210) te s gubitkom elastina (55). U ovom su istraživanju bolesnici sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom u usporedbi s kontrolnim zdravim ispitanicima imali značajno manji početni promjer brahijalne arterije što bi moglo upućivati na prevladavajući učinak hipoksijom izazvanih vazokonstrikcijских mehanizama poput pojačane aktivnosti simpatičkog sustava (48) i sustava renin-angiotenzin (47) u odnosu na vazodilatacijske mehanizme. Ova razlika u početnom promjeru brahijalne arterije može imati značajne reperkusije na FMD (99), zbog čega je  $D_0$  uključen kao kovarijanca pri analizi učinka intervencije na FMD, odnosno razlike odgovora FMD-a na intervenciju između udisanja sobnog zraka i kisika u bolesnika s KOPB-om.

Zanimljivo je da je u bolesnika s KOPB-om normalizacijom oksigenacije poništeno povećanje CD31+/CD41- EMP-ova izazvano oscilirajućim smičnim opterećenjem (Slika 10.), premda nije bilo značajne razlike u rSR-u između udisanja sobnog zraka odnosno kisika. To nas navodi na zaključak da je vjerojatno djelovanje kisika proizvelo zaštitni učinak, neovisno o oscilirajućem smičnom opterećenju. Budući da je kombinacija hipoksemije i oscilirajućeg smičnog opterećenja povezana sa značajnim porastom koncentracije navedenih EMP-ova, čini se da je uz oscilirajuće smično opterećenje potreban dodatni inzult da bi se poremetila funkcija endotelne stanice. Slično tome, segmenti arterija koji su kronično izloženi aterogenim obrascima smicanja zahtijevaju dodatne poticaje, poput hiperlipidemije, da bi u konačnici došlo do razvoja ateroskleroze (60). Stoga smatramo da, u bolesnika s KOPB-om, hipoksemija pridonosi nastanku endotelne disfunkcije koja se može pojačati oscilirajućim smičnim opterećenjem. Kako je prethodno rečeno, u bolesnika s KOPB-om se FMD (%) značajno povećao korekcijom hipoksemije nakon normalizacije za  $D_0$  i SR-AUC. I ovo poboljšanje FMD-a ukazuje na ulogu hipoksemije u smanjenju osjetljivosti endotela na oscilirajuće smicanje, u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja *in vitro* (211). Dakle, čini se da i mehanički (oscilirajuće smično opterećenje) i kemijski (hipoksemija) inzulti mogu pridonijeti nastanku i pogoršanju endotelne disfunkcije u bolesnika s KOPB-om.

Paralelno sa smanjenjem FMD-a (%) i FMD-a (mm) nakon intervencije oscilirajućim smičnim opterećenjem u bolesnika s KOPB-om na sobnom zraku i tijekom udisanja kisika,

smanjen je i podražaj za FMD odnosno SR-AUC, što sugerira da osjetljivost endotela na smicanje nije poremećena oscilirajućim smicanjem. Međutim, smanjenje FMD-a nakon intervencije, koje je bilo statistički značajno i nakon uključenja  $D_0$  i SR-AUC-a kao kovarijanci, navodi nas na zaključak da u bolesnika s napredovalim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom akutno povećanje retrogradnog smicanja ipak dodatno pogoršava ionako smanjeni FMD. Primjena različitih intenziteta podražaja i potencijalno postojanje učinka ovisnog o dozi, odnosno korelacije podražaja i reakcije, poslužili bi kao dodatni argument u prilog ovoj tezi.

Možemo zaključiti da je u usporedbi sa zdravim ispitanicima, u bolesnika s napredovalim, stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom endotelna disfunkcija, u smislu smanjenog bazalnog FMD-a, praćena povećanom bazalnom retrogradnom stopom smicanja (rSR). Akutni poremećaj protoka krvi u obliku oscilirajućeg smičnog opterećenja pogoršava FMD i u skupini bolesnika i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika. Međutim, u bolesnika s umjerenim do vrlo teškim, stabilnim KOPB-om i kroničnom hipoksemijom, smanjenje FMD-a je praćeno porastom plazmatske koncentracije EMP-ova koji su biljezi apoptoze endotelnih stanica, što predstavlja veću potencijalnu opasnost s obzirom na ionako oštećeno krvožilje ovih bolesnika. Primjena kisika poništava učinak oscilirajućeg smičnog opterećenja na porast razine cirkulirajućih EMP-ova i čini se da poboljšava FMD na dani podražaj. Istraživanje utjecaja eliminacije retrogradnog smicanja i povećanja srednjeg smičnog opterećenja (149) (npr. grijanjem ekstremiteta) na eventualno poboljšanje funkcije endotela u bolesnika s KOPB-om moglo bi poslužiti kao dodatni argument za potporu tezi o doprinosu poremećenog protoka krvi endotelnoj disfunkciji u bolesnika s KOPB-om.

### **Metodološka razmatranja**

Liječenje hipoksemičnih bolesnika sa stabilnim KOPB-om uključuje i terapiju kisikom čiji je cilj povećanje  $PaO_2$  iznad 55 mm Hg, odnosno iznad 59 mm Hg ako je hematokrit  $>0.55$ , ako postoji plućna hipertenzija ili znaci popuštanja desnog srca. To je u skladu sa smjernicama Britanskog torakalnog društva prema kojima je, u hiperkapnijskom obliku respiracijske insuficijencije, ciljni  $SpO_2$  88-92% (216). Dugotrajno liječenje kisikom (engl. *long-term oxygen therapy*, LTOT) dokazano smanjuje smrtnost i nastanak plućne hipertenzije u ovoj populaciji bolesnika, dok su učinci na zaduhu, funkcionalnu sposobnost, kvalitetu

života, oksidacijski stres i sustavnu upalu još uvijek kontroverzni (228, 229). Postoji bojazan da nadomjesna terapija kisikom može i u bolesnika s KOPB-om pogoršati oksidacijski stres i tako potencirati sustavnu upalu i ostale patofiziološke procese te ubrzati napredovanje bolesti. Tako su Carpagnano i sur. jednosatnom primjenom kisika preko maske ( $FiO_2$  28%), u usporedbi s udisanjem čistog zraka, izazvali porast pokazatelja sustavne upale i oksidacijskog stresa u kondenzatu izdahnutog zraka, ne samo u zdravih ispitanika, nego i u bolesnika s KOPB-om, kako normoksemičnih, tako i hipoksemičnih (230). S druge strane u istraživanju van Helvoorta i sur. jednosatna primjena kisika putem nosnih vila (4 L/min) u normoksemičnih, sarkopeničnih bolesnika s KOPB-om nije utjecala na pokazatelje sustavne upale i oksidacijskog stresa u sustavnoj cirkulaciji (227). U ovom istraživanju je u hipoksemičnih bolesnika s KOPB-om, u eksperimentalne svrhe, kratkotrajno i nadzirano primijenjen kisik niskim protokom (~3 L/min) putem nosnih vila s ciljem postizanja  $SpO_2 \geq 95\%$  da bi se omogućila usporedba s kontrolnim zdravim ispitanicima čiji je  $SpO_2$  u mirovanju iznosio  $96.4 \pm 1.0\%$ . Doista, primjena kisika u zdravih osoba i posljedični značajni porast  $PaO_2$  može dovesti do višestrukih fizioloških reakcija kao što su smanjeni tonus simpatičkog živčanog sustava (217), povećani oksidacijski stres (218), promjena bioraspodjelivosti NO-a (219) i periferne vaskularne funkcije (220). S obzirom da učinci hiperoksemije nisu ekvivalentni učincima korekcije hipoksemije, primjena kisika u normoksemičnih kontrolnih ispitanika bi predstavljala zbunjujući čimbenik u usporedbi s ispitivanom skupinom bolesnika s KOPB-om tijekom udisanja kisika, pa kisik u zdravih kontrolnih ispitanika nije primijenjen.

