

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Danijel Knežević

KARAKTERIZACIJA ENDOTELNE DISFUNKCIJE I ULOGA
INTERLEUKINA-18 U RAZVOJU ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKE
OZLJEDE NAKON KIRURŠKE REVASKULARIZACIJE
MIOKARDA

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Danijel Knežević

KARAKTERIZACIJA ENDOTELNE DISFUNKCIJE I ULOGA
INTERLEUKINA-18 U RAZVOJU ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKE
OZLJEDE NAKON KIRURŠKE REVASKULARIZACIJE
MIOKARDA

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Sotošek, dr. med.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Danijel Knežević

CHARACTERISATION OF ENDOTHELIAL DISFUNCTION AND
THE ROLE OF INTERLEUKIN-18 IN ISCHAEMIC REPERFUSION
DAMAGE DEVELOPMENT AFTER SURGICAL MYOCARDIAL
REVASCULARISATION

Doctoral thesis

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Sotošek, dr. med.

Rijeka, 2025.

Mentor rada: prof. dr. sc. Vlatka Sotošek, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred
povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Doktorski rad je izrađen na Klinici za kirurgiju i Klinici za anesteziologiju, intenzivnu medicinu i liječenje boli Kliničkog bolničkog centra Rijeka te Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Sotošek, dr. med. Doktorski rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projekta “Endotelna disfunkcija, upala i oksidacijski stres u kardiokirurških bolesnika” (IPS-2023-02-9560) te projekta "Karakterizacija endotelne disfunkcije i uloga IL-18 u razvoju ishemijsko-reperfuzijske ozljede nakon kirurške revaskularizacije miokarda" (uniri-biomed-18-5 5689) pod vodstvom prof. dr.sc. Vlatke Sotošek, dr. med.

ZAHVALE

U izradi mog doktorskog rada veliku potporu i pomoć pružila mi je moja mentorica prof. dr. sc. Vlatka Sotošek, pogotovo pri samome kraju kada me pogurala više nego sam se sam uspijevao pogurnuti, na čemu joj od srca zahvaljujem.

Bez bolesnika, ove studije, kao i niti jedne druge ne bi bilo. Veliku zahvalu upućujem svim bolesnicima koji su, nesebično i dragovoljno, pristali sudjelovati u ovom radu.

Veliko hvala upućujem svim djelatnicama i djelatnicima Zavoda za fiziologiju i imunologiju, kardiokirurške sale i jedinice intenzivnoga liječenja za liječenje kardiokirurških bolesnika, odjela kardijalne kirurgije, transfuzije i laboratorija, na velikoj pomoći u prikupljanju uzoraka te pri radu u laboratoriju.

Veliko hvala svim mojim prijateljicama i prijateljima, kolegicama i kolegama za razumijevanje, podršku, ohrabrivanje tijekom cijeloga procesa. Bilo je i smijeha i frustracija, ali da nije bilo njih bi vjerojatno davno odustao.

Posebno hvala i Tebi, koja si me trpjela dok sam se zatvarao u sobu „tipkati”, i nikako uspijevao završiti, samo ti vjerojatno znaš koliko mi je ovo bilo teško.

Za kraj, najveću zahvalnost iskazujem svojim roditeljima. Omogućili ste mi apsolutno sve što ste mogli i pobrinuli se da mi nikad ništa ne nedostaje. Velikim dijelom me učinili osobom koja jesam, osobom koja se i odlučila na ovo. Bez Vas bi sve ovo bilo u najmanju ruku manje bitno.

Sažetak

Cilj istraživanja

Kardiovaskularne bolesti su jedna od vodećih uzroka smrti u svijetu. Kirurška revaskularizacija miokarda je terapijski modalitet liječenja kada medikamentozna terapija niti perkutana koronarna intervencija nisu učinkovite. Postoje dvije kirurške tehnike, uz primjenu izvantjelesnog krvotoka te bez primjene izvantjelesnog krvotoka, Kirurška revaskularizacija miokarda, neovisno o korištenoj tehnici, uzrokuje ishemijsko–reperfuzijsku ozljedu miokarda posredovanu upalom i raspadom endotelnog glikokaliksa. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati učinak korištene kirurške tehnike na endotelnu disfunkciju i upalni odgovor posredovan interleukinom-18 (IL-18).

Ispitanici i metode

U ovo prospektivno kliničko istraživanje uključeno je 60 bolesnika kojima je bila učinjena revaskularizacija miokarda. Bolesnici su bili raspoređeni u dvije skupine; Skupinu 1, u kojoj je korišten izvantjelesni krvotok i Skupinu 2, u kojoj nije bio primijenjen izvantjelesni krvotok. Svakom bolesnika bilježili su se klinički i demografski podaci te su uzimani uzorci periferne krvi neposredno prije operacije (T1) te 24 (T2) i 72 (T3) sata nakon operacije. U uzorcima krvi bolesnika određivan je apsolutni broj leukocita te koncentracije C reaktivnog proteina (CRP), troponina T (cTn) i N-terminalnog fragmenta prohormona natriuretskog peptida tipa B (NT-proBNP). U plazmi se se enzimatskom imunokemijskom metodom (ELISA) mjerile koncentracije IL-18 te razgradnih produkata endotelnog glikokaliksa (sindekana-1, hijaluronske kiseline i sindekana-4) te von Willebrand faktora. Iz uzoraka krvi izolirane su mononuklearne stanice te su se obilježavale stanice NK i unutarstanična molekula perforin te su se analizirali protočnom citometrijom.

Rezultati

Apsolutni broj leukocita, koncentracije Tn i CRP-a bili su viši u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskim točkama T2 i T3 te u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine. Koncentracije NTproBNP su porasle u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1, no nije bilo statističke značajne razlike između skupina. Koncentracija IL-18 u perifernoj krvi bile su više u vremenskim točkama T2 i T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine te u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2, ali ne i koronarnom sinusu i bulbusu aorte. Koncentracije sindekana – 1 statistički značajno su poraste 24 sata nakon operacije u Skupini 1, ali ne i u Skupini 2 te su bile statistički značajno niže u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T2. Koncentracije hijaluronske kiseline poraste su statistički značajno u vremenskoj točki T3 u Skupini 1, ali ne i u Skupini 2. Koncentracije von Willebrand faktora su bile više u Skupini 1 u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1, a Skupini 2 u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1. Udio stanica NK te perforin pozitivnih stanica NK i njihovih subpopulacija nije se statistički značajno mijenjao niti među skupinama niti u analiziranim vremenskim točkama u uzorcima periferne krvi, koronarnog sinusa i aortalnog bulbusa.

Zaključak

Ovo istraživanje potvrđuje da korištenje izvantjelesnog krvotoka tijekom revaskularizacije miokarda potiče snažni upalni odgovor posredovan IL-18 koji utječe na povećanju razgradnju endotelnog glikokaliksa i posljedični razvoj ishemijsko reperfuzijske ozljede.

Ključne riječi: Glikokaliks, Interleukin – 18, Perforin, Revaskularizacija miokarda, Sindekan-1, Stanice NK

Summary

Objectives

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. Surgical myocardial revascularisation is a therapeutic option when medication or percutaneous coronary intervention isn't effective. Two surgical techniques exist, with usage of extracorporeal circulation and without. Surgical myocardial revascularisation, regardless of the technique used, causes ischemia–reperfusion injury (IRI) in the myocardium mediated by inflammation and degradation of the endothelial glycocalyx (EG). The aim of this study is to determine the effect of surgical technique on endothelial dysfunction (ED) and inflammatory response mediated by Interleukin-18 (IL-18).

Patients and methods

This prospective clinical study included 60 patients scheduled for myocardial revascularisation. The patients were allocated into two groups (30 in each group): Group 1 - usage of extracorporeal circulation, Group 2 – no usage of extracorporeal circulation. Every patient had their demographic and clinical parameters measured as well as their blood sampled. Peripheral blood was sampled before surgery (T1), 24(T2) and 72(T3) hours after surgery. We measured the absolute leukocyte count, concentrations of C Reactive Protein (CRP), Troponin T (cTn) and N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP). We also used Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to measure concentrations of IL-18, as well as endothelial glycocalyx degradation products (Syndecan-1, Hialuronic acid, Syndecan-4) and von Willebrand factor. From the blood samples we also isolated mononuclear cells and marked NK cells and intracellular perforin which we analyzed via flow cytometry.

Results

Absolute leukocyte count, TnT and CRP concentrations were higher in group 1 compared to group 2 in T2 and T3 time points compared to T1. NT-proBNP was elevated in the T3 time point compared to T1, with no statistical differences between groups. IL-18 concentration was higher in the T2 and T3 time points compared to T1 in both groups, and it was higher in group 1 compared to group 2. There were no differences in the samples taken from the aortic bulb and coronary sinus. Syndecan-1 concentrations were higher in T2 compared to T1 in group 1, but not group 2 and they were lower in T3 compared to T2. Hialuronic acid concentrations were higher at T3 in group 1, but not in group 2. von Willebrand concentrations were higher in T3 compared to T1 in group 1, while in group 2 we got higher values in T2 compared to T1 and then lower in T3 compared to T2. NK cell ratio and perforin positive NK cells and their subpopulations had no significant differences between groups or time points.

Conclusion

This research confirms that extracorporeal circulation during myocardial revascularisation seems to provoke a stronger inflammatory response mediated by IL-18 which induces stronger ED and subsequent development of ischemia–reperfusion injury

Key words: Glycocalyx, Interleukin-18, NK cells, Myocardial Revascularization, Perforin, Syndecan-1

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED RANIJIH ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1.Ishemijska bolest srca	2
1.1.1. Definicija koronarne bolesti srca.....	2
1.1.2. Etiologija i patogeneza.....	2
1.1.2.1.Endotelna disfunkcija i ateroskleroza koronarnih žila.....	2
1.1.2.2.Ostali uzroci ishemije miokarda.....	4
1.1.3. Epidemiologija.....	5
1.1.4. Čimbenici rizika.....	6
1.1.4.1.Promjenjivi čimbenici rizika.....	6
1.1.4.2.Nepromjenjivi čimbenici rizika.....	7
1.1.5. Vrste koronarne bolesti.....	8
1.1.6. Entiteti vezani uz koronarnu bolest srca.....	10
1.1.6.1.Stabilna angina pectoris.....	10
1.1.6.2.Akutni koronarni sindrom.....	11
1.1.6.3.Nestabilna angina pectoris.....	11
1.1.6.4.Akutni infarkt miokarda.....	11
1.1.6.5.Mikrovaskularna angina.....	13
1.1.6.6.Vazospastična angina pectoris (Prinzmetalova angina).....	14
1.1.6.7.Nijema ishemija.....	14
1.1.6.8.Iznenadna srčana smrt.....	14
1.1.6.9.Zatajivanje srca uslijed kronične ishemijske kardiomiopatije.....	14
1.1.6.10. Aritmije kao posljedica ishemijske ozljede srca.....	15
1.1.7. Dijagnostika bolesnika s koronarnom bolesti srca.....	15
1.1.8. Liječenje bolesnika s koronarnom bolesti srca.....	16
1.1.8.1.Konzervativno liječenje.....	16
1.1.8.2.Perkutana koronarna intervencija.....	16
1.1.8.3.Kirurška revaskularizacija miokarda.....	16
1.1.8.3.1. Premosnica uz primjenu izvantjelesnog krvotoka.....	17
1.1.8.3.2. Premosnica bez primjene izvantjelesnog krvotoka.....	18
1.1.8.3.3. Izbor tehnike za izvođenje kirurške revaskularizacije srca.....	18

1.1.9. Upalni odgovor tijekom kardiokirurške revaskularizacije miokarda.....	19
1.1.9.1. Interleukin 18.....	20
1.1.9.2. C reaktivni protein.....	21
1.1.9.3. Promjene stanične imunosti u bolesnika tijekom i nakon kirurške revaskularizacije.....	22
1.1.9.3.1. Stanice NK.....	22
1.1.9.3.2. Perforin.....	24
1.1.10. Endotelni glikokaliks i endotelna disfunkcija.....	25
1.1.11. Ishemijsko reperfuzijska ozljeda.....	27
1.1.12. Marker srčanoga oštećenja.....	29
1.1.12.1. Troponin.....	29
1.1.12.2. N-terminalni fragment prohormona natriuretskog peptida tipa B.....	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
3. ISPITANICI I METODE.....	33
3.1. Ispitanici.....	34
3.2. Etičnost istraživanja i informirani pristanak.....	35
3.3. Materijali.....	35
3.3.1. Kemikalije, mediji i puferi.....	35
3.3.2. Laboratorijski pribor i posude.....	37
3.3.3. Protutijela i imunoenzimski kitovi.....	37
3.3.4. Laboratorijski uređaji.....	38
3.4. Uzorkovanje krvi.....	39
3.5. Metode.....	39
3.5.1. Anestezija.....	39
3.5.2. Kirurška revaskularizacija srca.....	40
3.5.2.1. Kirurška revaskularizacija miokard uz primjena stroja za izvantjelesni krvotok	40
3.5.2.2. Kirurška revaskularizacija miokard bez primjene stroja za izvantjelesni krvotok.....	40
3.6. Klinički parametri.....	41

3.7.Određivanje apsolutnog broja leukocita, koncentracije C-reaktivnog proteina i troponina	41
3.8.Određivanje koncentracija interleukina-18, sindekana – 1, sindekan – 4, hijaluronske kiseline i von Willebrand faktora u plazmi.....	41
3.9.Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi.....	42
3.10. Obilježavanje površinskih biljega na izoliranim mononuklearnim stanicama periferne krv.....	42
3.11. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnog perforina u limfocitnim subpopulacijama.....	42
3.12. Statistička obrada podataka.....	43
4. REZULTATI.....	44
4.1.Klinički i demografski podatci bolesnika.....	45
4.2.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju troponina.....	47
4.3.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida.....	48
4.4.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na ukupan broj leukocita.....	49
4.5.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju C reaktivnog proteina.....	50
4.6.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju interleukina – 18.....	52
4.7.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentracije razgradnih produkta endotelnog glikokaliksa.....	53
4.8.Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentracije von Willebrandovog faktora.....	56

4.9. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na udio stanica NK.....	58
4.10. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na izražaj perforina u stanicama NK.....	60
4.11. Korelacije između koncentracija interleukina – 18, broja leukocita, koncentracije C reaktivnog proteina, troponina T i N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida.	62
4.12. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa te von Willebrand faktora.....	63
4.13. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i udjela stanica NK te njihovih subpopulacija.....	64
4.14. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i pefrorin pozitivnih stanica NK te njihovih subpopulacija.....	65
5. RASPRAVA.....	66
6. ZAKLJUČCI.....	76
7. LITERATURA.....	78
Popis kratica.....	94
Prilozi.....	97
Životopis.....	100

1. UVOD I PREGLED RANIJIH ISTRAŽIVANJA

1.1. Ishemijska bolest srca

1.1.1. Definicija koronarne bolesti srca

Koronarna bolest srca je bolest koja najčešće nastaje kao posljedica suženja lumena koronarnih arterija uslijed kompleksnog procesa ateroskleroze. Mogući su i drugi uzroci razvoja koronarne bolesti srca, poput funkcijskog poremećaja koronarnih arterija ili raslojavanja stijenke koronarnih arterija. Neovisno o uzroku, dolazi do smanjenja protoka krvi kroz srčano tkivo te posljedično do ishemije tkiva koje opskrbljuju zahvaćene krvne žile uslijed nedostatne dostave kisika u zahvaćeni dio miokarda. Ishemija, ako progredira, u konačnici može dovesti i do nekroze, odnosno odumiranja, zahvaćenih stanica srčanog tkiva, što nazivamo infarktom miokarda te razvoja lokalne upalne reakcije, ali i sustavnog upalnog odgovora [1-4].

1.1.2. Etiologija i patogeneza

1.1.2.1. Endotelna disfunkcija i ateroskleroza koronarnih žila

Ateroskleroza, odnosno proces sužavanja i otvrdnjavanja stijenke krvnih žila srca je najčešći uzrok koronarne bolesti srca. Ateroskleroza je kronična bolest, uvjetovana raznim genetskim čimbenicima te navikama bolesnika. Bolest je progresivna te se prezentira stvaranjem naslaga, odnosno plakova na unutarnjoj stijenci krvnih žila [3]. Unutarnju stijenku krvnih žila čini endotel u kombinaciji s endotelnim glikokaliksom. Ako postoje uvjeti za razvoj aterosklerotske bolesti doći će do nastajanja plaka, ozljede endotela i endotelnog glikokaliksa te posljedično do endotelne disfunkcije [5-7]. Endotelna disfunkcija dodatno ubrzava i potiče upalne promjene u lokalno zahvaćenome tkivo te dovodi do daljnjeg oštećenja što dovodi do progresije stupnja ishemije te, u slučaju značajnog ograničenja perfuzije zahvaćenog tkiva miokarda, do akutnog infarkta miokarda.

Ateroskleroza započinje oštećenjem endotela krvnih žila, pri čemu dolazi do taloženja različitih sastojaka plazme, osobito lipoproteina niske gustoće (LDL, *engl. low-density lipoproteins*). Takvo nakupljanje predstavlja početak kompleksnog patološkog procesa koji uključuje imunosne, upalne i stanične mehanizme. Na oštećenom endotelu aktiviraju se trombociti koji počinju izlučivati trombocitni čimbenik rasta (PDGF, *engl. platelet-derived growth factor*) i sintetizirati razne citokine što pojačava njihovu adheziju i agregaciju. PDGF i LDL u kombinaciji

djeluju na metabolizam kolesterola te kako se posljedično kolesterol ne razgrađuje u dovoljnoj mjeri, on se nakuplja u i oko glatkih mišićnih stanica, što dovodi do stvaranja masnih pruga koje predstavljaju najraniji oblik aterosklerotske lezije. Paralelno s tim, monociti iz krvotoka ulaze u područje oštećenja i diferenciraju se u makrofage. Oni fagocitiraju LDL i lipide iz nekrotiziranih stanica, pretvarajući se u tzv. pjenaste stanice koje dodatno doprinose upalnoj reakciji [8-12].

Pjenaste stanice izlučuju upalne posrednike koji potiču daljnju proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih stanica u intimu. S vremenom, oko nakupljenih lipida stvara se sloj vezivnog tkiva, tzv. fibrozna kapa, čime nastaje razvijeni aterosklerotski plak, poznat i kao aterom. Građa plaka može varirati: stabilni plakovi imaju malu lipidnu jezgru i debeli fibrozni pokrov, dok nestabilni (vulnerabilni) plakovi imaju tanku fibroznju kapu i veliku lipidnu jezgru, zbog čega su skloniji pucanju. Klinička manifestacija koronarne bolesti ne ovisi isključivo o stupnju suženja arterije. Iako stenoze veće od 70 % značajno utječu na protok krvi, čak i manji ateromi mogu dovesti do akutnih koronarnih događaja, osobito ako su nestabilni. U tom je kontekstu važna i uloga upale [8. 9].

U bolesnika s koronarnom bolešću uočava se povišena koncentracija pro-upalnih posrednika, poput interleukina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 te C-reaktivnog proteina (CRP) [13-15]. Aktivirani endotel oslobađa citokine i kemokine koji privlače različite leukocitne podtipove - neutrofile, limfocite, monocite i stanice NK. Te stanice se vežu na endotel, aktiviraju i ulaze u stijenku krvne žile te u miokard, osobito na mjestima ishemije. IL-1 β ima ključnu ulogu u privlačenju limfocita tijekom akutnih koronarnih zbivanja, a zajedno s interferonom gama (IFN- γ) i čimbenikom tumorske nekroze alfa (TNF- α , *engl. tumor necrosis factor alpha*) može potaknuti apoptozu kardiomiocita. U tom procesu sudjeluju i specifični podtipovi limfocita T (CD4⁺CD28⁻), koji pokazuju citotoksičnu aktivnost sličnu stanicama NK. Limfociti T i stanice NK su identificirani u perifernoj krvi i u plakovima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom [16]. Njihova sposobnost da potiču apoptozu glatkih mišićnih stanica ključna je za destabilizaciju plaka. To čine putem djelovanja citotoksičnih molekula poput perforina, uz sudjelovanje drugih proapoptotičkih čimbenika. Pucanje plaka oslobađa njegov sadržaj u lumen koronarne arterije te dolazi do aktivacije trombocita i otpuštanja proagregacijskih tvari. Nakon toga slijedi kaskadna aktivacija koagulacijskog sustava, što završava stvaranjem tromba i posljedičnim infarktom miokarda. Iako je stupanj suženja arterije važan, nestabilnost plaka i intenzitet upalne reakcije često

su ključni čimbenici u nastanku akutnih koronarnih događaja. Kvaliteta ateroma, a ne samo kvantiteta, određuje ishod bolesti [13-28].

1.1.2.2.Ostali uzroci ishemije miokarda

Više od 90% bolesnika s ishemijom miokarda u osnovi boluje od ateroskleroze, no valja napomenuti i ostale moguće uzroke kao što su spazam koronarnih arterija, vaskulitisi, disekcija uzlaznog dijela aorte i trauma srca [29-33].

Spazam koronarnih arterija (Prinzmetalova angina) predstavlja reverzibilno stanje koje se očituje suženjem lumena krvne žile i smanjenim protokom, što može dovesti do ishemije miokarda i pojave simptoma. Spazam se može javiti na arterijama koje su već zahvaćene aterosklerotskim promjenama, ali i na potpuno zdravim krvnim žilama. Točan mehanizam nastanka koronarnog spazma još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Ipak, pretpostavlja se da se radi o poremećaju ravnoteže između vazokonstriktorskih i vazodilatorskih čimbenika. Dugotrajan spazam, osobito u arterijama koje su već sužene, može aktivirati prokoagulacijske mehanizme i potaknuti stvaranje tromba, što u konačnici može rezultirati infarktom miokarda. Osim toga, određene tvari, npr. nikotin, poznate po svom vazokonstriktorskom djelovanju, mogu izazvati ili pogoršati koronarni spazam [29, 30].

Upalne bolesti krvnih žila, odnosno vaskulitisi, također mogu biti uzrokom poremećaja perfuzije u koronarnim arterijama. Neki od sustavnih vaskulitisa koji mogu utjecati na koronarnu cirkulaciju uključuju aortitis uzrokovan sifilisom (lues), Takayasu vaskulitis, Kawasaki sindrom, ankilozirajući spondilitis, itd. U tim stanjima dolazi do upale stijenke krvnih žila, što može rezultirati suženjem i/ili trombozom [29-31].

Disekcija aorte predstavlja stanje koje nastaje kada dođe do pucanja intime (unutarnjeg sloja) aorte, pri čemu se krv utiskuje između intime i medije stvarajući tzv. lažni lumen. Posljedično dolazi do smanjenja normalnog protoka kroz arteriju. Disekcija se može razviti bilo gdje duž aorte i može se proširiti prema proksimalnim ili distalnim dijelovima, uključujući i koronarne arterije.

Fizičke ozljede prsnog koša mogu dovesti do oštećenja koronarnih arterija. Takve traume najčešće su posljedica prometnih nesreća, ratnih ozljeda ili drugih mehaničkih udaraca u područje srca. Oštećenje može biti direktno u obliku razdora zida arterije, ili indirektno kroz sekundarne upalne i ishemijske promjene [29, 32, 33].

1.1.3. Epidemiologija

Kardiovaskularne bolesti, odnosno bolesti cirkulacijskog sustava, uključujući ishemijsku bolest srca, su najčešći uzrok smrti u svijetu pa i Hrvatskoj.

Koronarna bolest srca ostaje najčešći oblik bolesti srca te predstavlja vodeći uzrok hospitalizacija i smrti u razvijenim zemljama. Unatoč napretku u prevenciji i liječenju, i dalje predstavlja značajan javnozdravstveni izazov. U Hrvatskoj, prema podacima za 2023. godinu, kardiovaskularne bolesti bile su uzrok smrti kod 39 % svih umrlih, odnosno kod 19 937 osobe. Među njima, ishemijska bolest srca (uključujući kardiovaskularnu bolest) odgovorna je za 5 899 smrti, čime se potvrđuje kao jedan od glavnih pojedinačnih uzroka smrtnosti. Iako je tijekom posljednjih desetljeća zabilježen pad smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, između 2002. i 2019. godine stopa smrtnosti pala je za više od 30 %, no Hrvatska i dalje bilježi višu smrtnost u odnosu na prosjek Europske unije [34].

U Europskoj regiji kardiovaskularne bolesti uzrokuju oko 43,25 % svih smrti, dok prema podacima Europskog kardiološkog društva (ESC, *engl. European Society of Cardiology*) u 55 analiziranih zemalja kardiovaskularne bolesti čine oko 37,4 % ukupne smrtnosti. Ishemijska bolest srca ostaje vodeći uzrok smrti u mnogim zemljama, iako su stope znatno niže u zapadnoeuropskim državama u usporedbi s istokom Europe [35]. U Sjedinjenim Američkim Državama, koronarna bolest srca je i dalje najčešći uzrok smrti. U 2023. godini, više od 919 000 osoba umrlo je od kardiovaskularnih bolesti, dok je stopa smrtnosti od iznosila 224,3 smrti na 100 000 stanovnika (prilagođeno dobi). Procjenjuje se da koronarna bolest srca čini približno 40 % svih kardiovaskularnih smrti, što znači da je u SAD-u tijekom 2022. i 2023. godina blizu 370 000 ljudi godišnje umiralo zbog koronarne bolesti srca [36, 37].

Unatoč padu smrtnosti, u mnogim zemljama zahvaljujući boljoj dijagnostici, terapiji i javnozdravstvenim intervencijama, ukupni teret bolesti ostaje velik, osobito u populacijama s visokom prevalencijom čimbenika rizika poput pušenja, hipertenzije, dislipidemije, šećerne bolesti i sjedalačkog načina života.

1.1.4. Čimbenici rizika

Brojni su rizični čimbenici koji doprinose nastanku i progresiji koronarne srčane bolesti. Neki od njih podložni su modifikaciji putem promjena životnog stila ili medicinskih intervencija, dok su drugi nepromjenjivi i vezani uz individualne karakteristike. Sukladno tome, rizični čimbenici se uobičajeno klasificiraju u dvije skupine: promjenjivi i nepromjenjivi [35-40].

1.1.4.1. Promjenjivi čimbenici rizika

Pušenje predstavlja jedan od najznačajnijih neovisnih čimbenika rizika za razvoj koronarne srčane bolesti. Njegov štetni učinak prisutan je ne samo kod aktivnih pušača, već i kod osoba izloženih duhanskom dimu iz okoline, odnosno pasivnih pušača. Među brojnim toksičnim tvarima sadržanima u duhanskom dimu, nikotin koji izaziva vazokonstrikciju koronarnih arterija te ugljikov monoksid koji zbog većeg afiniteta prema hemoglobinu u odnosu na kisik uzrokuje tkivnu i staničnu hipoksiju posebno se ističu svojom negativnom fiziološkom djelovanjem. Kliničke studije pokazuju da prestanak pušenja nakon preboljelog infarkta miokarda značajno smanjuje smrtnost i preko 30 - ak % u usporedbi s onima koji nastavljaju pušiti. Stoga se prestanak pušenja, kao i izbjegavanje pasivne izloženosti duhanskom dimu, smatra jednom od najučinkovitijih mjera u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti [35-39].

Dislipidemija označava poremećaj metabolizma lipida, koji rezultira kvantitativnim ili funkcionalnim promjenama lipoproteina u serumu. Kao samostalan čimbenik ili u interakciji s ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima, značajno doprinosi razvoju aterosklerotskih promjena. Iako pojam dislipidemije obuhvaća širok spektar poremećaja lipidnog profila, u kliničkoj praksi najveća se pažnja posvećuje povišenim vrijednostima ukupnog kolesterola i LDL, kao i sniženim koncentracijama lipoproteina visoke gustoće (HDL, *engl. high density lipoprotein*), zbog njihove ključne uloge u procjeni kardiovaskularnog rizika i odabiru terapijskog pristupa.

Arterijska hipertenzija predstavlja ključni čimbenik rizika za razvoj koronarne arterijske bolesti. Osobe s povišenim arterijskim krvnim tlakom imaju dvostruko veću vjerojatnost za pojavu koronarne bolesti u usporedbi s onima koji imaju normalne vrijednosti krvnog tlaka. Stoga je održavanje arterijskog krvnog tlaka unutar preporučenih granica, sistoličkog ispod 140 mmHg i dijastoličkog ispod 90 mmHg, jedan od primarnih ciljeva u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih

bolesti. Povišeni tlak u arterijama uzrokuje mehanička oštećenja endotela uslijed direktnih udaraca krvi u stijenku krvne žile. Nadalje, povišeni tlak i posljedično ubrzani protok krvi stvaraju vrtložne tokove, pogotovo na mjestima grananja arterija, što u konačnici aktivira prokoagulacijske mehanizme i doprinosi patogenezi aterotrombotskih promjena [35-38].