Tlak intervencije od 75 mm Hg je izabran na temelju rezultata istraživanja Thijssen i sur. (161). Veće vrijednosti tlaka bi nakon deflacije manžete izazvale značajnu reaktivnu hiperemiju koja bi, kao dodatni podražaj endotela, bila zbunjujući čimbenik u procjeni utjecaja intervencije na FMD. Premda se ne očekuje da 20-minutna inflacija manžete na 75 mm Hg izazove ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje s obzirom na najniži SBP naših ispitanika od 100 mm Hg, kontaminacija krvlju iz distalne ishemične regije je isključena mjerenjem koncentracije laktata u krvi iz pokusne ruke prije i na kraju inflacije manžete pri čemu nije utvrđena značajna razlika.

Nije mjereno FMD na kontralateralnoj ruci, koja je predstavljala unutarnju kontrolu, budući da u prethodnim istraživanjima na kontralateralnoj ruci nisu uočene promjene obrasca smicanja, FMD-a niti koncentracije MP-ova (137, 161, 163, 164).

Veličina uzorka u ovom istraživanju je relativno mala što je uobičajeno u fiziološkim istraživanjima ovog tipa, a ovaj je nedostatak dijelom prevladan i angažmanom iskusnog ultrasoničara te primjenom automatiziranog softvera pri ultrazvučnim mjerenjima i analizama.

Nadalje, nije ispitan utjecaj komorbiditeta, čimbenika rizika i lijekova na hemodinamiku i endotelnu funkciju brahijalne arterije, između ostalog i zbog malog broja ispitanika. KOPB je često praćen komorbiditetima, poput arterijske hipertenzije i šećerne bolesti, koji također utječu na arterijsku strukturu i funkciju, naročito u napredovalim fazama bolesti. Stoga bi bilo iznimno teško odabrati populaciju bolesnika s napredovalim KOPB-om bez komorbiditeta i odgovarajuće terapije. Osim toga, takva bi populacija slabo predstavljala ciljanu populaciju bolesnika s napredovalim KOPB-om u stvarnom životu (186). Također se postavlja pitanje opravdanosti prilagodbe za kardiovaskularne bolesti s obzirom da su one posljedica endotelne disfunkcije, a ne obrnuto (184).

Još jedno važno ograničenje ovog istraživanja je potencijalno zbunjujući učinak plućne hipertenzije u bolesnika s KOPB-om. Prethodno je utvrđen poremećaj dilatacije plućne arterije ovisne o endotelu u reseciranim uzorcima pluća bolesnika i s blagim i s napredovalim KOPB-om s potencijalnim doprinosom razvoju plućne hipertenzije u KOPB-u (231, 232). Utvrđivanje plućne hipertenzije bi zahtijevalo kateterizaciju desne strane srca s obzirom da je osjetljivost manje invazivnih dijagnostičkih metoda kao što je ehokardiografija u bolesnika s KOPB-om prilično niska (233).

U ovom istraživanju nije ispitan utjecaj viskoznosti krvi na opažene razlike među bolesnicima s KOPB-om i zdravim ispitanicima jer su prethodna istraživanja pokazala kako viskoznost ima zanemariv učinak na pokazatelje vaskularne funkcije poput FMD-a (97).

## 6. ZAKLJUČCI

Glavni nalazi ovog eksperimentalnog istraživanja su sljedeći:

1. U usporedbi sa zdravim ispitanicima, u bolesnika s napredovalim, stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom endotelna je disfunkcija, u smislu smanjene dilatacije brahijalne arterije posredovane protokom (FMD), praćena povećanom bazalnom retrogradnom stopom smicanja (rSR).

2. U bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom oscilirajuće smično opterećenje s akutnim povećanjem retrogradnog smicanja dodatno pogoršava ionako smanjeni FMD, što je praćeno povećanjem plazmatske koncentracije CD31+/CD41- endotelnih mikročestica (EMP) kao biljega endotelne apoptoze.

3. U kontrolnih zdravih ispitanika oscilirajuće smično opterećenje s akutnim povećanjem retrogradnog smicanja također pogoršava FMD, ali bez utjecaja na plazmatsku koncentraciju mjerenih mikročestica (MP).

4. Korekcija hipoksemije u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom poništava učinak oscilirajućeg smičnog opterećenja na povećanje plazmatske koncentracije CD31+/CD41- EMP-ova te poboljšava o endotelu ovisni FMD.

## 7. SAŽETAK

Endotelna disfunkcija se smatra jednom od patofizioloških poveznica KOPB-a i kardiovaskularnih bolesti, koje su među najčešćim komorbiditetima i uzrocima smrti oboljelih od KOPB-a. Mehanizmi koji su odgovorni za poremećaj funkcije endotela s *pro*-aterogenim fenotipom endotelnih stanica u bolesnika s KOPB-om su u značajnoj mjeri još neistraženi.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati u bolesnika sa stabilnim, napredovalim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom hemodinamiku brahijalne arterije i pokazatelje endotelne funkcije: dilataciju brahijalne arterije posredovanu protokom (FMD) i plazmatsku koncentraciju endotelnih mikročestica (EMP). Također planirano je utvrditi pogoršava li akutni poremećaj protoka krvi, u obliku oscilirajućeg smičnog opterećenja, endotelnu funkciju te kakva je uloga kronične hipoksemije i njezine korekcije na hemodinamiku brahijalne arterije, poboljšava li korekcija hipoksemije akutnim udisanjem kisika endotelnu funkciju, odnosno štiti li je od eventualnog dodatnog pogoršanja induciranog oscilirajućim smičnim opterećenjem.

U 17 hipoksemičnih bolesnika s KOPB-om i 10 kontrolnih zdravih ispitanika odgovarajuće dobi ispitani su pri udisanju sobnog zraka: obrazac smicanja (antegradna stopa smicanja (aSR), retrogradna stopa smicanja (rSR) i oscilirajući smični indeks (OSI)), FMD brahijalne arterije te razina cirkulirajućih EMP-ova prije i nakon 20 minuta eksperimentalno induciranog oscilirajućeg smičnog opterećenja inflacijom podlaktične manžete na 75 mm Hg. Bolesnici s KOPB-om su ponovno podvrgnuti testiranju nakon korekcije hipoksemije 20-minutnim udisanjem kisika preko nosnih vila.