U osobe sa šećernom bolesti pojavnost koronarne bolesti srca je do četiri puta veća u odnosu na zdravu populaciju. Također, loša regulacija glukoze u plazmi kod bolesnika s već dijagnosticiranom koronarnom bolešću povezana je s povećanim rizikom progresije koronarne bolesti. Stoga je održavanje glikemije unutar referentnih vrijednosti ključno za prevenciju i kontrolu kardiovaskularnih komplikacija.

Drugi čimbenici poput prekomjerne i neprikladne prehrane, fizička neaktivnost, pretilost te psihosocijalni stres najčešće posredno preko ranije nabrojanih čimbenika rizika pridonose razvoju koronarne bolesti srca [38-40].

1.1.4.2.Nepromjenjivi čimbenici rizika

Starija životna dob predstavlja značajan čimbenik rizika za razvoj i progresiju koronarne srčane bolesti. Kod muškog spola rizik se značajno povećava nakon tridesete godine života, dok je kod ženskog spola porast rizika najčešće povezan s nastupom menopauze, uslijed hormonalnih promjena koje nepovoljno utječu na kardiovaskularno zdravlje [37-39].

Osobe muškog spola imaju veću učestalost obolijevanja od koronarne srčane bolesti u usporedbi s osobama ženskog spola. Međutim, u starijoj životnoj dobi, osobito nakon menopauze, rizik razvoja koronarne bolesti srca kod osoba ženskog spola postupno se izjednačava s rizikom u osoba muškog spola.

Pozitivna obiteljska anamneza, definirana kao poznata ishemijska kardiovaskularna bolest ili smrtni ishod uzrokovan kardiovaskularnom bolesti kod roditelja ili bliskih krvnih srodnika braće ili sestara prije 55. godine života kod članova muškog spola te prije 65. godine kod članova ženskog spola, predstavlja čimbenik rizika za razvoj koronarne srčane bolesti [38-40].

1.1.5. Vrste koronarne bolesti srca

Koronarna arterijska bolest najčešće se poistovjećuje sa suženjem ili začepljenjem koronarnih arterija, što je ujedno i njezin najčešći i najpoznatiji oblik. Međutim, postoje i drugi oblici koronarne patologije koji ne uključuju nužno anatomske suženje krvnih žila, ali mogu imati jednako ozbiljne kliničke posljedice. Ti oblici zahtijevaju dodatnu dijagnostičku obradu i često specijalizirani terapijski pristup[na kraju [41, 42]. Ovisno o mehanizmu nastanka, razlikuju se tri glavna tipa koronarne arterijske bolesti, to su opstruktivska koronarna arterijska bolest, neopstruktivska koronarna arterijska bolest te spontana disekcija koronarne arterije. Opstruktivska koronarna arterijska bolest je obilježena prisutnošću aterosklerotskih plakova koji uzrokuju značajno suženje (stenozu) ili potpunu okluziju lumena koronarne arterije. Takva stanja dovode do smanjenog protoka krvi prema miokardu, što može rezultirati ishemijskom, anginom pectoris, akutnim koronarnim sindromom ili infarktom miokarda. Dijagnoza se najčešće postavlja koronarografijom, a terapijski pristup uključuje promjene životnog stila, farmakološko liječenje i po potrebi invazivne zahvate poput perkutane koronarne intervencije (PCI, *engl. percutaneous coronary intervention*) ili kirurške revaskularizacije miokarda (CABG, *engl. coronary artery bypass grafting*) [43, 44]. U neopstruktivskoj koronarnoj arterijskoj bolesti koronarne arterije nisu značajno sužene, no prisutna je njihova funkcionalna disfunkcija. Mehanizmi uključuju vazospazam (neprikladno sužavanje arterija), mikrovaskularnu disfunkciju (poremećaj u najmanjim krvnim žilama miokarda) ili kompresiju krvne žile uzrokovanu preklapanjem srčanog mišića (*engl. myocardial bridging*). Ova stanja mogu uzrokovati simptome ishemije, iako koronarografija ne pokazuje značajne lezije. Dijagnoza zahtijeva dodatne funkcionalne testove, uključujući mjerenje koronarne rezerve protoka (CFR, *engl. coronary flow reserve*) i provocirajući test s acetilkolinom. Liječenje se temelji na individualiziranom farmakološkom pristupu, ovisno o patofiziološkom mehanizmu [45, 46]. Spontana disekcija koronarne arterije (SCAD, *engl. spontaneous coronary artery dissection*) je rijetko, ali potencijalno životno ugrožavajuće stanje koje se najčešće javlja kod mlađih osoba, osobito žena bez klasičnih čimbenika rizika. SCAD podrazumijeva spontano raslojavanje stijenke koronarne arterije, pri čemu se krv nakuplja između slojeva stijenke i stvara intramuralni hematoma. Taj hematoma može uzrokovati suženje ili začepljenje lumena arterije, što dovodi do ishemije miokarda. Dijagnoza se postavlja koronarografijom, često uz pomoć intravaskularnih metoda kao što su intravaskularni ultrazvuk

(IVUS, *engl. intravascular ultrasound*) ili optička koherentna tomografija (OCT, *engl. optical coherence tomography*). Terapijski pristup ovisi o težini kliničke slike i konzervativno liječenje često je metoda izbora, dok se invazivne intervencije primjenjuju u slučaju hemodinamske nestabilnosti ili progresivne okluzije [47, 48].

Koronarna bolest srca najčešće se prezentira boli lociranoj u grudnome košu, dominantno u pozadini prsne kosti te ju nazivamo anginozna bol. Može se razlikovati intenzitetom i karakteristikama. Bolesnici ju mogu opisivati kao oštru jaku bola, preko pečenja do pritiska, stezanja ili tupog osjećaja boli. Uz tipičnu lokalizaciju u pozadini prsne kosti često se može širiti u jednu (češće lijevu) ili obje ruke, prema vratu, u pozadinu prema leđima ili niže prema žličici. Bol može biti praćen i nespecifičnim simptomima poput mučnine, povraćanja, znojenja ili pak psihogeno strahom ili nemirom. Anginozna bol je tipičan simptom, no ne javlja se nužno uvijek te valja imati na umu i druge simptome poput palpitacija, vrtoglavice i sinkope. Tijekom rane faze bolesti, simptomi često u potpunosti i izostaju.

Imajući na umu da je anginozni bol najčešći i dominantni simptom, Kanadsko društvo za kardiovaskularne bolesti (CCS, *engl. Canadian Cardiovascular Society*) utvrdilo je klasifikaciju težine angine u 4 težinske skupine (Tablica 1). Počevši od I s progresijom do skupine IV. Što je stupanj veći učestalost komplikacija proporcionalno raste [49, 50].

Tablica 1. Klasifikacija težine angine prema Kanadskom društvu za kardiovaskularne bolesti (CCS, *engl. Candaian Caridovascular Society*)

Stupanj	Opis
1	Uobičajena aktivnost, poput hodanja ili uspinjanja stepenicama, ne izaziva anginozne tegobe. Anginozne tegobe prilikom jačeg napora ili brzog ili produženog opterećenja prilikom rada ili rekreacije
2	Blago ograničenje prilikom uobičajene aktivnosti. Brzo hodanje ili brzo uspinjanje stepenicama, hodanje uzbrdo, hodanje ili uspinjanje stepenicama nakon obroka ili u hladnoći ili uz vjetar i prilikom emocionalnog stresa ili samo prilikom prvih nekoliko sati po buđenju. Hodanje više od 200-tinjak metara na istoj razini ili više od jednog kata stepenicama normalnim tempom u normalnim uvjetima.
3	Značajno ograničenje uobičajene fizičke aktivnosti. Hodanje 100 do 200 metara na istoj razini i uspinjanje jednog kata stepenicama u normalnim uvjetima normalnim tempom.
4	Nemogućnost izvršavanja bilo kakve fizičke aktivnosti bez neugode, anginozne tegobe se mogu javljati u mirovanju.

1.1.6. Entiteti vezani uz koronarnu bolest srca

1.1.6.1. Stabila angina pectoris

Stabila angina pectoris je stanje koju opisuju prolazne faze tipične anginozne boli koja nastaje uslijed privremene ishemije ili hipoksije srčanoga mišića (najčešće uzrokovano tjelesnim naporom povećana potrošnja srčanog mišića uzrokuje nedostatak) ili psihičkoga stresa (vazokonstrikcija može dovesti do smanjene opskrbe zahvaćenog dijela irigacije zahvaćene koronarne žile). Također može se javiti uslijed obilnog obroka (povećana potreba za krvlju u probavnom sustavu, posljedično ograničena koronarna cirkulacija) ili prilikom naglog izlaganja hladnoći (nagla vazokonstrikcija koronarnih žila). Bol je obično kratkotrajan i u potpunosti se povlači po izostanku nekog od ranije spomenutih uzroka ili eventualne terapije (vazodilatatori npr. nitroglicerina) [41, 50, 51].

1.1.6.2.Akutni koronarni sindrom

Akutni koronarni sindrom može se podijeliti na nestabilnu anginu pectoris i akutni infarkt miokarda. Za razliku od koronarne bolesti u širem smislu, koja je kronična progresivna bolest, akutni koronarni sindrom je akutno stanje nastalo uslijed naglog zbivanja poput rupturę plaka te formiranja tromba i začepļjenja koronarne arterije, a može nastati kao posljedica koronarne bolesti srca [42, 53, 54].

1.1.6.3.Nestabilna angina pectoris

Za razliku od stabilne angine bol je obično jači, javlja se naglo, traje duže i ne popušta prilikom mirovanja ili uzimanja medikamentozne terapije. Često se javlja u mirovanju ili minimalnom naporu [41, 52, 53].

1.1.6.4.Akutni infarkt miokarda

Akutni infarkt miokarda (AIM) je stanje u kojem dolazi do odumiranja dijela miokarda. Klinički se AIM prema posljednjem konsenzusu radne skupine za univerzalnu definiciju infarkta miokarda (*engl. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction*) kojeg su 2018. godine donijeli Europsko kardiološko društvo (*engl. European Society of Cardiology* (ESC)/Američki koledž za kardiologiju (*engl. American College of Cardiology* (ACC)/Američka udruga za srce (*engl. American Heart Association* (AHA)/Svjetska federacija za srce (*engl. World Heart Federation* (WHF) dijeli u 5 tipova. Tipovi 1, 2 i 3 odnose se na AIM u užem smislu, dok se tipovi 4 i 5 odnose na AIM povezan s koronarnim postupcima [53].

Infarkt miokarda (IM) tip 1 uzrokovan je koronarnom bolesti srca uz rupturu ili eroziju aterosklerotskog plaka. Kriteriji za dijagnozu IM tip 1 uključuju prisutnost porasta i/ili pada troponina c (cTn) s barem jednom izmjerenom vrijednosti iznad 99-e percentile uz barem još jedan prateći kriterij od sljedećih: simptomi AIM, nove ishemijske promjene u EKG-u, razvoj patoloških Q valova, slikovni prikaz novog gubitka funkcionalnog miokarda ili razvoj nove abnormalnosti regije miokarda s obrascem koji odgovara ishemiji, potvrđen koronarni tromb angiografijom ili obdukcijom. Infarkt miokarda tip 2 klasificiran je neproporcionalnom potrebom

za kisikom u odnosu na dostupnu zalihi kisika. Do navedenoga može doći u osoba koje boluju od koronarne arterijske bolesti, ali i u zdravih, nadalje, uslijed vazospazma ili mikrovaskularne disfunkcije te uslijed disekcije ne aterosklerotskog porijekla. U tipu 2 IM nema disrupcije aterosklerotskog plaka. Tipični primjer IM tip 2 je pojava novog stresora, u osoba koje boluju od koronarne arterijske bolesti, koji ograničava i/ili smanjuje protok krvi i/ili dostavu kisika ili povećava potrošnju kisika. Konkretno, može se raditi o novonastalom krvarenju, zbog kojega uslijed pada hemoglobina dolazi do premale dostave kisika, uspon na veću nadmorsku visinu gdje je manja koncentracija kisika u atmosferi pa time i u cirkulaciji ili novonastala tahikardija koja uslijed dužeg trajanja i povećane potrebe za kisikom u konačnici dovede do ishemije i IM-a, itd. Tip 2 IM je tipično rjeđi u osoba koje ne boluju od koronarne arterijske bolesti, a ako se pojavi klinička slika je obično blaža. Kombinacije različitih uzročnika mogu biti uzrok IM tip 2. Kriteriji za dijagnozu IM tip 2 uključuju prisutnost porasta i/ili pada Tn s barem jednom izmjerenom vrijednosti iznad 99-e percentile uz dokaz neproporcionalne zalihe kisika u odnosu na potrošnju nezvezano uz akutnu trombozu koronarne cirkulacije uz barem još jedan od navedenih kriterija: simptomi AIM, nove ishemijske promjene u EKG-u, razvoj patoloških Q valova, slikovni prikaz novog gubitka funkcionalnog miokarda ili razvoj nove abnormalnosti regije miokarda s obrascem koji odgovara ishemiji.

Tip 3 IM odnosi se na bolesnike u kojih nije bilo vremena za analizu biokemijskih markera, jer nije bilo vremena izvaditi i analizirati krv ili jer su simptomi nastupili tako akutno da nije stiglo doći do porasta markera, a bolesnici preminu. Naime, radi se o bolesnicima kod kojih su se manifestirali tipični simptomi ishemije/IM, uključujući predmnijevane ishemijske promjene u EKG-u ili nastup ventrikularne fibrilacije (VF). Iako u tome trenu nema biomarkerske potvrde IM, ali postoji sumnja na akutnu ishemiju miokarda, svrstavaju ih u tip 3 IM. Navedena klasifikacija omogućila je izdvajanje navedene skupine bolesnika s IM iz veće grupe bolesnika koji preminu od iznenadne srčane smrti, bilo srčane bili druge prirode. Ako naknadna obdukcija dokaže postojanje tromba, naknadno ih se klasificira u tip 1. Kriteriji za dijagnozu jesu srčana smrt, sa simptomima koju ukazuju na ishemiju miokarda s praćenim novim ishemijskim promjenama u EKG-u ili VF-om, a preminuli su prije nego se dijagnoza mogla potvrditi biokemijski.

Tip 4 IM karakteriziraju incidenti povezani u postupke liječenje koronarne arterijske bolesti perkutanim koronarnim intervencijama (PKI). Mogu se dalje podijeliti na 3 podgrupe: IM povezan s PKI (tip 4a), IM povezan s trombozom stenta (tip 4b) te IM povezan uz restenozu po PKI (tip

4c). Tip 4a IM karakteriziran je porastom cTn više od 5 puta u odnosu na 99-u percentilu u bolesnika s normalnim bazalnim vrijednostima, dok u bolesnika s povišenim bazalnim vrijednostima porast mora biti barem 20% u odnosu na bazalnu vrijednost te pritom također veći od peterostrukog porasta u odnosu na 99-u percentilu normalnih vrijednosti. Nadalje, mora biti dokaza nove ishemije miokarda, bilo putem promjena u EKG-u, slikovnih tehnika, ili komplikacija povezanih uz postupak poput disekcije, okluzije velike epikardijalne arterije, okluzije ili tromboze bočnih grana, poremećaja kolateralnog protoka, sporog protoka ili izostanka novog protoka te distalne embolizacije. Tip 4b IM karakteriziran je trombozom stenta, potvrđeno angiografijom ili obdukcijom, prema istim kriterijima kao tip 1. Bitno je zabilježiti vrijeme tromboze u odnosu na PKI. Može se podijeliti na akutni koji nastaje unutar 24 sata od PKI, subakutni, ako tromboza nastupi nakon 4 sata, ali unutar 30 dana od PKI, na kasni koji se javlja nakon 30 dana, ali unutar godinu dana i vrlo kasna koji se pojavljuje nakon godine dana od PKI. Tip 4c IM karakteriziran je restenozom stenta ili restenozom na poziciji balon angioplastike, navedeni tip IM je dijagnosticiran kada se ne mogu potvrditi druge lezije ili tromb. Kriteriji za dijagnozu su jednaki kao za tip 1.

Tip 5 IM vezan je uz operacije koronarne prenosnice. Njegov nastanak je multifaktorijalan. Valja imati na umu da je porast cTn tijekom navedenog postupka normalan i očekivan te isto treba ukomponirati u procjene ozljede miokarda u usporedbi prilikom operacije prenosnice ili PKI. U oko trećine bolesnika koji pristupaju operaciji koronarne prenosnice zamijećene su ozljede miokarda.

Kriteriji za dijagnozu IM tip 5 je porast cTn 10 puta više od 99-e percentile normalnih vrijednosti. Ako bolesnici imaju povišene vrijednosti cTn prije operacije za dijagnozu tipa 5 IM je potreban porast od više od 20% te ukupna vrijednost veća od 10 puta 99-e percentile normalnih vrijednosti. Uz navedene vrijednosti cTn potreban je još jedan pozitivan kriterij od navedenih, to to su novi patološki Q valovi, potvrda okluzije grafta ili nova koronarna okluzija, slikovna potvrda novog oštećenja miokarda ili nova abnormalnost kretanje miokarda u skladu s ishemijskom ozljedom [54, 55, 57].

1.1.6.5. Mikrovaskularna angina

Može biti znak koronarne bolesti na razini mikrocirkulacije, ako su zahvaćene maleni arterijski ogranci. Simptomi su slični nestabilnoj angini [44, 45].

1.1.6.6.Vazospastična angina pectoris (Prinzmetalova angina)

Rijetki je oblik angine koji nastaje uslijed spazma, naglog stezanja mišićnice arterija srca, koji ograničava krvotok te dovodi do nastupa simptoma. U većine bolesnika se javlja tijekom mirovanja, kroz noć ili u ranojutarnjim satima. Medikamentozna terapija može pomoći u liječenju bolesnika s vazospastičnom anginom pectoris [45, 56].

1.1.6.7.Nijema ishemija

Nijema ishemija je stanje kada dolazi do ishemije miokarda bez kliničkih simptoma. Češće se pojavljuje u osoba koje su ranije već preboljele IM i osoba koje boluju od šećerne bolesti. Najčešće se otkrije kao nus nalaz prilikom neke druge manifestacije koronarne bolesti ili tijekom redovne kardiološke obrade. Dijagnoza postavlja se kontinuiranim EKG-om tijekom 24 sata ili testom opterećenja [40, 56].

1.1.6.8.Iznenadna srčana smrt

Iznenadna srčana smrt nastaje zbog naglog prekida adekvatne cirkulacije i posljedičnog gubitka svijesti koji nastanu uslijed zastoja srca. Početak simptoma bilježi se unutar jednog sata od incidenta. Smatra se da je nagli nastup ventrikularne fibrilacije uslijed akutne ishemije najčešći uzrok u općoj populaciji, a hipertrofija lijevog ventrikula u starijoj populaciji [57].

1.1.6.9.Zatajivanje srca uslijed kronične ishemijske kardiomiopatije

Srce zahvaćeno ishemijom prilagođava se novonastalome stanju te kompenzira ranije nastalu ozljedu manifestiranu nekrozom i apoptozom mišićnoga tkiva. Dolazi do uvećanja, najčešće lijeve klijetke. Proces kompenzacije naziva se remodelacija. To je kronični proces koji s vremenom na račun manje vrijednoga ili lošije raspoređenoga tkiva dovodi do pogoršanja srčane funkcije. Uz samu ozljedu, naknadnoj progresiji srčane funkcije pridonosi razvoj endotelne disfunkcije u preostalim dijelovima koronarne cirkulacije koja je najčešće aterosklerotski promijenjena. Oštećena funkcija srca na račun smanjenog udarnog volumena i posljedično

minutnog volumena zahtijeva kompenzaciju na razini periferije. Aktivira se simpatikus te renin-angiotenzin-aldosteronski sustav, tijelo zadržava natrij i vodu, povećava se periferni vaskularni otpor. Ako se ovaj proces ne kontrolira dodatno opterećuje srce i može dovesti do daljnje ozljede [40, 54].

1.1.6.10. Aritmije kao posljedica ishemijske ozljede srca

Ishemija može dovesti do problema provodnje električnoga potencijala. Od mehaničke zapreke u slučaju oštećenja provodne muskulature do brojnih promjena na razini stanice (poremećaj metabolizma). Navedene promjene mogu usporiti put impulsa, preusmjeriti ga da putuje neadekvatnim putem, kružne kretnje impulsa te na temelju svega toga dovesti do asinkrone funkcije atrijske i ventrikularne. Bol prilikom ishemijske je bitan čimbenik jer dovodi do aktivacije simpatikusa što pogoduje razvoju aritmija. Bitno je napomenuti i mogućnost nastanka „začaranog kruga“, uslijed ishemijske, boli, pojačanog djelovanja simpatikusa kada dolazi do lučenja katekolamina koji posljedično dovode do daljnjeg pozitivnog inotropnog i kronotropnog djelovanja srca čime se ono dodatno opterećuje i povećava vlastite metaboličke potrebe, i posljedično može povećati ishemijsku. Lokalizacija ishemijske bitna jer ovisno o anatomske lokaciji oštećenja pa tako ishemijska stražnje i donje stijenke češće dovodi do raznih bradikardija/bradiaritmija, a ishemijska prednje stijenke do tahikardije/tahiaritmije [40, 58].

1.1.7. Dijagnostika bolesnika s koronarnom bolešću srca

Dijagnostika bolesnika s koronarnom bolešću srca započinje kvalitetnim uzimanjem anamneze i fizikalnim pregledom. Prema indikaciji se vrši daljnja dijagnostika u vidu laboratorijskih pretraga i elektrokardiogram (EKG). Ovisno o kliničkoj slici, laboratorijskim nalazima i EKG-u koriste se napredniji postupci poput koronarografije te razni dinamički testovi (ergometrija, holter EKG, ultrazvučni pregled srca (transtorakalno ili transezofagijski) i drugi [40, 59].

1.1.8. Liječenje bolesnika s koronarnom bolesti srca

Liječenje ovih bolesnika s koronarnom bolesti srca ovisno je o stanju bolesti kada je bolest prepoznata i do kojih je simptoma dovela. Liječenje može biti konzervativno, može se učiniti primarna koronarna intervencija (PKI) ili kirurško liječenje [40].

1.1.8.1.Konzervativno liječenje

U ranim stadijima bolesti uglavnom je liječenje usmjereno na uklanjanje čimbenika rizika, promjene životnih navika koje pogoduju razvoju bolesti te adekvatnoj fizičkoj aktivnosti s ciljem usporenja ili zaustavljanja napredovanja koronarne bolesti. Nažalost, često niti rigorozno pridržavanje svih preventivnih mjera nije dovoljno kako bi se spriječila progresija bolesti. Osim navedenog u konzervativno liječenje spada i aktivna medikamentozna terapija s ciljem održavanja trenutačnoga stanja [40, 58].

1.1.8.2.Perkutana koronarna intervencija

U bolesnika u kojih je bolest napredovala do razine da konzervativne metode nisu dovoljne izvodi se PKI. PKI je minimalno invazivna tehnika pri kojoj se putem perifernih krvnih žila žicama dolazi do srca i koronarnih žila te pod radiološkom vizualizacijom vrši balon angioplastika i/ili postavljanje koronarnog stenta s ciljem poboljšanja protoka kroz zahvaćenu koronarnu žilu te održavanjem novog poboljšanog protoka [42, 59].

1.1.8.3.Kirurška revaskularizacija miokarda

Najčešće izvođena kardiokirurška operacija je operacija aortokoronarnih prenosnica (CABG, *engl. coronary artery bypass graft*) koja se primjenjuje u bolesnika s teškom koronarnom bolešću, ovisno o mjestu suženja koronarnih arterija, funkciji lijeve klijetke te prisutnim simptomima koronarne bolesti. Aortokoronarna prenosnica također je i metoda liječenja akutnog srčanog udara koji iz bilo kojeg razloga nije moguće liječiti perkutanom intervencijom. Postoje

dvije metode aortokoronarnog premoštenja, premosnica uz primjenu izvantjelesnog krvotoka (*engl. on-pump*) i premosnica bez primjene izvantjelesnog krvotoka (*engl. off-pump*) [60, 61].

1.1.8.3.1. Premosnica uz primjenu izvantjelesnog krvotoka

Premosnica uz primjenu izvantjelesnog krvotoka ili on-pump tehnika uključuje korištenje stroja koji vrši funkciju kardiopulmonalne premosnice (izvantjelesni krvotok/cirkulacija) tijekom zahvata te je srčana akcija zaustavljena primjenom otopina kalija, što kirurgu omogućava siguran pristup srcu i koronarnim arterijama dok se perfuzija organa održava putem izvantjelesne cirkulacije. U klasičnome smislu, operater izvodi sternotomije radi pristupa grudnoj šupljini te otvara perikardijalnu vreću kako bi pristupio srcu. Potom se priprema žila za graft, najčešće ili lijeva unutarnja mamarna arterija ili vena safena. Po pripremi grafta započinju se pripreme za izvantjelesni krvotok. Arterijska i venska kanulacija ključni su koraci za uspostavu izvantjelesnog krvotoka, kojim se privremeno preuzima funkcija srca i pluća tijekom kardijalne kirurgije. Arterijska kanulacija se izvodi se prva, najčešće na distalnom dijelu uzlazne aorte, ali može se koristiti i femoralna ili aksilarna arterija. Nakon kanulacije, krv iz izvantjelesnog krvotoka najčešće paralelno teče anterogradno prema organima i retrogradno prema srcu, što je prihvatljivo kod kompetentnog aortnog zaliska, no valja imati na umu da može biti problema kod aortalne regurgitacije. Potom se postavlja aortalna klema koja izolira srce te od tog trena krv teče isključivo prema periferiji i označava početak ishemijskog vremena miokarda. Kardioplegija se daje odmah nakon postavljanja klemme radi zastoja i zaštite srca. Kardioplegijska zaštita trebala bi ispunjavati sljedeće ciljeve:

1. Omogućiti brzo i učinkovito zaustavljanje srčane aktivnosti, čime se smanjuje metabolička potrošnja tijekom ishemije.
2. Zaštititi miokard usporavanjem nastupa nepovratnog oštećenja te djelovati kao pufer koji ograničava opseg reperfuzijskog oštećenja.
3. Biti reverzibilna, kako bi se funkcija srca mogla brzo obnoviti po završetku izvantjelesnog krvotoka.
4. Imati minimalnu toksičnost za srce i ostale organe.

Većina kardioplegijskih otopina uzrokuje kemijski zastoj inhibicijom brzih natrijevih struja, čime se sprječava provođenje akcijskog potencijala i omogućuje sigurna asistolija. Tijekom

korištenja izvantjelesnog krvotoka, cirkulacija se provodi putem stroja za izvantjelesnu cirkulaciju te je potrebno održavanje razine aktiviranog vremena zgrušavanja putem primjene heparina kako ne bi došlo do grušanja krvi u sustavu. U sustavu se vrši filtracija i izmjena plinova (inače funkcija pluća) te se kisikom obogaćena krv vraća u organizam. Stoga se navedeno zove kardiopulmonalna premosnica, jer se preskače cirkulacija kroz srce i pluća, ali stroj vrši funkciju oba organa.

Tijekom izvođenja kardiokirurškog zahvata uz primjenu stroja za izvantjelesnu cirkulaciju izvodi se i venska kanulacija koja usmjerava venski povrat krvi i vrši se na razini desnog atrija ili na razini gornje i donje šuplje vene kako bi povrat krvi u sustav bio potpun. Istovremeno je potrebno učiniti drenažu koja se temelji na gravitaciji, uz mogućnost vakuuma ako je potrebno. Tijekom zahvata važno je održavati središnji venski tlak manji od <10 mmHg kako bi se izbjegla kongestija[60-71].

1.1.8.3.2. Premosnica bez primjene izvantjelesnog krvotoka

Premosnica bez primjene izvantjelesnog krvotoka ili off-pump tehnika uključuje rad na „kucajućem“ srcu. Pristup je jednak kao za zahvate uz primjenu izvantjelesnog krvotoka te se vrši sternotomija te i otvara se perikardijalna vreća. Potom se vizualizira dio srca, odnosno žila predviđena za mjesto postavljanja premosnice. U sljedećem aktu kirurg postavlja instrument koji na principu pritiska i vakuma stabilizira srce na kojem operater radi dok je ostatak srca aktivan. Instrument omogućava manje kretnje srca u dio srca koji je predviđen za operaciju. Nakon stabilizacije srca instrumentom učini se arteriotomija te postavlja graft. U ovoj fazi operater postavlja privremene kleme ili podveske na arteriju na kojoj operira kako bi imao beskrvno operacijsko polje, međutim dolazi do razvoja distalne ishemije. Ako bolesnik ne može tolerirati (aritmije, hipotenzija) navedi postupak, može se postaviti privremeni šant, mala artifičijelna premosnica koja omogućava nastavak djelomične cirkulacije kroz arteriju na kojoj se operira [60-71].

1.1.8.3.3. Izbor tehnike za izvođenje kirurške revaskularizacije miokarda

Objekti kirurške tehnike imaju svoje prednosti i nedostatke za izvođenje kirurške revaskularizacije miokarda. Nažalost, još uvijek ne postoji jasan konsenzus koja tehnika je bolja i

zašto. Izbor tehnike ovisan je o izboru kirurga koji izvodi zahvat, empirijskom odabiru, iskustvu te stanju bolesnika. Opće je prihvaćano da se tehnika uz primjenu izvantjelesnog krvotoka se tipično koristi za bolesnike s višežilnom bolesti srca, ili bolesnike s višebrojnim značajnim komorbiditetima, dok se tehnika bez izvantjelesnog krvotoka koristi kod bolesnika sa specifičnim stanjima kao što su kalcifikacije ascendentne aorte, značajne bolesti pluća ili terminalne bubrežne bolesti [72].

1.1.9. Upalni odgovor tijekom kardiokirurške revaskularizacije miokarda

Upalni odgovor organizma predstavlja složen fiziološki mehanizam kojim tijelo reagira na infekciju, ozljedu ili drugi oblik oštećenja tkiva. Ključna funkcija upale je otklanjanje uzročnika oštećenja, uklanjanje oštećenih stanica te uspostavljanje procesa reparacije tkiva. U upalni odgovor uključeni su osim leukocita brojni posrednici, među kojima se ističu citokini, kemokini, prostaglandini te proteini akutne faze upale [41,61,64].

Kirurški zahvati na srcu, osobito oni uz korištenje izvantjelesnog optoka izazivaju izražen sustavni upalni odgovor. Dolazi do aktivacije brojnih imunoloških puteva, uključujući aktivaciju komplementa, citokinsku kaskadu i migraciju leukocita, kao rezultat kontakta krvi s umjetnim površinama, ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja te mehaničkog stresa na tkivo. Povišene vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP) nakon operacije na srcu često koreliraju s intenzitetom upalne aktivnosti i mogu poslužiti kao prognostički parametar za razvoj ranih poslijeoperacijskih komplikacija.

Troponin T, specifičan biomarker oštećenja miokarda, koristi se za procjenu perioperacijske srčane ozljede. Njegove povišene vrijednosti nakon kardijalne kirurgije upućuju na stupanj miokardijalnog stresa ili ishemijskog oštećenja, a u kombinaciji s povišenim koncentracijama interleukina (IL)-18 i CRP-a može doprinijeti cjelovitoj procjeni poslijeoperacijskog stanja bolesnika. Značajnu ulogu u procjeni srčane funkcije ima i N-terminalni fragment prohormona natriuretskog peptida tipa B (NT-pro-BNP, *engl. N-terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide*) [7, 66, 73].

1.1.9.1. Interleukin-18

Interleukin 18 poznat je po svojoj snažnoj proupalnoj aktivnosti. Sintetizira se kao biološki neaktivan prekursor koji se mora aktivirati, najčešće s pomoću enzima kaspaze-1, kako bi postao funkcionalno aktivan citokin. IL-18 se izražava u brojnim staničnim tipovima, uključujući monocite, makrofage, dendritične stanice i epitelne stanice, ali i u određenim ne-hematopoetskim tkivima [14, 20].

Nakon vezanja na svoj receptor (IL-18R α i IL-18R β), IL-18 aktivira signalne putove ovisne o adapter proteinu MyD88, koji zatim pokreću kaskadu uključujući IRAK (*engl. interleukin-1 receptor-associated kinase*) i TRAF6 (*engl. tumor necrosis factor receptor associated protein*). Konačni rezultat je aktivacija transkripcijskih čimbenika poput NF- κ B i AP-1, što dovodi do izražaja niza proupalnih posrednika, uključujući citokine, kemokine i molekule stanične adhezije. Osobito u prisutnosti IL-12, IL-18 snažno inducira sintezu interferona-gama (IFN γ), čime potiče imunološki odgovor tipa Th1. Međutim, ovisno o mikrokolištu i citokinskoj ravnoteži, IL-18 može sudjelovati u Th2 ili regulacijskim imunološkim procesima [20, 73, 74].

Zbog svoje ključne uloge u modulaciji upale, IL-18 je predmet intenzivnog istraživanja u nizu bolesti, uključujući autoimune poremećaje, kronične upalne bolesti, metaboličke disfunkcije i aterosklerozu [16, 75]. Posebno u kontekstu kardiovaskularnih bolesti, IL-18 se povezuje s razvojem i progresijom aterosklerotskih lezija. Povišene koncentracije IL-18 pronađene su u plakovima kod bolesnika s koronarnom bolešću, a koreliraju i s lošijim ishodima. Ove spoznaje ukazuju na njegovu potencijalnu ulogu ne samo kao biomarkera, već i kao mogućeg terapijskog cilja.

U kliničkom kontekstu kardijalne kirurgije, osobito kod operacija koronarne prenosnice koje se izvode uz pomoć izvantjelesnog krvotoka, IL-18 dobiva sve više pažnje. Tijekom izvođenja izvantjelesnog krvotoka dolazi do sustavne upalne reakcije s aktivacijom leukocita, endotelnih stanica i komplementa. Tradicionalno se ova upalna reakcija analizirala mjerenjem koncentracija citokina poput IL-6, čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF α , *engl. tumor necrosis factor alpha*) i IL-1 β , no novije studije sve više uključuju i IL-18 kao važnog sudionika. Dodatno, istraživanja koje uspoređuju operacije koronarne prenosnice s ili bez korištenja sustava za izvantjelesni krvotok pokazale su da kirurški zahvati koji uključuju izvantjelesni krvotok izazivaju znatno veći porast koncentracija IL-18, CRP i leukocita u ranom poslijeoperacijskom razdoblju (24 do 72 sata).

Zanimljivo je da je u skupini bolesnika kojima je bio primijenjen izvantjelesni krvotok zabilježena i pozitivna korelacija između koncentracija IL-18 i biomarkera oštećenja endotelnog glikokaliksa, kao što je sindekan-1, što dodatno upućuje na sustavni utjecaj IL-18 tijekom reperfuzijskog razdoblja [7, 73-77].

1.1.9.2. C-reaktivni protein

C-reaktivni protein je akutne fazne koji se sintetizira u jetri kao odgovor na upalne podražaje, prvenstveno pod utjecajem IL-6. CRP ima važnu ulogu u prirođenoj imunosti, gdje se veže na fosfokolin na površini mrtvih ili oštećenih stanica te mikroorganizama, olakšavajući njihovo uklanjanje aktivacijom komplementnog sustava i fagocitozom. U zdravih osoba koncentracija CRP-a u plazmi obično iznosi manje od 1 mg/L, no može porasti i više stotina puta unutar nekoliko sati nakon početka upale. Zbog toga se CRP često koristi kao klinički biomarker za otkrivanje i praćenje akutnih i kroničnih upalnih stanja, uključujući infekcije, autoimune bolesti i kardiovaskularne poremećaje [15, 66].

U kontekstu operacija koronarne prenosnice, osobito onih koje uključuju primjenu izvantjelesnog krvotoka, dolazi do značajne sustavne upalne aktivacije. Ta reakcija obuhvaća kontakt krvi s umjetnim materijalima u stroju za izvantjelesni krvotok, ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, kiruršku traumu i endotoksemiju. Ovi mehanizmi aktiviraju brojne upalne posrednike, među kojima se CRP ističe kao rani i osjetljiv marker.

Nakon operacije koronarne prenosnice, koncentracija CRP-a u serumu počinje rasti unutar 6 do 12 sati, dostiže vrhunac najčešće između 48 i 72 sata te se postupno smanjuje. Neki bolesnici mogu pokazivati trajno visoke koncentracije CRP-a, što je povezano s većim rizikom od poslijeoperacijskih komplikacija, uključujući infekcije, fibrilaciju atrijsku, nisku minutnu srčanu funkciju i poremećaje cijeljenja rane. Jedna od važnih kliničkih implikacija povišenog CRP-a nakon operacija koronarne prenosnice odnosi se na rizik pojave poslijeoperacijske fibrilacije atrijske, koja je česta komplikacija i može značajno produžiti boravak u bolnici. Pokazano je da su bolesnici s višim koncentracijama CRP-a u ranom poslijeoperacijskom razdoblju skloniji razvoju aritmija, što podupire hipotezu o ulozi upale u patogenezi ove komplikacije. Također, istraživanja pokazuju da bolesnici koji su operirani tehnikom bez stroja za izvantjelesni krvotok, odnosno operirani tehnikom na „kucajućem srcu“ imaju manji porast CRP-a u usporedbi s onima kod kojih

je uređaj korišten stroja za izvantjelesni krvotok, što ukazuje na moguć manji stupanj sustavne upale ovisno o odabranoj tehnici [66, 78-81].

1.1.9.3. Promjene stanične imunosti u bolesnika tijekom i nakon kirurške revaskularizacije miokarda

Tijekom operacijskog zahvata i osobito zbog primjene izvantjelesnog krvotoka, dolazi do snažne aktivacije urođenog imuniteta, ali i prolazne supresije komponenata stečene imunosti. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda dodatno pojačava sustavnu upalnu reakciju, što rezultira otpuštanjem citokina, promjenama u funkciji leukocita i aktivacijom endotelних stanica. Jedna od prvih zabilježenih promjena uključuje smanjenje broja limfocita T u perifernoј krvi, uz istovremeno povećanje broja aktiviranih monocita i neutrofila. Urođeni imunitet, posebice stanice NK, pokazuje pojačanu aktivaciju u ranom poslijeoperacijskom razdoblju. Stanice NK tada sudjeluju u ranoј imunološkoј obrani i modifikaciji upalnog odgovora, djelomično posredovanog oslobađanjem citotoksičnih molekula kao što je perforin. Promjene u izražaju i funkciji stanica NK i perforina stoga predstavljaju važan dio imunološke dinamike koja prati kiruršku revaskularizaciju [7, 24, 80].

U ranom poslijeoperacijskom razdoblju dolazi do neravnoteže između protuupalnih i proupalnih citokina, što može rezultirati kratkotrajnim imunosupresijskim stanjem i povećanom osjetljivošću na infekcije. Oporavak stanične imunosti nakon operacije ovisi o individualnim čimbenicima, uključujući dob, prisutnost komorbiditeta te duljinu i složenost zahvata. Stanice NK imaju značajnu ulogu u ranoј fazi imunološkog odgovora dok perforin djeluje kao jedan od glavnih mehanizama stanične citotoksičnosti [7, 66, 80, 82-86].

1.1.9.3.1. Stanice NK

Prirodne stanice ubojice, poznate kao stanice NK (*engl. natural killer*), ključne su komponente prirođenog imunološkog sustava. Njihovo ime proizlazi iz sposobnosti da spontano prepoznaju i uništavaju stanice koje djeluju patološki, poput tumorskih ili virusno inficiranih stanica. Za razliku od limfocita T i limfocita B, stanice NK ne posjeduju receptore specifične za antigen, već funkcioniraju prema principu nadzora vlastitosti stanica. Prema tzv. "missing self"

hipotezi, stanice NK nadziru izražaj molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC I, *engl. major histocompatibility complex*) na stanicama domaćina. Kada ove molekule izostanu, što je čest slučaj kod virusno zaraženih i tumorskih stanica, stanice NK se aktiviraju i ciljano uništavaju takve stanice. Ova aktivnost regulirana je ravnotežom između aktivacijskih i inhibicijskih receptora na površini stanica NK.

Unutar populacije stanica NK razlikuju se dvije glavne subpopulacije: dominantna CD56^{dim} podskupina (oko 90 %) pokazuje snažnu citotoksičnu aktivnost, dok CD56^{bright} stanice (oko 10 %) imaju važnu ulogu u regulaciji imunog odgovora putem lučenja citokina. Stanice NK su posebno važne u ranoj fazi infekcija, ali i u nadzoru tumorskog rasta. Također, sve je više dokaza da posjeduju određene oblike imunološkog pamćenja, pa u slučaju ponovljenog susreta s istim antigenom mogu brže i snažnije reagirati, osobito putem pojačanog lučenja interferona gama (IFN- γ) [23-28, 87-89].

Tijekom i nakon kirurške revaskularizacije miokarda, prirodne stanice NK sudjeluju u složenoj mreži imunološkog odgovora koja se aktivira kao posljedica kirurškog stresa, izvantjelesnog krvotoka i ishemijsko-reperfuzijske ozljede. U tim uvjetima, stanice NK postaju funkcionalno aktivirane te luče niz posrednika koji imaju ključne uloge u regulaciji upalnog procesa i stanične citotoksičnosti. Aktivirane NK stanice izlučuju protuvirusne i pro-upalne citokine, osobito IFN- γ , koji pojačava aktivnost makrofaga, potiče diferencijaciju limfocita T i doprinosi amplifikaciji sustavne upalne reakcije. Osim citokinske funkcije, stanice NK posjeduju snažan citotoksični kapacitet, kojim odstranjuju stanice s oštećenim ili smanjenim izražajem MHC I molekula, što je česta posljedica stresa, hipoksije ili stanične disfunkcije izazvane reperfuzijom [90-92].

Citotoksičnost stanica NK posredovana je oslobađanjem sadržaja njihovih citoplazmatskih granula, prvenstveno perforina i granzima. Perforin je ključna molekula koja formira pore u membrani ciljnih stanica, omogućujući ulazak granzima, koji zatim pokreću apoptozu. Ovaj mehanizam omogućuje brzo i učinkovito uklanjanje oštećenih ili stresom promijenjenih stanica, ali u kontekstu ishemijsko-reperfuzijske ozljede može pridonijeti dodatnom oštećenju miokarda ako nije precizno reguliran [90, 92-95].

Povećan izražaj perforina zabilježena je u stanicama NK tijekom sustavne upale i nakon kirurških zahvata, a njezina razina može korelirati s intenzitetom lokalne ili sustavne citotoksičnosti. U kardiokirurškom kontekstu, citotoksičnost stanica NK predstavlja dvosjekli mač:

s jedne strane, može pomoći u čišćenju oštećenih stanica i ograničavanju sekundarnog oštećenja, dok s druge može pojačavati upalu i pogoršati ishod ako dođe do pretjerane aktivacije [82-87, 92-96].

1.1.9.3.2. Perforin

Perforin je ključna molekula u mehanizmu stanične citotoksičnosti, posebno važna za djelovanje limfocita CD8⁺ T, stanica NKT i stanica NK. Riječ je o glikoproteinu mase između 66 i 70 kilodaltona, pohranjenom u citoplazmatskim zrcima navedenih citotoksičnih stanica.

Nakon aktivacije, perforin se izlučuje putem egzocitoze i ugrađuje u membranu ciljane stanice. U prisutnosti kalcijevih iona, dolazi do njegove polimerizacije i stvaranja pora u membrani. Ove pore omogućuju ulazak vode u ciljnu stanicu, što može dovesti do njezina osmolarnog bubrenja i smrti kroz nekrozu. Osim toga, kroz te pore ulaze i druge citotoksične molekule, primjerice granzimi, koji potom unutar stanice aktiviraju apoptozu. Perforin stoga može djelovati dvostruko, izravno mehanički narušavajući membranu i inducirajući nekrozu, ili posredno, omogućujući ulazak proapoptotskih molekula koje ciljano pokreću programiranu staničnu smrt. Ova sofisticirana regulacija omogućava brzo i učinkovito uklanjanje zaraženih ili transformiranih stanica.

Iako je perforin od iznimnog značaja u imunološkom nadzoru, njegova nestabilnost i brza razgradnja čine ga teško uočljivim u normalnim tkivima. Povećana prisutnost perforina zabilježena je u stanjima poput virusnih infekcija i autoimunih bolesti. Nasuprot tome, smanjen izražaj ili mutacije gena za perforin povezane su s oslabljenom citotoksičnom funkcijom, većom sklonošću infekcijama te razvojem limfoproliferacijskih poremećaja, uključujući limfome.

Poznato je da na izražaj perforina utječu brojni proupalni citokini koji pripadaju Th1 odgovoru, uključujući IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 i IL-21. Ti čimbenici djeluju kao važni poticaji za povećanje sinteze perforina u citotoksičnim stanicama, čime se pojačava njihov citotoksični potencijal [26, 27, 97-101].

U poslijeoperacijskom razdoblju, posebice tijekom faze reperfuzije, povećani izražaj i aktivnost perforina može imati dvoznačan učinak. S jedne strane, ona pridonosi uklanjanju oštećenih, apoptotičnih ili imunološki promijenjenih stanica koje su nastale kao posljedica ishemije i oksidacijskog stresa. S druge strane, nekontrolirano lučenje perforina može izazvati dodatno

oštećenje kardiomiocita i endotela, pogoršavajući ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu i doprinoseći disfunkciji miokarda.

Povišeni izražaj perforina u stanicama periferne krvi nakon operacije zabilježena je u brojnim studijama, a njezina dinamika često korelira s intenzitetom sustavnog upalnog odgovora i s koncentracijama serumskih markera oštećenja srca. Zbog toga se perforin sve češće razmatra ne samo kao efektorska molekula u imunološkoj reakciji nakon operacija, nego i kao potencijalni biomarker težine upale i tkivne ozljede nakon kardiokirurških zahvata [82-86, 93-95].

1.1.10. Endotelni glikokaliks i endotelna disfunkcija

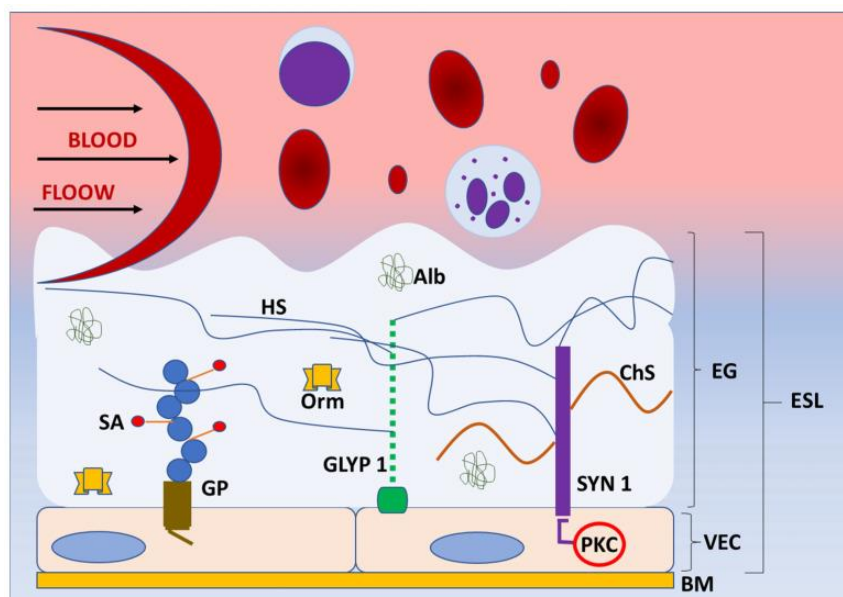
Endotelni glikokaliks je dinamični sloj, sličan gelu, koji oblaže unutarnju stijenku lumena endotelnih stanica krvnih žila. Ima značajnu ulogu u vaskularnoj homeostazi, regulaciji propusnosti i mehanotransdukciji [102-107]. Većinom je građen od proteoglikana, glikozaminoglikana i proteina plazme (Slika 1). Obzirom da endotelni glikokaliks oblaže luminalnu stijenku endotelnih stanica krvnih žila, direktno se nalazi u kontaktu s cirkulirajućom krvi te je izložen trenju uslijed kontakta krvi i endotelnog glikokaliksa [108]. Proteinska jezgra endotelnog glikokaliksa sačinjena je od transmembranskih sindekana (sindekan 1 - 4) te za membranu vezanih glipikana [109]. Sindekan - 1 je dominantna forma sindekana te je uključen proces odgovora na upalu, infekciju te tumore [110]. Sindekan-4 je također važan transmembranski proteoglikan unutar endotelnog glikokaliksa koji sudjeluje u regulaciji adhezije i migracije stanica, kao i u mehanotransdukciji. Sindekan - 4 ima ključnu ulogu u održavanju integriteta vaskularne barijere te modulira upalne procese kroz interakcije s citokinima i čimbenicima rasta. Njegova funkcija je važna za očuvanje strukture i funkcije endotelnog glikokaliksa posebno u uvjetima stresa kao što je ishemijsko-reperfuzijska ozljeda. Poremećaj funkcije sindekana-4 doprinosi povećanoj vaskularnoj propusnosti i pojačanoj upalnoj reakciji, što pogoršava endotelnu disfunkciju. Osim toga, sindekan - 4 sudjeluje u remodeliranju ekstracelularnog matriksa, važnom za regeneraciju oštećenog tkiva tijekom i nakon kirurških zahvata poput koronarne prenosnice.

Proteoglikani sindekan i glipikan vežu na sebe glikozaminoglikane poput heparan sulfata, hondroitin sulfata, dermatan sulfata i hijaluronsku kiselinu [109]. Zahvaljujući svojoj građi u obliku dugih molekula, glukozaminoglikani se kreću kroz krv, poput vlakana usidrenih na endotelne stanice, te na sebi sadržavaju razna vezivna mjesta za razne krvne stanice, receptore i proteine [111]. Hijaluronska kiselina ima linearnu, ne-sulfatnu strukturu i ostvaruje interakciju s

receptorom CD44 na površini vaskularnih endotelnih stanica [104]. Iako hijaluronska kiselina čini samo 5 do 20% ukupnih glukozaminoglikana endotelnog glikokaliksa, ima bitne funkcije. Od presudne je važnosti za debljinu i fleksibilnost endotelnog glikokaliksa te time ostvaruje neke od ključnih svojstava endotelnog glikokaliksa poput mehanotransdukcije, selektivne propusnosti te ograničava adheziju i ulazak leukocita [112]. U fiziološkim uvjetima, hijaluronska kiselina na temelju navedenog ostvaruje protu-upalna i imunosupresijska svojstva [113]. Istraživanja su pokazala da je hijaluronska kiselina, zajedno s hondroitin sulfatom, najosjetljivija na strukturalne i kemijske promjene uzrokovane oksidacijskim stresom [104]. Oksidacijski stres vodi fragmentaciji hijaluronske kiseline, što posljedično vodi daljnjoj stimulaciji proizvodnje citokina i povećava intenzitet upale [112]. Stoga, svaka promjena u strukturi endotelnog glikokaliksa uzrokovana određenim uvjetima (ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, ateroskleroza, diabetes, sepsa i sl.) oštećuje mogućnost vezivanja proteina [109]. Posljedica oštećenja endotelnog glikokaliksa je otpuštanje (*engl. shedding*) sindekana i hijaluronske kiseline u krv, što vodi daljnjoj sekreciji pro-upalnih citokina [114]. U bolesnika tijekom kardiokirurških zahvata, rano otpuštanje sindekana-1 i posljedično hijaluronske kiseline te hondroitin sulfata vezanih za sindekan-1 zamijećeno je prilikom reperfuzije [115]. Njihovo rano otpuštanje tijekom reperfuzije obilježava značajnu ozljedu endotela i degradaciju EG-a, što može pogoršati ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu.

Još jedan važan sastojak endotelnog glikokaliksa je von Willebrand faktor, koji ima ključnu ulogu u hemostazi. Von Willebrand faktor je prisutan na površini endotelnih stanica unutar glikokaliksa i sudjeluje u adheziji trombocita na oštećenja krvnih žila. Osim toga, von Willebrand faktor može biti uključen u regulaciju upalnog odgovora, jer interakcije s endotelnom glikokaliksi i endotelom utječu na aktivaciju trombocita i leukocita te time posredno utječu na upalne procese i vaskularnu funkciju tijekom i nakon kirurških intervencija kao što je operacija koronarne prenosnice [116-120].

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, koja je česta tijekom kardiokirurških zahvata vodi oksidacijskom stresu, upali i endotelnoj disfunkciji, što sve potom dodatno remeti strukturu i funkciju endotelnog glikokaliksa [5, 6, 121-124].



Slika 1. Shematski prikaz osnovne strukture endotelnog glikokaliksa u normalnim uvjetima.

Endotelni glikokaliks čini zaštitni sloj glikozaminoglikana, proteoglikana (sindekani, glipikani) te ugradbeni proteini na luminalnoj strani stanica vaskularnog endotela. On sprječava izravni kontakt krvi s stijenkom krvnih žila. Kratice: ESL – površni sloj endotela (*engl. endothelial surface layer*), EG – endotelni glikokaliks, VEC – stanica vaskularnog endotela (*engl. vascular endothelial cell*), BM – bazalna membrana, GP- glikoprotein, SA – sijalinska kiselina, GLYP1 – glipikan 1 (*engl. Glypican 1*), SYN1 – sindekan 1 (*engl. Syndecan 1*), PKC – protein kinaza C, HS – heparan sulfat, CHS – hondroitin sulfat (*engl. Chondroitin sulphate*), ORM – orosomukoid, ALB – albumin.

1.1.11. Ishemijsko reperfuzijska ozljeda

Ishemijsko reperfuzijska ozljeda je složen patofiziološki proces koji se javlja kada se nakon perioda ishemije, odnosno smanjenog ili prekinutog protoka krvi, uspostavi reperfuzija tkiva. Ishemija dovodi do smanjenja opskrbe kisikom i hranjivim tvarima, što rezultira energetske deficitom u stanicama. Zbog nedostatka adenozin-trifosfata (ATP) dolazi do disfunkcije ionskih pumpi, osobito natrij-kalijeve ATPaze, što uzrokuje nakupljanje natrija i vode u stanicama te njihov edem i oštećenje membrana. Anaerobna glikoliza dovodi do akumulacije laktata i sniženja pH, što dodatno remeti stanične funkcije. Mitohondriji gube sposobnost stvaranja energije i počinju stvarati reaktivne kisikove vrste (ROS, *engl. reactive oxygen species*) već tijekom ishemije [123].

Reperfuzija, iako neophodna za preživljavanje tkiva, paradoksalno može pogoršati oštećenje. Nagli dotok kisika u tkivo uzrokuje stvaranje ROS kao što su superoksidni anion, vodikov peroksid i hidroksilni radikali. Ove molekule induciraju oksidacijski stres, oštećujući lipide, proteine i DNK, što vodi do stanične smrti putem nekroze i apoptoze. Istovremeno, reperfuzija aktivira upalni odgovor. Endotelne stanice potiču izražaj adhezijskih molekula poput selektina i integrina, koje omogućavaju prijanjanje neutrofila i drugih leukocita na vaskularni zid. Aktivirani neutrofili migriraju u tkivo, gdje oslobađaju proteolitičke enzime i dodatne ROS, što dodatno pojačava stanično oštećenje i vaskularnu propusnost [123, 124].

Endotelni glikokaliks igra ključnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze. On štiti endotel od mehaničkog oštećenja, regulira propusnost kapilara, inhibira agregaciju trombocita i prijanjanje leukocita. Tijekom ishemijsko reperfuzijske ozljede dolazi do razgradnje endotelnog glikokaliksa pod utjecajem oksidacijskog stresa i upalnih citokina, što dovodi do endotelne disfunkcije. Oštećenje endotelnog glikokaliksa povećava vaskularnu propusnost, omogućuje infiltraciju upalnih stanica i doprinosi stvaranju edema.

Endotelna disfunkcija predstavlja poremećaj u funkciji endotela, obilježen smanjenom sintezom vazodilatatora kao što je dušični oksid (NO, *engl. nitrous oxide*) i povećanim stvaranjem vazokonstriktora i proupalnih posrednika. Ova neravnoteža dovodi do povećane adhezije leukocita, aktivacije trombocita, povećane vaskularne permeabilnosti i mikrotromboze, što dodatno utječe na mikrokrvnu opskrbu i produbljuje ishemijsko oštećenje tkiva.