U bolesnika s KOPB-om je, u odnosu na zdrave ispitanike, utvrđen oko šest puta veći bazalni rSR ( $p < 0.05$ ) te manji bazalni FMD ( $p < 0.05$ ). Intervencija oscilirajućim smicanjem je uzrokovala značajno smanjenje FMD-a u svim skupinama ( $p < 0.01$ ), dok je značajni porast plazmatske koncentracije biljega apoptoze, odnosno CD31+/CD41- EMP-ova, zabilježen

samo u bolesnika s KOPB-om pri udisanju sobnog zraka. Normalizacijom oksigenacije je u bolesnika s KOPB-om poništeno povećanje CD31+/CD41- EMP-ova izazvano oscilirajućim smicanjem, a istovremeno je došlo do značajnog povećanja FMD-a uz korekciju za intenzitet podražaja smičnim opterećenjem i početni promjer brahijalne arterije.

Pokazano je da akutni poremećaj protoka krvi s povećanim retrogradnim smicanjem u bolesnika sa stabilnim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom dodatno pogoršava već oštećenu endotelnu funkciju, što je praćeno porastom cirkulirajućih biljega endotelne apoptoze. Rezultati ovog temeljnog istraživanja pridonose boljem razumijevanju kompleksnih mehanizama koji su odgovorni za fiziologiju endotela u zdravih ljudi, odnosno za *pro*-aterogeni fenotip endotelnih stanica u bolesnika s napredovalim KOPB-om i kroničnom respiracijskom insuficijencijom. Ovim je istraživanjem, također, potvrđena uloga kronične hipoksemije u ekspresiji vulnerabilnog endotelnog fenotipa te pokazan dodatni protektivni učinak terapije kisikom. S obzirom na povezanost endotelne disfunkcije i povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti u KOPB-u, očekuje se da bolje razumijevanje funkcije endotela pridonese boljoj fenotipizaciji bolesnika s KOPB-om i preciznijoj procjeni kardiovaskularnog rizika.



## 8. NASLOV I SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU

### **Disturbed blood flow worsens endothelial dysfunction in moderate-very severe chronic obstructive pulmonary disease**

Endothelial dysfunction is considered to be one of the pathophysiological links of COPD and cardiovascular diseases, which are among the most common comorbidities and causes of death in COPD. Mechanisms that are responsible for the endothelial dysfunction with *pro*-atherogenic phenotype of endothelial cells in COPD patients are significantly unexplored.

The aim of this study was to examine brachial artery hemodynamics and endothelial function indicators in patients with stable, advanced COPD and chronic respiratory insufficiency: flow-mediated dilation (FMD) of brachial artery and plasma concentration of endothelial microparticles (EMP). It was also planned to test whether acutely induced oscillatory shear stress worsens endothelial function in hypoxemic, stable COPD patients, how chronic hypoxemia and its correction influence brachial artery hemodynamics, whether acute low-flow oxygen administration improves endothelial function and if it is protective against potential oscillatory shear stress-induced endothelial dysfunction.

In 17 hypoxemic, stable COPD patients and 10 age-matched, non-smoking, healthy control subjects shear pattern (antegrade and retrograde shear rate (aSR and rSR), oscillatory shear index (OSI)), brachial artery FMD and circulating EMPs were examined during room air breathing before and after 20 minutes of experimentally-induced oscillatory shear stress (forearm cuff inflated to 75 mm Hg). COPD patients underwent the same protocol a second

time following a 20-minute wash-in period of low-flow supplemental oxygen to normalize arterial oxygen saturation.

Compared to healthy controls, COPD patients had around six-fold greater baseline rSR ( $p < 0.05$ ) and lower baseline FMD ( $p < 0.05$ ). The oscillatory shear stress intervention induced significant decreases in brachial artery FMD of all groups ( $p < 0.05$ ) and significantly increased circulating markers of endothelial cell apoptosis (CD31+/CD41- EMPs) in COPD patients during room air breathing, but not age-matched controls. Supplemental oxygen administration abrogated the oscillatory shear stress-induced increase in CD31+/CD41- EMPs and improved FMD after accounting for the shear stress stimulus and brachial artery diameter.

It has been demonstrated that acutely disturbed blood flow, with increased retrograde shear stress, further deteriorates the already impaired endothelial function with attendant increase in circulating markers of endothelial apoptosis in patients with stable COPD and chronic respiratory insufficiency. The results of this fundamental research contribute to a better understanding of the complex mechanisms responsible for endothelial physiology in healthy people and for *pro*-atherogenic endothelial cell phenotype in patients with advanced COPD and chronic respiratory insufficiency. This research also confirms the role of chronic hypoxemia in expressing a vulnerable endothelial phenotype and shows additional protective effect of oxygen therapy. Given the association between endothelial dysfunction and increased risk of cardiovascular disease in COPD, a better understanding of endothelial function is expected to contribute to better phenotyping of patients with COPD and a more accurate assessment of cardiovascular risk.

## 9. LITERATURA

1. Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: The GOLD Science Committee Report 2019. *Eur Respir J*. 2019.
2. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2):020415.
3. Lopez-Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD. *Respirology*. 2016;21(1):14-23.
4. European Respiratory Society. Lung health in Europe: a better understanding of lung disease and respiratory care in Europe facts & figures [www.ersnet.org2014](http://www.ersnet.org2014).
5. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.
6. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:435-59.
7. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
8. Agusti A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11:122.
9. Goossens LM, Leimer I, Metzdorf N, Becker K, Rutten-van Molken MP. Does the 2013 GOLD classification improve the ability to predict lung function decline, exacerbations and mortality: a post-hoc analysis of the 4-year UPLIFT trial. *BMC Pulm Med*. 2014;14:163.
10. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1128-38.
11. Soriano JB, Lamprecht B, Ramirez AS, Martinez-Cambor P, Kaiser B, Alfageme I, et al. Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Respir Med*. 2015;3(6):443-50.
12. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.