Tijekom operacije koronarne prenosnice, ishemijsko reperfuzijska ozljeda ima značajnu kliničku važnost. Tijekom kirurškog zahvata, privremeni prekid protoka krvi u koronarnoj arteriji neizbježan je kako bi se omogućio rad na srčanom mišiću. Nakon uspostave izvantjelesne cirkulacije i ponovnog uspostavljanja protoka, miokard se izlaže reperfuzijskom stresu. Ova ozljeda može uzrokovati poremećaje srčane funkcije, uključujući smanjenje kontraktilnosti, aritmije i povećan upalni odgovor, što negativno utječe na klinički ishod liječenja bolesnika. Zbog toga se u operaciji primjenjuju strategije zaštite miokarda poput primjene hladne kardioplegije, koja smanjuje metabolizam i štiti stanice od oksidacijskog oštećenja te lijekovi koji smanjuju upalu [115, 125-131].

1.1.12. Markeri srčanoga oštećenja

1.1.12.1. Troponin T

Troponin T je specifični proteinski element koji se nalazi unutar srčanih mišićnih stanica i ključan je za regulaciju kontrakcije miokarda. On je dio troponinskog kompleksa koji kontrolira interakciju između aktina i miozina, što je temelj mehanizma srčane kontrakcije. Zbog svoje visoke specifičnosti za srčani mišić, troponin T se koristi kao pouzdan biomarker za utvrđivanje oštećenja srčanog tkiva. Pod normalnim uvjetima, koncentracije troponina T u krvi su vrlo niske, no prilikom oštećenja srčanih stanica, primjerice uslijed ishemije ili infarkta miokarda, te stanice otpuštaju troponin T u krvotok. Porast koncentracije troponina T može se uočiti nekoliko sati nakon početka ozljede i ostaje povišen tijekom nekoliko dana, što omogućuje dijagnostiku akutnih i subakutnih srčanih ozljeda. Za dijagnostiku je bitna dinamika vrijednosti, odnosno porast u određenom vremenskome intervalu [132-136].

Tijekom operacija koronarne prenosnice, srce je izloženo razdobljima ishemije zbog prekida ili smanjenja dotoka krvi, kao i potencijalnoj reperfuzijskoj ozljedi tijekom ponovnog uspostavljanja protoka krvi. Reperfuzija može uzrokovati oštećenje srčanih stanica i posljedično povećanje koncentracije troponina T u krvi. Praćenje koncentracije troponina T nakon zahvata ključno je za procjenu stupnja i opsega oštećenja srčanog mišića te za rano prepoznavanje mogućih komplikacija kao što su perioperacijski infarkt miokarda ili srčana disfunkcija.

Povišene koncentracije troponina T u poslijeoperacijskom razdoblju povezane su s lošijom prognozom i mogu zahtijevati dodatne dijagnostičke ili terapijske mjere. Zbog toga je mjerenje ovog biomarkera standardni dio poslijeoperacijskog nadzora bolesnika nakon operacije koronarne prenosnice, što omogućuje pravovremenu intervenciju i optimizaciju liječenja [137-144].

1.1.12.2. N-terminalni fragment prohormona natriuretskog peptida tipa B

N-terminalni fragment prohormona natriuretskog peptida tipa B (NT-proBNP) je peptid koji se oslobađa iz srčanih stanica kao odgovor na povećani stres i istezanje stijenke miokarda. Ovaj biomarker se koristi kao važan pokazatelj srčane funkcije, posebno u dijagnostici i procjeni težine zatajenja srca. U fiziološkim uvjetima, koncentracije NT-proBNP-a u krvi su niske, ali u prisutnosti srčanih poremećaja, kao što su zatajenje srca, ishemija ili hipertenzija, dolazi do

njegovog značajnog povećanja. NT-proBNP pomaže u regulaciji volumena krvi i krvnog tlaka putem natriureze, diureze i vazodilatacije, djelujući kao zaštitni mehanizam u uvjetima preopterećenja srca [145-150].

Tijekom operacija koronarne prenosnice, srce je izloženo stresu zbog privremenog prekida ili smanjenja krvotoka, što može dovesti do povećanog stresa miokarda te dodatno oksidacijskog stresa. Posljedično, dolazi do povećanog lučenja NT-proBNP-a, što odražava stupanj srčanog stresa i moguće oštećenje miokarda. Praćenje razine NT-proBNP-a u perioperacijskom razdoblju ključno je za procjenu srčane funkcije i rizika od komplikacija kao što su zatajenje srca nakon operacije.

Povišene vrijednosti NT-proBNP-a povezane su s lošijom prognozom, većim rizikom od poslijeoperacijskih komplikacija i produženim oporavkom. Stoga se ovaj biomarker koristi za identifikaciju bolesnika s povećanim kardiovaskularnim rizikom te omogućuje pravovremenu prilagodbu terapije i praćenje kliničkog stanja. Upravo zbog svoje osjetljivosti i specifičnosti, NT-proBNP je postao standardni dio kardiološkog nadzora bolesnika prije i nakon zahvata koronarne prenosnice, pomažući u optimizaciji ishoda liječenja [151-159].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su:

- istražiti utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok i bez primjene stroja za izvantjelesni krvotok na koncentraciju IL-18, raspadnih produkata EG (sindekana – 1, heparan sulfata, sindekana - 4), von Willebrandovog faktora, NT-proBNP, troponina T i C reaktivnog proteina (CRP) u krvi koronarnog sinusa, bulbusa aorte i perifere venske krvi bolesnika s ishemijskom bolešću srca tijekom kirurške revaskularizacije te u perifernoj krvi prije operacije te 24 i 72 sata nakon kirurškog zahvata,
- istražiti utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok i bez primjene stroja za izvantjelesni krvotok na udio stanica NK i izražaja perforina u krvi koronarnog sinusa, bulbusa aorte i perifere venske krvi bolesnika s ishemijskom bolešću srca tijekom kirurške revaskularizacije te u perifernoj krvi prije operacije te 24 i 72 sata nakon kirurškog zahvata,
- analizirati korelacije sindekana-1, heparan sulfata i sindekana-4 s koncentracijama IL-18 te udjelom perforin pozitivnih stanica NK,
- analizirati korelacije između koncentracije raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa i IL-18 te biljega oštećenja miokarda (troponin T , NT-proBNP, CRP).
- trajanje liječenja (trajanje strojne ventilacije, boravak u jedinicama intenzivne medicine), ishod liječenja bolesnika (odlazak na odjel ili smrtni ishod).

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovu prospektivno istraživanje bili su uključeni bolesnici koji su bili planirani za elektivnu operaciju revaskularizacije miokarda u razdoblju od svibnja 2023. do prosinca 2024. godine, a studija se provodila na Zavodu za anesteziologiju, intenzivnu medicinu i liječenje boli, Zavodu za anesteziju u kardijalnoj kirurgiji te Klinici za kardijalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka, Hrvatska.

U istraživanje je uključeno ukupno 60 bolesnika kod kojih je provedena kirurška revaskularizacija miokarda. Bolesnici su bili podijeljeni u dvije skupine, ovisno o korištenoj kirurškoj tehnici. Skupina 1 uključivala je bolesnike operirane uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok, dok je Skupina 2 uključivala bolesnike operirane bez korištenja izvantjelesnog optoka (Slika 6). Izbor kirurške tehnike bio je prepušten operateru te se temeljio na smjericama ACCF/AHA iz 2021. godine [13]. Kirurzi su bili upoznati s provedbom istraživanja, ali nisu znali o uključivanju bolesnika u istraživanje sve dok nije donesena odluka o vrsti kirurške tehnike, kako bi se smanjio rizik od potencijalne pristranosti u odabiru metode.

Iz istraživanja su isključeni bolesnici mlađi od 18 i stariji od 80 godina, bolesnici s potvrđenom autoimunom bolesti, malignom bolesti, oni koji su uzimali kortikosteroidnu ili imunosupresijsku terapiju, kao i bolesnici s anamnezom koagulopatije.

Tijekom istraživanja zabilježeni su demografski podaci uključujući spol i dob bolesnika, trajanje operacije i anestezije, trajanje strojne ventilacije, trajanje boravka u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) te ishod liječenja.

3.2. Etičnost istraživanja i informirani pristanak

Protokol istraživanja odobrili su Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

Svi bolesnici su dobili pisane informacije o istraživanju te dodatna usmena pojašnjenja od strane istraživačkog tima. U studiju su uključeni isključivo bolesnici koji su potpisali informirani pristanak. Odluka o izvođenju kirurškog zahvata premoštenja koronarnih arterija temeljila se na smjernicama Europskog kardiološkog društva (*engl. European Society of Cardiology, ESC*) i Europskog udruženja za torakalnu i kardiovaskularnu kirurgiju (*engl. The European Association for Cardio-Thoracic Surgery, EACTS*) [62].

3.3. Materijali

3.3.1. Kemikalije, mediji i puferi

Tablica 2. Kemikalije korištene u izvođenju pokusa

Kemikalija	Proizvođač
Ethilen-daimin-tetra-acetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Njemačka
Fetalni teleći serum (FSC, <i>engl. fetal calf serum</i>)	Gibco, Carlsbad, SAD
Gentamicin sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Hepes	Serva, Heidelberg, Njemačka
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Kalcij-klorid (CaCl_2)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kalij-klorid (KCl)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
L-glutamin	Merck, Darmstadt, Njemačka
Limfoprep	Nycomed Pharma, Oslo, Norveška
Magnezij-klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Kemika, Zagreb, Hrvatska

Natrij-azid (NaN_3)	Difco, Detroit, SAD
Natrij-citrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-hidroksid, NaOH	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-klorid, NaCl	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Nikal-sulfat-heksahidrat, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Penicilin	Grunenthal, Stolberg, Njemačka
Propidium iodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Streptomycin sulfat	Merck, Sigma - Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Tripansko modriilo (Trypan blue)	Serva, Heidelberg, Njemačka
Türkova otopina	Kemika, Zagreb, Hrvatska

Tablica 3. Mediji i puferi korišteni u izvođenju pokusa

Mediji i puferi	Sastav medija i pufera
Puferirana fiziološka otopina (PBS)	Natrij-klorid (NaCl) 140 mM, Kalij-klorid (KCl) 2,7 mM, Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 6,5 mM, Kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 1,5 mM, Kalcij-klorid (CaCl) 0,7 mM, Magnezij-klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) 0,7 mM.
Medij za kulturu tkiva	RPMI 1640 (GIBCO), L-glutamin 2 mM, Hepes (pH 7,2), 10 mM, Penicilin 1×10^5 i.j/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l, Gentamycin sulfat 0,05 g/l, Serum goveđeg fetusa (FCS) 10%.
Medij za protočni citometar	PBS 1 l, EDTA 10 mM, Hepes (pH 7,2) 20 mM, Serum goveđeg fetusa 2%, natrij-azid (NaN_3) 0,1%.
4% Paraformaldehid (pH 7,4)	Paraformaldehid 40 g/l, Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 16,83 g/l, Natrij-

	hidroksid (NaOH) 3,85 g/l, Glukoza 5,4 g/l.
Saponinski pufer	PBS, Saponin 0,1%, Serum goveđeg fetusa 2%, EDTA 1 mM.

3.3.2. Laboratorijski pribor i posude

Tablica 4. Laboratorijski materijal korišten u izvođenju pokusa

Laboratorijski materijal	Proizvođač
Filter 30 mm	Mylteni Biotec, Auburn, SAD
Epruvete	Eppendorf, TPP, Hambourg, Njemačka
Neubauerova komorica za brojenje stanica	
Pasteurova pipeta	Kartell, Noviglio, Italija
Plastični nastavci za pipete, 0-1000 microl	Kartell, Noviglio, Italija
Plastična kušalica sa zatvaračem, 50 ml	Falcon, Lawrence, SAD
Plastične kušalice za protočni citometar 12 x70 mm	Falcon, Lawrence, SAD
Plastične pipete	Greiner, Taufkirchen, Njemačka

3.3.3. Protutijela imunoenzimski kitovi

Tablica 5. Protutijela korištena u istraživanju

Protutijelo	Proizvođač
Protu-humano protu-CD56 protutijelo FITC, NCAM 16.2/mišji IgG1, Biljeg CD56 PE	BD Pharmingen, San Jose, SAD
Protu-humano protu-perforinsko protutijelo, G9/miajiIgG2b, Humani perforin FITC	Protu-humano protu-perforinsko protutijelo, G9/miajiIgG2b, Humani perforin

FITC–*engl. Fluoresceine-isothiocyanate*, PE–*engl. phycoerithryn*

Tablica 6. Imunoenzimski kitovi korišteni u istraživanju

Imunoenzimski kitovi (ELISA, <i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	Proizvođač
---	------------

Human Syndecan-1 ELISA Kit (CD138)	Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Velika Britanija
Human HSPG ELISA Kit (Perlecan)	Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Velika Britanija
Human LYVE1 ELISA Kit	Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Velika Britanija
Human Von Willebrand Factor ELISA Kit	Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Velika Britanija

3.3.4. Laboratorijski uređaji

Tablica 7. Uređaji korišteni u izvođenju pokusa

Uređaj	Proizvođač
Automatski analizator za određivanje biokemijskih i hematoloških sastojaka iz krvi i seruma	CELL-DYN 1800 ABBOTT, Illinois, SAD COBAS C501 Roche Diagnostics Mannheim, Njemačka COBAS E601 Roche Diagnostics Mannheim, Njemačka
Centrifuga	Juan, Sorvall, Bohemia, SAD
Elektronički brojač Technicom H-1 system	Technicom, San Jose, SAD
ELISA čitač	Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska
FACScan, FACS Calibur, protočni citometar	Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka
Hladnjak - 80	Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemska
Inkubator	Shel Lab, Cornelius, SAD
Komora za rad u sterilnim uvjetima	Elhert, Gutersloh, Njemačka
Pipete	Eppendorf, Hambourg, Njemačka
Vaga	Mettler, Zagreb, Hrvatska

3.4. Uzorkovanje krvi

Uzorkovanje krvi se vršilo u 3 vremenske točke; neposredno prije zahvata te 24 i 72 sata nakon zahvata. U svakoj vremenskoj točki se uzorkovalo 10 ml periferne venske krvi uzeti prije zahvata te 24 sata i 72 sata po učinjenom zahvatu te tijekom zahvata dodatno uzeti uzorci krvi 2ml iz bulbusa aorte i koronarnog sinusa. Protokoli uzorkovanja su bili standardizirani, odnosno iz uzoraka krvi izdvojila se je plazma i izolirale mononuklearne stanice metodom odvajanja na gradijentu gustoće te su se izdvojene plazme i leukociti pohranjivali na temperaturu od -80 oC u ledenicama Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Iz plazmi su se mjerile i analizirale koncentracije topljivih čimbenika sindekana - 1, sindekana - 4, hijaluronske kiseline, von Willebrand faktora (vWf), IL – 18, a iz izoliranih mononuklearnih stanica udjeli stanica NK.

3.5. Metode

3.5.1. Anestezija

Po dolasku u operacijsku salu bolesnici su preoksigenirani. Opća anestezija inducirana je intravenskom primjenom sedativa propofola (Propofol-Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Njemačka) u dozi od 1,5–2 mg/kg i sufentanila u dozi od 0,4 µg/kg (Sufentanil Altamedics, Laboratoire Renaudin, Ixassou, Francuska), nakon čega je uslijedila primjena bolusa rokuronija u dozi od 0,6 mg/kg (Rocuronium bromide, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Njemačka). Svi su bolesnici endotrahealno intubirani i strojno ventilirani uz zaštitne ventilacijske postavke, uz održavanje normokapnije tijekom zahvata. Anestezija je održavana dodatnim dozama sufentanila i rokuronijeva bromida te inhalacijom sevoflurana (Sevofluran Baxter, Baxter S.A., Lessines, Belgija) uz minimalnu alveolarnu koncentraciju (MAC) od 0,7–1,5. Frakcija inspiracijskog kisika (FiO₂) titrirana je tako da se održava saturacija (SpO₂) između 94–98 %. Vazopresori, traneksaminska kiselina, heparin, protamin, transfuzije i hemostatski pripravci primjenjivani su u skladu s bolničkim protokolom i procjenom nadležnog anesteziologa.

3.5.2. Kirurška revaskularizacija miokarda

3.5.2.1. Kirurška revaskularizacija miokarda uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok

Kod zahvata uz primjenu stroja za izvantjelesni optok korišten je oksigenator s filtrom Affinity Fusion (Medtronic, Minneapolis, MN, SAD). Srednji arterijski tlak održavan je u rasponu od 50 do 80 mmHg, a protok krvi na razini od 2,4 L/min/m². Primijenjena je blaga sustavna hipotermija. Kardioplegija krvlju prema Calafiore protokolu primijenjena je retrogradno putem kardioplegične kanile radi zaštite miokarda. Prije pokretanja strojnog krvotoka, zbog sprječavanja grušanja krvi u cijevima aparata bolesnici su dobiti 300 internacionalnih jedinica heparina (Heparin, Belupo, Koprivnica, Hrvatska) po kilogramu tjelesne mase intravenski. Antikoagulacijsko djelovanje heparina pratilo se je mjerenjima aktiviranog vremena zgrušavanja (AVZ) s ciljnim vrijednostima iznad 400 sekundi uz dodatne doze heparina po potrebi. Po završetku šivanja anastomoza apliciralo se je protamin klorid (Biomed Sp z.o.o., Varšava, Poljska) s ciljem reverzije učinka heparina uz kontrolu završnih vrijednosti AVZ.

3.5.2.2. Kirurška revaskularizacija miokarda bez primjene stroja za izvantjelesni krvotok

Kod zahvata bez korištenja izvantjelesnog optoka, operacija je izvedena na kucajućem srcu uz pomoć sustava Octopus IV (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, SAD). Za operacije na kucajućem srcu, koristio se je Octopus IV system (Medtronic Inc., Minneapolis, USA) i heparinizacija od 150 internacionalnih jedinica/kg tjelesne mase uz kontrole i korekciju po potrebi.

Neovisno o vrsti revaskularizacije, svim bolesnicima postavljeni su epikardne elektrode privremenog elektrostimulatora srca te dvije medijastinalne drenaže, a dodatno je postavljana jedna torakalna drenaža u slučaju otvaranja pleuralne šupljine.

Nakon zahvata, svi bolesnici prebačeni su u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) radi postoperativnog praćenja. Po prijemu u JIL, cilj je bio rano skidanje sa strojne ventilacije i ekstubacija, pod uvjetom da su zadovoljeni svi klinički kriteriji.

3.6. Klinički parametri

U svih bolesnika pratili su se vitalni parametri: sistolički (SKT), dijastolički (DKT) i srednji (MAP, *engl. mean arterial pressure*) sustavni krvni tlak, središnji venski tlak (SVT) te ejekcijska frakcija srca (EF) i to neposredno prije kirurškog zahvata (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) po završetku operacije.

3.7. Određivanje apsolutnog broja leukocita, koncentracije C-reaktivnog proteina i troponina T

Apsolutni broj leukocita određen je pomoću elektroničkog brojača (Technicom H-1 System; Technicon Instrument Corporation, New York, NY, SAD) temeljenog na lasersko-optičkom principu tamnog polja. Koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i troponina T (cTn) određene su pomoću automatskog analizatora (Olympus, Tokyo, Japan).

3.8. Određivanje koncentracija interleukina-18, sindekana – 1, sindekana – 4, hijaluronske kiseline i von Willebrandovog faktora

Koncentracije interleukina-18 (IL-18), sindekana-1, sindekana – 4, hijaluronske kiseline i von Willebrand faktora u plazmi kvantificirane su primjenom visokosenzitivnih imunoenzimskih testova (ELISA), nabavljenih od proizvođača Abcam (Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Velika Britanija) u skladu s uputama proizvođača. Ukratko, uzorci plazme i standardi dodani su u jažice mikrotitarskih pločica prethodno obložene specifičnim protutijelima. Nakon inkubacije i uklanjanja nespecifično vezanih tvari, dodano je biotinom konjugirano detekcijsko protutijelo, a zatim streptavidin–peroksidaza hrena. Kolorimetrijska reakcija razvijena je pomoću TMB supstrata te prekinuta dodatkom kiseline iz kompleta. Optička gustoća mjerena je mikrotitarskim čitačem (EL808, BioTek Instruments, Winooski, VT, SAD) pri primarnoj valnoj duljini od 450 nm uz referentnu valnu duljinu od 630 nm. Koncentracije su izračunate na temelju standardnih krivulja za svaki analit i izražene u pg/mL. Podaci su analizirani pomoću internetskog analitičkog softvera (<https://www.myassays.com/>, Brighton, East Sussex, Velika Britanija).

3.9. Izolacija mononuklearnih stanica

Mononuklearne stanice iz uzoraka krvi izolirane su metodom centrifugiranja na gradijentu gustoće koristeći Lymphoprep (Fresenius Kabi, Oslo, Norveška) [124]. Za postupak je korišteno 10 ml heparinizirane periferne krvi, koja je pažljivo nanescena na jednak volumen Lymphoprepa (10 ml). Uzorak je potom centrifugiran 20 minuta pri 600 g. Nakon centrifugiranja, pomoću Pasteurove pipete izdvojen je sloj mononuklearnih stanica (tzv. "prsten stanica") smješten između plazme i gradijenta. Stanice su zatim dvaput isprane u Rosmary Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mediju i resuspendirane u istom mediju namijenjenom za kulturu tkiva. Brojanje stanica provedeno je u Neubauerovoj komorici koristeći Tůrkovu otopinu za leukocite. Dobivene mononuklearne stanice korištene su odmah u daljnjim eksperimentalnim analizama. Vijabilnost stanica određena je protočnom citometrijom, pomoću bojenja tripanskim modrilom ili propidijevim jodidom u koncentraciji od 0,5 µg/ml na 10^6 stanica.

3.10. Obilježavanje površinskih biljega na izoliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi

Mononuklearne stanice izolirane centrifugiranjem na gradijentu gustoće obilježavane su metodom direktne imunofluorescencije. Za identifikaciju stanica NK koristili smo protutijela usmjerena na površinski biljeg CD56. Protutijela su bila direktno konjugirana s fluorescentnim bojama FITC ili PE. Za indirektno obilježavanje koristili smo specifična primarna mišja protuhumana protutijela i sekundarna kozja protutijela označena FITC bojom. Obilježene stanice čuvali smo na 4 °C do analize na protočnom citometru (FACSCalibur, Becton Dickinson & Co, SAD) uz pomoć softvera CellQuest Pro.

3.11. Istovremeno obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnog perforina u limfocitnim subpopulacijama

Izolirane mononuklearne stanice (3×10^5 po uzorku) centrifugirane i fiksirane s 4% paraformaldehidom, potom su permeabilizirane u saponinskom puferu. Nakon 20 minuta inkubacije dodana su direktno konjugirana protutijela protiv perforina (FITC) i inkubirana 30

minuta na 4 °C. Stanice su isprane u saponinskom puferu, a zatim je membrana zatvorena dodatkom medija za protočnu citometriju. Nespecifično vezivanje protutijela spriječeno je inkubacijom s 1% humanim serumom krvne grupe AB. Nakon dodatnog obilježavanja površinskih biljega, stanice su fiksirane 2% paraformaldehidom i čuvane na 4 °C do analize.

3.12. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka rađena je u računalnom programu Statistica 14.0.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA SAD). Za male nezavisne uzorke koristili smo Kruskal Walis ANOVA neparametrijski test. Statistička značajnost određena je uz $P < 0,05$. Da bismo utvrdili između kojih dviju od više međusobno uspoređivanih skupina postoji statistička značajnost koristili smo Mann-Whitney U test. Korelacija između pojedinih parametara izračunata je upotrebom Spearmanovog koeficijenta korelacije ranga. Razlike među varijablama koje su izražene na nominalnoj razini ispitala su se pomoću hi-kvadrat testa. Statistička značajnost se je izračunavala ima osnovu broja međusobnih usporedbi. Slikovni i tabelarni prikazi rezultata napravljeni su u računalnom programu Microsoft Excel (Microsoft Office, Redmon, Washington, SAD) i Statistica 14.0.0.

4. REZULTATI

4.1. Klinički i demografski podatci bolesnika

U Tablici 8 prikazani su demoografski i klinički podatci bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2. Statističkom obradom podataka, nije bilo statistički značajne razlike u dobi, spolu, trajanju strojne ventilacije, trajanju liječenja u JIL-u te ishodu liječenja.

Tablica 8. Demografski i klinički podatci

	Skupina 1	Skupina 2	P vrijednost
Dob (godine)*	68.4 (59-74,5)	67 (63-69)	< 0,05
Spol (M/Ž)**	19/11	18/12	< 0,05
Trajanje strojne ventilacije (sati)*	10 (9-13,1)	10 (9-11)	< 0,05
Trajanje boravka u JIL-u (sati)*	25 (24-36)	24 (24-48)	< 0,05
Ishod (otpust/smrt)**	30/0	30/0	< 0,05

*Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila

**Rezultati su prikazani kao apsolutni broj

U Tablici 9 su prikazani klinički podatci bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2. Statističkom obradom podatka nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka (SKT), dijastoličkog krvnog tlaka (DKT), srednjeg arterijskog tlaka (MAP), središnjeg krvnog tlaka (SKT) i ejeckijske frakcije u analiziranom vremenskim točkama u Skupini 1 i Skupini 2 te između Skupina.

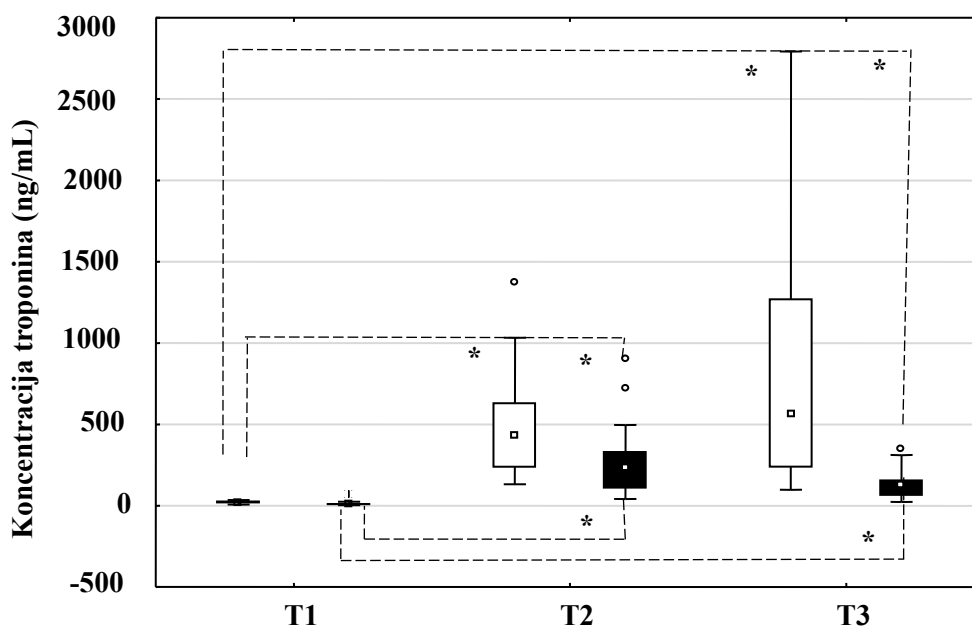
Tablica 9. Klinički podaci bolesnika Skupine 1 i Skupine 2

Parametar	Skupina 1			Skupina 2			P vrijednost
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	
SKT	140 (130-150)	110 (100-130)	110 (105-140)	135 (120-140)	110 (110-120)	120 (110-120)	< 0,05
DKT	80 (70-80)	70 (70-80)	70 (70-80)	80 (70-85)	70 (70-75)	72,5 (70-77,5)	< 0,05
MAP	95 (85-100)	75 (70-90)	85 (80-90)	90,5 (85-91)	85 (85-87)	80 (75-85)	< 0,05
SVT	8 (6-9)	7,5 (5-8)	5 (5-8)	7 (6-9)	7 (6-9)	7 (6-8)	< 0,05
EF	50 (45-55)	45 (35-50)	45 (45-50)	42,5 (35-50)	40 (35-50)	42,5 (35-50)	< 0,05

SKT - sistolički krvni tlak (referentne vrijednosti: 100-140 mm Hg); DKT - dijastolički krvni tlak (referentne vrijednosti: 60-90 mmHg); MAP - srednji arterijski tlak (referentne vrijednosti: 70-105 mmHg); SVT - središnji venski tlak (referentne vrijednosti: 2-6 mmHg); EF - ejekejska frakcija (>60% normalna sistolička funkcija srca, <35% jako oslabljena sistolička funkcija srca). Rezultati su prikazani kao median (25. – 75. percentila).