13. Perez T, Burgel PR, Paillasseur JL, Caillaud D, Deslee G, Chanez P, et al. Modified Medical Research Council scale vs Baseline Dyspnea Index to evaluate dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1663-72.
14. Karloh M, Fleig Mayer A, Maurici R, Pizzichini MMM, Jones PW, Pizzichini E. The COPD Assessment Test: What Do We Know So Far?: A Systematic Review and Meta-Analysis About Clinical Outcomes Prediction and Classification of Patients Into GOLD Stages. *Chest*. 2016;149(2):413-25.
15. Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med*. 2013;11:181.
16. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(5):557-82.
17. Miravittles M, Calle M, Soler-Cataluna JJ. Clinical phenotypes of COPD: identification, definition and implications for guidelines. *Arch Bronconeumol*. 2012;48(3):86-98.
18. Agusti AG. COPD, a multicomponent disease: implications for management. *Respir Med*. 2005;99(6):670-82.
19. Miller J, Edwards LD, Agusti A, Bakke P, Calverley PM, Celli B, et al. Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Respir Med*. 2013;107(9):1376-84.
20. Decramer M, Janssens W. Chronic obstructive pulmonary disease and comorbidities. *Lancet Respir Med*. 2013;1(1):73-83.
21. Smith MC, Wrobel JP. Epidemiology and clinical impact of major comorbidities in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:871-88.
22. Sabit R, Thomas P, Shale DJ, Collins P, Linnane SJ. The effects of hypoxia on markers of coagulation and systemic inflammation in patients with COPD. *Chest*. 2010;138(1):47-51.
23. Patel AR, Hurst JR. Extrapulmonary comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art. *Expert Rev Respir Med*. 2011;5(5):647-62.
24. Clarenbach CF, Senn O, Sievi NA, Camen G, van Gestel AJ, Rossi VA, et al. Determinants of endothelial function in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2013;42(5):1194-204.

25. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J.* 2008;32(4):962-9.
26. Divo M, Cote C, de Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, et al. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(2):155-61.
27. Berry CE, Wise RA. Mortality in COPD: causes, risk factors, and prevention. *COPD.* 2010;7(5):375-82.
28. Chen W, Thomas J, Sadatsafavi M, FitzGerald JM. Risk of cardiovascular comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2015;3(8):631-9.
29. Westerik JA, Metting EI, van Boven JF, Tiersma W, Kocks JW, Schermer TR. Associations between chronic comorbidity and exacerbation risk in primary care patients with COPD. *Respir Res.* 2017;18(1):31.
30. Anthonisen NR, Connett JE, Enright PL, Manfreda J, Lung Health Study Research G. Hospitalizations and mortality in the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(3):333-9.
31. Sin DD, Wu L, Man SF. The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature. *Chest.* 2005;127(6):1952-9.
32. Maclay JD, MacNee W. Cardiovascular disease in COPD: mechanisms. *Chest.* 2013;143(3):798-807.
33. Ghoorah K, De Soyza A, Kunadian V. Increased cardiovascular risk in patients with chronic obstructive pulmonary disease and the potential mechanisms linking the two conditions: a review. *Cardiol Rev.* 2013;21(4):196-202.
34. Rabe KF, Hurst JR, Suissa S. Cardiovascular disease and COPD: dangerous liaisons? *Eur Respir Rev.* 2018;27(149).
35. Man SF, Van Eeden S, Sin DD. Vascular risk in chronic obstructive pulmonary disease: role of inflammation and other mediators. *Can J Cardiol.* 2012;28(6):653-61.
36. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One.* 2012;7(5):e37483.
37. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1065-72.

38. Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007;29(3):527-34.
39. Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, Hubbard RB, Wedzicha JA. Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest*. 2010;137(5):1091-7.
40. McAllister DA, Maclay JD, Mills NL, Leitch A, Reid P, Carruthers R, et al. Diagnosis of myocardial infarction following hospitalisation for exacerbation of COPD. *Eur Respir J*. 2012;39(5):1097-103.
41. Maclay JD, McAllister DA, Johnston S, Raftis J, McGuinness C, Deans A, et al. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax*. 2011;66(9):769-74.
42. Tsuji T, Aoshihara K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):886-93.
43. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Komuro I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(2):141-8.
44. Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, et al. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest*. 2007;132(6):1733-40.
45. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*. 1995;91(8):2125-31.
46. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372.
47. Skwarski KM, Morrison D, Barratt A, Lee M, MacNee W. Effects of hypoxia on renal hormonal balance in normal subjects and in patients with COPD. *Respir Med*. 1998;92(12):1331-6.
48. Heindl S, Lehnert M, Criege CP, Hasenfuss G, Andreas S. Marked sympathetic activation in patients with chronic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(4):597-601.

49. Volterrani M, Scalvini S, Mazzuero G, Lanfranchi P, Colombo R, Clark AL, et al. Decreased heart rate variability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*. 1994;106(5):1432-7.
50. Andreas S, Anker SD, Scanlon PD, Somers VK. Neurohumoral activation as a link to systemic manifestations of chronic lung disease. *Chest*. 2005;128(5):3618-24.
51. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1318-27.
52. Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Aboyans V, Brodmann M, Cifkova R, Cosentino F, et al. The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation: Endorsed by the Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY) Society. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):507-32.
53. Sabit R, Bolton CE, Edwards PH, Pettit RJ, Evans WD, McEniery CM, et al. Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(12):1259-65.
54. Mills NL, Miller JJ, Anand A, Robinson SD, Frazer GA, Anderson D, et al. Increased arterial stiffness in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a mechanism for increased cardiovascular risk. *Thorax*. 2008;63(4):306-11.
55. Maclay JD, McAllister DA, Rabinovich R, Haq I, Maxwell S, Hartland S, et al. Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2012;67(7):606-12.
56. Peinado VI, Pizarro S, Barbera JA. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest*. 2008;134(4):808-14.
57. Green CE, Turner AM. The role of the endothelium in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Res*. 2017;18(1):20.
58. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95.
59. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
60. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327-87.
61. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.

62. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
63. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250(6 Pt 2):H1145-9.
64. Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP, et al. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H1380-9.
65. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):16-26.
66. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 2006;259(4):351-63.
67. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(2):F193-206.
68. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(6):713-38.
69. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003;108(16):1912-6.
70. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-9.
71. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-67.
72. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*. 2002;106(6):640-2.
73. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(6):502-9.
74. Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, Buithieu J, Rose MS, Conradson H, et al. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation*. 2011;123(2):163-9.



75. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension*. 2011;57(3):363-9.
76. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(1):H2-12.
77. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010;26(6):631-40.
78. Matsuzawa Y, Kwon TG, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(11).
79. Veerasamy M, Bagnall A, Neely D, Allen J, Sinclair H, Kunadian V. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: a state of the art review. *Cardiol Rev*. 2015;23(3):119-29.
80. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
81. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Lehn-Stefan A, Overkamp D, Dietz K, et al. Insulin resistant young subjects at risk of accelerated atherosclerosis exhibit a marked reduction in peripheral endothelial function early in life but not differences in intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2003;171(2):303-9.
82. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens*. 2012;6(2):85-99.
83. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(10):1728-30.
84. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*. 2005;568(Pt 2):357-69.
85. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011;18(6):775-89.

86. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2010;122(25):e584-636.
87. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2012;33(13):1635-701.
88. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
89. Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(3):1233-4; discussion 7-8.
90. Parker BA, Tschakovsky ME, Augeri AL, Polk DM, Thompson PD, Kiernan FJ. Heterogenous vasodilator pathways underlie flow-mediated dilation in men and women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):H1118-26.
91. Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension*. 2014;63(2):376-82.
92. Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ. Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. *Hypertension*. 2008;51(2):203-10.
93. Liuni A, Luca MC, Lisi M, Dragoni S, di Stolfo G, Mariani JA, et al. Observations of time-based measures of flow-mediated dilation of forearm conduit arteries: implications for the accurate assessment of endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(3):H939-45.
94. Parker BA, Trehearn TL, Meendering JR. Pick your Poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(4):1357-9.
95. Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res*. 2006;43(3):251-69.
96. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension*. 2010;55(5):1075-85.