4.2. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju troponina

Analizom koncentracija cTn u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskim točkama T2 i T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine. Uspoređujući koncentracije cTn između skupina uočili smo statistički značajno veće koncentracije cTn u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskim točkama T2 i T3, ali ne i u T1 (Slika 2).

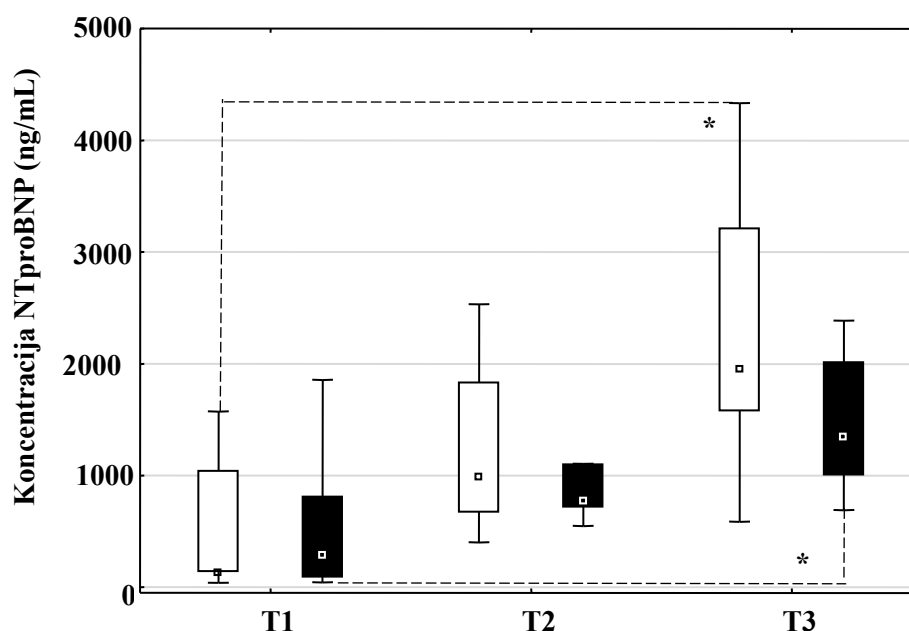


Slika 2. Usporedba koncentracije troponina (cTn) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

*Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.3. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida

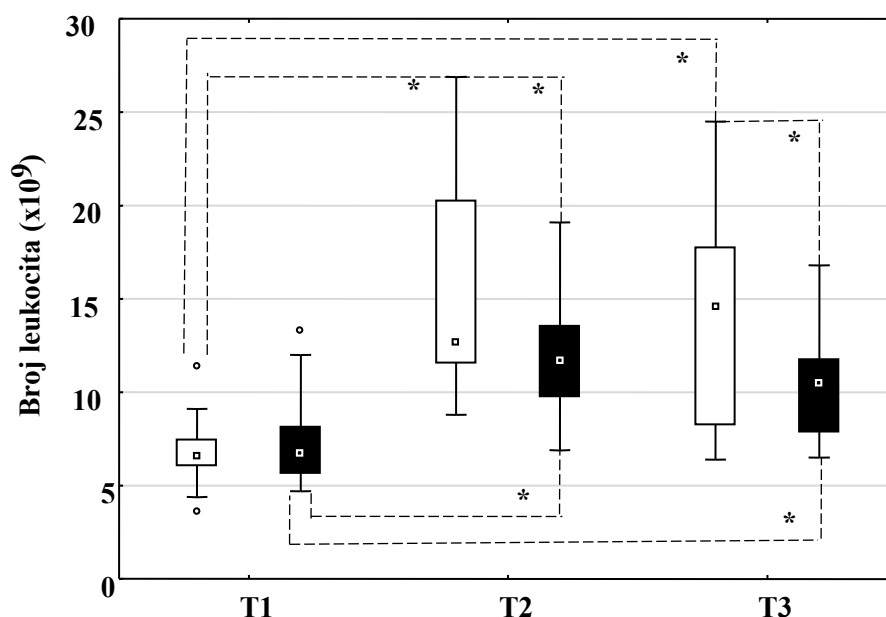
Analizom koncentracija NTproBNP u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine bolesnika. Uspoređujući koncentracije NTpro-BNP između skupina nismo uočili statistički značajne razlike između Skupine 1 i Skupine 2 (Slika 3).



Slika 3. Usporedba koncentracije N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida (NTproBNP) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.4. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na ukupan broj leukocita

Analizom broja leukocita u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno veći broj leukocita u vremenskim točkama T2 i T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine. Uspoređujući broj leukocita između skupina uočili smo statistički značajno veći broj leukocita u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskim točkama T2 i T3, ali ne i u T1 (Slika 4).

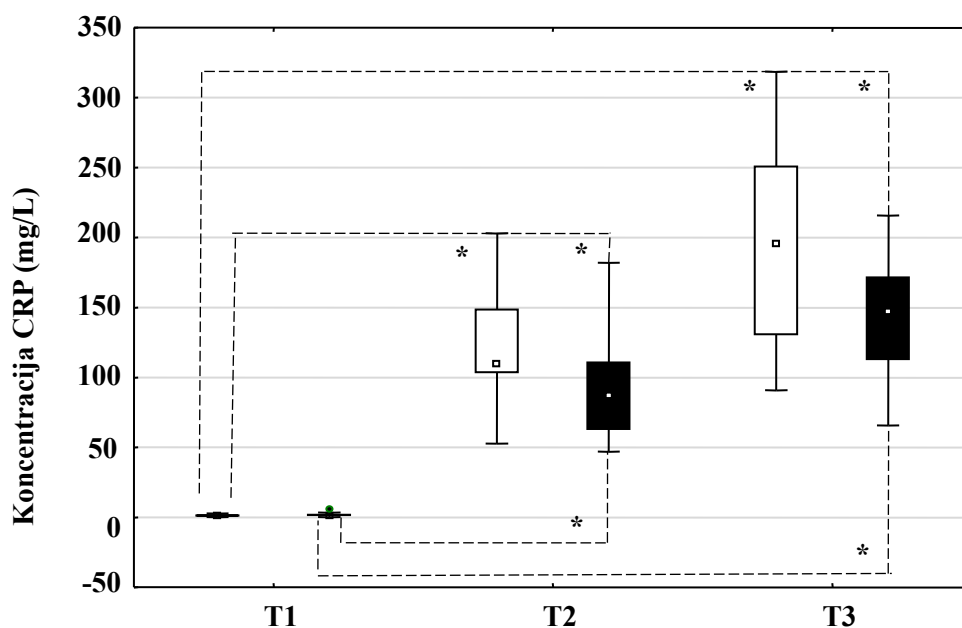


Slika 4. Usporedba apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

*Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.5. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju C reaktivnog proteina

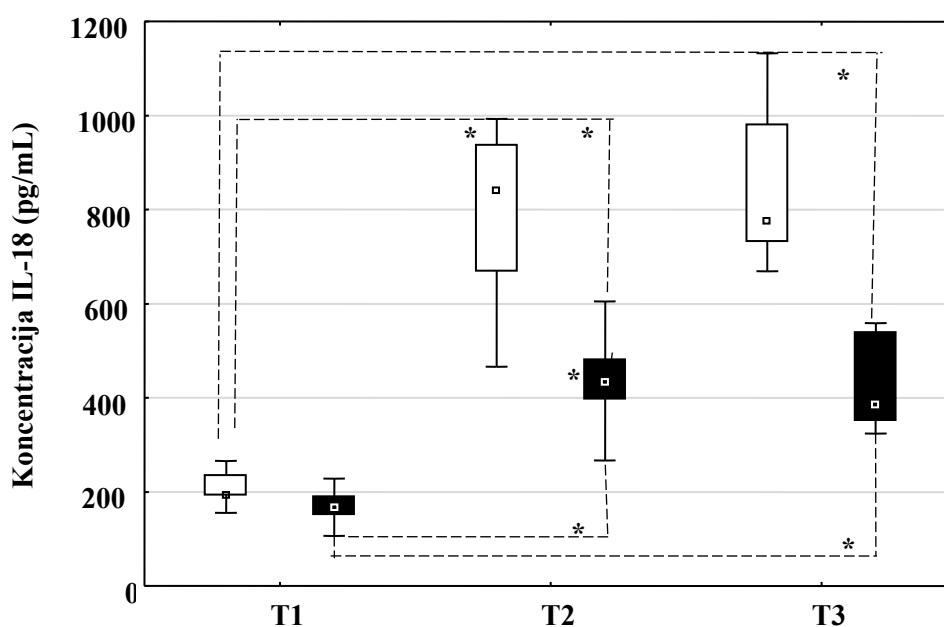
Analizom koncentracija CRP u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskim točkama T2 i T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine. Uspoređujući koncentracije CRP-a između skupina uočili smo statistički značajno veće koncentracije CRP-a u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskim točkama T2 i T3, ali ne i u vremenskoj točki T1 (Slika 5).



Slika 5. Usporedba koncentracije C reaktivnog proteina (CRP) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

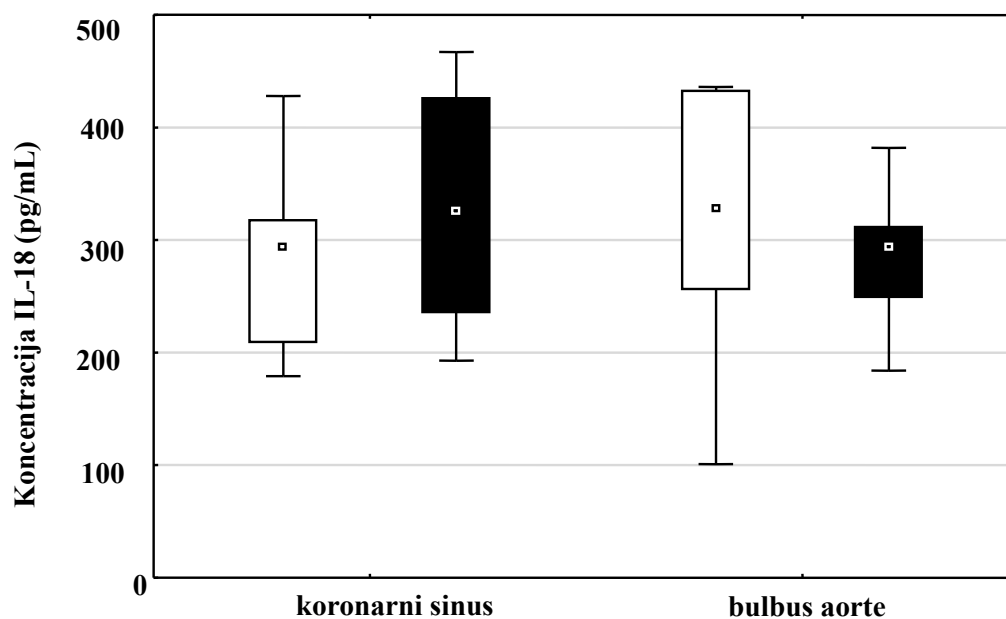
4.6. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentraciju interleukina - 18

Analizom koncentracija IL-18 u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1 u obje skupine bolesnika. Uspoređujući koncentracije IL-18 između skupina uočili smo statistički značajno veće koncentracije IL-18 u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskim točkama T2 i T3, ali ne i u vremenskoj točki T1 (Slika 6).



Slika 6. Usporedba koncentracije Interleukina 18 (IL-18) perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

Analizom koncentracija IL-18 u krvi koronarnog sinusa i bulbusa aorte izuzetih tijekom operacije u bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 nismo uočili statistički značajne razlike (Slika 7).



Slika 7. Usporedba koncentracije interleukina 18 (IL-18) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

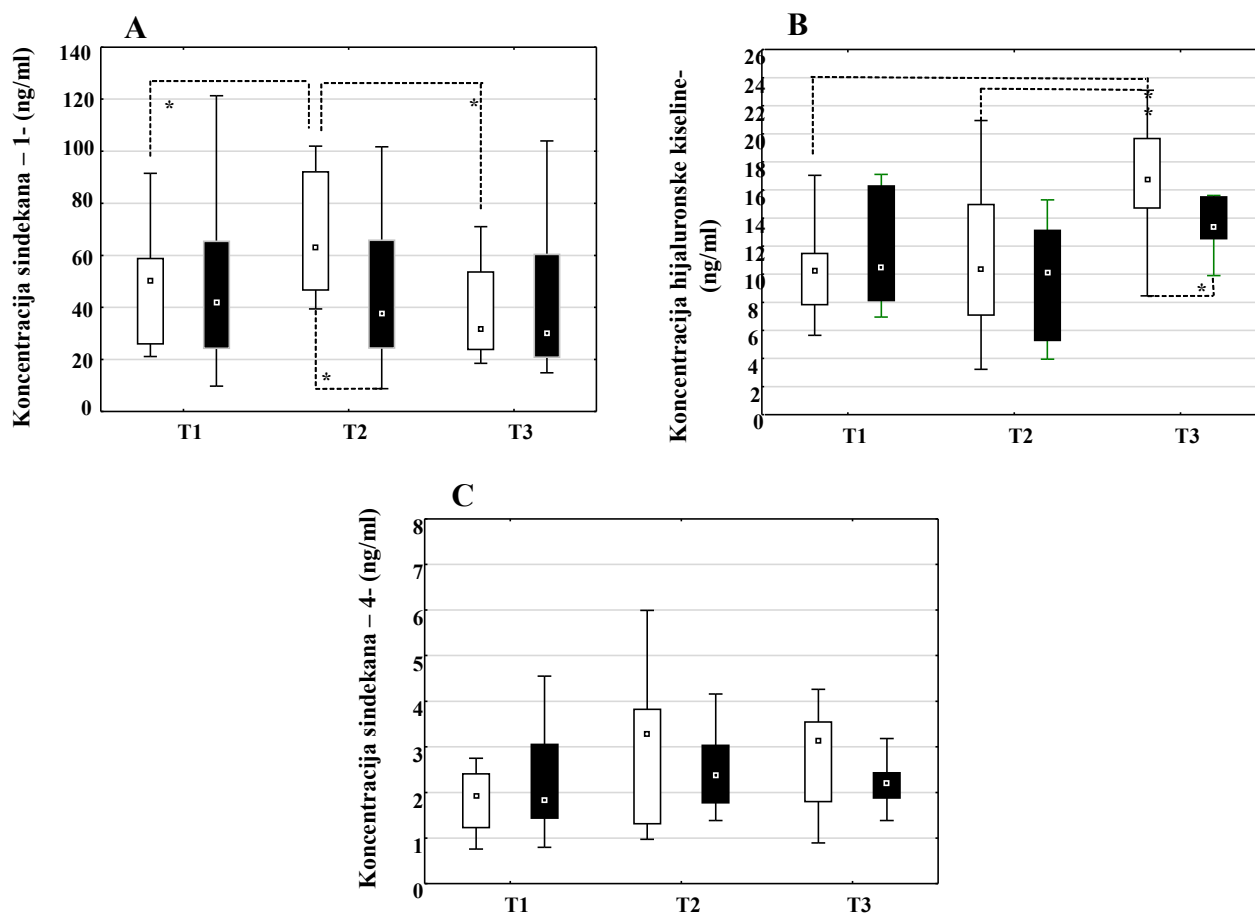
4.7. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentracije razgradnih produkata endotelnog glikokaliksa

Promjene u koncentracijama razgradnih produkata endotelnog glikokaliksa (sindekana -1, hijaluronske kiseline i sindekana – 4) u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i Skupine 2 prikazani su na Slici 8.

Analizom koncentracija sindekana – 1 u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 uočili smo statistički značajan porast njegove koncentracije vremenskoj točki T2 u odnosu na vremensku točku T1 te statistički značajan pad u točki T3 u odnosu na vremensku točku T2. U Skupini 1 nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama sindekana – 1 u analiziranim vremenskim točkama. Uspoređujući koncentracije sindekana - 1 u perifernoj krvi između skupina uočili smo statistički značajno veću koncentraciju sindekana - 1 u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskoj točki T2, ali ne u vremenskim točkama T1 niti T3 (Slika 8 A).

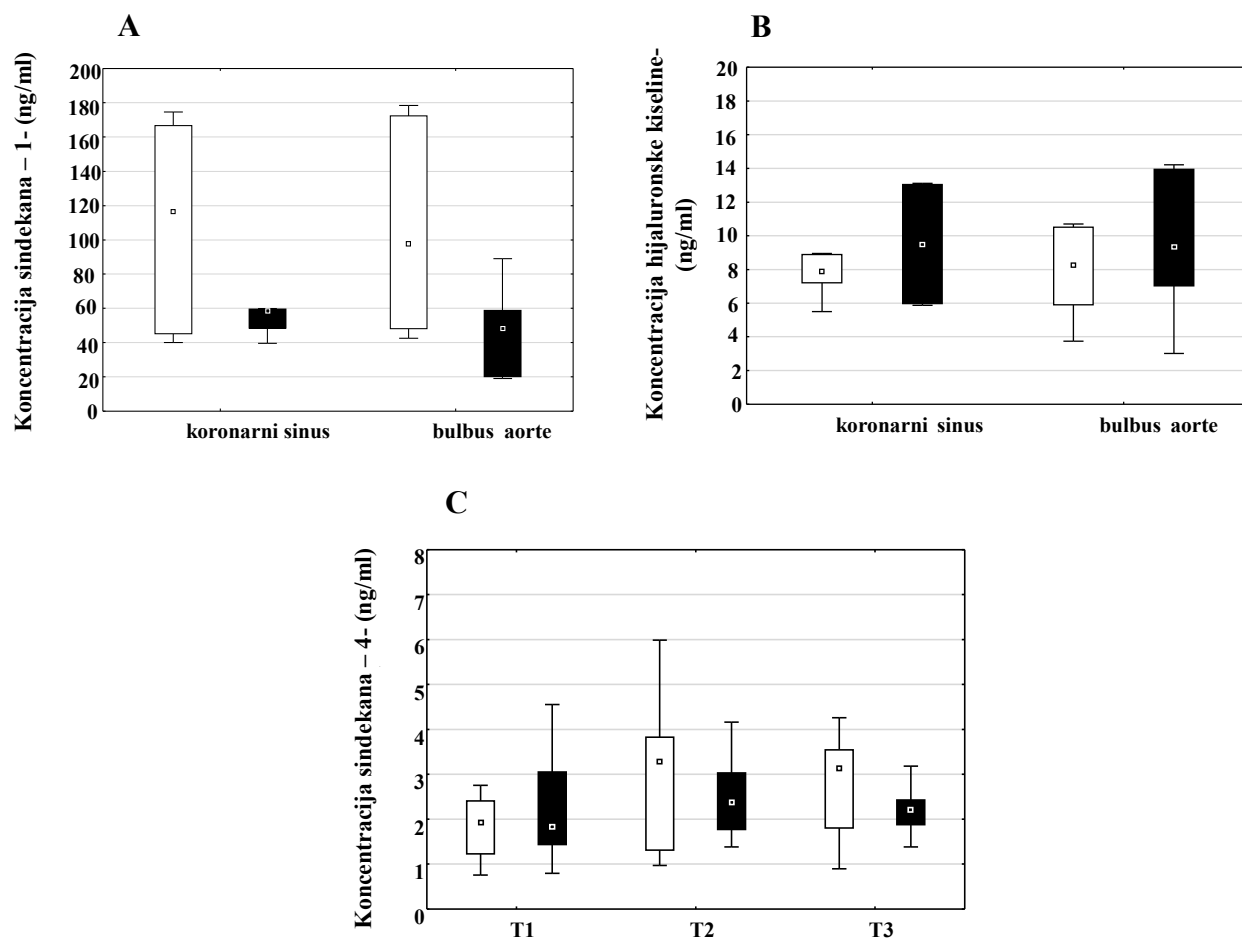
Analizom koncentracija hijaluronske kiseline u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskoj točki T2 i T3 u odnosu na vremensku točku T1 u Skupini 1, dok u Skupini 2 nije bilo statistički značajnih razlika (Slika 8 B). Uspoređujući koncentracije hijaluronske kiseline između skupina uočili smo statistički značajno veće koncentracije hijaluronske kiseline u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskoj točki T3, ali ne i u T1 niti T2.

Analizom koncentracija sindekana - 4 u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 nismo uočili statistički značajne razlike u ni jednoj vremenskoj točki niti među Skupinama 1 i 2 (Slika 8 C).



Slika 8. Usporedba koncentracije sindekana – 1 (A), hijaluronske kiseline (B) i sindekana – 4 (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

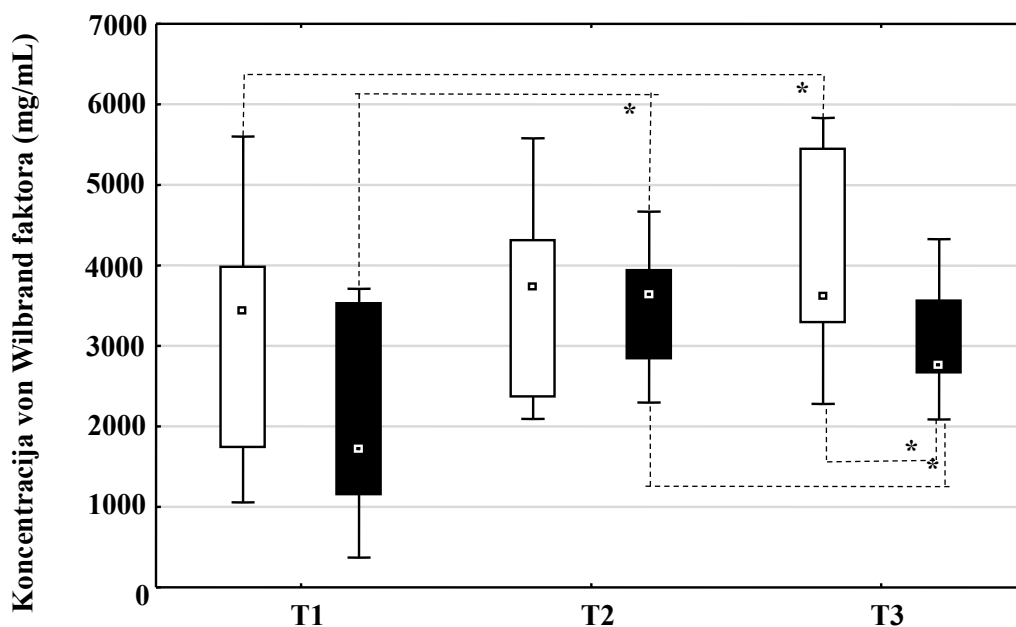
U ovom istraživanju smo analizirali koncentracije sindekana -1 (Slika 9 A), hijaluronske kiseline (Slika 9 B) i sindekana – 4 (Slika 9 C) u uzorcima koronarnog sinusa i bulbusa aorte te nismo našli statistički značajne razlike u njihovim koncentracijama između Skupine 1 i Skupine 2.



Slika 9. Usporedba koncentracije sindekana – 1 (A), hijaluronske kiseline (B) i sindekana – 4 (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

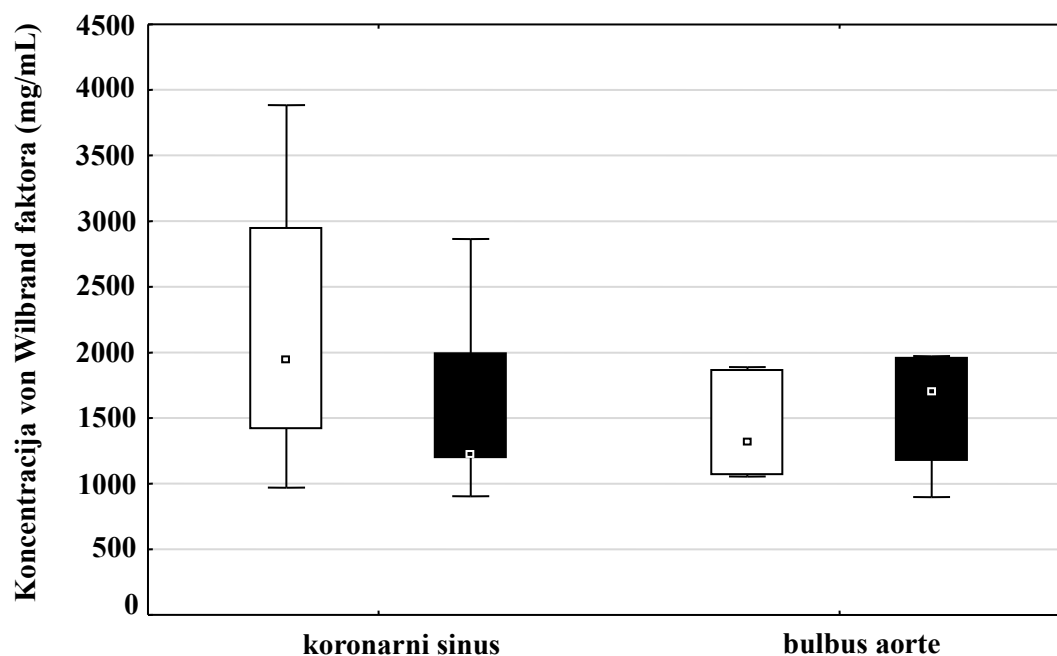
4.8. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na koncentracije von Willebrand faktora

Analizom koncentracija von Willebrand faktora u perifernoj krvi bolesnika u Skupini 1 i Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti njegove koncentracije u vremenskoj točki T3 u odnosu na vremensku točku T1 u Skupini 1. U Skupini 2 uočili smo statistički značajno više vrijednosti u vremenskoj točki T2 u odnosu na T1 te potom statistički značajno manje vrijednosti u vremenskoj točki T3 u odnosu na T2 (Slika 10). Uspoređujući koncentracije vWf između skupina uočili smo statistički značajno veće koncentracije vWf u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 u vremenskoj točki T3, ali ne i u vremenskim točkama T1 i T2.



Slika 10. Usporedba koncentracije von Willebrand faktora u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

U istraživanju smo analizirali koncentracije von Willebrand faktora u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte te nismo našli statistički značajne razlike u njihovim koncentracijama između Skupine 1 i Skupine 2 (Slika 11).

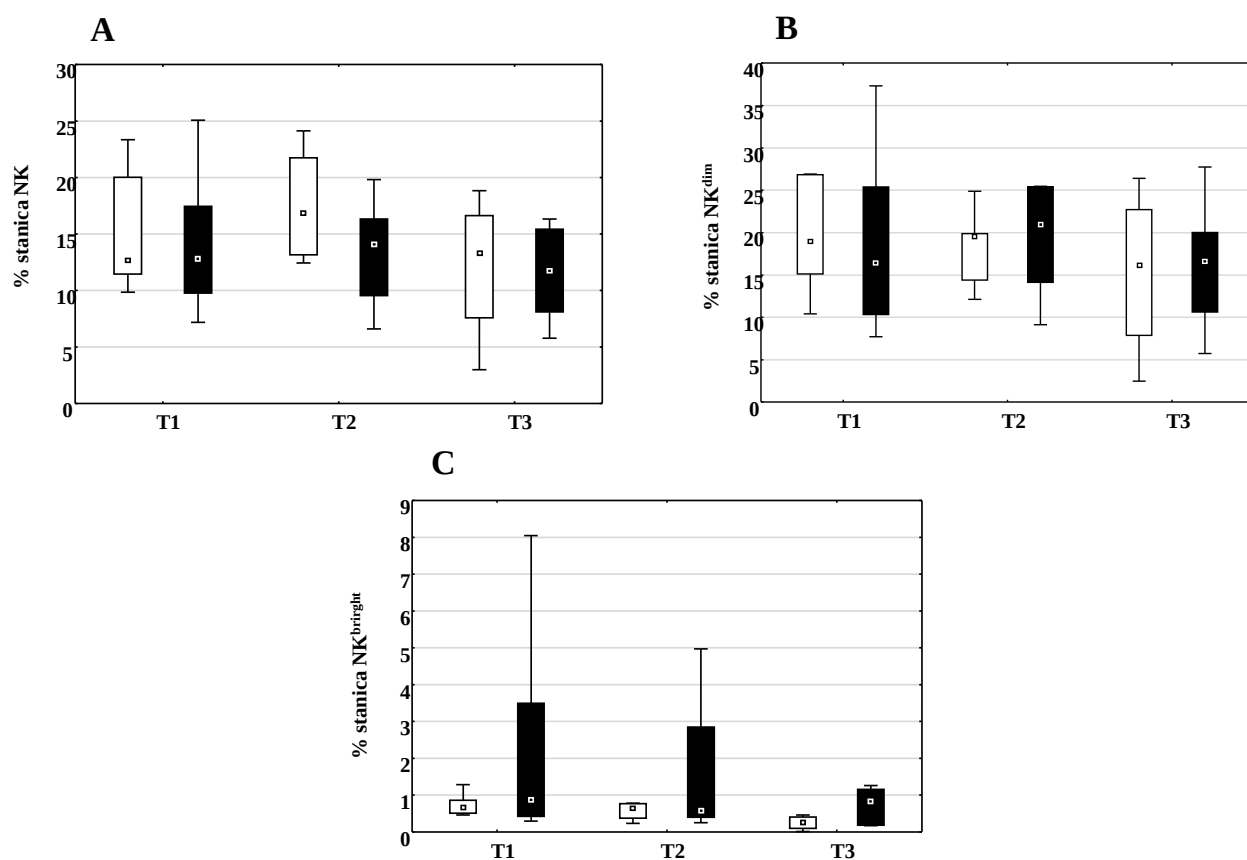


Slika 11. Usporedba koncentracije von Willebrand faktora u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.9. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na udio stanica NK

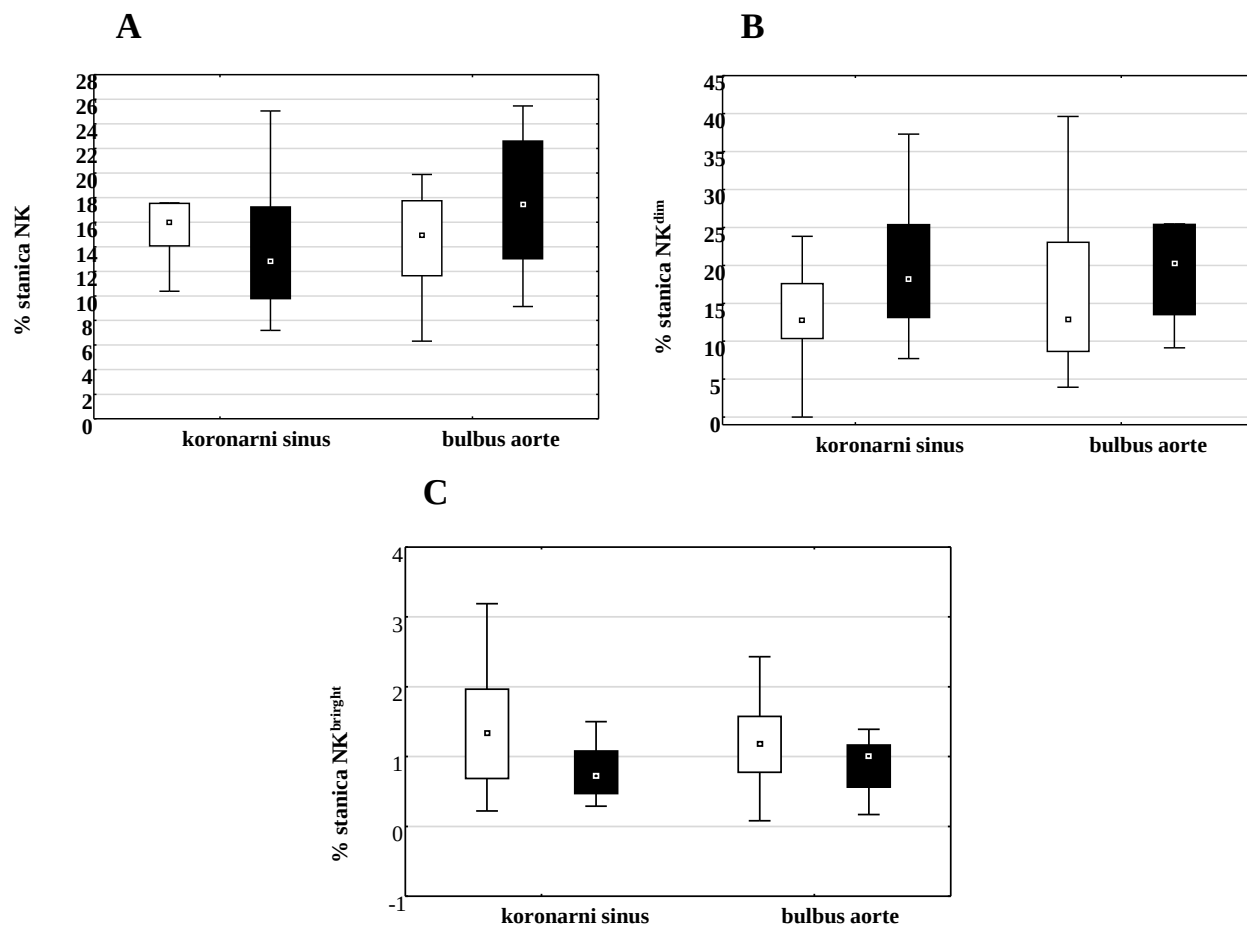
Promjene u udjelu stanica NK i subpopulacija stanica NK^{dim} i stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i Skupine 2 prikazani su na Slici 12.

Analizom udjela stanica NK (Slika 12 A) te subpopulacija stanica NK^{dim} (Slika 12 B) i stanica NK^{bright} (Slika 12 C) u perifernoj krvi bolesnika nismo uočili statistički značajne razlike među vremenskim točkama T1, T2 i T3 unutar skupine te između Skupine 1 i Skupine 2.



Slika 12. Usporedba udjela stanica NK (A), subpopulacije stanica NK^{dim} (B) i subpopulacije stanica NK^{bright} (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

U našem istraživanju analizirali smo utjecaj vrste zahvata na promjene udjela stanica NK (Slika 13 A) i subpopulacija stanica NK^{dim} (Slika 13 B) i subpopulacija NK^{bright} (Slika 13 C) između Skupina 1 i 2 u uzorcima koronarnog sinusa i bulbusa aorte te nismo našli statistički značajne razlike u njihovim udjelima između Skupine 1 i Skupine 2.

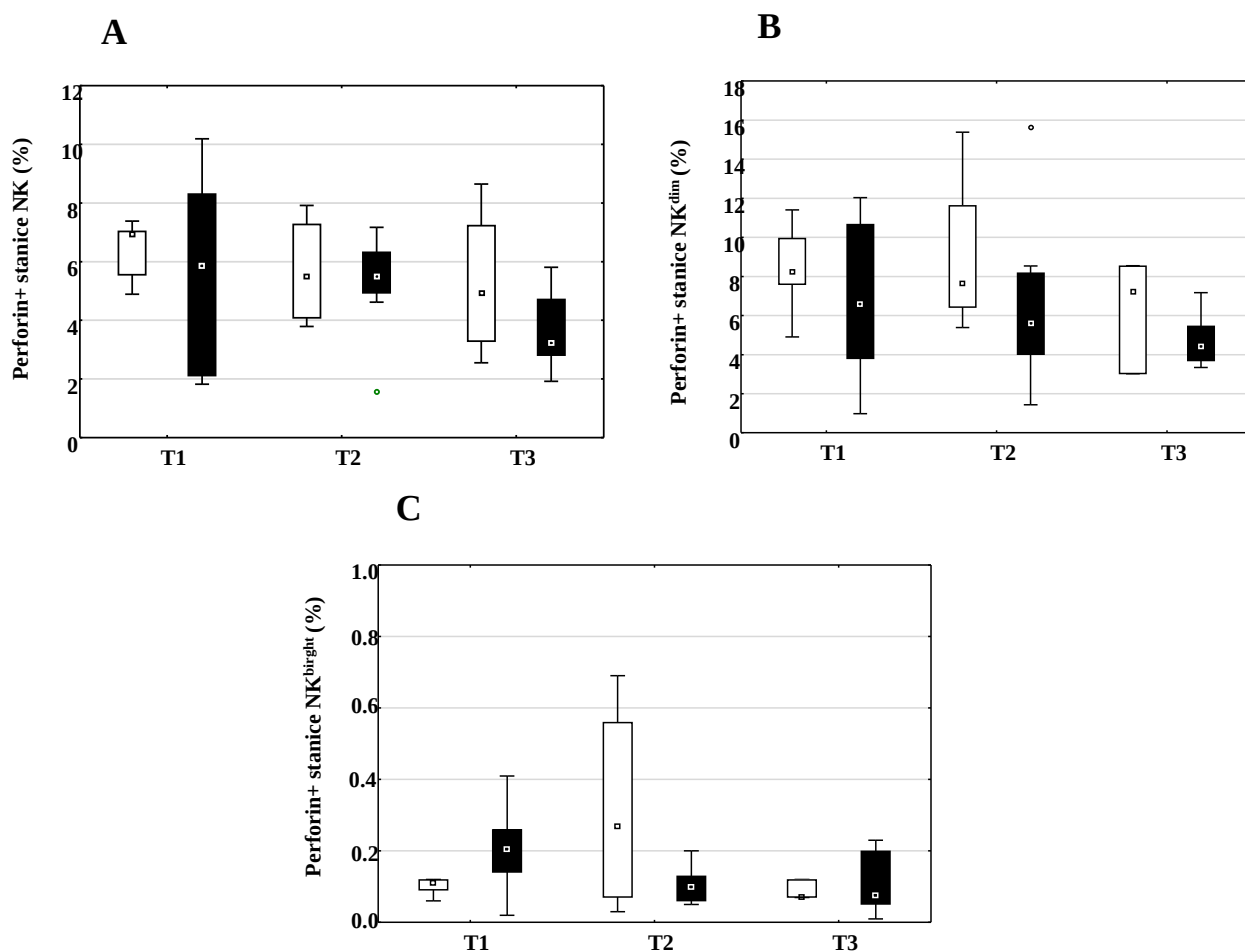


Slika 13. Usporedba udjela stanica NK (A), subpopulacije stanica NK^{dim} (B) i subpopulacije stanica NK^{bright} (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$.

Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.10. Utjecaj kirurške revaskularizacije miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka i bez primjene izvantjelesnog krvotoka na izražaj perforina u stanicama NK

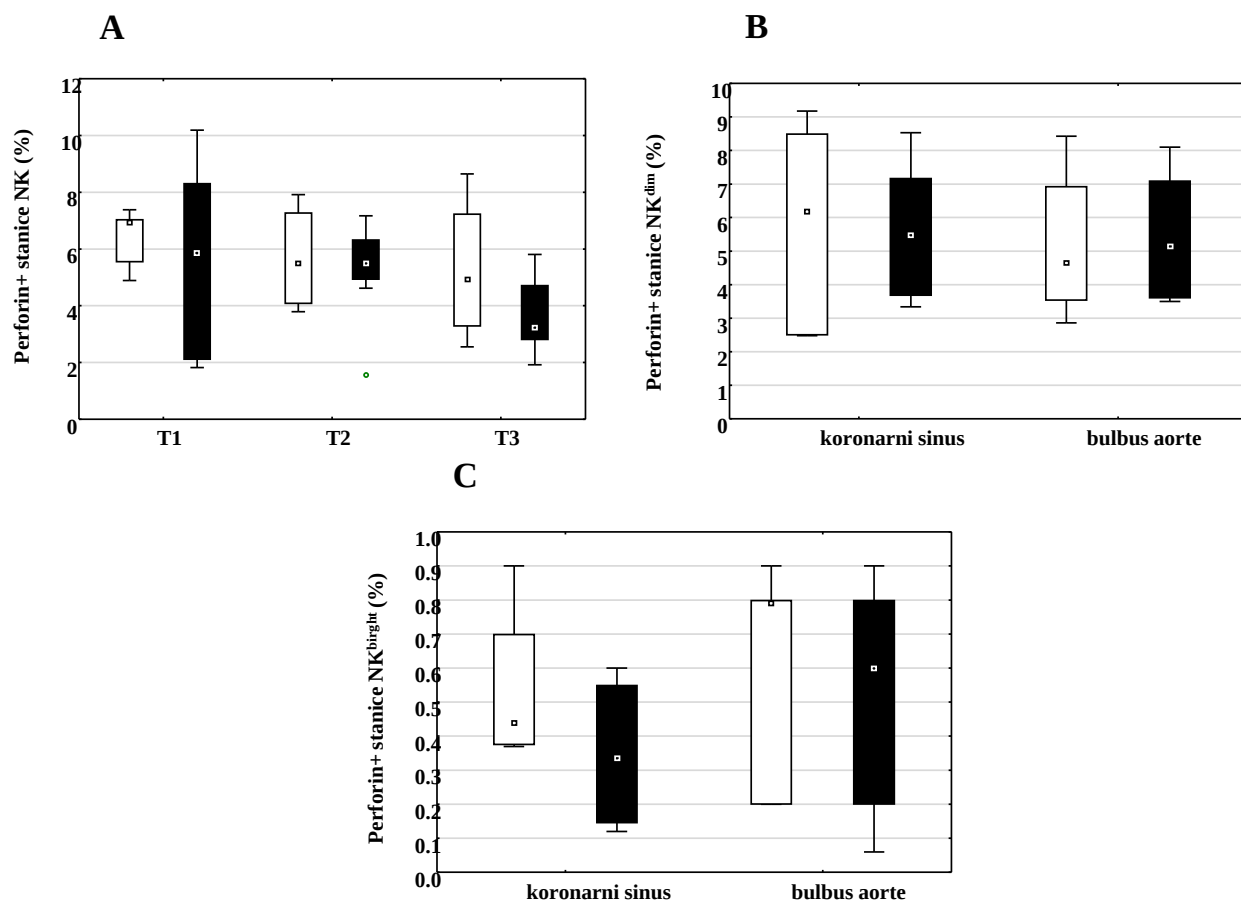
Analizom udjela perforin pozitivnih stanica NK (Slika 14 A) te perforin pozitivnih stanica NK^{dim} (Slika 14 B) i stanica NK^{bright} (Slika 14 C) u perifernoj krvi bolesnika nismo uočili statistički značajne razlike među vremenskim točkama T1, T2 i T3 unutar skupine te između Skupine 1 i Skupine 2.



Slika 14. Usporedba udjela perforin pozitivnih stanica NK (A), subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK_{dim} (B) i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK_{bright} (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$.

Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

U našem istraživanju analizirali smo utjecaj vrste zahvata na promjene udjela perforin pozitivnih stanica NK (Slika 15 A) i subpopulacija perforin pozitivnih stanica NK^{dim} (Slika 15 B) i perforin pozitivnih stanica NK^{bright} (Slika 15 C) između Skupina 1 i 2 u uzorcima koronarnog sinusa i bulbusa aorte te nismo našli statistički značajne razlike.



Slika 15. Usporedba udjela perforin pozitivnih stanica NK (A), subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{dim} (B) i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{bright} (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije. *Razina statističke značajnosti: $P < 0.05$. Rezultati su prikazani kao medijan i 25. – 75. percentila.

4.11. Korelacije između koncentracija interleukina – 18, broja leukocita, koncentracije C reaktivnog proteina, troponina T i N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida

U Tablici 10 su prikazane korelacije između koncentracije IL-18, broja leukocita, koncentracije CRP, cTn te NTproBNP u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. Analizom rezultata uočili smo pozitivne vrijednosti korelacija između koncentracije IL-18 i broja leukocita kao i pozitivne korelacije između koncentracije IL-18 i koncentracije CRP-a u vremenskim točkama T2 i T3 Skupini 1. U Skupini 2 zabilježene su pozitivne vrijednosti korelacija između koncentracije IL-18 i broja leukocita u vremenskim točkama T2 i T3.

Tablica 10. Korelacije između koncentracije IL-18, broja leukocita, koncentracije CRP, cTn te NTproBNP u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Korelacije	Koncentracija IL-18 (pg/mL)											
	Skupina 1						Skupina 2					
	T1		T2		T3		T1		T2		T3	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Broj leukocita (x10 ⁹)	0.70	0.18	0.74	0.013	0.83	0.04	0.18	0.61	0.71	0.019	0.41	0.02
Koncentracija CRP (mg/L)	0.74	0.15	0.73	0.016	0.84	0.03	-0.16	0.67	0.49	0.15	0.33	0.38
Koncentracija cTn (ng/mL)	0.40	0.59	0.89	0.41	0.71	0.15	0.07	0.84	0.19	0.06	0.64	0.16
Koncentracija NTproBNP (ng/mL)	0,10	0,86	0,05	0,87	0,31	0,54	0,39	0,29	0,42	0,25	0,17	0,65

CRP – C reaktivni protein, cTn – troponin, NTproBNP – N – terminalni pro – B – natriuretski peptid

4.12. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa te von Willebrand faktora

U Tablici 11 su prikazane korelacije između koncentracije IL-18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa (sindekana – 1, hijaluronske kiseline i sindekana – 4) te između koncentracije IL-18 i koncentracije von Willebrand faktora u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. Analizom rezultata uočili smo pozitivne vrijednosti korelacija između koncentracije IL-18 i koncentracije sindekana - 1 u vremenskim točkama T2 i T3 u Skupini 1. U Skupini 2 nismo zabilježili korelacije između koncentracije IL-18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa te između koncentracije IL-18 i koncentracije von Willebrand faktora.

Tablica 11. Korelacije između koncentracije IL-18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa (sindekana – 1, hijaluronske kiseline i sindekana – 4) te između koncentracije IL-18 i koncentracije von Willebrand faktora u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Korelacije	Koncentracija IL-18 (pg/mL)											
	Skupina 1						Skupina 2					
	T1		T2		T3		T1		T2		T3	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Koncentracija sindekana - 1 (ng/mL)	0.57	0.31	0.82	0.022	0.73	0.01	0.37	0.31	0.42	0.22	0.05	0.89
Koncentracija sindekana - 4 (ng/mL)	0,72	0,52	0,60	0,28	0,40	0,42	0,50	0,38	0,35	0,34	0,14	0,68
Koncentracija hijaluronske kiseline (ng/mL)	0.19	0.81	0.25	0.45	0.32	0.52	0.21	0.61	0.12	0.72	0.25	0.51
Koncentracija von Willebrand faktora (mg/mL)	0,49	0,59	0,47	0,41	0,18	0,72	0,28	0,46	0,58	0,10	0,36	0,48

4.13. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i udjela stanica NK te njihovih subpopulacija

U Tablici 12 su prikazane korelacije između koncentracije IL-18 i udjela stanica NK, njihovih subpopulacija stanica NK^{dim} i stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. Analizom rezultata nismo uočili korelaciju između koncentracije IL-18 i udjela stanica NK te njihovih subpopulacija.

Tablica 12. Korelacije između koncentracije IL-18 i udjela stanica NK, njihovih subpopulacija stanica NK^{dim} i stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Korelacije	Koncentracija IL-18 (pg/mL)											
	Skupina 1						Skupina 2					
	T1		T2		T3		T1		T2		T3	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Stanice NK	-0,40	0,35	0,31	0,72	0,34	0,65	0,47	0,54	0,21	0,71	0,79	0,06
Stanice NK ^{dim}	-0,72	0,48	0,91	0,26	0,27	0,72	0,17	0,64	0,14	0,70	0,69	0,07
Stanice NK ^{bright}	-0,82	0,52	0,40	0,73	0,30	0,69	0,39	0,30	0,15	0,68	0,76	0,07

4.14. Korelacije između koncentracija interleukina – 18 i perforin pozitivnih stanica NK te njihovih subpopulacija

U Tablici 13 su prikazane korelacije između koncentracije IL-18 i udjela perforin pozitivnih stanica NK, subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{dim} i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije. Analizom rezultata nismo uočili korelacije između koncentracije IL-18 i udjela perforin pozitivnih stanica NK, subpopulacija perforin pozitivnih stanica NK^{dim} i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{bright}.

Tablica 13. korelacije između koncentracije IL-18 i udjela perforin pozitivnih stanica NK, subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{dim} i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Korelacije	Koncentracija IL-18 (pg/mL)											
	Skupina 1						Skupina 2					
	T1		T2		T3		T1		T2		T3	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Perforin⁺stanice NK	0,72	0,48	0,91	0,08	0,21	0,85	0,04	0,90	0,62	0,87	0,74	0,25
Perforin⁺stanice NK^{dim}	0,14	0,90	0,13	0,98	0,09	0,93	0,35	0,34	0,17	0,65	0,23	0,63
Perforin⁺stanice NK^{bright}	0,98	0,06	0,26	0,74	0,32	0,78	0,26	0,86	0,25	0,45	0,61	0,38

5. RASPRAVA

Koronarna bolest srca ostaje vodeća bolest kardiovaskularnog sustava i glavni uzrok smrtnosti i pobola u svijetu. Prema Global Burden of Disease studiji iz 2019., Koronarna bolest srca je odgovorna za više od 8 milijuna smrti godišnje, čime predstavlja primarni javnozdravstveni izazov unatoč napretku u prevenciji, dijagnostici i terapiji [1]. U posljednjim desetljećima zabilježen je trend smanjenja smrtnosti bolesnika s koronarnom bolesti srca u visokorazvijenim zemljama zahvaljujući poboljšanoj farmakoterapiji (statini, antiagregacijska terapija), ranim intervencijama i promjenama životnog stila, dok u zemljama s niskim i srednjim prihodima prevalencija i dalje raste [7, 37]. Kardiovaskularne bolesti, među kojima je koronarna bolest srca dominantna, odgovorne su za oko 20,5 milijuna smrti godišnje širom svijeta, a prema projekcijama taj broj mogao bi porasti na 23 milijuna godišnje do 2030. ako trenutačni trendovi rizika ne budu učinkovito kontrolirani [4]. U Europskoj regiji Svjetske zdravstvene organizacije, 2019. godine više od 4,2 milijuna ljudi umrlo je od kardiovaskularnih bolesti, što čini više od 42 % svih smrti bolesnika u tom dijelu svijeta [35]. U Hrvatskoj kardiovaskularne bolesti su već duži niz godina vodeći uzrok smrti. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, 2022. godine od kardiovaskularnih bolesti je preminulo 22 303 osobe, što čini 39,1 % svih smrti. Od toga su žene činile 43,8 %, a muškarci 34,3 %. Ishemijska bolest srca među vodećim je dijagnozama te je 6 925 smrti u 2022. godini pripisano je koronarnoj bolesti srca, dok su cerebrovaskularne bolesti bile drugi najčešći uzrok. Unatoč trendu smanjenja smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti u posljednjih nekoliko godina, Hrvatska i dalje bilježi visoku standardiziranu stopu smrtnosti. Naime, stopa od 572,8 smrti bolesnika na 100 000 stanovnika smješta Hrvatsku iznad prosjeka zemalja Europske unije, čija je prosječna stopa oko 367,6 / 100 000 [34]. Ovi epidemiološki podaci jasno ilustriraju veliki teret koronarne bolesti srca u Hrvatskoj, kako u apsolutnom broju smrti, tako i u usporedbi s razvijenim zemljama Europe. Taj teret opterećuje zdravstveni sustav, jer bolesnici s kardiovaskularnim bolestima zahtijevaju liječenje koje može biti medikamentozno, endoskopsko i kirurško. Kirurško liječenje bolesnika s kardiovaskularnim bolestima je složeno i uglavnom se primjenjuje u bolesnika s višezilnom koronarnom bolesti te uznapredovalom bolesti kada druge metode liječenja nisu učinkovite [72].

U ovom istraživanju smo analizirati demografske podatke bolesnika te smo uočili da su bolesnici imali prosječno 68 godina u obje skupine, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima i epidemiološkim podacima za smrtnost od kardiovaskularnih bolesti [34]. Naime, bolesnici kojima je bila potrebna koronarna prenosnica su oboljeli od napredovale koronarne bolesti te drugi manje

invazivni modaliteti liječenja nisu bili primjenjivi. U slučaju da operacije nisu bile izvedene, navedena populacija bolesnika bi bila izražena visokom riziku za daljnje napredovanje bolesti. Analizirajući spol bolesnika koji su bili uključeni u istraživanje, nije bilo statistički značajne razlike, no ipak se vidi tendencija većeg broja muških bolesnika, što u navedenom dobnom razredu odgovara većem riziku za razvoj kardiovaskularnih bolesti u muškaraca u odnosu na žene [7]. Unatoč tome, nismo zabilježili značajnih razlika među skupinama u ishodima, odnosno u trajanju strojne ventilacije i trajanju boravka u jedinici intenzivnog liječenja te ishodu. Našim istraživanjem nismo zabilježili statistički značajnih razlika u kliničkim parametrima poput sistoličke/dijastoličke/srednje vrijednosti krvnoga tlaka, srednjeg venskog tlaka, ejekcijske frakcije srca između skupina bolesnika što ukazuje na učinkovito kirurško i anesteziološko liječenje tijekom i neposredno nakon operacije.

Kirurško liječenje bolesnika s kardiovaskularnim bolestima dovodi do izraženog upalnog odgovora, endotelne disfunkcije te ishemijsko-reperfuzijske ozljede [124], stoga je cilj ovog istraživanja bio analizirati utjecaj različite tehnike kirurške revaskularizacije miokarda na ove promjene. Revaskularizacija uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok uključuje zaustavljanje srca tijekom operacije te preuzimanje funkcije srca uporabom stroja za izvantjelesni krvotok. Kako bi navedeno bilo moguće postavljaju se kanile koje odvođe krv od srca tijekom operacije putem sustava cijevi te pritom krv prolazi kroz stroj za izvantjelesni krvotok gdje se obogaćuje kisikom i potom vraća putem kanile ka srcu. S obzirom na to da je srčana akcija zaustavljena i da se cirkulacija vrši umjetno putem aparata, srce miruje te se kirurgu omogućavaju optimalni uvjeti za postupke na zahvaćenim koronarnim žilama uz zadovoljavanje potreba organizma putem cirkulacije regulirane aparatom. Prilikom primjene navedene tehnike krv biva „izvučena“ iz tijela te pritom prolazi cijevima, u kontaktu je stranim materijalom, što potiče razne mehanizme u organizmu [71]. Rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na da kardijalna kirurgija, osobito kada se izvodi uz uporabu stroja za izvantjelesni krvotok, izaziva izrazito snažan sustavni upalni odgovor te značajnu ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu [80, 115]. Dodir krvi s umjetnim površinama tijekom primjene stroja za izvantjelesni krvotok dovodi do promjena u mikrocirkulaciji i aktivaciju komplementa koji potiču imunološku reakciju širokog opsega te oštećenje endotelnog glikokaliksa [93]. Oštećenje endotelnog glikokaliksa tijekom kirurškog zahvata povezano je s poremećajem vaskularne permeabilnosti, razvojem endotelne disfunkcije te aktivacijom upalnih i koagulacijskih putova [104, 160].

Takve promjene mogu doprinijeti razvoju edema, hemodinamske nestabilnosti te produženom liječenju kardiokirurških bolesnika [115].

U ovom istraživanju smo uočili povećane koncentracije IL-18 u perifernoj krvi u obje skupine bolesnika 24 i 72 sata nakon operacije u odnosu na koncentracije prije operacije. Također navedene vrijednosti su pratile porast apsolutnog broja leukocita i koncentracije CRP-a. Unatoč sličnom obrascu dinamike u obje skupine, vrijednosti IL-18, CRP-a i broj leukocita bili su statistički značajno viši u skupini operiranoj uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok, što ukazuje na izraženiju sustavnu upalu u tih bolesnika u odnosu na skupinu bez primjene stroja za izvantjelesni krvotok. Ovakvi nalazi u skladu su s istraživanjima koji su pokazali značajan učinak stroja za izvantjelesni krvotok na snažniji upalni odgovor tijekom i nakon operacije [123, 128, 162]. Takva razlika između skupina dodatno naglašava i heterogenost upalnog odgovora među bolesnicima ovisno o korištenju stroja za izvantjelesni krvotok, što može značajno utjecati na odabir bolesnika za kardiokiruršku operaciju. Nadalje, u ovom istraživanju smo uočili pozitivnu korelaciju između koncentracija IL-18 i CRP samo u skupini bolesnika kojima je operacija učinjena uz primjenu stroja izvantjelesni krvotok 24 i 72 sata nakon operacije. Pozitivnu korelaciju u istoj skupini bolesnika uočili smo između koncentracije IL-18 i apsolutnog broja leukocita bila prisutna u obje skupine bolesnika 24 i 72 sata nakon operacije. Ovakav obrazac upućuje na da IL-18 ima važnu ulogu u poticanju upalnog odgovora, neovisno o kirurškoj tehnici, dok je njegova veza s proteinskim upalnim markerima izraženija kada postoji prisutnost dodatnih fizioloških opterećenja, poput kontakta krvi s umjetnim površinama u stroju za izvantjelesni krvotok. Ovi rezultati ukazuju da bi IL-18 mogao biti potencijalni biomarker procjene intenziteta upale inducirane tijekom operacije. IL-18 je snažan proupalni citokin koji je uključen u različite faze aktivacije imunološkog sustava, a povišene koncentracije često su zabilježene kod bolesnika s kardiovaskularnim bolestima [161]. Pokazalo se da IL-18 može modulirati odgovor makrofaga, potaknuti proizvodnju IFN- γ te posredno doprinijeti progresiji ishemijsko-reperfuzijske ozljede [9, 73]. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da IL-18 može imati važnu ulogu i u perioperacijskom razdoblju, osobito u uvjetima jače upalne stimulacije kakva se javlja tijekom operacija uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok. Eksperimentalni radovi značajno su produbili razumijevanje uloge IL-18 u oštećenju miokarda [74]. Neutralizacija IL-18 blokirajućim protutijelima ili IL-18-vezujućim proteinima pokazala se učinkovitom u smanjenju ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom inducirano oštećenja miokarda, uz smanjenje upalne aktivacije i poboljšanje funkcionalnog oporavka srčanog tkiva [76]. Također je uočeno

da IL-18 može posredovati kardijalnu upalu aktivacijom transkripcije kemokina CXCL16, a inhibicija ovog puta povezana je sa smanjenjem reperfuzijskog oštećenja [162]. Ovi nalazi otvaraju mogućnost terapijske modulacije IL-18 kao potencijalnog zaštitnog pristupa u perioperacijskom razdoblju, iako su potrebna dodatna istraživanja koja bi potvrdila njegovu kliničku primjenjivost.