97. Parkhurst KL, Lin HF, Devan AE, Barnes JN, Tarumi T, Tanaka H. Contribution of blood viscosity in the assessment of flow-mediated dilation and arterial stiffness. *Vasc Med.* 2012;17(4):231-4.
98. Pyke KE, Tschakovsky ME. Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation? *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(4):1510-9.
99. Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, et al. Interrelationships Among Flow-Mediated Vasodilation, Nitroglycerine-Induced Vasodilation, Baseline Brachial Artery Diameter, Hyperemic Shear Stress, and Cardiovascular Risk Factors. *J Am Heart Assoc.* 2017;7(1).
100. Thijssen DH, Bullens LM, van Bommel MM, Dawson EA, Hopkins N, Tinken TM, et al. Does arterial shear explain the magnitude of flow-mediated dilation?: a comparison between young and older humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(1):H57-64.
101. Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, Mickleborough TD, Fly AD, et al. Normalization of flow-mediated dilation to shear stress area under the curve eliminates the impact of variable hyperemic stimulus. *Cardiovasc Ultrasound.* 2008;6:44.
102. Tschakovsky ME, Pyke KE. Counterpoint: Flow-mediated dilation does not reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(3):1235-7; discussion 7-8.
103. Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, Mickleborough TD, Fly AD, et al. Adjusting flow-mediated dilation for shear stress stimulus allows demonstration of endothelial dysfunction in a population with moderate cardiovascular risk. *J Vasc Res.* 2009;46(6):592-600.
104. Atkinson G, Batterham AM, Black MA, Cable NT, Hopkins ND, Dawson EA, et al. Is the ratio of flow-mediated dilation and shear rate a statistically sound approach to normalization in cross-sectional studies on endothelial function? *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(6):1893-9.
105. Atkinson G, Batterham AM. Allometric scaling of diameter change in the original flow-mediated dilation protocol. *Atherosclerosis.* 2013;226(2):425-7.
106. Atkinson G, Batterham AM, Thijssen DH, Green DJ. A new approach to improve the specificity of flow-mediated dilation for indicating endothelial function in cardiovascular research. *J Hypertens.* 2013;31(2):287-91.
107. Atkinson G, Batterham AM. The clinical relevance of the percentage flow-mediated dilation index. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17(2):4.

108. Philpott AC, Lonn E, Title LM, Verma S, Buithieu J, Charbonneau F, et al. Comparison of new measures of vascular function to flow mediated dilatation as a measure of cardiovascular risk factors. *Am J Cardiol.* 2009;103(11):1610-5.
109. Halcox JP, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation.* 2009;119(7):1005-12.
110. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(5):1235-41.
111. Teragawa H, Ueda K, Matsuda K, Kimura M, Higashi Y, Oshima T, et al. Relationship between endothelial function in the coronary and brachial arteries. *Clin Cardiol.* 2005;28(10):460-6.
112. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 1997;129(1):111-8.
113. Gori T, von Henning U, Muxel S, Schaefer S, Fasola F, Vosseler M, et al. Both flow-mediated dilation and constriction are associated with changes in blood flow and shear stress: Two complementary perspectives on endothelial function. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(3):255-66.
114. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
115. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 2017;27(3):172-88.
116. van der Pol E, Boing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):48-56.
117. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
118. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:26913.

119. Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzas EI, Di Vizio D, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1396823.
120. Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(6):1093-106.
121. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):27-33.
122. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res*. 2003;109(4):175-80.
123. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res*. 2009;335(1):143-51.
124. Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, Hoffman EA, Vogel-Claussen J, Hueper K, et al. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):60-8.
125. Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:303-14.
126. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253-9.
127. Bledzka K, Smyth SS, Plow EF. Integrin alphaIIb beta3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res*. 2013;112(8):1189-200.
128. Grover SP, Mackman N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(4):709-25.
129. Skubitz KM, Skubitz AP. Interdependency of CEACAM-1, -3, -6, and -8 induced human neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Transl Med*. 2008;6:78.
130. Ranao DR, Kelley SL, Tapping RI. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J Biol Chem*. 2013;288(14):9729-41.
131. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*. 2018;14:618-25.

132. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 2011;109(5):593-606.
133. Hromada C, Muhleder S, Grillari J, Redl H, Holnthoner W. Endothelial Extracellular Vesicles-Promises and Challenges. *Front Physiol.* 2017;8:275.
134. Tremblay JC, Thom SR, Yang M, Ainslie PN. Oscillatory shear stress, flow-mediated dilatation, and circulating microparticles at sea level and high altitude. *Atherosclerosis.* 2017;256:115-22.
135. Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res.* 2013;112(10):1323-33.
136. Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, et al. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2007;49(4):902-8.
137. Jenkins NT, Padilla J, Boyle LJ, Credeur DP, Laughlin MH, Fadel PJ. Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium. *Hypertension.* 2013;61(3):615-21.
138. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem.* 2013;59(8):1166-74.
139. Santulli G. MicroRNAs and Endothelial (Dys) Function. *J Cell Physiol.* 2016;231(8):1638-44.
140. Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, Chen J, Mendeleev N, Goligorsky MS, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(3):H1106-14.
141. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999;104(1):93-102.
142. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1910-5.
143. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;104(22):2649-52.
144. Wang JM, Wang Y, Huang JY, Yang Z, Chen L, Wang LC, et al. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res.* 2007;44(3):241-8.

145. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):112-6.
146. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2007;110(7):2432-9.
147. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002;160(2):673-80.
148. Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica.* 2009;94(3):387-94.
149. Simmons GH, Padilla J, Young CN, Wong BJ, Lang JA, Davis MJ, et al. Increased brachial artery retrograde shear rate at exercise onset is abolished during prolonged cycling: role of thermoregulatory vasodilation. *J Appl Physiol (1985).* 2011;110(2):389-97.
150. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1999;282(21):2035-42.
151. Padilla J, Simmons GH, Vianna LC, Davis MJ, Laughlin MH, Fadel PJ. Brachial artery vasodilatation during prolonged lower limb exercise: role of shear rate. *Exp Physiol.* 2011;96(10):1019-27.
152. Tulis DA, Unthank JL, Prewitt RL. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol.* 1998;274(3):H874-82.
153. Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science.* 1986;231(4736):405-7.
154. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol (1985).* 2008;104(3):588-600.
155. Hastings NE, Simmers MB, McDonald OG, Wamhoff BR, Blackman BR. Atherosclerosis-prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes pro-inflammatory priming. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(6):C1824-33.

156. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem.* 2004;279(1):163-8.
157. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10417-22.
158. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev.* 2008;88(3):1009-86.
159. Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M, et al. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res.* 2003;93(12):1225-32.
160. Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res.* 2013;99(2):315-27.
161. Thijssen DH, Dawson EA, Tinken TM, Cable NT, Green DJ. Retrograde flow and shear rate acutely impair endothelial function in humans. *Hypertension.* 2009;53(6):986-92.
162. Schreuder TH, Green DJ, Hopman MT, Thijssen DH. Acute impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in humans. *Physiol Rep.* 2014;2(1):e00193.
163. Totosy de Zepetnek JO, Ditor DS, Au JS, MacDonald MJ. Impact of shear rate pattern on upper and lower limb conduit artery endothelial function in both spinal cord-injured and able-bodied men. *Exp Physiol.* 2015;100(10):1107-17.
164. Johnson BD, Mather KJ, Newcomer SC, Mickleborough TD, Wallace JP. Vitamin C prevents the acute decline of flow-mediated dilation after altered shear rate patterns. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2013;38(3):268-74.
165. Padilla J, Young CN, Simmons GH, Deo SH, Newcomer SC, Sullivan JP, et al. Increased muscle sympathetic nerve activity acutely alters conduit artery shear rate patterns. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(4):H1128-35.
166. Dyson KS, Shoemaker JK, Hughson RL. Effect of acute sympathetic nervous system activation on flow-mediated dilation of brachial artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(4):H1446-53.



167. Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, Reed C, Wright J, O'Driscoll G, et al. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol*. 2005;562(Pt 2):617-28.
168. Schreuder TH, Green DJ, Hopman MT, Thijssen DH. Impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in older subjects. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):199-204.
169. Padilla J, Simmons GH, Fadel PJ, Laughlin MH, Joyner MJ, Casey DP. Impact of aging on conduit artery retrograde and oscillatory shear at rest and during exercise: role of nitric oxide. *Hypertension*. 2011;57(3):484-9.
170. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA. Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension*. 2004;43(1):36-40.
171. Casey DP, Padilla J, Joyner MJ. alpha-adrenergic vasoconstriction contributes to the age-related increase in conduit artery retrograde and oscillatory shear. *Hypertension*. 2012;60(4):1016-22.
172. Breton-Romero R, Wang N, Palmisano J, Larson MG, Vasan RS, Mitchell GF, et al. Cross-Sectional Associations of Flow Reversal, Vascular Function, and Arterial Stiffness in the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(12):2452-9.
173. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(1):88-97.
174. Takahashi T, Suzuki S, Kubo H, Yamaya M, Kurosawa S, Kato M. Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2011;16(4):680-7.
175. Vaes AW, Spruit MA, Theunis J, Goswami N, Vanfleteren LE, Franssen FME, et al. Endothelial function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of studies using flow mediated dilatation. *Expert Rev Respir Med*. 2017;11(12):1021-31.
176. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
177. Johnson HM, Gossett LK, Piper ME, Aeschlimann SE, Korcarz CE, Baker TB, et al. Effects of smoking and smoking cessation on endothelial function: 1-year outcomes from a randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(18):1988-95.
178. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of

endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2149-55.

179. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(18):1760-71.

180. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, He M, et al. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax*. 2012;67(12):1067-74.

181. Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey BG, Strulovici-Barel Y, et al. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(2):224-32.

182. Lockett AD, Brown MB, Santos-Falcon N, Rush NI, Oueini H, Oberle AJ, et al. Active trafficking of alpha 1 antitrypsin across the lung endothelium. *PLoS One*. 2014;9(4):e93979.

183. Strulovici-Barel Y, Staudt MR, Krause A, Gordon C, Tilley AE, Harvey BG, et al. Persistence of circulating endothelial microparticles in COPD despite smoking cessation. *Thorax*. 2016;71(12):1137-44.

184. Barr RG, Mesia-Vela S, Austin JH, Basner RC, Keller BM, Reeves AP, et al. Impaired flow-mediated dilation is associated with low pulmonary function and emphysema in ex-smokers: the Emphysema and Cancer Action Project (EMCAP) Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(12):1200-7.

185. Eickhoff P, Valipour A, Kiss D, Schreder M, Cekici L, Geyer K, et al. Determinants of systemic vascular function in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(12):1211-8.

186. Moro L, Pedone C, Scarlata S, Malafarina V, Fimognari F, Antonelli-Incalzi R. Endothelial dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Angiology*. 2008;59(3):357-64.

187. Pizarro S, Garcia-Lucio J, Peinado VI, Tura-Ceide O, Diez M, Blanco I, et al. Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9(8):e106163.

188. de Matthaëis A, Greco A, Dagostino MP, Paroni G, Fontana A, Vinciguerra M, et al. Effects of hypercapnia on peripheral vascular reactivity in elderly patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Interv Aging*. 2014;9:871-8.

189. Urban MH, Ay L, Funk GC, Burghuber OC, Eickhoff P, Wolzt M, et al. Insulin resistance may contribute to vascular dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2014;126(3-4):106-12.
190. Boyer L, Chaar V, Pelle G, Maitre B, Chouaid C, Covali-Noroc A, et al. Effects of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease. *J Appl Physiol (1985).* 2011;110(5):1196-203.
191. Clarenbach CF, Sievi NA, Brock M, Schneiter D, Weder W, Kohler M. Lung Volume Reduction Surgery and Improvement of Endothelial Function and Blood Pressure in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(3):307-14.
192. Keymel S, Schueller B, Sansone R, Wagstaff R, Steiner S, Kelm M, et al. Oxygen dependence of endothelium-dependent vasodilation: importance in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Sci.* 2018;14(2):297-306.
193. Ives SJ, Harris RA, Witman MA, Fjeldstad AS, Garten RS, McDaniel J, et al. Vascular dysfunction and chronic obstructive pulmonary disease: the role of redox balance. *Hypertension.* 2014;63(3):459-67.
194. Naka KK, Tweddel AC, Doshi SN, Goodfellow J, Henderson AH. Flow-mediated changes in pulse wave velocity: a new clinical measure of endothelial function. *Eur Heart J.* 2006;27(3):302-9.
195. Marchetti N, Ciccolella DE, Jacobs MR, Crookshank A, Gaughan JP, Kashem MA, et al. Hospitalized acute exacerbation of COPD impairs flow and nitroglycerin-mediated peripheral vascular dilation. *COPD.* 2011;8(2):60-5.
196. Garcia-Lucio J, Peinado VI, de Jover L, Del Pozo R, Blanco I, Bonjoch C, et al. Imbalance between endothelial damage and repair capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195724.
197. Barr RG. The epidemiology of vascular dysfunction relating to chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(6):522-7.
198. Hoyos CM, Melehan KL, Liu PY, Grunstein RR, Phillips CL. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev.* 2015;20:15-26.
199. Trzepizur W, Martinez MC, Priou P, Andriantsitohaina R, Gagnadoux F. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J.* 2014;44(1):207-16.