U ovom istraživanju smo mjerili i analizirali udio stanica NK i njihovih subpopulacija kao i perforin pozitivnih stanica NK i te nismo uočili statistički značajne razlike među skupinama bolesnika u navedenim istraživanim vremenskim točkama. Također, nismo zabilježili korelacija između koncentracija IL-18 i stanica NK te njihovih subpopulacija što govori u prilog slabom utjecaju IL-18 na udio stanica NK u istraživanom vremenskom razdoblju [163]. S obzirom na to da stanice NK sudjeluju u remodelaciji miokarda nakon ishemije, moguće je da je istraživano razdoblje bio prekratko te su potrebna mjerenja i analize u dužem razdoblju.

Poznato je da IL-18 sudjeluje u razvoju ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja te povezana s lošiju prognozom bolesnika s ishemijskom bolesti srca [164]. Povišene koncentracije IL-18 povezane su s većim rizikom ishemijskih događaja [165], uključujući infarkt miokarda [165]. U skladu s time, u našem istraživanju došlo je do porasta koncentracije troponina nakon kirurške revaskularizacije, što odražava stupanj mišićnog oštećenja nastalog tijekom ishemije i reperfuzije 24 i 72 sata nakon operacije uz statistički značajniji porast u skupini operiranoj uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok. Dodatno, ovi nalazi pokazuju da i u klinički stabilnih bolesnika prije zahvata može doći do značajnog porasta koncentracije troponina, neovisno o povoljnim ishodima poslije operacije, čime se potvrđuje važnost pažljivog tumačenja troponinskih vrijednosti u ranom poslijeoperacijskom razdoblju. Analizirajući koncentracije NT-pro-BNP, uočili smo značajna porast njegove vrijednosti 72 sata nakon operacije u odnosu na vrijednost prije operacije u obje skupine. Navedeno govori u prilog dužem vremenu potrebnome za razvoj opterećenja miokarda, u odnosu na ranije potvrđenu izravnu ozljedu praćenu porastom koncentracije troponina [132]. Koncentracije IL-18, koncentracija troponina i koncentracije NT-pro-BNP u ovom istraživanju nisu korelirali ni 24 niti 72 sata nakon operacije, bez obzira na kiruršku tehniku. To ukazuje da porast biljega oštećenja miokarda primarno odražava mehaničke i reperfuzijske procese povezane s operacijom, a manje sustavnu upalu posredovanu IL-18. Ovaj nalaz potvrđuje da se rani porast koncentracije troponina ne može izravno tumačiti kao pokazatelj jačine upalnog odgovora, što je važno pri razlikovanju kirurški induciranog oštećenja miokarda od potencijalnih perioperacijskih ishemijskih

događaja. Značajno povišenje koncentracije troponina nakon kardijalne kirurgije smatraju se prognostički važnim pokazateljem oštećenja miokarda [55], a takvo oštećenje predstavlja jednu od najčešćih poslijeoperacijskih komplikacija koja je povezana s povećanim rizikom smrtnosti i morbiditeta [167, 168]. Stoga praćenje koncentracije troponina tijekom i nakon operacije ostaje ključan element rane poslijeoperacijske procjene oštećenja miokarda [133]. Veći porast koncentracije troponina u skupini bolesnika uz primjenu stroja izvantjelesni krvotok dodatno potvrđuje širi opseg ishemijsko reperfuzijske ozljede miokarda koji je uzorkovan strojem za izvantjelesni krvotok, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima [169]. Time se još jednom naglašava važnost optimizacije perfuzijskih tehnika, smanjivanja vremena uporabe stroja za izvantjelesni krvotok i prilagodbe postupaka zaštite miokarda kako bi se smanjilo ishemijsko - reperfuzijsko oštećenje. Ovi rezultati također otvaraju mogućnost istraživanja ciljane modulacije citokinske signalizacije u perioperacijskom razdoblju kao jednog od potencijalnih načina poboljšanja kirurških ishoda.

Kirurška revaskularizacija miokarda značajno utječe ne endotel, osobito endotelni glikokaliks. Endotelni glikokaliks jedan je od najosjetljivijih i najvažnijih strukturalnih elemenata zahvaćenih tijekom kardijalne kirurgije [109]. Njegovo oštećenje pridonosi razvoju endotelne disfunkcije, povećanoj vaskularnoj permeabilnosti te aktivaciji upalne kaskade, što može negativno utjecati na tijek liječenja bolesnika [170]. Poznato je da proupalni citokini koji se oslobađaju tijekom operacije aktiviraju različite proteolitičke enzime, uključujući matriks metaloproteinaze, koje cijepaju ektodomen sindekana te hijaluronidazu, koja razgrađuje hijaluronsku kiselinu [112, 171]. Ove promjene narušavaju integritet endotelnog glikokaliksa i ostavljaju endotel izloženijim mehaničkom stresu i oksidacijskom oštećenju [115]. S obzirom na važnost glikokaliksa u regulaciji vaskularnog tonusa, mikrocirkulacije i homeostaze, takvi poremećaji mogu imati značajne posljedice na perioperacijsku mikrovaskularnu stabilnost [120, 172]. U našem istraživanju smo uočili značajne razlike u koncentracijama produkata razgradnje endotelnog glikokaliksa u perifernoj krvi, ali ne i u uzorcima krvi koronarnog sinusa i bulbusa aorte što se može objasniti nedostatkom vremena potrebnog za razvoj oštećenja endotelnog glikokaliksa u koronarnom sinusu i bulbusu aorte. Međutim, 24 i 72 sata nakon operacije uočili smo značajni porast koncentracije sindekana – 1 i hijaluronske kiseline u perifernoj krvi što upućuje da kirurška revaskularizacija miokarda potiče sustavnu upalu i pojačanu degradaciju endotelnog glikokaliksa u ranoj poslijeoperacijskom razdoblju, osobito u bolesnika koji su operirani uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok. Koncentracije sindekana - 1 su porasle 24 sata nakon operacije u odnosu na vrijednosti prije kirurškog zahvata te

su se vratile na početne vrijednosti 72 sata nakon operacije u skupini bolesnika uz primjenu izvantjelesnog krvotoka, dok u skupini bolesnika bez primjene izvantjelesnog krvotoka nije bilo statistički značajnih razlika. Vrijednosti hijaluronske kiseline su značajno porasle 72 sata nakon operacije odnosu na vrijednosti prije i 24 nakon operacije u skupini bolesnika uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok dok su vrijednosti sindekana - 4 ostale stabilne u svim vremenskim skupinama u obje skupine. Dodatno smo uočili da koncentracije IL-18 pozitivno koreliraju s koncentracijama sindekana - 1 i CRP-a u skupini bolesnika operiranoj uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok, dok u obje skupine postoji pozitivna korelacija koncentracija IL-18 i apsolutnog broja leukocita. S druge strane, hijaluronska kiselina nije pokazala korelaciju s koncentracijama IL-18, što ukazuje da se različite komponente endotelnog glikokaliksa mogu razgrađivati putem različitih mehanizama ili u različitim vremenskim točkama. Jedno od mogućih objašnjenja za različitu dinamiku promjene koncentracija sindekana - 1, sindekana - 4 i hijaluronske kiseline jest da je sindekan-1 osjetljiviji na upalne posrednike povezane s kirurškim tehnikama i utjecajem izvantjelesne cirkulacije [124]. Ovaj uzorak praćenja u skladu je s poznatim učincima izvantjelesne cirkulacije, uključujući ne-fiziološki protok, hemodiluciju, mehanički „shear” stres i kontakt krvi s umjetnim površinama, za koje se zna da pridonose oštećenju endotelnog glikokaliksa, upali i stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta. Dinamika promjene koncentracije hijaluronske kiseline upućuje na progresivni porast koji može biti rezultat oksidacijskog oštećenja nakon operacije [112, 131]. Hijaluronska kiselina jedan je od komponenata endotelnog glikokaliksa najosjetljivijih na reaktivne kisikove vrste [111, 113].

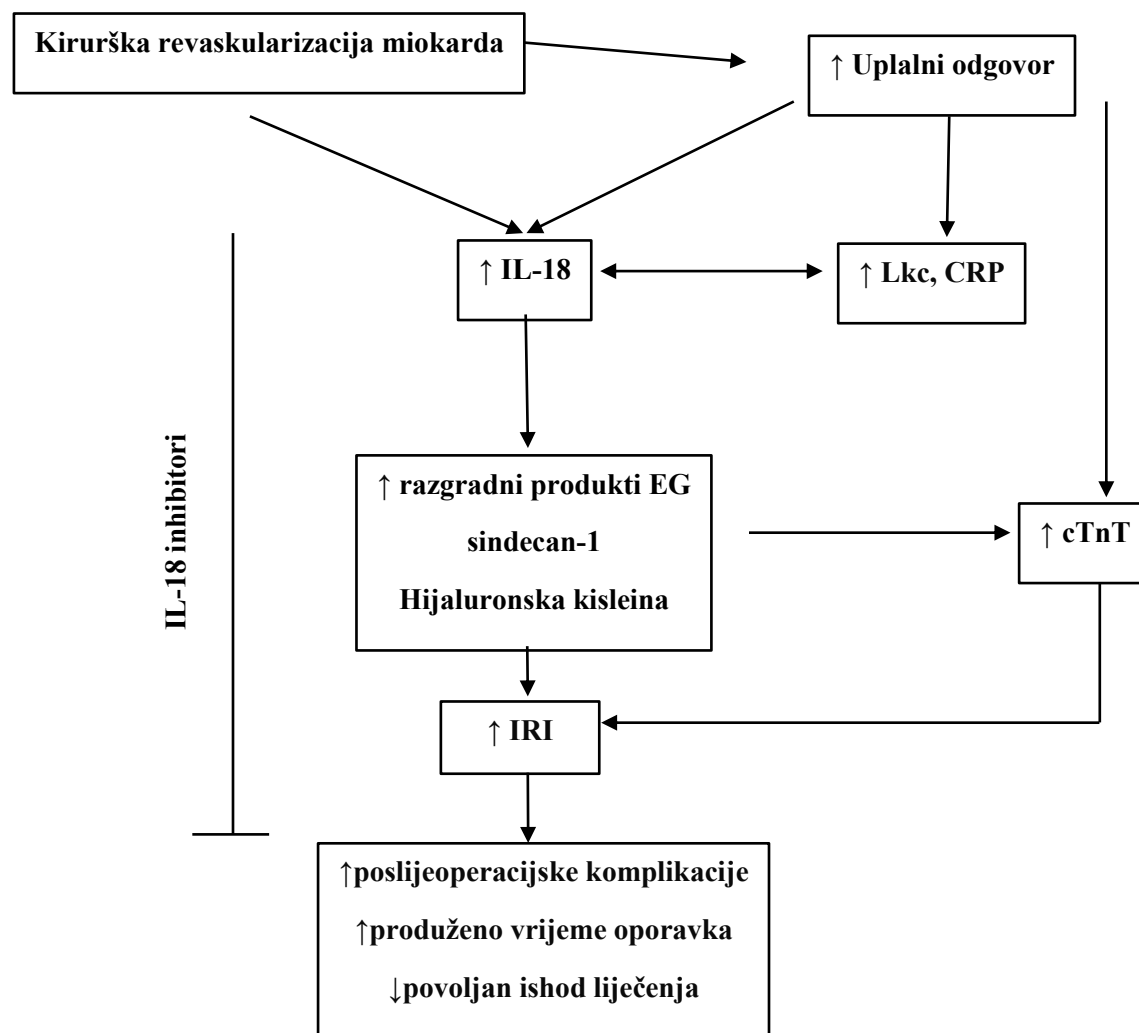
U ovom istraživanju smo uočili statistički značajni porast koncentracije von Willebrand faktora u skupini bolesnika uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok 72 sata nakon operacije dok u skupini bolesnika bez uporabe stroja za izvantjelesni krvotok je zabilježen porast njegove koncentracije 24 sata nakon operacije što ukazuje na njegov brži porast u odnosu na skupinu uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok. Dodatno, 72 sata nakon operacije koncentracije von Willebrand faktora su bile značajno veće u skupini uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok u odnosu na skupinu bez primjene izvan tjelesnog krvotoka. Ove razlike upućuju da je reakcija organizma bila brža i izraženija u skupini operiranoj bez uporabe stroja za izvantjelesni krvotok, ali je reakcija dugotrajnija u skupini uz primjenu stroja za izvan tjelesnu cirkulaciju. Von Willebrand faktor sudjeluje u hemostazi, adheziji trombocita na oštećeni dio endotela, prijenosnik je faktora VIII te svojim utjecajem na permeabilnost mikrocirkulacije utječe na lokalni upalni odgovor [173, 174].

Raniji porast u skupine operirane bez primjene izvan tjelesnog krvotoka govori u prilog većeg „shear“ stresa tijekom zahvata, vjerojatno uslijed promijenjenih hemodinamskih uvjeta tijekom operacijskog zahvata kojemu je izloženo srce i koronarna cirkulacija, uz relativno brzu normalizaciju nakon operacijskog zahvata. Suprotno, u skupini operiranoj uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok cirkulacija je bila stabilnija te je do oštećenja došlo odgođeno, ali je ono u konačnici bilo izraženije što govori u prilog jačeg upalnoga odgovora u skupine operirane uz primjenu stroja za izvantjelesni krvotok.

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Prvo, broj analiziranih vremenskih točaka bio je ograničen, što može dovesti do neuočavanja dinamičkim promjena koncentracije istraživanih parametara. Češće uzimanje uzoraka, osobito u prvih nekoliko sati nakon operacije, omogućilo bi detaljniji vremenski profil. Nadalje, mjerenje koncentracije IL-18 i razgradnih produkata endotelnog glikokaliksa nakon 72 sata moglo bi biti korisno za dodatno praćenje njihovih promjena u razdobljima smanjena upale i oporavaka endotelnog glikokaliksa. Drugo, veličina uzorka bila je relativno mala, što ograničava statističku snagu za otkrivanje detaljnijih, ali klinički važnih razlika. Treće, ovim istraživanjem se je mjerila koncentracija IL-18 te bi mjerenje i analiza dodatnih upalnih posrednika poput IL-6 i TNF-alfa omogućila sveobuhvatnije razumijevanje istraživanih procesa te pružilo dublji uvid u mehanizme oštećenja endotela u bolesnika tijekom i nakon kirurške revaskularizacije miokarda.

S obzirom na značajnu povezanost IL-18 s upalnim markerima i ishemijsko - reperfuzijskom ozljedom, daljnja istraživanja trebala bi se usredotočiti na procjenu njegovog prognostičkog potencijala u većim skupinama bolesnika. IL-18 bi potencijalno mogao služiti kao predikcijski biomarker razvoja endotelne disfunkcije. Iako ovo istraživanje ukazuje da IL-18 nije izravno uključen u nekrozu miokarda, njegova snažna povezanost s ranom upalom i endotelnom disfunkcijom upućuje na mogućnost da može pomoći u prepoznavanju bolesnika s rizikom vaskularnih komplikacija nakon kardiokirurških zahvata. Povišene koncentracije IL-18 u ranom poslijeoperacijskom razdoblju mogle bi ukazivati na snažniji upalni odgovor i nadolazeću endotelnu disfunkciju. Osim toga, istraživanja endotelna korištenjem neinvazivnih tehnika i topljivih endotelnih biljega mogla bi pružiti dodatne uvide u oštećenja endotelnog glikokaliksa. Terapijske strategije usmjerene na IL-18 u kontekstu kardiokirurgije trebale bi se dodatno analizirati i mogle bi ponuditi nove terapijske mogućnosti. Proširujući njegovu kliničku primjenu, mjerenje koncentracija IL-18 moglo bi se uvesti kao dio standardnog praćenja kardiokirurških bolesnika.

Sažetak rezultata istraživanja i njihovog utjecaja na kliničke ishode bolesnika nakon kirurške revaskularizacije miokarda prikazan je na Slici 16.



Slika 16. Sažetak rezultata istraživanja i njihovog utjecaja na ishode liječenja bolesnika nakon kirurške revaskularizacije miokarda. Kardiokirurški zahvat dovodi do pojačanog upalnog odgovora koji potiče razgradnju endotelnog glikokaliksa. Intenzivniji upalni odgovor dovodi do veće razgradnje endotelnog glikokaliksa, što posljedično potiče ishemijsko – reperfuzijsku ozljedu. Ishemijsko- reperfuzijska ozljeda povećava razvoj poslijeoperacijskih komplikacija te produljuje vrijeme oporavka i smanjuje vjerojatnost pozitivnog ishoda. CRP – C-reaktivni protein, cTn – srčani troponin, EG – endotelni glikokaliks, IL – interleukin, Lkc – leukociti, IRI – ishemijsko-reperfuzijska ozljeda.

6. ZAKLJUČCI

- Koncentracije troponina T (TnT) značajno su porasle nakon operacije u obje skupine, ali su bile značajno više u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 24 i 72 sata nakon operacije što ukazuje da kirurška revaskularizacija miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka uzrokuje veće oštećenje miokarda nego operacija bez primjene izvantjelesnog krvotoka.
- Apsolutni broj leukocita te koncentracije CRP i IL-18 značajno su porasli 24 i 72 sata nakon operacije u obje skupine, no bile su statistički značajno veće u Skupini 1 u odnosu na Skupinu 2 što ukazuje na snažniji upalni odgovor nakon kirurška revaskularizacija miokarda uz primjenu izvantjelesnog krvotoka.
- Koncentracije sindekana – 1 i hijaluronske kiseline su značajno porasle u Skupini 1 što ukazuje da primjena izvantjelesnog krvotoka dovodi do većeg stupnja razgradnje endotelnog glikokaliksa u ranom poslijeoperacijskom razdoblju.
- Ovim istraživanjem nisu uočene značajne razlike u udjelu NK stanica, njihovih subpopulacija te perforin pozitivnih stanica NK što ukazuje da kirurška revaskularizacija miokarda i primjena izvantjelesnog krvotoka ne utječu značajno na udio i aktivaciju stanica NK u perifernoj krvi.
- Koncentracije IL-18 su pozitivno korelirale s koncentracijama sindekana-1 te koncentracijama CRP i apsolutnim brojem leukocita, ali ne i s udjelom stanica NK što ukazuje da IL-18 potiče i odražava upalni odgovor i posreduje oštećenje endotelnog glikokaliksa, a ne i aktivaciju stanica NK stanica.
- Kirurška revaskularizacija miokarda s primjenom izvantjelesnog krvotoka uzrokuje jači upalni odgovor, veće oštećenje miokarda i izraženije oštećenje endotelnog glikokaliksa u usporedbi s kirurškom revaskularizacijom miokarda bez primjene izvantjelesnog krvotoka u kojem IL-18 ima značajnu ulogu.

7. LITERATURA

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO i sur. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 2020;76(25):2982-3021.
2. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111(25):3481-8.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685-95.
4. Institute of Medicine (US) Committee on Social Security Cardiovascular Disability Criteria. Cardiovascular Disability: Updating the Social Security Listings. National Academies Press, Washington, D.C., USA; 2010.
5. Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 2014;69(7):777-84.
6. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1(3):183–98.
7. Mirhafez SR, Khadem SH, Sahebkar A i sur. Comparative effects of on-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting surgery on serum cytokine and chemokine levels. *IU-BMB Life* 2021;73(12):1423–31.
8. Ajoolabady A, Pratico D, Lin L i sur. Inflammation in atherosclerosis: pathophysiology and mechanisms. *Cell Death Dis* 2024; 15(11):817.
9. Theofilis P, Oikonomou E, Tsioufis K, Tousoulis D. The role of macrophages in atherosclerosis: pathophysiologic mechanisms and treatment considerations. *Int J Mol Sci* 2023;24(11):9568.
10. Ross R, Faggitto A, Bowen-Pope D, Raines E. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 1984;Nov;70(5 Pt 2):III77–82.
11. Wu MY, Li CJ, Hou MF, Chu PY. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2017;18(10):2034.
12. Wang H, Liu Z, Shao J i sur. Immune and inflammation in acute coronary syndrome: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Immunol Res* 2020;4904217.
13. Pan Y, Fan F, Jiang J, Zhang Y. Clinical outcomes of anti-inflammatory therapies inhibiting the NLRP3/IL-1 β /IL-6/CRP pathway in coronary artery disease patients: a systematic review

and meta-analysis of 37,056 individuals from 32 randomized trials. *Inflamm Res* 2025;74(1):99.

14. Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P i sur. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J* 2014;35(9):578-89.
15. Hulthe J, McPheat W, Samnegård A, Tornvall P, Hamsten A, Eriksson P. Plasma interleukin (IL)-18 concentrations is elevated in patients with previous myocardial infarction and related to severity of coronary atherosclerosis independently of C-reactive protein and IL-6. *Atherosclerosis* 2006; 188(2):450-4.
16. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H i sur. Systematic characterization of human CD8⁺ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8⁺ T cells. *Immunology* 2001; 103(3):281-90.
17. Nathan N, Preux PM, Feiss P, Denizot Y. Plasma interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 concentrations and complications after coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000; 14(2):156-60.
18. Thompson SR, Novick D, Stock CJ i sur. Free Interleukin (IL)-18 levels, and the impact of IL18 and IL18BP genetic variation, in CHD patients and healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12):2743-9.
19. Venkatachalam K, Prabhu SD, Reddy VS, Boylston WH, Valente AJ, Chandrasekar B. Neutralization of interleukin-18 ameliorates ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *J Biol Chem* 2009; 284(12):7853-65.
20. Kawasaki D, Tsujino T, Morimoto S i sur. Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Coron Artery Dis* 2005;16(7):437-41.
21. Hartford M, Wiklund O, Hultén LM, i sur. Interleukin-18 as a predictor of future events in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(10):2039–46.
22. Koch W, Wolferstetter H, Schatke A, Schömig A, Kastrati A. Interleukin-18 gene variation and risk of acute myocardial infarction. *Cytokine* 2011;56(3):786–91.
23. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21(12):573–83.

24. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126(4):458–65.
25. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633–40.
26. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 2015;15(6):388–400.
27. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, i sur. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med* 2019;216(9):2113–27.
28. Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M. Role of Lipid Accumulation and Inflammation in Atherosclerosis: Focus on Molecular and Cellular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:707529.
29. Khanna S, Garikapati K, Goh DSL i sur. Coronary artery vasculitis: a review of current literature. *BMC Cardiovasc Disord* 2021;21(1):7.
30. Gori T. Coronary Vasculitis. *Biomedicines* 2021; 9(6):622.
31. Hayes SN, Kim ESH, Saw J, i sur. Spontaneous Coronary Artery Dissection: Current State of the Science. *Circulation* 2018;137(19):e523–e57.
32. Singulane CC, Wang S, Watts K i sur. Spontaneous Coronary Artery Dissection (SCAD): Unveiling the Enigma of the Unexpected Coronary Event. *Curr Atheroscler Rep* 2025; 27(1):81.
33. Alihanoglu YI, Kilic ID, Yildiz BS. Non-Atherosclerotic Causes of Acute Coronary Syndrome and Management of The Patients. *Eur J Gen Med* 2013;10(12):22–31.
34. Erceg M, Miler Knežević A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2023. godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ); 2024. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2024/09/Izvjesce_umrli_2023_1.pdf.
35. European Society of Cardiology. Cardiovascular disease disproportionately affects middle-income countries [Internet]. Sophia Antipolis: ESC Press Office; 2024;Aug 27 Dostupno na: <https://www.escardio.org/The-ESC/Press-Office/Press-releases/Cardiovascular-disease-disproportionately-affects-middle-income-countries>.
36. Centers for Disease Control and Prevention. Heart disease facts: data & research [Internet]. Atlanta (GA): CDC; 2024;Oct [pristupljeno 18 stu 2025]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/heart-disease/data-research/facts-stats/index.html>.

37. American Heart Association. Heart disease remains leading cause of death as key health risk factors continue to rise [Internet]. Dallas (TX): AHA Newsroom; 2025;Jan [pristupljeno 18 stu 2025]. Dostupno na: <https://newsroom.heart.org/news/heart-disease-remains-leading-cause-of-death-as-key-health-risk-factors-continue-to-rise>.
38. Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views* 2017;18(3):109-14.
39. StatPearls Authors. Risk Factors for Coronary Artery Disease [Internet]. StatPearls 2025 [pristupljeno 18 stu 2025]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554410/>.
40. Knuuti J, Wijns W, Saraste A i sur. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J* 2020;41(3):407–477.
41. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-43.
42. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A i sur. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2019;40(2):87–165.
43. Fihn SD, Gardin JM, Abrams J i sur. 2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2012;60(24):e44–e164.
44. Kunadian V, Chieffo A, Camici PG i sur. An EAPCI Expert Consensus Document on Ischaemia with Non-Obstructive Coronary Arteries in Collaboration with European Society of Cardiology Working Group on Coronary Pathophysiology & Microcirculation Endorsed by Coronary Vasomotor Disorders International Study Group. *Eur Heart J* 2020; 41(37):3504-20.
45. Ong P, Camici PG, Beltrame JF i sur. Coronary Vasomotion Disorders International Study Group (COVADIS). International standardization of diagnostic criteria for microvascular angina. *Int J Cardiol* 2018;250:16-20.
46. Hayes SN, Kim ESH, Saw J i sur. Spontaneous coronary artery dissection: current state of the science. *Circulation* 2018;137(19):e523–e557.
47. Saw J. Spontaneous coronary artery dissection. *Can J Cardiol* 2013;29(9):1027–33.
48. Adlam D, Alfonso F, Maas A, Vrints C. European Society of Cardiology position paper on spontaneous coronary artery dissection. *Eur Heart J* 2018;39(36):3353–68.

49. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K i sur. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina: summary article. *Circulation* 2003;107(1):149–58.
50. Campeau L. The Canadian Cardiovascular Society grading of angina pectoris revisited 30 years later. *Can J Cardiol* 2002;18(4):371-9.
51. Fox K, Garcia MA, Ardissino D i sur. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary. *Eur Heart J* 2006;27(11):1341–81.
52. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG i sur. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non–ST-elevation acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(24):e139–e228.
53. Collet JP, Thiele H, Barbato E i sur. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2021;42(14):1289–367.
54. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D i sur. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2022;79(17):e263–e421.
55. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS i sur. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Eur Heart J* 2019;40(3):237–69.
56. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ i sur. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2021;143(8):e254-e743.
57. Theofilis P, Antonopoulos AS, Sagris M I sur. Silent Myocardial Ischemia: From Pathophysiology to Diagnosis and Treatment. *Biomedicines* 2024;12(2):259.
58. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A i sur. 2015 ESC Guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and prevention of sudden cardiac death. *Eur Heart J* 2015;36(41):2793–867.
59. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL i sur. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2016;37(29):2315–81.
60. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD i sur. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2013;127(4):e362–e425.

61. Gaudino M, Angelini GD, Antoniadou C i sur. Off-pump coronary artery bypass grafting: 30 years of debate. *J Am Heart Assoc* 2018;7(16):e009934.
62. He L, Tiemuerniyazi X, Chen L i sur. Clinical outcomes of on-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery: a meta-analysis. *Int J Surg* 2024;110(8):5063–70.
63. Lamy A, Devereaux PJ, Prabhakaran D i sur. Off-pump versus on-pump coronary-artery bypass grafting at 30 days. *N Engl J Med* 2012;366(16):1489–97.
64. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2000;69(4):1198-204.
65. Chiari P, Fellahi J-L. Myocardial protection in cardiac surgery: a comprehensive review of current therapies and future cardioprotective strategies. *Front Med (Lausanne)* 2024;11:1424188.
66. Shaeefi S, Mittel A, Loberman D, Ramakrishna H. Off-Pump Versus On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting — A Systematic Review and Analysis of Clinical Outcomes. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2019;33(1):232–44.
67. King N. On vs. off pump coronary artery bypass grafting: the next chapter. *Ann Transl Med* 2017;5(5):116.
68. Shroyer AL, Grover FL, Hattler B, i sur. On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 2009;361(19):1827–37.
69. Chikwe J, Lee T, Itagaki S, Adams DH, Egorova NN. Long-Term Outcomes After Off-Pump Versus On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting by Experienced Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2018;72(13):1478–86.
70. Benedetto U, Puskas J, Kappetein AP, i sur. Off-Pump Versus On-Pump Bypass Surgery for Left Main Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 2019;74(6):729–40.
71. Khan MS, Islam MY, Ahmed MU, Bawany FI, Khan A, Arshad MH. On pump coronary artery bypass graft surgery versus off pump coronary artery bypass graft surgery: a review. *Glob J Health Sci* 2014;6(3):186–93.
72. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL i sur. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2011;124(23):e652–e735.

73. Weymann A, Popov AF, Sabashnikov A i sur. Baseline and postoperative levels of C-reactive protein and interleukins as inflammatory predictors of atrial fibrillation following cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Kardiol Pol* 2018;76(2):440–451.
74. Dinarello CA. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1):11–24.
75. Trøseid M, Seljeflot I, Arnesen H. The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:11.
76. O'Brien LC, Mezzaroma E, Van Tassell BW i sur. Interleukin-18 as a therapeutic target in acute myocardial infarction and heart failure. *Mol Med* 2014; 20(1):221-9.
77. Jia X, Buckley L, Sun C i sur. Association of interleukin-6 and interleukin-18 with cardiovascular disease in older adults: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Eur J Prev Cardiol* 2023;30(16):1731–40.
78. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111(12):1805–12.
79. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003;107(3):363–9.
80. Rimmelé T, Venkataraman R, Madden NJ i sur. Comparison of inflammatory response during on-pump and off-pump coronary artery bypass surgery. *Int J Artif Organs* 2010; 33(3):131-8.
81. Santonocito C, Sanfilippo F, De Locker I i sur. C-Reactive protein kinetics after cardiac surgery: A retrospective multicenter study. *Ann Card Anaesth* 2022;25(4):498-504.
82. Franke A, Lante W, Fackeldey V i sur. Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28(4):569–75.
83. Lu C-C, Wu T-S, Hsu Y-J, i sur. NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *J Leukoc Biol* 2014; 96(6):1119–29.
84. Gaudriot B, Uhel F, Gregoire M i sur. Immune Dysfunction After Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass: Beneficial Effects of Maintaining Mechanical Ventilation. *Shock* 2015;44(3):228-33.

85. Allen ML, Peters MJ, Goldman A i sur. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Critical Care Medicine* 2002; 30(5):p 1140-5.
86. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000;127(2):117–26.
87. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9(5):503-10.
88. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225–74.
89. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:73-91.
90. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):735-47.
91. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):713-25.
92. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R i sur. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(7):640-8.
93. Seghaye MC, Duchateau J, Grabitz RG i sur. Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106(6):978-87.
94. Butler J, Pathi V, Paton RD i sur. Changes in immunologic function and cytokine production after open-heart surgery in children. *Chest* 1996;109(6):1538–47.
95. Ankersmit HJ, Moser B, Zuckermann A i sur. Activation-induced T cell death, and aberrant T cell activation via TNFR1 and CD95-CD95 ligand pathway in stable cardiac transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 2002;128(1):175-80.
96. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T i sur. Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98(4):580-91.
97. Brennan AJ, Chia J, Trapani JA, Voskoboinik I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death Differ* 2010;17(4):607-15.

98. Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007;19(3):301-8.
99. López JA, Susanto O, Jenkins MR i sur. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 2013;121(14):2659–68.
100. Tajima K, Yamamoto F, Kawazoe K i sur. Cardiopulmonary Bypass and Cellular Immunity: Changes in Lymphocyte Subsets and Natural Killer Cell Activity. *Ann Thorac Surg* 1993;55:625-30.
101. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22(4):189-95.
102. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007;454(3):345–359.
103. Suzuki A, Tomita H, Okada H. Form follows function: The endothelial glycocalyx. *Transl Res* 2022; 247:158-67.
104. Villalba N, Baby S, Yuan SY. The endothelial glycocalyx as a double-edged sword in microvascular homeostasis and pathogenesis. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:711003.
105. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007;9:121-67.
106. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit Care* 2019; 17;23(1):16.
107. Arkill KP, Michel CC, Rider EVM i sur. John squire and endothelial glycocalyx structure: an unfinished story. *J Muscle Res Cell Motil* 2023; 44(3):217-23.
108. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AH, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol* 2015; 80(3):389-402.
109. Milusev A, Rieben R, Sorvillo N. The Endothelial Glycocalyx: A Possible Therapeutic Target in Cardiovascular Disorders. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:897087.
110. Karampoor S, Zahednasab H, Farahmand M i sur. A possible pathogenic role of syndecan-1 in the pathogenesis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Int Immunopharmacol* 2021;97:107684.

111. Spiess BD. Heparin: Effects upon the Glycocalyx and Endothelial Cells. *J Extra Corpor Technol* 2017; 49(3):192-7.
112. Dogné S, Flamion B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. *Am J Pathol* 2020;190(4):768-80.
113. Erickson M, Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int* 2012;2012:893947.
114. Goodall KJ, Poon IK, Phipps S, Hulett MD. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One* 2014;9(10):e109596.
115. Passov A, Schramko A, Salminen US, Aittomäki J, Andersson S, Pesonen E. Endothelial glycocalyx during early reperfusion in patients undergoing cardiac surgery. *PLoS One* 2021; 16(5):e0251747.
116. Ferreira G, Taylor A, Mensah SA. Deciphering the triad of endothelial glycocalyx, von Willebrand Factor, and P-selectin in inflammation-induced coagulation. *Front Cell Dev Biol* 2024;12:1372355.
117. Ozawa K, Packwood W, Muller MA i sur. Removal of endothelial surface-associated von villebrand factor suppresses accelerate datherosclerosis after myocardial infarction. *J Transl Med* 2024; 22(1):412.
118. Okhota S, Kozlov S, Avtaeva Y i sur. Platelet Adhesion Mediated by von Willebrand Factor at High Shear Rates Is Associated with Premature Coronary Artery Disease. *Biomedicines* 2023;11(7):1916.
119. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 2008;117(11):1449-59.
120. Dehghani T, Panitch A. Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle. *Open Biol* 2020;10(10):200161.
121. Knežević D, Batičić L, Ćurko-Cofek B i sur. The Effect of Coronary Artery Bypass Surgery on Interleukin-18 Concentration and Biomarkers Related to Vascular Endothelial Glycocalyx Degradation. *Int J Mol Sci* 2025;26(12):5453.
122. Batinac T, Batičić L, Kršek A i sur. Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease: Hyperbaric Oxygen Therapy as an Emerging Therapeutic Modality? *J Cardiovasc Dev Dis* 2024;11(12):408.

123. Ćurko-Cofek B, Jenko M, Taleska Stupica G i sur. The Crucial Triad: Endothelial Glycocalyx, Oxidative Stress, and Inflammation in Cardiac Surgery — Exploring the Molecular Connections. *Int J Mol Sci* 2024;25(20):10891.
124. Knežević D, Ćurko-Cofek B, Batinac T i sur. Endothelial Dysfunction in Patients Undergoing Cardiac Surgery: A Narrative Review and Clinical Implications. *J Cardiovasc Dev Dis* 2023;10(5):213.
125. van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2012;15;52(8):1382-402.
126. Chappell D, Heindl B, Jacob M i sur. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2011;115(3):483–91.
127. Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg* 2011; 254(2):194-200.
128. Bruegger D, Brettner F, Rossberg I i sur. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg* 2015;99(3):926–31.
129. Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2016;24:48.
130. Hu C, Zhang P, Sun C, Mo S, Wang Y. Sulodexide alleviates renal fibrosis following prolonged ischemia-reperfusion injury by protecting vascular endothelial glycocalyx. *Organ Transplantation* 2025;16(3):404-15.
131. Abassi Z, Armaly Z, Heyman SN. Glycocalyx Degradation in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2020;190:752-67.
132. Pölzl L, Engler C, Sterzinger P i sur. Association of high-sensitivity cardiac troponin T with 30-day and 5-year mortality after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2023;82:1301–12.
133. Thio MSY, Noordzij PG, Klingenberg JH i sur. The prognostic value of postoperative cardiac troponin I and T for major adverse cardiac events after coronary artery bypass grafting: a systematic review. *BJA Open* 2025;15:100484.

134. Omar AS, Sudarsanan S, Hanoura S i sur. Kinetics of highly sensitive troponin T after cardiac surgery. *Biomed Res Int* 2015;2015:574546.
135. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L i sur. Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012;56(1):30-8.
136. Carrier M, Pelletier LC, Martineau R, Pellerin M, Solymoss BC. In elective coronary artery bypass grafting, preoperative troponin T level predicts the risk of myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115(6):1328-34.
137. Kathiresan S, Servoss SJ, Newell JB i sur. Cardiac troponin T elevation after coronary artery bypass grafting is associated with increased one-year mortality. *Am J Cardiol* 2004;94(7):879–81.
138. Devereaux PJ, Sessler DI, Leslie K i sur. High-sensitivity cardiac troponin I after cardiac surgery and 30-day mortality. *N Engl J Med* 2022;386(8):752–63.
139. Moon MH, Song H, Wang YP, Jo KH, Kim CK, Cho KD. Changes of cardiac troponin I and operative mortality of coronary artery bypass. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2014; 22(1):40-5.
140. Brown JR, Hernandez F Jr, Klemperer JD i sur. Long-term survival and cardiac troponin T elevation in on- and off-pump coronary artery bypass surgery. *Heart Surg Forum* 2008;11(3):E163-8.
141. Adabag AS, Rector T, Mithani S i sur. Prognostic significance of elevated cardiac troponin I after heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2007; 83(5):1744-50.
142. Heuts S, Denessen EJS, Daemen JHT i sur. Meta-Analysis Evaluating High-Sensitivity Cardiac Troponin T Kinetics after Coronary Artery Bypass Grafting in Relation to the Current Definitions of Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 2022;163:25-31.
143. Nellipudi J. Troponin T after cardiac surgery: what is normal? A review of the literature. *Int J Med Biomed Stud* 2021;5(11):114–19.
144. Heuts S, Gollmann-Tepeköylü C, Denessen EJS i sur. Cardiac troponin release following coronary artery bypass grafting: mechanisms and clinical implications. *Eur Heart J* 2023; 44(2):100-12.
145. Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J i sur. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of

- 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006; 27(3):330-7.
146. Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Head-to-head comparison of the diagnostic utility of BNP and NT-proBNP in symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clin Chim Acta* 2004;341(1-2):41-8.
 147. McKie PM, Burnett JC Jr. NT-proBNP: The Gold Standard Biomarker in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2016;68(22):2437-9.
 148. Kellett J, Cleland JG, Cannon J i sur. NT-proBNP in perioperative risk assessment in cardiac surgery. *Eur Heart J* 2013;34:1394–402.
 149. Schmidt G, Frieling N, Schneck E i sur. Preoperative routine measurement of NT-proBNP predicts postoperative morbidity after non-cardiac surgery with intermediate or high surgical risk: an observational study. *BMC Anesthesiol* 2024;24(1):113.
 150. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003;362(9380):316-22.
 151. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG i sur. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998;97(19):1921-9.
 152. Bettencourt P, Azevedo A, Pimenta J, Friões F, Ferreira S, Ferreira A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. *Circulation* 2004;110(15):2168-74.
 153. Malachias MVB, Wijkman MO, Bertoluci MC. NT-proBNP as a predictor of death and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2022;14(1):64.
 154. Masson S, Latini R, Anand IS i sur. Prognostic value of changes in N-terminal pro-brain natriuretic peptide in Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial). *J Am Coll Cardiol* 2008;52(12):997-1003.
 155. Apple FS, Collinson PO; IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem* 2012;(1):54-61.
 156. Cowie MR, Struthers AD, Wood DA i sur. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* 1997;350(9088):1349-53.

157. McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrandt P, Dargie HJ. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail* 2004;6(3):269-73.
158. Goetze JP, Christoffersen C, Perko M i sur. Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J* 2003;17(9):1105-7.
159. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM i sur. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161–7.
160. Abraham AS, Elliott CW, Abraham MS, Ahuja S. Intra-operative anesthetic induced myocardial protection during cardiothoracic surgery: a literature review. *J Thorac Dis* 2023;15(12):7042-9.
161. Squicciarino E, Stasi A, Lorusso R, Paparella D. Narrative review of the systemic inflammatory reaction to cardiac surgery and cardiopulmonary bypass. *Artif Organs* 2022;46(4):568-77.
162. Fatehi Hassanabad A, Schoettler FI, Kent WDT i sur. Cardiac surgery elicits pericardial inflammatory responses that are distinct compared with postcardiopulmonary bypass systemic inflammation. *JTCVS Open* 2023;16:389-400.
163. Kumrić M, Kurir TT, Borovac JA, Božić J. The Role of Natural Killer (NK) Cells in Acute Coronary Syndrome: A Comprehensive Review. *Biomolecules* 2020;10(11):1514.
164. Pfeiler S, Winkels H, Kelm M, Gerdes N. IL-1 family cytokines in cardiovascular disease. *Cytokine* 2019;122:154-215.
165. Parolari A, Poggio P, Myasoedova V i sur. Biomarkers in Coronary Artery Bypass Surgery: Ready for Prime Time and Outcome Prediction? *Front Cardiovasc Med* 2016;2:39.
166. Zhao G, Zhang H, Zhu S i sur. Interleukin-18 accelerates cardiac inflammation and dysfunction during ischemia/reperfusion injury by transcriptional activation of CXCL16. *Cell Signal* 2021;87:110-41.
167. Åkerblom A, James SK, Lakic TG, Becker RC, Cannon CP, Steg PG, Himmelmann A, Katus HA, Storey RF, Wallentin L, Weaver WD, Siegbahn A; PLATO Investigators. Interleukin-18 in patients with acute coronary syndromes. *Clin Cardiol* 2019;42(12):1202-9.
168. Wang M, Tan J, Wang Y, Meldrum KK, Dinarello CA, Meldrum DR. IL-18 binding protein-expressing mesenchymal stem cells improve myocardial protection after ischemia or infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(41):17499-504.

169. Lurati Buse GA, Koller MT, Grapow M, Bolliger D, Seeberger M, Filipovic M. The prognostic value of troponin release after adult cardiac surgery—A meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:399–406.
170. Paparella D, Guida P, Caparrotti S i sur. Myocardial damage influences short- and mid-term survival after valve surgery: A prospective multicenter study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:2373–9.
171. Domanski MJ, Mahaffey K, Hasselblad V i sur. Association of myocardial enzyme elevation and survival following coronary artery bypass graft surgery. *JAMA* 2011;305:585–91.
172. Jin J, Fang F, Gao W i sur. The Structure and Function of the Glycocalyx and Its Connection With Blood-Brain Barrier. *Front Cell Neurosci* 2021;15:739699.
173. Kozlov S, Okhota S, Avtaeva Y, Melnikov I, Matroze E, Gabbasov Z. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:1038030.
174. Lo B, Nierich AP, Kalkman CJ, Fijnheer R. Relatively increased von Willebrand factor activity after off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Thromb Haemost* 2007;97(1):21-6.

Popis pokrata

ACCF – engl. American College of Cardiology Foundation

AHA – engl. American heart association

AIM - Akutni Infarkt Miokarda

ALB – albumin

AP - Angina Pektoris

ATP – adenzin trifosfat

BM – bazalna membrana

BMI - engl. body mass index

BSA - engl. bovine serum albumine

CABG - engl. coronary artery bypass grafting

CCS - engl. Canadian Cardiovascular Society

CFR - engl. coronary flow reserve

CHS – engl. chondroitin sulphate

CRP - C Reaktivni Protein

cTn – koncentracija troponina

Cy-PE5 – eng. Cy-chrome phycoerythrin

DKT – diastolički krvni tlak

EDTA - Ethilen-Diamin-Tetra-Acetat

ED – endotelna disfunkcija

EF – ežekcijska frakcija

EG – endotelni glikokaliks

EKG - elektrokardiogram

ELISA - engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESC - engl. European Society of Cardiology

ESL – površni sloj endotela (engl. endothelial surface layer)

FITC – eng. fluorescein isothiocyanate

GLYP1 – glipikan 1 (engl. glypican 1)
GP - glikoprotein
HDL - engl. high density lipoprotein
HS – heparan sulfat
IFN γ - interferon-gama
IL- interleukin
IM – infarkt miokarda
IRI – engl. ischemia–reperfusion injury
IVUS - engl. intravascular ultrasound
JIL – jedinica intenzivnog liječenja
KBC - Klinički bolnički centar
LDL - engl. Low Density Lipoprotein
MAP - engl. Mean Arterial Pressure
NK - engl. natural killer
NKT – engl. natural killer T cells
NO - engl. nitrous oxide
NTpro-BNP – N-terminalni fragment prohormona natriuretskog peptida tipa B
OCT - engl. optical coherence tomography
ORM – orosomukoid
PCI - engl. percutaneous coronary intervention
PE – eng. phycoerithryn
PDGF - engl. platelet derived growth factor
PKC – protein kinaza C
PKI – perkutana koronarna intervencija
ROS - engl. reactive oxygen species
SA – engl. sialic acid
SCAD - engl. spontaneous coronary artery dissection
SKT - sistolički krvni tlak

SVT - središnji venski tlak

SYN1 – sindekan 1 (engl. syndecan 1)

TNF- α - engl. tumor necrosis factor alpha

VEC – stanica vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial cell)

VWF – von Willebrand faktor

Prilozi

Tablica 1. Klasifikacija težine angine prema Kanadskom društvu za kardiovaskularne bolesti (CCS, engl. Canadian Cardiovascular Society)

Tablica 2. Kemikalije korištene u izvođenju pokusa

Tablica 3. Mediji i puferi korišteni u izvođenju pokusa

Tablica 4. Laboratorijski materijal korišten u izvođenju pokusa

Tablica 5. Protutijela korištena u istraživanju

Tablica 6. Imunoenzimski kitovi korišteni u istraživanju

Tablica 7. Uređaji korišteni u izvođenju pokusa

Tablica 8. Demografski i klinički podatci

Tablica 9. Klinički podaci bolesnika Skupine 1 i Skupine 2

Tablica 10. Korelacije između koncentracije IL-18, broja leukocita, koncentracije CRP, cTn te NTproBNP u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Tablica 11. Korelacije između koncentracije IL-18 i raspadnih produkata endotelnog glikokaliksa (sindekana – 1, hijaluronske kiseline i sindekana – 4) te između koncentracije IL-18 i koncentracije von Willebrand faktora u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Tablica 12. Korelacije između koncentracije IL-18 i udjela stanica NK, njihovih subpopulacija stanica NK^{dim} i stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Tablica 13. korelacije između koncentracije IL-18 i udjela perforin pozitivnih stanica NK, subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{dim} i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NK^{bright} u perifernoj krvi bolesnika Skupine 1 i u Skupine 2 neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 1. Shematski prikaz osnovne strukture endotelnog glikokaliksa u normalnim uvjetima.

Slika 2. Usporedba koncentracije troponina (cTn) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 3. Usporedba koncentracije N – terminalnog pro – B – natriuretskog peptida (NTproBNP) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 4. Usporedba apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 5. Usporedba koncentracije C reaktivnog proteina (CRP) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 6. Usporedba koncentracije Interleukina 18 (IL-18) perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 7. Usporedba koncentracije interleukina 18 (IL-18) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije.

Slika 8. Usporedba koncentracije sindekana – 1 (A), hijaluronske kiseline (B) i sindekana – 4 (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 9. Usporedba koncentracije sindekana – 1 (A), hijaluronske kiseline (B) i sindekana – 4 (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije.

Slika 10. Usporedba koncentracije von Willebrandt faktora u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 11. Usporedba koncentracije von Willebrand faktora u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije.

Slika 12. Usporedba udjela stanica NK (A), subpopulacije stanica NKdim (B) i subpopulacije stanica NKbright (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 13. Usporedba udjela stanica NK (A), subpopulacije stanica NKdim (B) i subpopulacije stanica NKbright (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije.

Slika 14. Usporedba udjela perforin pozitivnih stanica NK (A), subpopulacije perforin pozitivnih stanica NKdim (B) i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NKbright (C) u perifernoj krvi između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) neposredno prije operacije (T1), 24 sata (T2) i 72 sata (T3) nakon operacije.

Slika 15. Usporedba udjela perforin pozitivnih stanica NK (A), subpopulacije perforin pozitivnih stanica NKdim (B) i subpopulacije perforin pozitivnih stanica NKbright (C) u uzorcima krvi iz koronarnog sinusa i bulbusa aorte između bolesnika Skupine 1 (□) i Skupine 2 (■) tijekom operacije.

Slika 16. Sažetak rezultata istraživanja i njihovog utjecaja na ishode liječenja bolesnika nakon kirurške revaskularizacije miokarda. Kardiokirurški zahvat dovodi do pojačanog upalnog odgovora koji potiče razgradnju endotelnog glikokaliksa. Intenzivniji upalni odgovor dovodi do veće razgradnje endotelnog glikokaliksa, što posljedično potiče ishemijsko – reperfuzijsku ozljedu. Ishemijsko- reperfuzijska ozljeda povećava razvoj poslijeoperacijskih komplikacija te produljuje vrijeme oporavka i smanjuje vjerojatnost pozitivnog ishoda.

CRP – C-reaktivni protein, cTn – srčani troponin, EG – endotelni glikokaliks, IL – interleukin, Lkc – leukociti, IRI – ishemijsko-reperfuzijska ozljeda.

Životopis

Ime i prezime:

Danijel Knežević

Datum rođenja: 17/07/1988

Mjesto rođenja: Karlovac, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Spol: Muško

E-adresa: danijel.knezevic2@uniri.hr

Adresa: Braće Brancheta 20, 51000, Rijeka, Hrvatska (Službena)

RADNO ISKUSTVO:

Asistent pri katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje – 2014 – trenutačno
– Medicinski fakultet Rijeka

Asistent na zavodu za fiziologiju i patofiziologiju – 2014 – 2018 - Medicinski fakultet Rijeka

Specijalizant anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja – 2014 – 2021 - KBC Rijeka

Specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja – 2021 – trenutačno – KBC
Rijeka

JEZIČNE VJEŠTINE:

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

Drugi jezici: ENGLESKI, NJEMAČKI

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:

1995 – 2003 Karlovac, Hrvatska - Osnovna škola „Braća Seljan”

2003 – 2007 Karlovac, Hrvatska - Gimnazija Karlovac

2007 – 2013 Rijeka, Hrvatska - Medicinski fakultet Rijeka - DOKTOR MEDICINE

2014 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska - Medicinski fakultet Rijeka – Poslijediplomski
doktorski studij Biomedicina

KONFERENCIJE I SEMINARI:

02/06/2016 – 04/06/2016 Zadar, Hrvatska - European-American Anesthesia Conference

25/04/2024 - 27/04/2024 Trakošćan, Hrvatska - XIII. HRVATSKO-EUROPSKO-AMERIČKA ANESTEZIOLOŠKA KONFERENCIJA - Dexmedetomidine use in pediatric anesthesia on otorhinolaryngology surgical cases

14/06/2019 – 15/06/2019 Zagreb, Hrvatska 7th Croatian Congress on Regional Anaesthesia and Analgesia with International Participation - Bilateral intermediate cervical block with general anesthesia for right sided thyroid lobectomy, a case report

MREŽE I ČLANSTVA:

2014 – TRENUTAČNO Hrvatska liječnička komora

2016 – TRENUTAČNO Europsko reanimatološko društvo

2018 – TRENUTAČNO Hrvatski liječnički zbor

2023 – TRENUTAČNO Hrvatsko društvo za ultrazvukom vođenu regionalnu anesteziju Hrvatskog liječničkog zbora

TEČAJEVI:

Instruktor naprednog održavanja života – ERC (engl. European resuscitation council)

Instruktor - Ultrazvukom vođena regionalna anestezija

Instruktorski kandidat – ETC (engl. European trauma course)

Polaznik - FATE (engl. Focus Assessed Transthoracic Echocardiography)

Polaznik - engl. Teaching Professionals to Teach (TP2T)

Polaznik - Moderna i praktična medicinska edukacija

Polaznik - Engleski kao jezik visokoškolske nastave u medicini (EJVINMed)

PROJEKTI:

2019 – TRENUTAČNO - Karakterizacija endotelne disfunkcije i uloga IL-18 u razvoju ishemijsko-reperfuzijske ozljede nakon kirurške revaskularizacije miokarda - Suradnik na projektu.

PUBLIKACIJE:

2015 - Utvrđivanje komorbiditeta i serumske koncentracije srčanih biomarkera u pacijenata s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti liječenih invazivnom ili neinvazivnom ventilacijom
Autori: Pal, Sven; Knežević, Danijel; Kuharić, Janja; Šustić, Alan; Sotošek Tokmadžić, Vlatka; Harjač, Antonija; Marčun, Robert; Lainščak, Mitja | Ime časopisa: Medicina Fluminensis

2017 - Endothelial dysfunction mediated by interleukin-18 in patients with ischemic heart disease undergoing coronary artery bypass grafting surgery
Autori: Jadranko, Sokolic; Tokmadzic, Vlatka Sotosek; Danijel, Knezevic; Igor, Medved; Nada, Vukelic Damjani; Sanja, Balen; Marijana, Rakic; Ana, Lanca Bastiancic; Gordana, Laskarin
Ime časopisa: Medical hypotheses

2017 – Frequency and perforin expression of different lymphocyte subpopulations in patients with lower limb fracture and thoracic injury
Autori: Grzalja, Nikola; Cicvaric, Tedi; Knezevic, Danijel; Kuharic, Janja; Sustic, Alan; Bakota, Bore; Komen, Simona; Tokmadzic, Vlatka Sotosek
Ime časopisa: Injury

2019 - Decrease of Perforin Expressing Lymphocytes after On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting Surgery Irrespective of Carbohydrate Preoperative Oral Feeding
Autori: Sokolic, Jadranko; Knezevic, Danijel; Kuharic, Janja; Medved, Igor; Sustic, Alan; Zupan, Zeljko; Laskarin, Gordana; Tadin, Tomislav; Sotošek, Tokmadžić V
Ime časopisa: The heart surgery forum

2023 - Endothelial Dysfunction in Patients Undergoing Cardiac Surgery: A Narrative Review and Clinical Implications
Autori: Knežević D, Ćurko-Cofek B, Batinac T, Laškarin G, Rakić M, Šoštarić M, Zdravković M, Šustić A, Sotošek V, Batičić L.
Ime časopisa: Journal of Cardiovascular Development and Disease

2024 - The Crucial Triad: Endothelial Glycocalyx, Oxidative Stress, and Inflammation in Cardiac Surgery-Exploring the Molecular Connections.

Autori: Ćurko-Cofek B, Jenko M, Taleska Stupica G, Batićić L, Krsek A, Batinac T, Ljubačev A, Zdravković M, Knežević D, Šoštarić M, Sotošek V.

Ime časopisa: International Journal of Molecular Sciences

2024 - Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease: Hyperbaric Oxygen Therapy as an Emerging Therapeutic Modality?

Autori: Batinac T, Batićić L, Kršek A, Knežević D, Marcucci E, Sotošek V, Ćurko-Cofek B

Ime časopisa: Journal of Cardiovascular Development and Disease

2025 - The Effect of Coronary Artery Bypass Surgery on Interleukin-18 Concentration and Biomarkers Related to Vascular Endothelial Glycocalyx Degradation

Autori: Danijel Knežević, Lara Batićić, Božena Ćurko-Cofek, Lara Valenčić Seršić, Gordana Laškarin, Marko Zdravković, Tanja Batinac, Aleksandra Ljubačev, Maja Šoštarić, Vlatka Sotošek

Ime časopisa: International Journal of Molecular Sciences