200. Tuleta I, Franca CN, Wenzel D, Fleischmann B, Nickenig G, Werner N, et al. Intermittent Hypoxia Impairs Endothelial Function in Early Preatherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2015;858:1-7.
201. Blitzer ML, Loh E, Roddy MA, Stamler JS, Creager MA. Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(3):591-6.
202. Xie A, Skatrud JB, Puleo DS, Morgan BJ. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2001;91(4):1555-62.
203. Hijmering ML, Stroes ES, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(4):683-8.
204. Lewis NC, Bailey DM, Dumanoir GR, Messinger L, Lucas SJ, Cotter JD, et al. Conduit artery structure and function in lowlanders and native highlanders: relationships with oxidative stress and role of sympathoexcitation. *J Physiol.* 2014;592(5):1009-24.
205. Maher AR, Milsom AB, Gunaruwan P, Abozguia K, Ahmed I, Weaver RA, et al. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation.* 2008;117(5):670-7.
206. Ward ME. Dilation of rat diaphragmatic arterioles by flow and hypoxia: roles of nitric oxide and prostaglandins. *J Appl Physiol (1985).* 1999;86(5):1644-50.
207. Umbrello M, Dyson A, Feelisch M, Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(14):1690-710.
208. Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax.* 2005;60(4):265-7.
209. Blum A, Simsolo C, Sirchan R. Vascular responsiveness in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Eur J Intern Med.* 2014;25(4):370-3.
210. Chen YT, Chen KS, Chen JS, Lin WW, Hu WH, Chang MK, et al. Aortic and pulmonary input impedance in patients with cor pulmonale. *Jpn Heart J.* 1990;31(5):619-29.
211. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, et al. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med.* 1991;324(22):1539-47.
212. Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol.* 2014;592(5):841-59.

213. Vantanajal JS, Ashmead JC, Anderson TJ, Hepple RT, Poulin MJ. Differential sensitivities of cerebral and brachial blood flow to hypercapnia in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(1):87-93.
214. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-38.
215. Thom SR, Milovanova TN, Bogush M, Bhopale VM, Yang M, Bushmann K, et al. Microparticle production, neutrophil activation, and intravascular bubbles following open-water SCUBA diving. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(8):1268-78.
216. O'Driscoll BR, Howard LS, Earis J, Mak V. British Thoracic Society Guideline for oxygen use in adults in healthcare and emergency settings. *BMJ Open Respir Res*. 2017;4(1):e000170.
217. Seals DR, Johnson DG, Fregosi RF. Hyperoxia lowers sympathetic activity at rest but not during exercise in humans. *Am J Physiol*. 1991;260(5 Pt 2):R873-8.
218. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R, Gunawardena R, Naidu A. Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Respir J*. 2003;21(1):48-51.
219. Modun D, Krnic M, Vukovic J, Kokic V, Kukoc-Modun L, Tsikas D, et al. Plasma nitrite concentration decreases after hyperoxia-induced oxidative stress in healthy humans. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2012;32(5):404-8.
220. Crawford P, Good PA, Gutierrez E, Feinberg JH, Boehmer JP, Silber DH, et al. Effects of supplemental oxygen on forearm vasodilation in humans. *J Appl Physiol* (1985). 1997;82(5):1601-6.
221. Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ. Impact of age, sex, and exercise on brachial artery flow-mediated dilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(3):H1109-16.
222. Montero D, Pierce GL, Stehouwer CD, Padilla J, Thijssen DH. The impact of age on vascular smooth muscle function in humans. *J Hypertens*. 2015;33(3):445-53; discussion 53.
223. Scalvini S, Porta R, Zanelli E, Volterrani M, Vitacca M, Pagani M, et al. Effects of oxygen on autonomic nervous system dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13(1):119-24.
224. Mohammed J, Meeus M, Derom E, Da Silva H, Calders P. Evidence for Autonomic Function and Its Influencing Factors in Subjects With COPD: A Systematic Review. *Respir Care*. 2015;60(12):1841-51.

225. Barnard P, Andronikou S, Pokorski M, Smatresk N, Mokashi A, Lahiri S. Time-dependent effect of hypoxia on carotid body chemosensory function. *J Appl Physiol* (1985). 1987;63(2):685-91.
226. Querido JS, Kennedy PM, Sheel AW. Hyperoxia attenuates muscle sympathetic nerve activity following isocapnic hypoxia in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108(4):906-12.
227. van Helvoort HA, Heijdra YF, Heunks LM, Meijer PL, Ruitenbeek W, Thijs HM, et al. Supplemental oxygen prevents exercise-induced oxidative stress in muscle-wasted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1122-9.
228. McDonald CF. Oxygen therapy for COPD. *J Thorac Dis*. 2014;6(11):1632-9.
229. Branson RD. Oxygen Therapy in COPD. *Respir Care*. 2018;63(6):734-48.
230. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. *Thorax*. 2004;59(12):1016-9.
231. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol*. 1998;274(6):L908-13.
232. Peinado VI, Gomez FP, Barbera JA, Roman A, Angels Montero M, Ramirez J, et al. Pulmonary vascular abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease undergoing lung transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(12):1262-9.
233. Arcasoy SM, Christie JD, Ferrari VA, Sutton MS, Zisman DA, Blumenthal NP, et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(5):735-40.

# 10. ŽIVOTOPIS

## Osobni podaci

**Ime i prezime:** Suzana Mladinov

**Datum i mjesto rođenja:** 16. veljače 1976., Split, Hrvatska

**Adresa stanovanja:** Doverska 34, 21 000 Split, Hrvatska

**Adresa zaposlenja:** Klinika za plućne bolesti, Klinički bolnički centar Split,  
Spinčićeva 1, 21 000 Split, Hrvatska

**Telefon:** 021/771 963

**Mobitel:** 095/90 21 477

**E-mail:** suzana.mladinov@gmail.com

## Obrazovanje

1982.-1990. Osnovna škola „Veljko Neškovićin”, Split

1990.-1995. Opća gimnazija „Vladimir Nazor”, Split

1995.-2000. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
stručni naziv: doktor medicine

2004.- Poslijediplomski doktorski studij Sveučilišta u Splitu,  
studijski program: Klinička medicina utemeljena na dokazima

## Stručno usavršavanje

2007.-2011. Specijalizacija interne medicine, Klinički bolnički centar Split

2014.-2016. Subspecijalizacija pulmologije, Klinički bolnički centar Split

### Zaposlenja

2001. Klinička bolnica Split  
doktor medicine-pripravnik
- 2002.-2005. Dom zdravlja „Dr. Ante Franulović“, Vela Luka  
liječnik obiteljske medicine
2006. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu  
znanstveni novak na Katedri za neuroznanost
- 2007.-2011. Klinika za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split  
specijalizant interne medicine
- 2011.-2016. Klinika za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split  
specijalist interne medicine
- 2016.- Klinika za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split  
specijalist interne medicine, subspecijalist pulmologije

### Nastavna aktivnost

- 2016.- Suradničko zvanje naslovnog asistenta pri Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu: znanstveno područje Biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje Kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana Interna medicina

### Stručno-znanstvene publikacije u indeksiranim časopisima

1. Mise K, Capkun V, Jurcev-Savicevic A, Sundov Z, Bradaric A, **Mladinov S**. The influence of gastroesophageal reflux in the lung: a case-control study. *Respirology*. 2010 Jul;15(5):837-42.
2. Milas I, Lukšić B, **Mladinov S**, Glavinić R, Beljan R, Knežević S. Spontana ruptura slezene u infekcijskoj mononukleozii: prikaz tri slučaja. *Medica Jadertina*. Vol.40 No.3-4 Ožujak 2011.
3. Lukšić B, **Mladinov S**, Goić-Barišić I, Srzić A, Brzić I, Perić L. Acute appendicitis, a rare complication of varicella: a report of three cases. *J Infect*. 2012 Apr;64(4):430-3.
4. Tandara L, Grubisic TZ, Ivan G, Jurisic Z, Tandara M, Gugo K, **Mladinov S**, Salamunic I. Systemic inflammation up-regulates serum hepcidin in exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem*. 2015 Dec;48(18):1252-7.
5. Norris HC, Mangum TS, Kern JP, Elliott JE, Beasley KM, Goodman RD, **Mladinov S**, Barak OF, Bakovic D, Dujic Z, Lovering AT. Intrapulmonary arteriovenous anastomoses



- in humans with chronic obstructive pulmonary disease: implications for cryptogenic stroke? *Exp Physiol*. 2016 Aug 1;101(8):1128-42.
6. Piljić Burazer M, **Mladinov S**, Čapkun V, Kuret S, Glavina Durdov M. The Utility of Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1), Napsin A, Excision Repair Cross-Complementing 1 (ERCC1), Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression in Small Biopsy in Prognosis of Patients with Lung Adenocarcinoma - A Retrograde Single-Center Study from Croatia. *Med Sci Monit*. 2017 Jan 27;23:489-497.
  7. Barak OF, **Mladinov S**, Hoiland RL, Tremblay JC, Thom SR, Yang M, Mijacika T, Dujic Z. Disturbed blood flow worsens endothelial dysfunction in moderate-severe chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*. 2017 Dec 5;7(1):16929.
  8. Hoiland RL, **Mladinov S**, Barak OF, Willie CK, Mijacika T, Stembridge M, Dujic Z, Ainslie PN. Oxygen therapy improves cerebral oxygen delivery and neurovascular function in hypoxaemic chronic obstructive pulmonary disease patients. *Exp Physiol*. 2018 Aug;103(8):1170-1177.

### Kongresna priopćenja

1. Mladinov S, Kokeza J, Popovic V, Gudelj I, Ardalic Z, Mise K. Bronchoscopic findings in patients with gastroesophageal reflux (GER) and dry cough. *European Respiratory Journal* 2015 46: PA1834.
2. Mladinov S, Skopljanac I, Ivcevic V, Kuret S, Glavina Durdov M, Miše K. EGFR mutation in non-small cell lung cancer (NSCLC) in South Croatia. *European Respiratory Journal* 2015 46: PA4249.
3. Ivcevic V, Kokeza J, Mise K, Mladinov S, Bozinovic T, Popovic V. Case report: idiopathic acute eosinophilic pneumonia (IAEP). *EAACI Online Library*. Jun 6, 2015; 104354.
4. Kokeza J, Mladinov S, Popovic V, Bozinovic T, Ivcevic V, Peric I, Lozo E, Mise K. Lung cancer in elderly. 5. kongres Hrvatskog torakalnog društva, Zagreb, Hrvatska. 2015.
5. Piljić Burazer M, Mladinov S, Čapkun V, Kuret S, Glavina Durdov M. Prediktivno i prognostičko značenje izražaja TTF-1, napsina A, ERCC1, ALK i EGFR u malim bioptičkim uzorcima u bolesnika s adenokarcinomom pluća - retrogradno istraživanje jednog centra iz Hrvatske. 7. kongres Hrvatskog torakalnog društva, Zagreb, Hrvatska. 2017.

6. Božinović T, Mladinov S, Kokeza J, Popović V, Ilak D, Šegrt I, Škopljanac I, Piljić Burazer M. Analiza EGFR mutacija iz bronhoskopskih uzoraka u KBC Split. 48. kongres Hrvatskog pulmološkog društva, Pula, Hrvatska. 2017.

### **Članstva u strukovnim organizacijama**

Hrvatska liječnička komora, Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko pulmološko društvo, Hrvatsko torakalno društvo, Hrvatsko somnološko društvo, Europsko respiracijsko društvo (European Respiratory Society)

# 11. PRILOZI

## Prilog 1. Skala zaduhe mMRC (engl. *modified Medical Research Council*)

Stupanj zaduhe	
0	zaduha pri teškoj tjelesnoj aktivnosti
1	zaduha pri brzom hodu po ravnom ili pri hodu po blagoj uzbrdici
2	hod po ravnom sporiji od vršnjaka zbog zaduhe ili mora stati i uhvatiti dah pri hodu vlastitim tempom
3	mora stati i uhvatiti dah nakon prohodanih oko 100 m ili nakon nekoliko minuta hoda po ravnom
4	zbog zaduhe ne napušta kuću ili osjeća zaduhu pri oblačenju

## Prilog 2. Upitnik CAT (engl. *COPD Assessment Test*)

Za svaku tvrdnju navedenu ispod, označite (znakom X) kućicu koja vas trenutno najbolje opisuje.

Nikada ne kašljem	0	1	2	3	4	5	Stalno kašljem	
Uopće nemam sekreta (sluzi) u plućima	0	1	2	3	4	5	Moja su pluća u cijelosti puna sekreta (sluzi)	
Uopće ne osjećam stezanje u prsnom košu	0	1	2	3	4	5	Osjećam jako stezanje u prsnom košu	
Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama ne nedostaje mi zraka	0	1	2	3	4	5	Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama jako mi nedostaje zraka	
Nisam ograničen u obavljanju bilo kojih kućanskih aktivnosti	0	1	2	3	4	5	Vrlo sam ograničen u obavljanju kućanskih aktivnosti	
S povjerenjem izlazim iz kuće bez obzira na svoju plućnu bolest	0	1	2	3	4	5	Uopće nemam povjerenja kad izlazim iz kuće zbog svoje plućne bolesti	
Čvrsto spavam	0	1	2	3	4	5	Ne spavam čvrsto zbog svoje plućne bolesti	
Imam puno energije	0	1	2	3	4	5	Uopće nemam energije	
							Ukupno	

### **Prilog 3. Objavljeni rad iz ovog istraživanja**

Barak OF\*, Mladinov S\*, Hoiland RL, Tremblay JC, Thom SR, Yang M, Mijacika T, Dujic Z. Disturbed blood flow worsens endothelial dysfunction in moderate-severe chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 2017 Dec 5;7(1):16929. doi: 10.1038/s41598-017-17249-6.

\* *prvo autorstvo s jednakim doprinosom*

Časopis *Scientific reports*: čimbenik odjeka 4.259.